

MORFOMETRIA AMASTIGOTICA Y DESARROLLO DE CUATRO AISLADOS DE *LEISHMANIA MEXICANA PIFANOI* DE VENEZUELA EN *LUTZOMYIA TOWNSENDI*

J.V. SCORZA*
O. DELGADO**

Utilizando parámetros biométricos de la fase amastigota y el tipo de desarrollo de los parásitos en el flebótomo Lutzomyia townsendi, se han estudiado cuatro aislados de Leishmania obtenidos de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa, comparándolos con otros aislados de L. mexicana mexicana y L. braziliensis. Los resultados muestran una estrecha semejanza entre los cuatro aislados de pacientes anérgicos y la L. mexicana mexicana y sugieren que el nombre de L. mexicana pifanoi no parece sostenible; los cuatro aislados, por el contrario, podrían identificarse como L. mexicana amazonensis.

Al cuadro clínico de la leishmania difusa, anérgica o lepromatoide se le ha atribuido un particular agente etiológico. Medina & Romero (1962) lo denominaron *Leishmania pifanoi*. Zuckerman & Lainson (1977), tomando en cuenta el tipo de desarrollo del parásito en el hamster y en los medios de cultivo, lo identificaron como *L. mexicana pifanoi*. Según Gardener, Change & Peters (1974) el análisis isoenzimático de un aislado similar (LV 105) obtenido de un caso de leishmaniasis lepromatoide, permitió ubicarlo dentro de la variante I para la deshidrogenasa málica, similar a la *L. mexicana mexicana*, aislada de *Oryzomys capito*, y diferente de los parásitos incluidos en la variante III para la misma enzima, que incluyó cepas de *L. mexicana amazonensis* aisladas de *Proechimys* sp. en Brasil. Un estudio más reciente de Miles et al (1979) sobre propiedades electroforéticas de 18 enzimas reveló algunas diferencias entre *L. mexicana pifanoi*, *L. m. mexicana* y *L. m. amazonensis*, diferencias que no permitieron la elaboración de un juicio taxonómico definitivo.

La inoculación de parásitos aislados de un cuadro clínico de leishmaniasis difusa en tres voluntarios, produjo lesiones cutáneas simples que cedieron al tratamiento convencional (Convit, Pinardi & Rondon, 1972).

Este trabajo fue realizado con subsidios del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de los Andes, Venezuela y del Componente Leishmaniasis del Programa para el Desarrollo de las Naciones Unidas/Banco Mundial/OMS. Programa Especial para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales.

* Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

** Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

Recebido para publicação em 8 de dezembro de 1981 e aceito em 18 de março de 1982.

Cuando se estudió la infectividad de *L. braziliensis* para flebótomos, Coelho, Falcão & Falcão (1967) utilizaron dos aislados de leishmania, uno de los cuales procedía de un caso crónico de leishmaniasis difusa nodular (Muestra N° 4). Su desarrollo en por lo menos cuatro especies de flebótomos dió un tipo de evolución predominantemente anterior, lo cual sugiere que ese aislado N° 4 se ubicaría dentro del grupo "mexicana".

En este trabajo se describe el desarrollo de cuatro aislados de *Leishmania* obtenidos de pacientes con leishmaniasis difusa anérgica, en *Lu. townsendi*, comparándolos con el desarrollo de *L. mexicana mexicana* y de *L. braziliensis* en el mismo flebótomo. Se pretende ubicarlos en uno de los dos complejos establecidos por Lainson, Ward & Shaw (1977). Adicionalmente, comparamos la morfometría de los amastigotos de esos cuatro aislados, con la de los amastigotos de especies con desarrollo conocido, utilizando los parámetros que Shaw & Lainson (1976) emplearon para diferenciar las especies de los dos complejos.

PARASITOS, VECTORES Y METODOS

1 – *Parásitos*. Utilizamos cuatro aislados de *Leishmania mexicana pifanoi* obtenidos de pacientes con cuadro de leishmaniasis difusa del tipo anérgico, que han sido previamente estudiados por Delgado et al (1981).

Aislado MF, de un paciente de 53 años, procedente de Camatagua, Edo. Aragua (Fig. 1) con una lesión ulcerada en la cara lateral externa de la nariz (Fig. 2); la inoculación de material clínico en el hamster produjo una enorme hipertrofia tarsal con ulceración tardía (Fig. 3).

Aislado JC, de un paciente de 36 años procedente de Charallave, Edo. Aragua (Fig. 1), con pápulas en la región interiliar (Fig. 4). La inoculación de material clínico en el hamster produjo también una gran hipertrofia tarsal (Fig. 5).

Aislado AV, de un paciente de 18 años, procedente de Puerto La Cruz, Edo. Anzóategui (Fig. 1), con crónicas lesiones en la cara y las extremidades (Fig. 6). La inoculación de material clínico en las patas de hamsteres produjo también una lesión tumoral grande con ulceración tardía (Fig. 7).

Aislado C, de una paciente de 70 años procedente de Carúpano, Edo. Sucre (Fig. 1), presentó un cuadro de leishmaniasis difusa con 14 años de evolución (Fig. 8). La inoculación de material biopsico en el hamster produjo una lesión hipertrófica moderada (Fig. 9).

Como controles con conocido desarrollo en los flebótomos, incluimos otros dos aislados:

L.m. Oc. *Leishmania mexicana mexicana* aislada por Herrer, Telford & Christensen (1971) de *Oryzomys capito* en Panamá, correspondiente a LV41 17 46 de Liverpool, que inoculada en el hamster produce lesiones hipertróficas y metástasis (Fig. 10).

JFT, *Leishmania braziliensis*, aislada de una lesión cutánea en el Estado Trujillo, Venezuela. Inoculado en el hamster el parásito produce pequeñas lesiones con ulceración precoz (Fig. 11).

2 – *Morfometría de los parásitos*. Se hicieron improntas de las lesiones de los hamsteres con los parásitos JC, AV, MF, C, JFT y LmOc., que fueron fijadas con metanol y se colorearon con Giemsa al 5% en tampón de fosfato M/200 a pH 7,2 durante una hora. Se fotografiaron los amastigotos a 1200X para ampliarlos a la misma escala. Se midieron con un calibrador, para precisar su longitud y su anchura total, el índice nuclear y el índice cinetoplástico, en no menos de 30 amastigotos.

