

## BASES EXPERIMENTALES PARA LA IDENTIFICACION DE *LEISHMANIA* SPP. DE AMERICA POR MORFOMETRIA DE AMASTIGOTOS

HAIDEÉ URDANETA\*  
J. V. SCORZA\*\*

*Estudios morfométricos sobre los amastigotos de dieciocho poblaciones de cuatro aislados pertenecientes a dos especies venezolanas de Leishmania (L. braziliensis y L. garnhami) indican que la posición del cinetoplasto no se modifica en modo estadísticamente significativo cuando los parásitos son sometidos a pasajes por hamsteres y ratones, cultivos en medio NNN o por infección en un vector (Lu. townsendi). La posición del cinetoplasto, medido como la distancia entre el extremo posterior del amastigoto al cinetoplasto, dividido entre la distancia del organoide al extremo anterior de la célula, permite diferenciar a L. braziliensis de L. mexicana y L. garnhami. Los otros parámetros morfométricos no son tan confiables.*

Se repite insistentemente que no existen diferencias morfológicas microscópicas entre las deferentes especies del género *Leishmania* (Garnham, 1965; Gardener, Shchory & Chance, 1976; Hommel, 1978 y Williams & Coelho, 1978). Sin embargo se han producido evidencias que fundamentan una cierta diferenciación a nivel microscópico entre especies de una misma región geográfica. Safjanova & Aliev (1973) reconocen observaciones de Yakimoff (1915) que condujeron a diferenciar a las dos formas de leishmanias que en la URSS producen lesiones cutáneas, hasta separarlas a nivel subespecífico como *L. trópica major* y *L. trópica minor*. En modo similar, Shaw & Lainson (1976) precisaron diferencias morfométricas entre seis aislados de parásitos adscritos a los complejos "mexicana" o "braziliensis". En ese trabajo se describen diferencias entre los tamaños de los amastigotos y sus cinetoplastos y también diferencias menores en las posiciones relativas de los cinetoplastos y de los núcleos que fundamentan, morfológicamente, la separación de las dos especies.

Los aislados de parásitos utilizados por Shaw & Lainson (1976) tenían diferentes períodos de mantenimiento en el laboratorio; dos de los cuatro, identificados como *L. mexicana amazonensis*, tenían para la época de la publicación del trabajo, ocho años de

---

\* Departamento de Biología y Química del Núcleo Universitario "Rafael Rangel", Trujillo – Venezuela.

\*\* Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida – Venezuela.

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

Recibido para publicación en 8 de Diciembre de 1981 y acepto en 8 de Febrero de 1982.

aislados; los otros dos parecían ser mas recientes. De los dos de *L. braziliensis braziliensis* uno parecía reciente, el otro tenía tres años, por lo menos. Esos parásitos aparentemente —no se indica— se habían mantenido por pasajes en hamsteres y de las lesiones en estos animales se hicieron las preparaciones para los estudios biométricos.

Como quiera que los aislados de *L. mexicana amazonensis* utilizados por los investigadores británicos mostraron entre sí diferencias altamente significativas entre sus longitudes, con superposiciones de valores de 23% y tambien superposiciones de 12%, por ejemplo entre las *L. braziliensis braziliensis* mas grandes y las *L. mexicana amazonensis* mas pequeñas, hemos querido investigar si el pasaje de cuatro cepas, por variadas condiciones de laboratorio, produce alteraciones en sus parámetros morfométricos. La secuencia y variedad del tratamiento a los cuales las hemos sometido se precisan en la metodología de este trabajo e incluyen pasajes *in vivo* e *in vitro* con variada duración.

Si ciertamente los atributos morfométricos de un aislado dado de *Leishmania* no varían considerablemente en el curso de un prolongado mantenimiento, las diferencias biométricas observadas por Shaw & Lainson (1976) adquieren valor práctico de gran confiabilidad. En este trabajo no solamente investigamos la estabilidad de los atributos morfométricos, sino comparamos dos parásitos de un grupo bien conocido como "braziliensis", con otros dos identificados como *L. garnhami*, que exhiben caracteres comunes a los dos complejos de *Leishmania* del Nuevo Mundo (Moreno & Scorza, 1981).