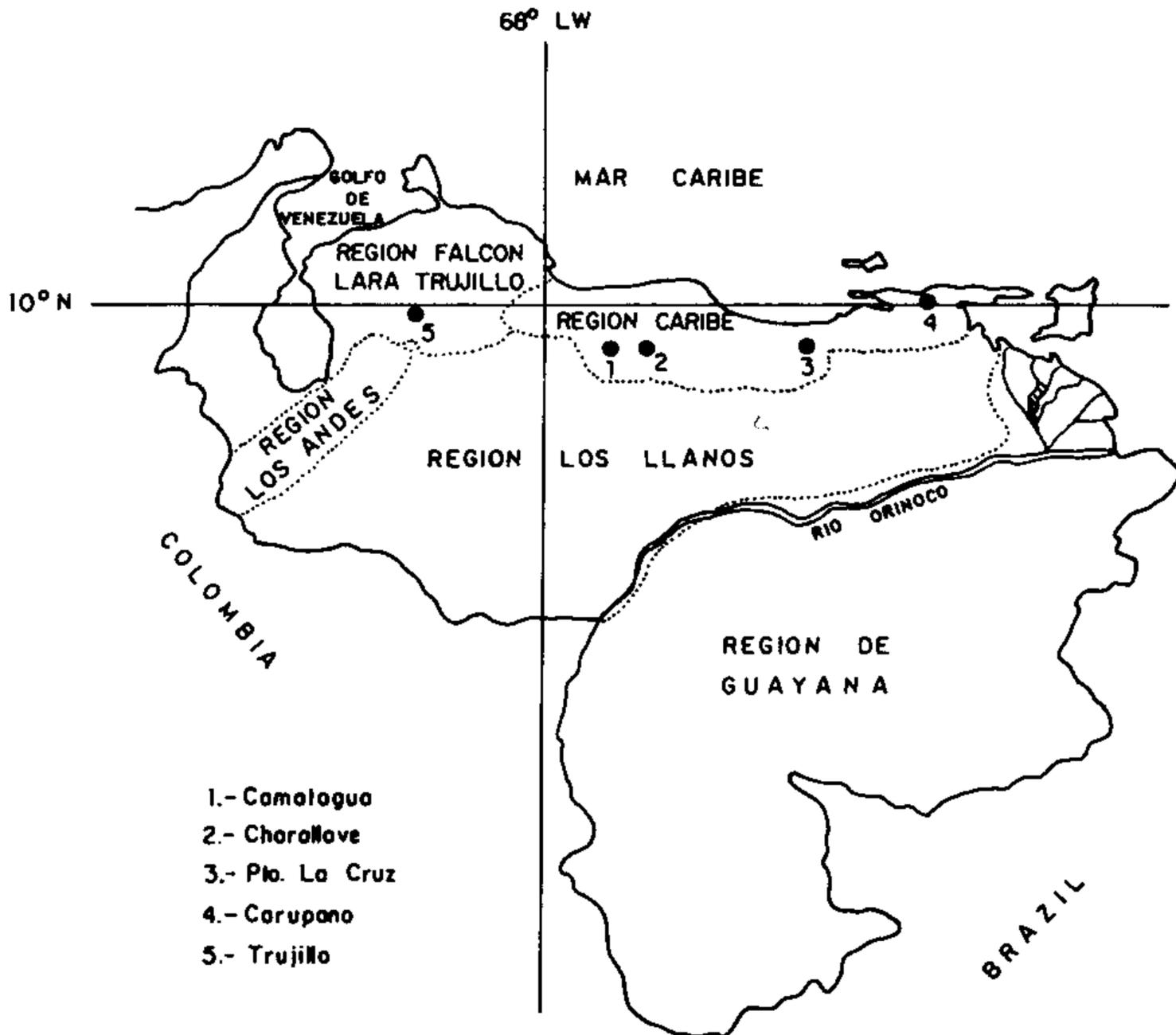


Fig. 1 – Proccendencia de los aislados de *Leishmania mexicana amazonensis* en la Region Caribe en Venezuela.

3 – *Desarrollo en el flebótomo* *Lutzomyia townsendi*. *Lu. townsendi* (Ortiz, 1959) es un Phlebotominae antropofílico y fototático muy abundante en los Andes de Venezuela, por encima de los 800 m.s.n.m. Hembras silvestres de esta especie fueron capturadas en una localidad no endémica del Edo. Trujillo a 1.350 m.s.n.m. y se confinaron en envases cilíndricos (Fig. 12) revestidos interiormente con lámina de corcho. Los insectos fueron ingurgitados, en lotes de 30 ejemplares, introduciendo la pata lesionada del hamster anestesiado a través del orificio inferior del envase. En la oscuridad casi todos los insectos se ingurgitaron y fueron mantenidos durante otros cinco días con solución de sacarosa al 50% en un trozo de esponja plástica colocada sobre la malla de nylon que cubre

la parte superior del envase. Los envases fueron incubados a 22°C y 80% HR dentro de cavas de plástico isoporoso opaco. Al quinto día, se disecó a las hembras ovígeras y se precisó el tipo de desarrollo de los parásitos.