## MATERIALES Y METODOS

### *Aislados de parásitos*

H.M.Q., aislada en hamster el 25 de Mayo de 1975, de un caso clínico masculino de 26 años de edad, procedente de Onia, Distrito Tovar, Estado Mérida, quien presentó una lesión única en el dorso de la mano izquierda con tres meses de evolución. Los amastigotos exhiben el liposoma característico de *L. garnhami* y su desarrollo es peripilórico en *Lu. townsendi*. Este paciente fue tratado con Glucantime y dos años después presentó una nueva lesión por reinfección; de esta nueva lesión se hizo un aislamiento en hamster. Son las tres poblaciones números 16, 17 y 18.

L.M.R., aislada en hamster el 3 Abril de 1975 de un paciente masculino de 4 años de edad, procedente de Onia, Distrito Tovar, Estado Mérida, quien presentó una lesión única en la pierna derecha con dos meses de evolución. Los amastigotos muestran el liposoma de *L. garnhami* y presenta desarrollo peripilórico en *Lu. townsendi*. De esta cepa tenemos las poblaciones 9, 10 y 11.

L.A.R., aislada el 23 de Marzo de 1979 de un caso clínico femenino de 55 años de edad, con una lesión de tres meses de evolución en un brazo, contraída en el barrio La Alameda de la ciudad de Trujillo, Estado Trujillo. Con material biopsico se inoculó un hamster que desarrolló una lesión evidente de tipo nodular el 5 de Abril de 1979. La evolución de este aislado en *Lu. townsendi* sigue un curso peripilórico característico de *L. braziliensis*. De este aislado tenemos las poblaciones 1 al 8.

H.M.T., aislada en hamster el 8 de Marzo de 1979 de un caso clínico femenino de 50 años de edad, procedente de la urbanización Timirisís en la ciudad de Trujillo, Estado Trujillo, quien presentó nueve lesiones en la espalda. El desarrollo de este aislado en *Lu. townsendi* fue del tipo peripilórico, característico de *L. braziliensis*. De este aislado tenemos cuatro poblaciones, números 12, 13, 14 y 15.

### *Métodos morfológicos*

Todas las preparaciones en estudio fueron hechas a partir de lesiones cutáneas de las patas posteriores de hamsteres. Los animales fueron sacrificados por sobreenestesia con éter o cloroformo y quince minutos después de la muerte, se les afeitó el área infectada y se tomó un fragmento de piel. Cada fragmento fue comprimido ligeramente sobre papel de filtro seco e inmediatamente se hizo con él un serial de improntas sobre una lámina desgrasada. Secadas al aire, las improntas fueron fijadas con metanol hasta la completa evaporación del fijador y coloreadas con Giemsa al 5% en tampón de fosfato M/200 a pH 7,2 durante una hora.

Los amastigotos fueron fotografiados con película Kodak de alto contraste de 35mm, con lente de 1,25 y cámara M-35 S Nikon. Cada vez que se fotografiaron amastigotos de un aislado, se hicieron fotografías de un micrometro de platina (2 mm/10nm) como referencia del aumento.

Se fotografiaron solamente parásitos extracelulares que exhibieran claramente un núcleo, un cinetoplasto y la bolsa flagelar.

Los negativos fueron coplados en papel de 19 x 24 cms junto con la escala micrométrica. En cada amastigoto se midió la longitud tomándose como extremo anterior al polo con la bolsa flagelar, la anchura máxima y el diámetro mayor del cinetoplasto, medidas que se dan con apreciación hasta  $0,1/\mu\text{m}$ . Se calcularon las siguientes relaciones: cinetoplasto al extremo posterior sobre parte media del núcleo al extremo posterior (Cep/Nep); índice cinetoplástico como cinetoplasto al extremo posterior sobre cinetoplasto al extremo anterior (Cep/Cea); índice nuclear como parte media del núcleo al extremo posterior sobre parte media del núcleo al extremo anterior (Nep/Nea).

### *Manipulación de cada aislado*

H.M.Q. Se estudió la preparación original de una primera infección hecha por improntas del material biopsico; los parásitos fueron mantenidos durante tres años por pasajes tri-o cuatrimestrales en hamsteres; después de 30 pasajes en cultivo NNN, se inocularon cuatro hamsteres hembras con promastigotos en el dorso de la pata posterior derecha el 30 de Marzo de 1979 para obtener lesiones el 3 de Mayo de 1979. Con hembras silvestres de *Lu. townsendi* se hicieron xenodiagnósticos sobre las lesiones de estos hamsteres y por disección de los flebotomos, cinco días después de la ingurgitación, se separaron los promastigotos de la faringe para inocularlos intradérmicamente en las patas posteriores de dos hamsteres machos: Uno de estos últimos animales desarrolló una lesión que fue examinada el 8 de Septiembre de 1979; de esta lesión se hicieron improntas para el estudio biométrico. Se comparan, por lo tanto, los amastigotos del paciente con los de un hamster, tras ser mantenidos los parásitos en hamsteres, en cultivo en NNN y tras la inoculación de formas de flebotomos en un hamster. Se incluyen también para comparación, parásitos de hamster correspondientes a una segunda infección en este mismo paciente que también resultó producida por *L. garnhami*.

L.M.R. Se estudiaron amastigotos de tres preparaciones. Una fue hecha con el 15º pasaje trimestral en hamster; la segunda fue un pasaje en hamster con parásitos tomados de ratón albino NMRI infectado a su vez con promastigotos de cultivo en NNN y la tercera, de otro hamster infectado con promastigotos de cultivo.

L.A. Se estudiaron amastigotos de ocho preparaciones; los de la impronta original tomada de la paciente y los de los pasajes en hamsteres desde el 1º hasta el 7º pasaje, sin otra manipulación.

H.M.T. Se estudiaron amastigotos de tres preparaciones; la original de la biopsia de la paciente y los dos pasajes en hamsteres; sin otra manipulación.

### Tratamiento de la información

Cada preparación microscópica corresponde a una población de parásitos con  $n$  amastigotos.

Se distinguen tres y tres poblaciones de *L. garnhami* respectivamente para los aislados HMQ de la primera y segunda infecciones y LMR procedentes del Estado Mérida y también ocho y tres poblaciones respectivamente, para los aislados LAR y HMT de *L. braziliensis* del Estado Trujillo.

En cada población, a cada individuo, se le han calculado seis parámetros. Se ha calculado la  $\bar{x}$  y  $s$ , con la varianza, para cada parámetro.

En una primera aproximación estadística se han comparado gráficamente las medias y las desviaciones estandard de los parámetros de las poblaciones de un mismo aislado, con la finalidad de visualizar semejanzas o diferencias entre las poblaciones de un mismo aislado y entre los aislados, partiendo del prejuicio de que los de los estados Mérida y Trujillo son diferentes entre sí porque han sido adscritos taxonómicamente a dos especies diferentes y que, los aislados de un mismo Estado son semejantes entre sí.

En una segunda aproximación, hemos hecho un análisis de varianza y prueba de Duncan entre los parámetros de las poblaciones de un mismo aislado, con excepción de los de la segunda infección de HMQ, para precisar cual o cuales de los parámetros eran iguales o significativamente diferentes. Este análisis nos informaría si la manipulación padecida por un aislado dado introduce modificaciones importantes en algunos parámetros, o lo que es similar, si los parámetros permanecen inmodificables en el curso del mantenimiento de un aislado dado.

## RESULTADOS

Una primera aproximación al estudio comparativo de seis parámetros en los amastigotos de cuatro aislados de dos especies de *Leishmania* de los Andes venezolanos, revela algunas diferencias biométricas. La Fig. N<sup>o</sup> 1 muestra las medias ( $\bar{x}$ ) de los seis parámetros de diecisiete poblaciones de amastigotos.