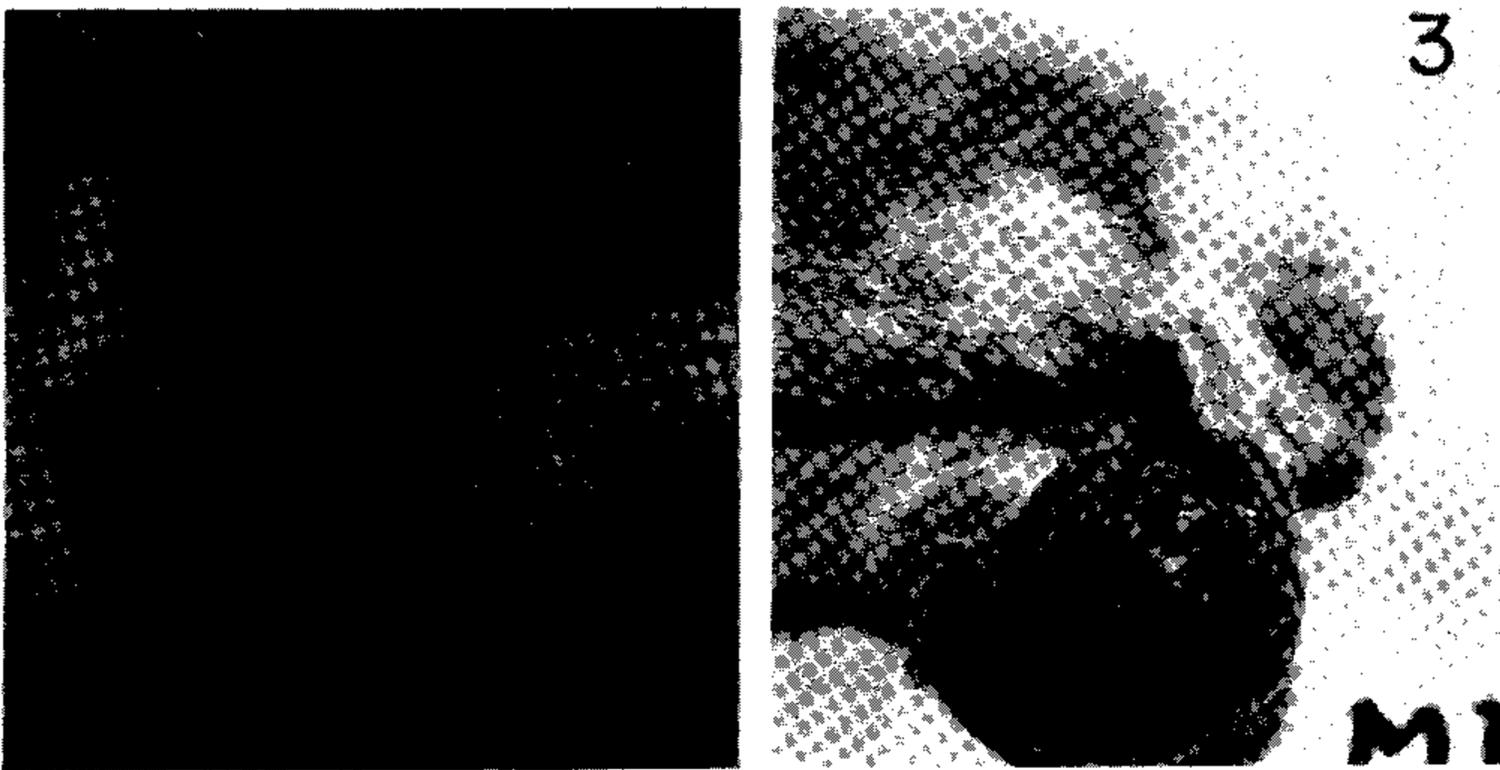


Fig. 2 – Lesión nasal ulcerosa del paciente MF, anérgico.

Fig. 3 – Hipertrofia tarsal en hamster inoculado con amastigotos de *Leishmania* sp. del paciente MF.

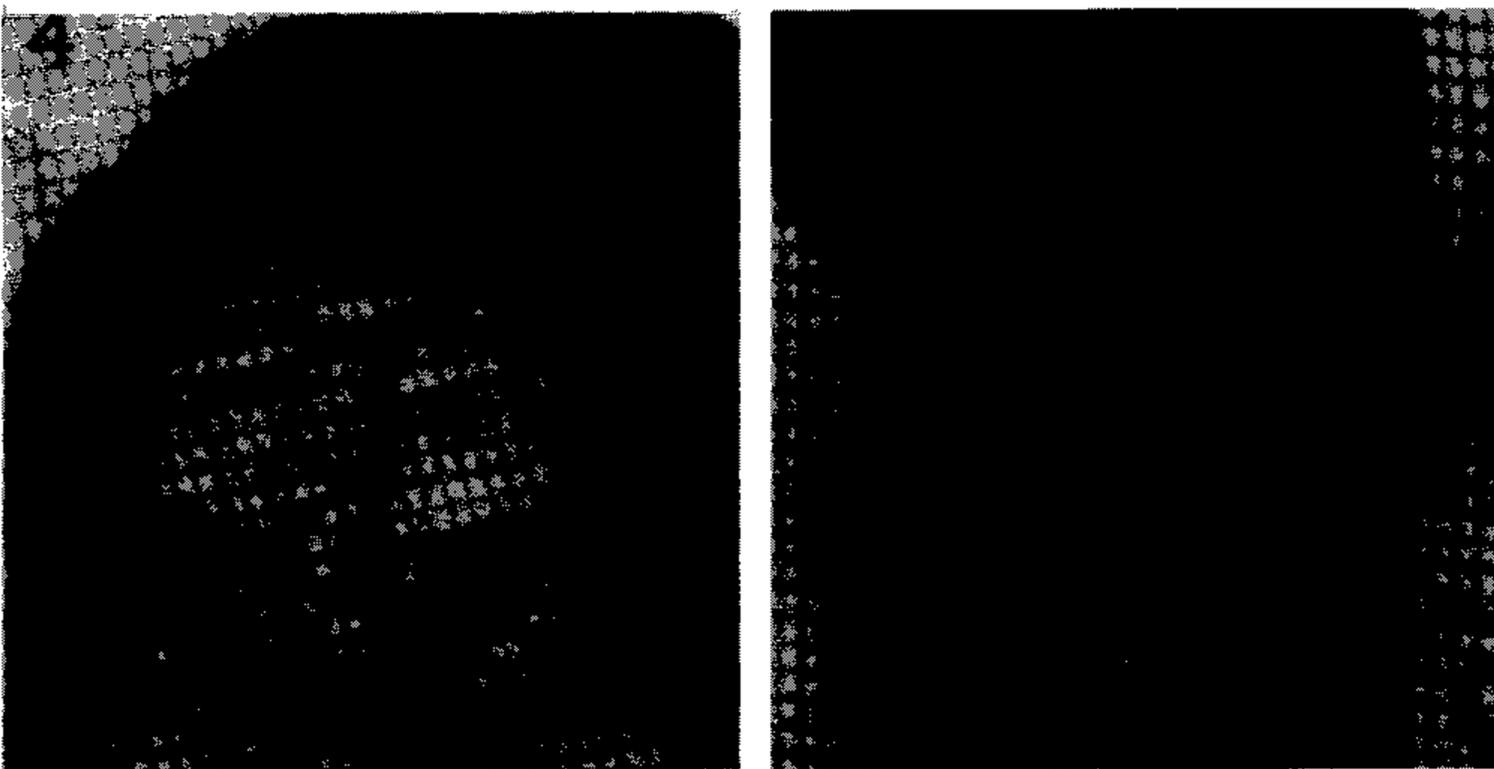


Fig. 4 – Lesión papular interciliar del paciente anérgico JC.

Fig. 5 – Hipertrofia tarsal de hamster infectado con amastigotos de *Leishmania* sp. del paciente JC.