A la izquierda se sitúan los dos aislados de *L. braziliensis* (LAR y HMT) y a la derecha los de *L. garnhami* (LMR y HMQ). En la Fig. 1A se observa que la relación entre las distancias del cinetoplasto y del núcleo con respecto al extremo posterior del parásito, separan a las dos especies; la media mínima de las seis poblaciones de *L. garnhami* es de 1,2 en tanto que ocho de las once poblaciones de *L. braziliensis* tienen una media igual o inferior a 1,2. El índice cinetoplasto-nuclear es mayor en *L. garnhami* que en *L. braziliensis*, lo cual indica que los cinetoplastos en la primera especie se sitúan prenuclearmente en *L. garnhami*, en tanto que en *L. braziliensis* son paranucleares.

En la Fig. 1B se representan las medias de los índices cinetoplásticos que en *L. braziliensis* son menores de 0,7 y en *L. garnhami* son mayores de 0,7.

Los índices nucleares (Fig. 1C) no revelan diferencias como tampoco las longitudes y anchuras de los amastigotos de una y otra especie (Fig. 1D y E). El diámetro mayor de los cinetoplastos (Fig. 1F) parece ser mayor o tiende a ser mayor en *L. braziliensis* que en *L. garnhami*.

Examinadas preliminarmente estas diferencias, veamos ahora los resultados del análisis de varianza y de la prueba de Duncan entre los seis parámetros dentro de cada aislado. Compararemos primero a las tres poblaciones de *L. garnhami* HMQ.

Fig. 1 A

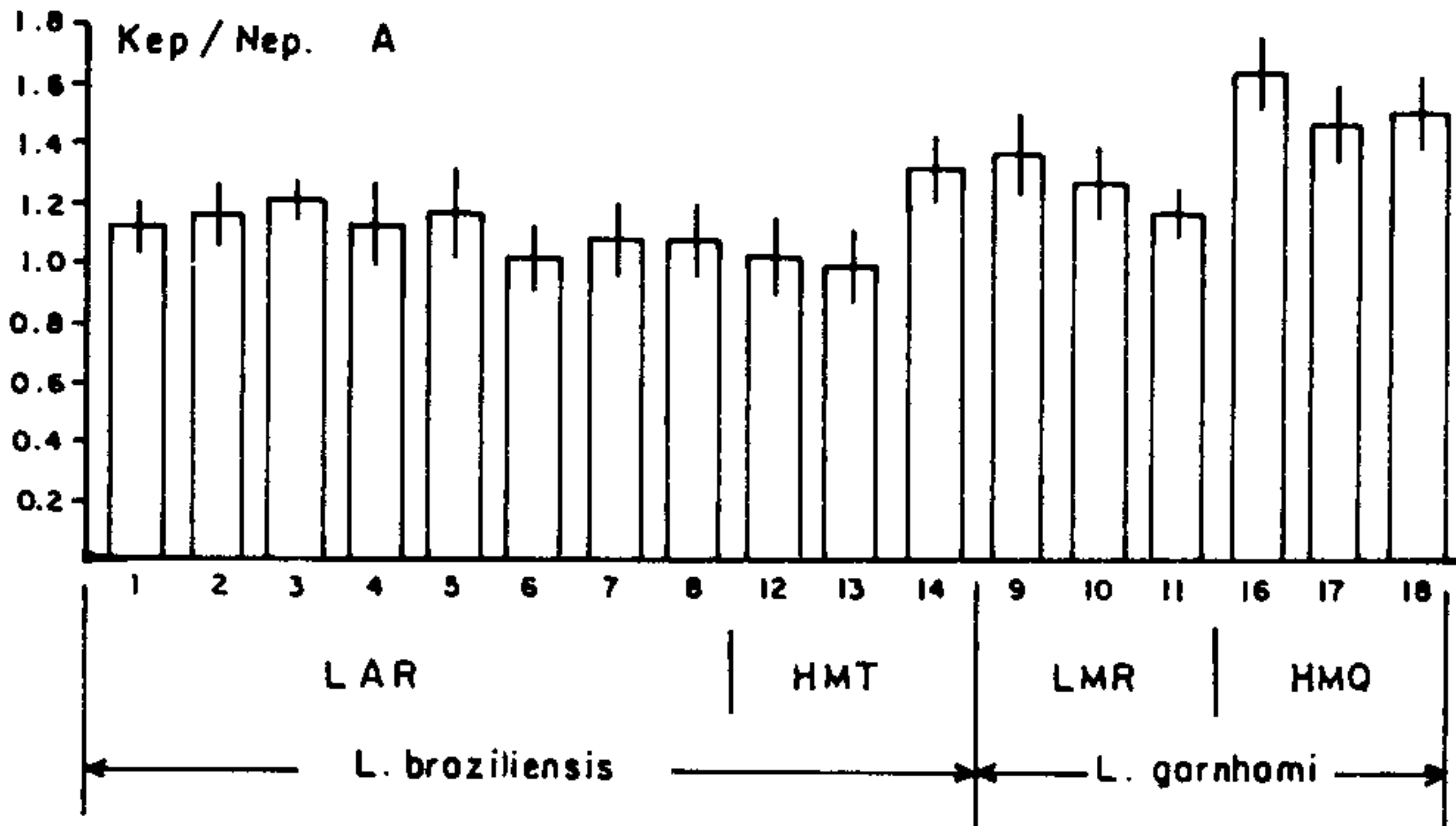


Fig. 1 A -  $\bar{x}$  y s de las relaciones cinetoplasto extremo posterior y nucleo extremo posterior en amastigotos de 17 poblaciones de *Leishmania* spp del Occidente de Venezuela.

#### Aislado HMQ de *L. garnhami*

Las tres poblaciones HMQ corresponden a dos infecciones del mismo paciente. Las de la población 16 son los parásitos de la primera infección de este paciente y los de la 18 son los mismos parásitos que han sido pasados por el vector (*Lu. townsendi*); el aislado 17 son los amastigotos de la segunda infección contraída tres años después por la misma persona. En el Cuadro I presentamos los resultados del análisis estadístico.

Cuatro de los seis parámetros en los amastigotos de un aislado de *L. guarnhami* no muestran diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan a los parásitos de la lesión original con los de un hamster infectado cuatro años después, cuando con estos mismos parásitos se habían hecho pasajes en el mismo roedor durante tres años, cuando durante un año se le mantuvo por cultivo en medio NNN y finalmente se le pasó por el vector (*L. townsendi*) para inocular otra vez con estos promastigotos a otro hamster. El mismo análisis, midiendo cien (100) amastigotos de una segunda infección contraída por el mismo individuo en la misma zona endémica, revela igualmente que la morfometría de los amastigotos de esta segunda infección, con excepción del índice nuclear y de la longitud de los parásitos, es igual a la de la primera infección. Los índices cinetoplasto-nuclear y cinetoplástico así como el diámetro de los cinetoplastos sirven de indicadores biométricos para caracterizar a este aislado de *L. garnhami*.

#### Aislado LMR de *L. garnhami*

En este caso se estudian las variaciones morfométricas de un aislado después del 15º pasaje en hamster (9), de una infección después de ser pasados por el ratón albino