RESULTADOS

1 – *Morfometría de los amastigotos.* Los resultados de las medidas de no menos de 30 amastigotos provenientes de hamsteres inoculados con parásitos de los casos en estudio, se presentan en el Cuadro I. Cinco de los seis aislados, con excepción del JFT, poseen amastigotos “grandes” con más de 3.75 nm de longitud y más de 2.45 nm de an-

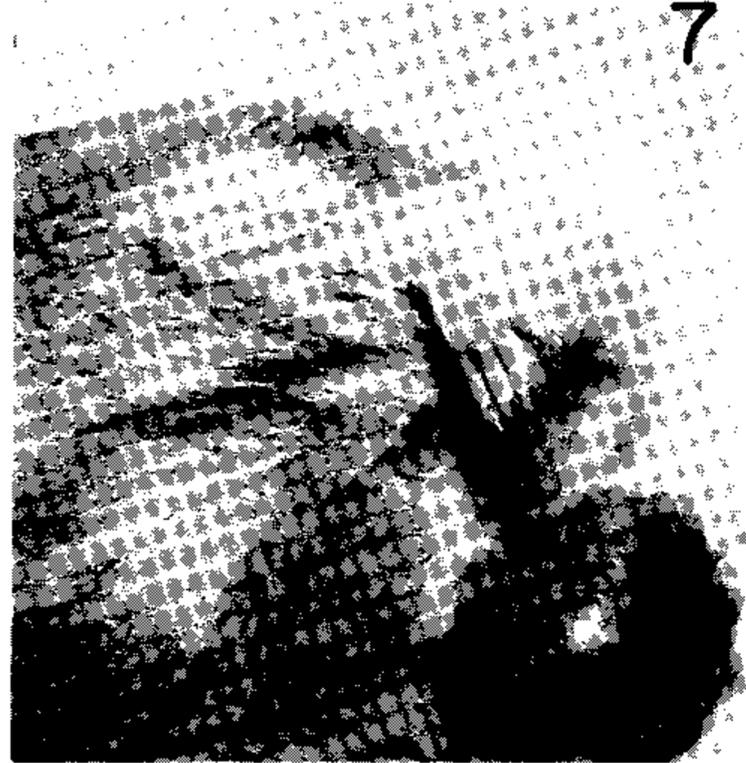


Fig. 6 – Ulcera en la comisura nasolabial del paciente anérgico AV.

Fig. 7 – Hipertrofia tarsal de hamster infectado con amastigotos de *Leishmania* sp del paciente AV.

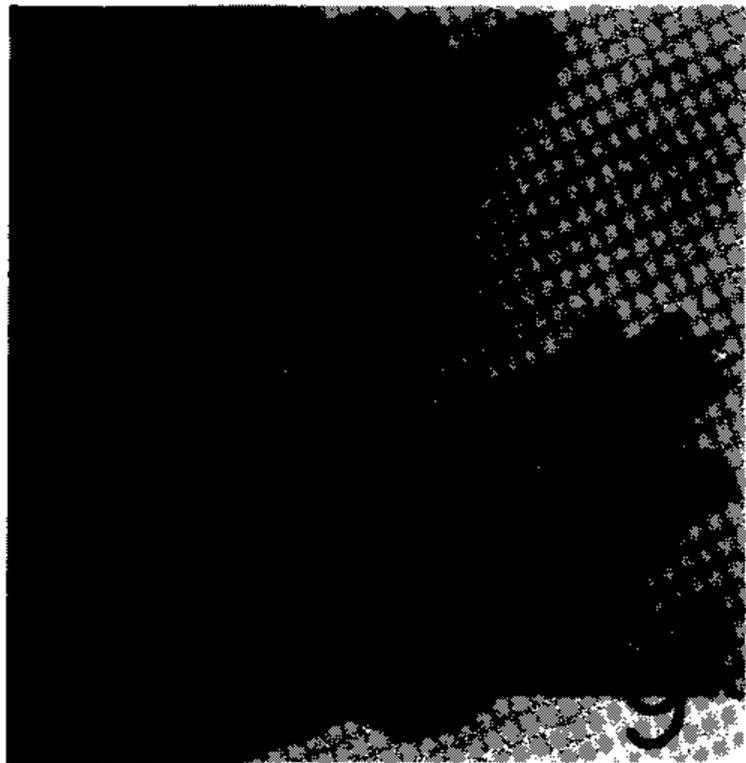


Fig. 8 – Lesión nodular de la paciente C.

Fig. 9 – Hipertrofia tarsal moderada en hamster infectado con amastigotos de *Leishmania* sp. de la paciente C.

chura. No se aprecian diferencias entre los índices nucleares aunque sí entre los índices cinetoplásticos. Los parásitos de JFT poseen cinetoplastos muy próximos al núcleo o bien paranucleares con índices de 0.63 en tanto que los otros muestran cinetoplastos antenucleares con índices casi iguales a la unidad que, comparados con los índices nucleares del aislado JFT de *L. braziliensis*, muestran claramente la posición anterior de sus cinetoplastos.

2 – *Desarrollo de los distintos aislados de Leishmania spp. en Lu. townsendi.* *L. mexicana mexicana*, a los cinco días después de la ingurgitación, se desarrolló en 21 de 27 flebótomos que picaron (77,8%). En 19 de 21 flebótomos positivos se encontraron

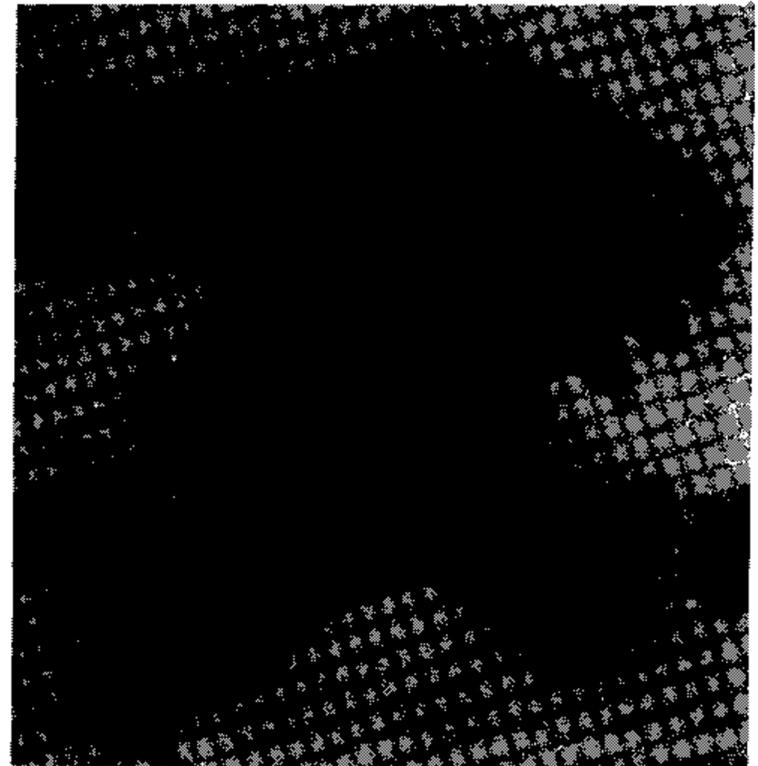
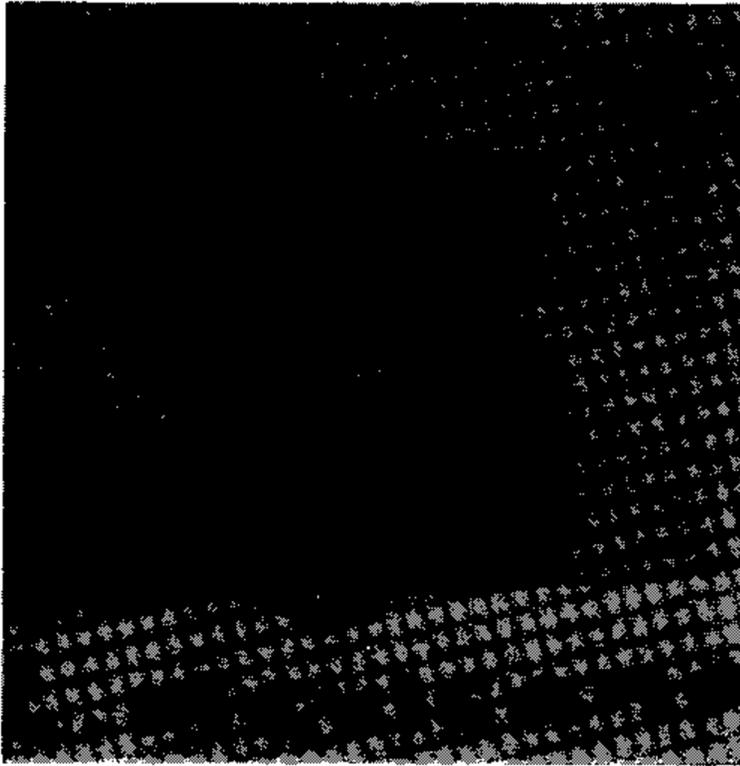