Fig. 1 B

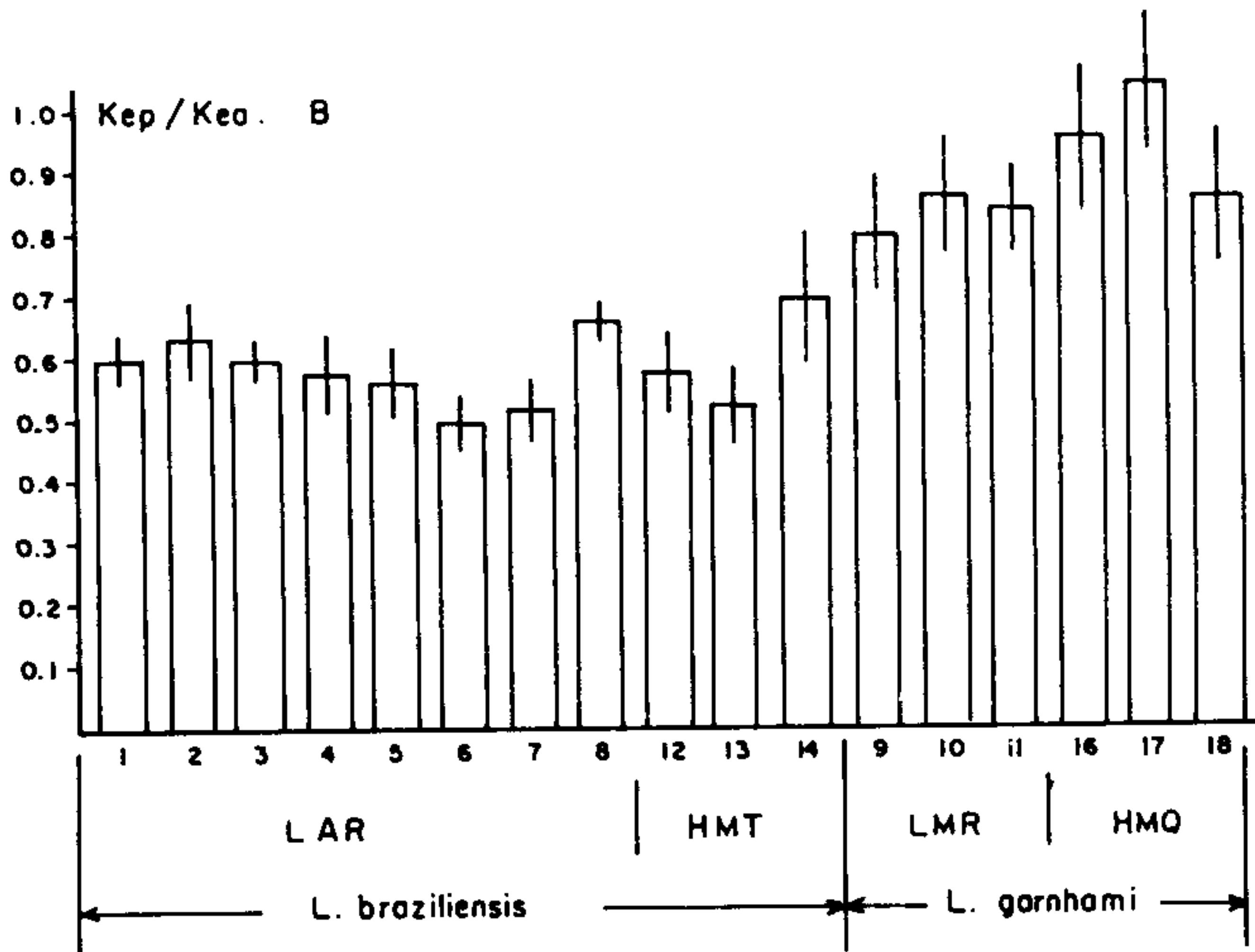


Fig. 1 B —  $\bar{x}$  y  $s$  de los índices cinetoplásticos en los amastigotos de 17 poblaciones de *Leishmania* spp del Occidente de Venezuela.

(10) y de una infección en hamster después de ser cultivado en NNN (11). Los resultados se presentan en el Cuadro II.

En este caso (LMR), cuatro de los seis parámetros no mostraron variaciones biométricas estadísticamente significativas. Como en el caso del aislado HMQ de *L. garnhami*, este otro aislado fue consistentemente invariable en los índices cinetoplasto-nuclear, cinetoplástico y también en la longitud total de los amastigotos.

#### Aislado LAR de *L. braziliensis*

Este aislado fue obtenido en Marzo de 1979 y desde entonces fue pasado sucesivamente ocho veces en hamsteres por inoculación subcutánea de amastigotos de las lesiones en las patas posteriores de los roedores. Se tienen así las poblaciones 1 al 8. En el Cuadro III presentamos los valores extremos de las  $\bar{x}$  de cada uno de los seis parámetros, los estadísticos F y P, además de los grupos que a partir de la prueba de Duncan constituyen para las ocho poblaciones que se comparan. Se midió un número mínimo de ocho amastigotos en la impronta de la biopsia de la paciente, hasta un máximo de 74 para las improntas de hamsteres.

El análisis de los resultados revela que únicamente el índice cinetoplasto-nuclear con relación al extremo posterior del amastigoto no varía en modo estadísticamente signi-

## CUADRO I

Análisis de varianza y prueba de Duncan entre tres poblaciones de *L. garnhami* correspondientes a dos infecciones en el mismo paciente (HMQ).

Parámetros	F	<P	Diferencias entre las poblaciones	$\bar{x}$ extremos y n° de amastigotos por población	Observaciones sobre la primera y segunda infección
Cep/Nep	2,89	0,05	Ninguna entre 16 y 18	1,68 – 1,54 (26) · (220)	No hay diferencias entre la primera y segunda infección
Cep/Cea	8,78	0,0002	Ninguna entre 16 y 18	0,95 – 0,86 (26) (220)	No hay diferencias entre la primera y segunda infección
Nep/Nea	18,11	0,0001	Ninguna entre 16 y 18	0,45 – 0,42 (26) – (220)	La segunda infección es diferente
Longitud	10,59	0,0001	Ninguna entre 16 y 18	4,27 – 4,23 nm (26) – (220)	La segunda infección es diferente
Anchura	18,14	0,001	Hay diferencias entre 16 y 18	3,0 – 2,43 nm (26) (220)	No señala diferencias entre la primera y segunda infección
Diámetro mayor del cinetoplasto	46,13	0,0001	Hay diferencias entre 16 y 18	1,40 – 1,10 nm (26) (220)	No señala diferencias entre la primera y segunda infección

## CUADRO II

Análisis de varianza y prueba de Duncan entre tres poblaciones de *L. garnhami* (LMR) después de pasajes por hamsteres, ratón albino y cultivo en NNN

Parámetros	F	<P	Diferencias entre las poblaciones	$\bar{x}$ y n° de amastigotos por población 9 – 10 – 11
Cep/Nep	2,23	0,112	ninguna	1,40 – 1,28 – 1,22 (59) (26) (27)
Cep/Cea	0,35	0,70	ninguna	0,80 – 0,86 – 0,85 (59) (26) (27)
Nep/Nea	9,89	0,0001	Difieren el 9 del 10 y 11	0,46 – 0,60 – 0,59 (59) (26) (27)
Longitud	0,75	0,473	ninguna	4,18 – 4,21 – 4,33 nm (59) (26) (27)
Anchura	18,19	0,001	Los tres son diferentes	2,69 – 2,18 – 2,47 nm (59) (26) (27)
Diámetro mayor del cinetoplasto	2,38	0,097	ninguna	1,48 – 1,44 – 1,61 nm (59) (26) (27)