Fig. 10 – Lesiones tarsales y metástasis en un hamster infectado con *Leishmania mexicana mexicana*.

Fig. 11 – Lesión ulcero-costrosa en el tarso de un hamster inoculado con *L. braziliensis*, aislado JFT.

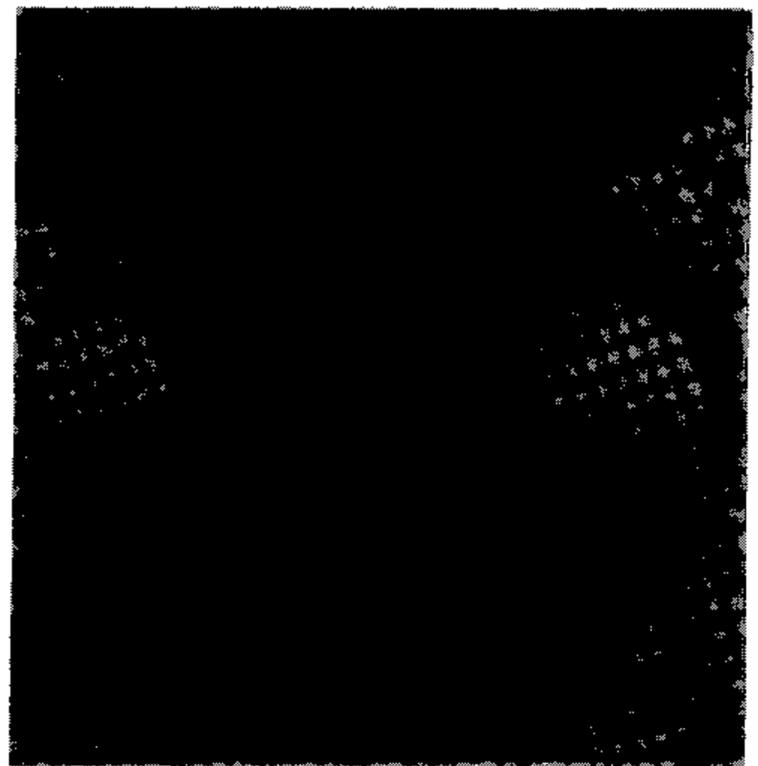


Fig. 12 – Envase de vidrio y corcho para el mantenimiento de flebótomos infectados.

Fig. 13 – Faringe y glándulas salivales de *Lu. townsendi* infectada con *L. mexicana mexicana*. 150X.

nectomonas y haptomonas en la faringe formando un tapón (Figs. 13 y 14). En algunos ejemplares se observaron escasas nectomonas libres en el píloro o triángulo posterior (Fig. 15). En los otros dos insectos se observaron algunas rosetas libres dentro de esta misma sección del intestino posterior (Fig. 16).

JFT, produjo consistentemente un desarrollo de tipo pilórico (Fig. 17) en 8 de los 22 flebótomos que se ingurgitaron (36.4%); haptomonas inmóviles se observaron adheridas a los pliegues de la armadura pilórica (Fig. 18). En la faringe de cuatro insectos se hallaron escasas nectomonas y haptomonas.



Fig. 14 – Detalle ampliado de la faringe de *Lu. townsendi* infectado con *L. mexicana mexicana* mostrando un tapón de haptomonas y nectomonas. 1350X.

CUADRO I

Dimensiones en nm e índices de las medidas de amastigotos de seis aislados de *Leishmania* sp. (\bar{x} Y desviación estandar)

Aislado	Nº de Amastigos	Longitud total	Anchura total	Índice nuclear	Índice cinetoplástico
Lm. Oc.	36	4,90 ± 0,41	3,70 ± 0,65	0,56 ± 0,14	1,06 ± 0,26
J F T	31	2,84 ± 0,22	2,42 ± 0,35	0,49 ± 0,11	0,63 ± 0,33
J C	36	3,83 ± 0,19	2,59 ± 0,25	0,46 ± 0,15	0,96 ± 0,14
A V	30	3,94 ± 0,30	2,81 ± 0,21	0,48 ± 0,15	1,01 ± 0,25
M F	38	4,09 ± 0,15	2,96 ± 0,40	0,43 ± 0,12	1,03 ± 0,27
C	31	3,75 ± 0,27	2,56 ± 0,31	0,42 ± 0,21	0,98 ± 0,15

L. m. pifanoi. Los cuatro aislados de casos clínicos de leishmaniasis difusa o lepromatosa, consistentemente, produjeron infecciones superiores al 60% de los insectos que picaron y los sobrevivientes, en un mínimo de 61%, desarrollaron infecciones con algunas nectomonas en el píloro (Figs. 19-22) que también aparecieron en el recto y en la ampolla rectal. La colonización faríngea con haptomonas fue un hecho común para todos estos aislados: 18 de 21 (85,7%) para la cepa MF; 12 de 17 (70,6%) para la cepa AV; 12 de 18 (66,7%) para la cepa C y 20 de 22 (90,9%) para la cepa JC.

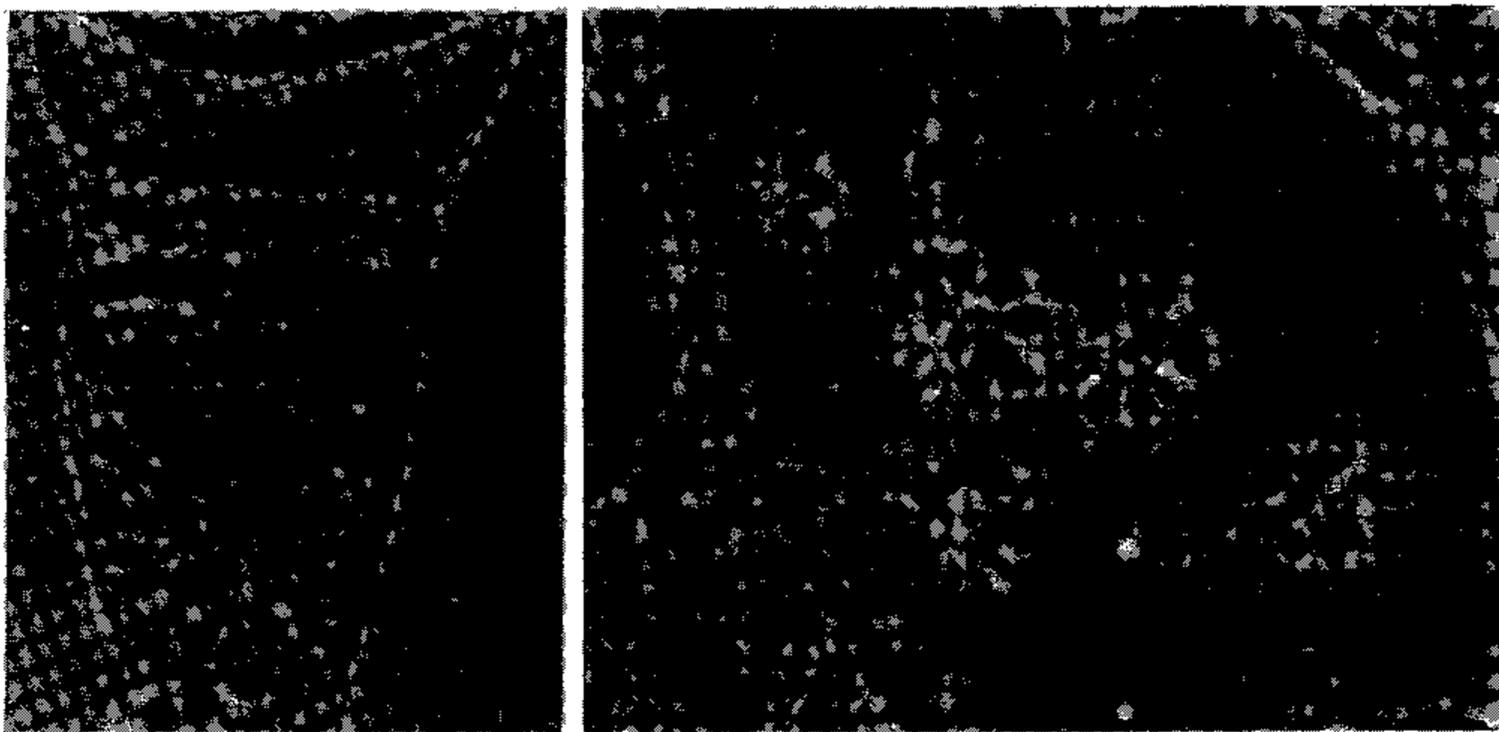


Fig. 15 – Píloro de *Lu. townsendi* mostrando escasas nectomonas de *L. mexicana mexicana*. 600X.

Fig. 16 – Rosetas de *L. mexicana mexicana* en el píloro de *Lu. townsendi*. 1350X.

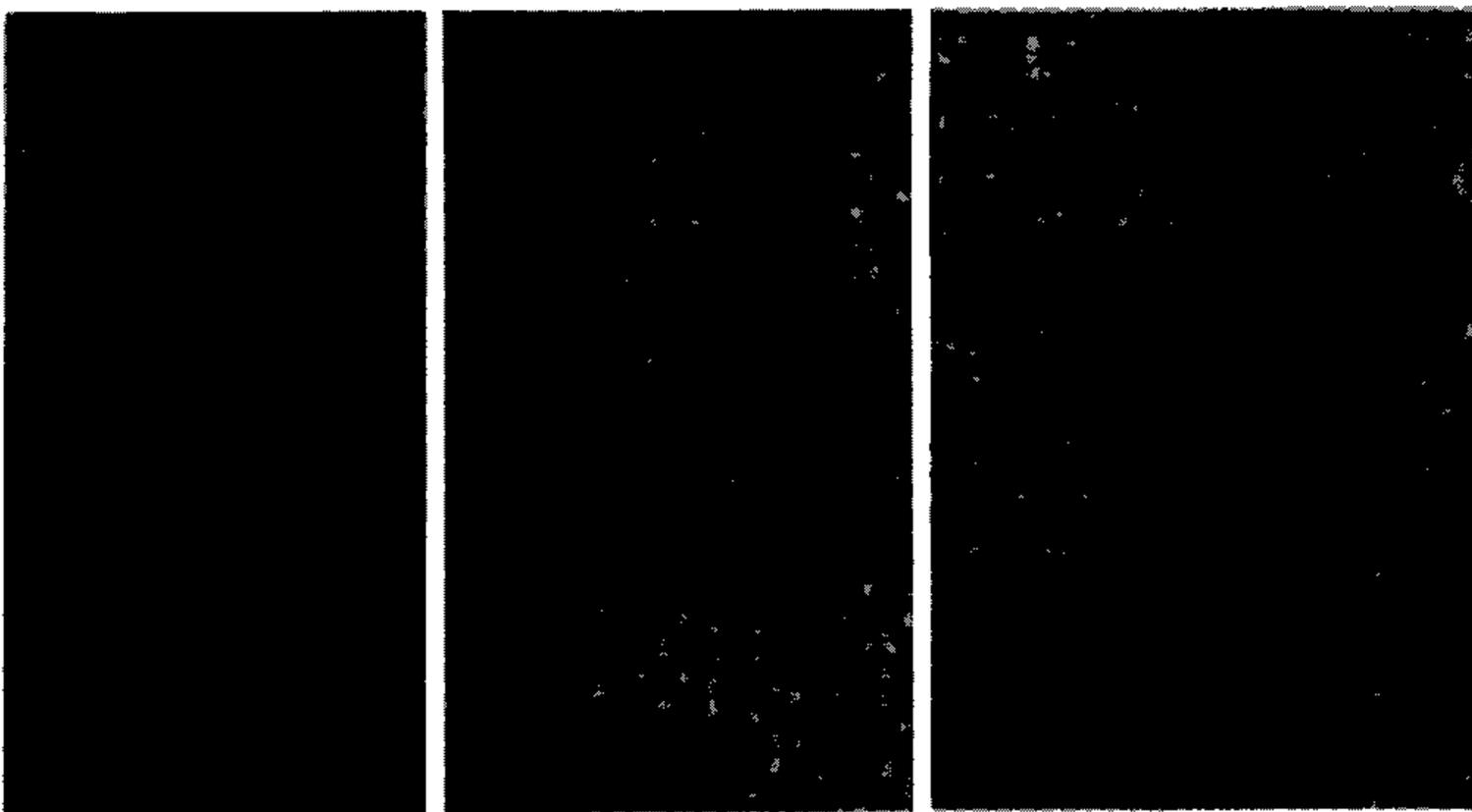


Fig. 17 – Estómago posterior y píloro de *Lu. townsendi* infectado con haptomonas de *L. braziliensis* (JFT). 150X.

Fig. 18 – Haptomonas de *L. braziliensis* (JFT) adheridas por los flagelos a las crestas pilóricas de *Lu. townsendi*. 1350X.

Fig. 19 – Válvula pilórica de *Lu. townsendi* mostrando escasas nectomonas de *L. mexicana ssp.* de un caso anérgico, en el estómago y el píloro. 600X.

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

El cuadro clínico de la leishmaniasis difusa puede ser producida por especies de *Leishmania* dermatropas de diferentes localizaciones geográficas. La enfermedad es bien

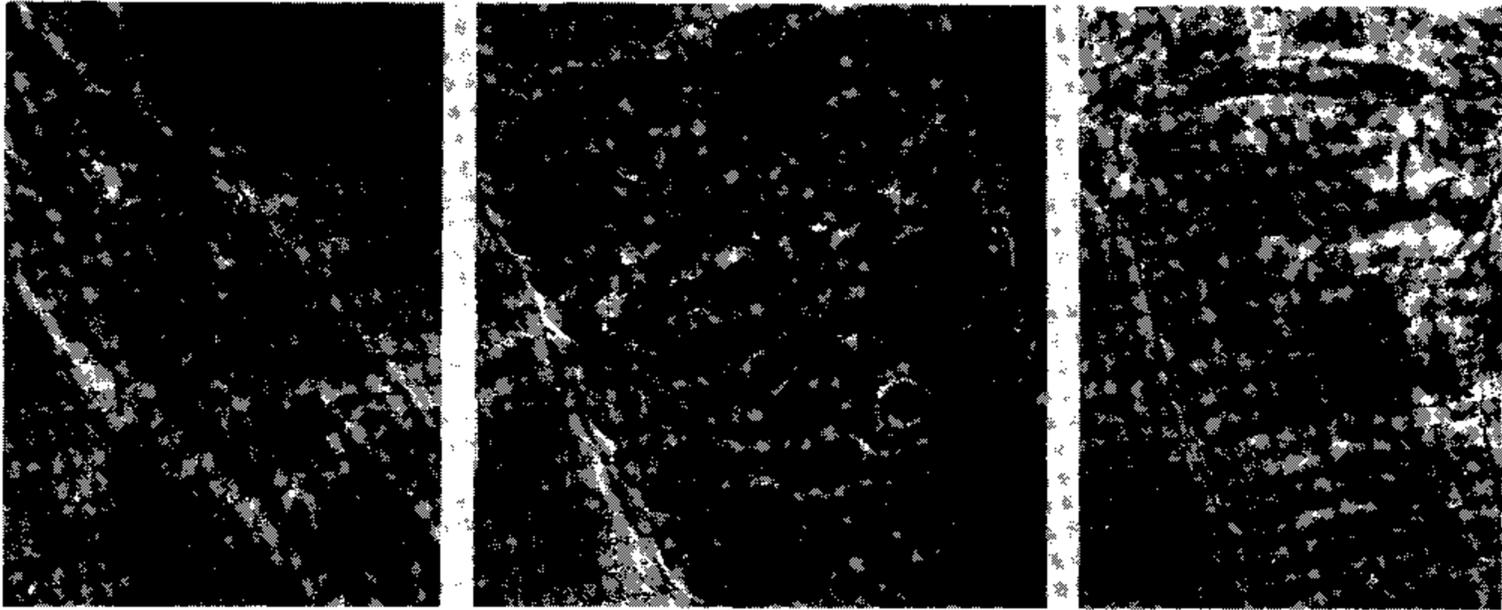


Fig. 20 – Píloro vacío de *Lu. townsendi* que mostró intensa infección faríngea con nectomonas de *L. mexicana* ssp. de un caso anérgico.

Fig. 21 y 22 – Píloros de *Lu. townsendi* infectados con *L. mexicana* ssp. mostrando nectomonas libres. 600X.

conocida en Etiopía (Balzer et al, 1960) donde el agente etiológico, que produce en individuos normales una lesión cutánea no complicada, es una especie diferente de las de América (Bray, Ashford & Bray, 1973).

La relativa frecuencia en Venezuela de la leishmaniasis cutánea diseminada ha hecho pensar que se trata de una entidad nosológica asociada a un parásito específico de una limitada área geográfica. Sin embargo, creemos que la treintena de casos venezolanos que constituyen la base para la especulación sobre la taxonomía del parásito, más bien son el producto de una vigilancia dermatológica sanitaria en un país donde la leishmaniasis cutánea existe en casi todo el territorio nacional. Las evidencias producidas por Convit, Pinardi & Rondon (1972) son esclarecedoras a este respecto.

Los casos venezolanos de leishmaniasis diseminada proceden de la subregión de la Cordillera de la Costa en donde es endémica la forma cutánea simple de la dolencia y en donde *Lu. panamensis* es el transmisor (Pifano et al, 1959). En la misma subregión litoral-norte se ha encontrado a la *Lu. flaviscutellata* (Torrealba, 1972) que Shaw & Lainson (1968) hallaron asociada a *Oryzomys capito* en la transmisión de la *L. mexicana amazonensis* en el norte del Brasil. Sobre reservorios en la misma región nortea venezolana, Pifano (1968) encontró amastigotos en la piel de *Oryzomys concolor* y Torrealba, Gomez-Nuñez & Ulloa (1972) demostraron la presencia de parásitos en la sangre de *Heteromys anomalus* que produjeron en hamsteres grandes lesiones granulomatosas histiocitarias ricas en amastigotos.

Existe por lo tanto una superposición geográfica de la epidemiología de la leishmaniasis cutánea simple con la de la leishmaniasis diseminada y siendo esta última un cuadro clínico complicado que se sitúa en el polo maligno para individuos con un defecto inmune para el parásito, no parece sostenible la tesis de individualizar taxonómicamente al agente etiológico de la forma diseminada.

Las evidencias que aportamos en este trabajo, con el estudio comparado de parásitos de cuatro aislados de casos clínicos con leishmaniasis diseminada, con un aislado de *Leishmania mexicana mexicana* (LV 41) y con otro de otra subregión en el occidente de Venezuela, revelan estrechas semejanzas de carácter biométrico, de desarrollo en el hamster y en un vector (*Lu. townsendi*) que estrechan el parentesco de las cuatro cepas en estudio con la de *L. mexicana mexicana*. Aun más, una de nuestras cepas (JC) es la misma que el Dr. J. Convit entregara a los laboratorios de Liverpool para estudios isoenzimáticos

y que Trotter, Peters & Robinson (1980) a partir de los trabajos de Gardener, Chance & Peters (1974), ubican en la variante I de la deshidrogenasa málica junto con otros aislados de *L. mexicana mexicana* (LV4, LV40 y LV41) obtenidos de *Nectomys sumichrasti* de Honduras, de *Proechimys semispinosus* y de *Oryzomya capito* de Panamá, respectivamente.

Los criterios que manejamos, biométricos y de desarrollo en los modelos hamster y *Lu. townsendi*, permiten confirmar claramente a los dos complejos de *Leishmania* en América y ubicar a los cuatro aislados en estudio dentro del complejo de la *L. mexicana*. Los índices biométricos concuerdan con los producidos por Shaw & Lainson (1976) para separar a *L. mexicana amazonensis* de *L. braziliensis braziliensis* y reafirman a los cuatro aislados dentro del complejo *mexicana*.

A juzgar por lo expuesto, los cuatro aislados de *Leishmania* obtenidos de sendos casos de leishmaniasis diseminada de la subregión norte-litoral venezolana, exhiben claros caracteres biométricos y bionómicos que confirman su ubicación dentro de los parásitos del complejo *mexicana*; la única evidencia isoenzimática a mano señala que guardan estrecho parentesco con la *L. mexicana amazonensis* y el hecho de que estos parásitos produzcan una lesión clínica convencional de leishmaniasis cutánea (Convit et al, 1972) no parecen soportar la proposición de mantenerlos separados como una distinta subespecie. Los atributos biológicos que Lainson & Shaw (1978) le atribuyen (p. 61) se compadecen con el comportamiento de la *L. mexicana amazonensis*.

SUMMARY

By means of morphometric parameters of amastigote stage and the type of development in a susceptible sandfly, four isolates of the so called *Leishmania mexicana pifanoi* are compared with one of *L. mexicana mexicana* and other of *L. braziliensis*. The results indicate that those isolates from diffuse chronic cutaneous lesions show a very close similarity with *L. mexicana mexicana* and suggest that the name *L. mexicana pifanoi* seems not to be tenable. These isolates may belong instead to *L. mexicana amazonensis*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los técnicos Julio César Márquez y Maritza Rondón por la ayuda en el trabajo de campo y de laboratorio.

REFERÊNCIAS

- BALZER, R. J.; DESTOMBES, P.; SCHALLER, K. P. & SERIE, C., 1960. Leishmaniose cutané pseudolépromeuse en Ethiopie. *Bull. Soc. Path. exot.*, 53 :293-298.
- BRAY, R. S.; ASHFORD, R. W. & BRAY, M. A., 1973. The parasite causing cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 67 :345-348.
- COELHO, M. de V.; FALCÃO, A. R. & FALCÃO, A. L., 1967. Desenvolvimento de espécies do genero *Leishmania* em especies brasileiras de flebotomos do genero *Lutzomyia* França, 1924. 1. - Evolução de *L. braziliensis* em flebotomos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9 :177-191.
- CONVIT, J.; PINARDI, M. E. & RONDON, J., 1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 66 :603-610.
- DELGADO, O., ROMANO, E. L.; BELFORT, E.; PIFANO, F.; SCORZA, J. V. & ROJAS, Z., 1981. Dialyzable leucocyte extract therapy in immunodepressed patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. & Immunopathol.* (en prensa).
- GARDNER, P. J.; CHANCE, M. L. & PETERS, W., 1974. Biochemical taxonomy of leishmania. II Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 68 :317-325.

- HERRER, A.; TELFORD, S. & CHRISTENSEN, H.A., 1971. Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. I. Investigation of the infection among forest mammals. *Ann. Trop. Med. & Parasitol.*, 65 :349-358.
- LAINSON, R.; WARD, R.D. & SHAW, J.J., 1977. Leishmania in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc. Roy. Soc., B.* 199 :309-320.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J., 1978. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. En *Biology of the Kinetoplastida*. ed. por W.H.R. Lumsden y D.A. Evans. Vol. 2. Acad. Press, 2-116 pp.
- MEDINA, R. & ROMERO, J., 1962. Estudio clínico y parasitológico de una nueva cepa de *Leishmania*. *Arch. Venez. Patol. Trop. y Parasit. Med.*, 3 :298-326.
- MILLES, M.A.; POVOA, M.M. DE SOUZA, A.; LAINSON, R. & SHAW, J.J., 1979. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 74 :243-252.
- PIFANO, F.C., 1968. Citado por Torrealba, 1972.
- PIFANO, F.; ALVAREZ, A.; ORTIZ, I.; DAGERT, C. & SCORZA, J.V., 1959. *Phlebotomus panamensis* Shannon, 1926; Transmisor de la leishmaniasis tegumentaria en Venezuela. *Gac. Med. Caracas* 67 :229-235.
- SHAW, J.J. & LAINSON, R., 1968. Leishmaniasis in Brasil. – II. Observation on enzootic rodent leishmaniasis in the lower Amazon region. The feeding habits of the vector, *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodent and other animals. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 62 :396-405.
- SHAW, J.J. & LAINSON, R., 1976. Leishmaniasis in Brazil. – XI. Observations on the morphology of leishmania of the *braziliensis* and *mexicana* complexes. *J. Trop. Med. Hyg.* 76 :9-13.
- TORREALBA, J.W., 1972. Proyecto de investigación sobre leishmaniasis tegumentaria. Univ. Carabobo, Fac. Med. mimeogr. 50 pp.
- TORREALBA, J.W.; GOMEZ-NUÑEZ, J. & ULLOA, G., 1972. Isolation of *Leishmania brasiliensis* by intraperitoneal inoculation of blood from a reservoir host into hamsters. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 66 :361.
- TROTTER, E.R.; PETERS, W. & ROBINSON, B.L., 1980. The experimental chemotherapy of leishmaniasis, VI. The development of rodent models for cutaneous infection with *L. major* and *L. mexicana amazonensis*. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 74 :299-319.
- ZUCKERMAN, A. & LAINSON, R., 1977. *Leishmania*. En *Parasitic Protozoa*, ed. por J.P. Kreier, vol. I. Acad. Press. 58 :133 pp.