Fig. 1 C

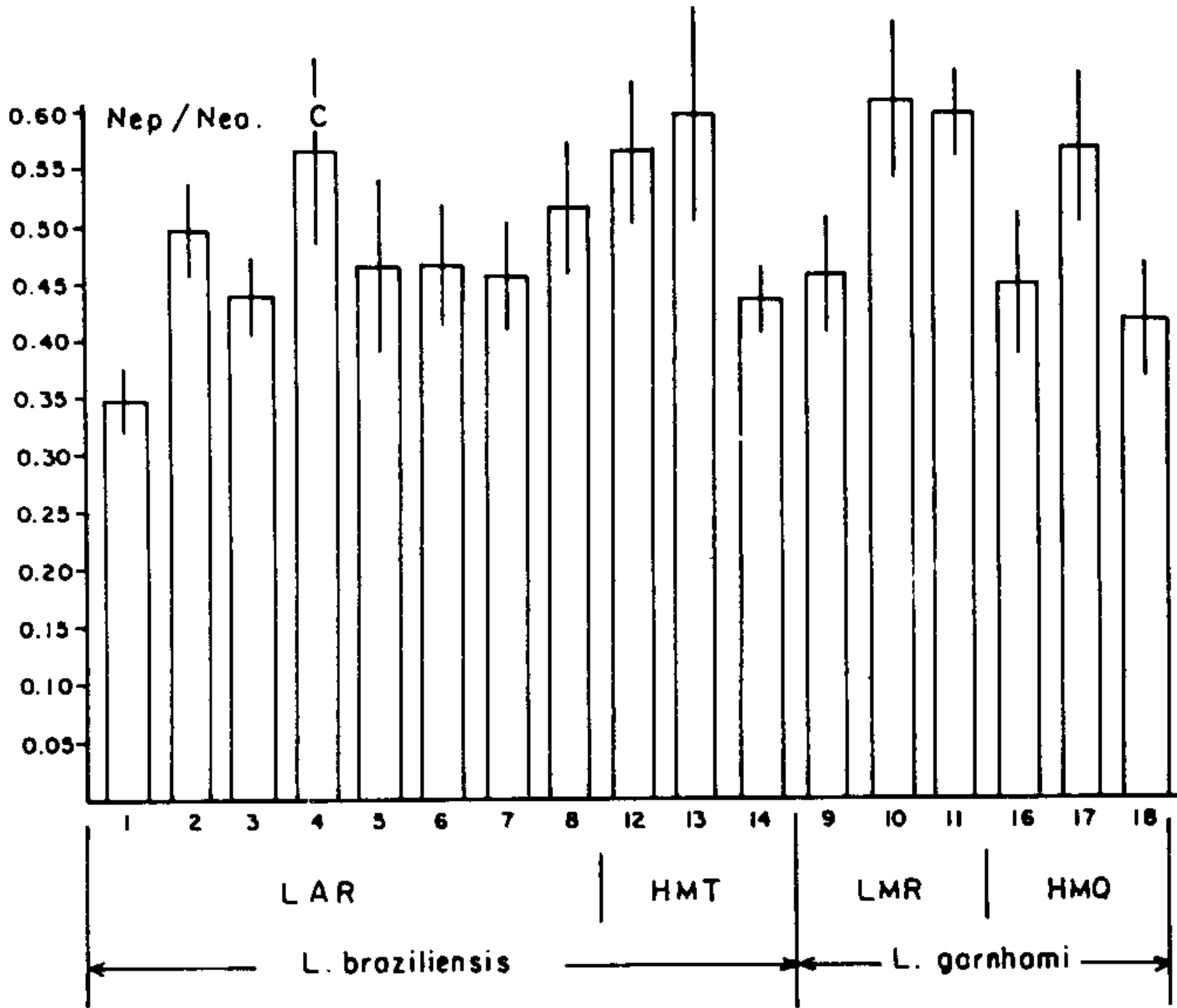


Fig. 1 C –  $\bar{x}$  y  $s$  de los índices nucleares de los amastigotos de 17 poblaciones de *Leishmania* spp del Occidente Venezolano.

CUADRO III

Análisis de varianza y prueba de Duncan para los seis parámetros biométricos de ocho poblaciones de *L. braziliensis*, aislado LAR

Parámetros	F	P	Agrupamientos de poblaciones	$\bar{x}$ extremas
Cep/Nep	0,86	0,54	Forman un único grupo	1,10 – 1,17
Cep/Cea	3,44	0,0018	134567, 2345, 23458	0,43 – 0,66
Nep/Nea	1,61	0,13	13567, 2345678	0,35 – 0,52
Longitud	57,92	0,0001	124; 35; 67 y 78	3,28 – 4,57 nm
Anchura	15,82	0,0001	1234; 234; 56; 78	2,32 – 3,24 nm
Diámetro mayor del cinetoplasto	67,28	0,0001	123; 34; 5678	1,34 – 2,46 nm



Fig. 1 D

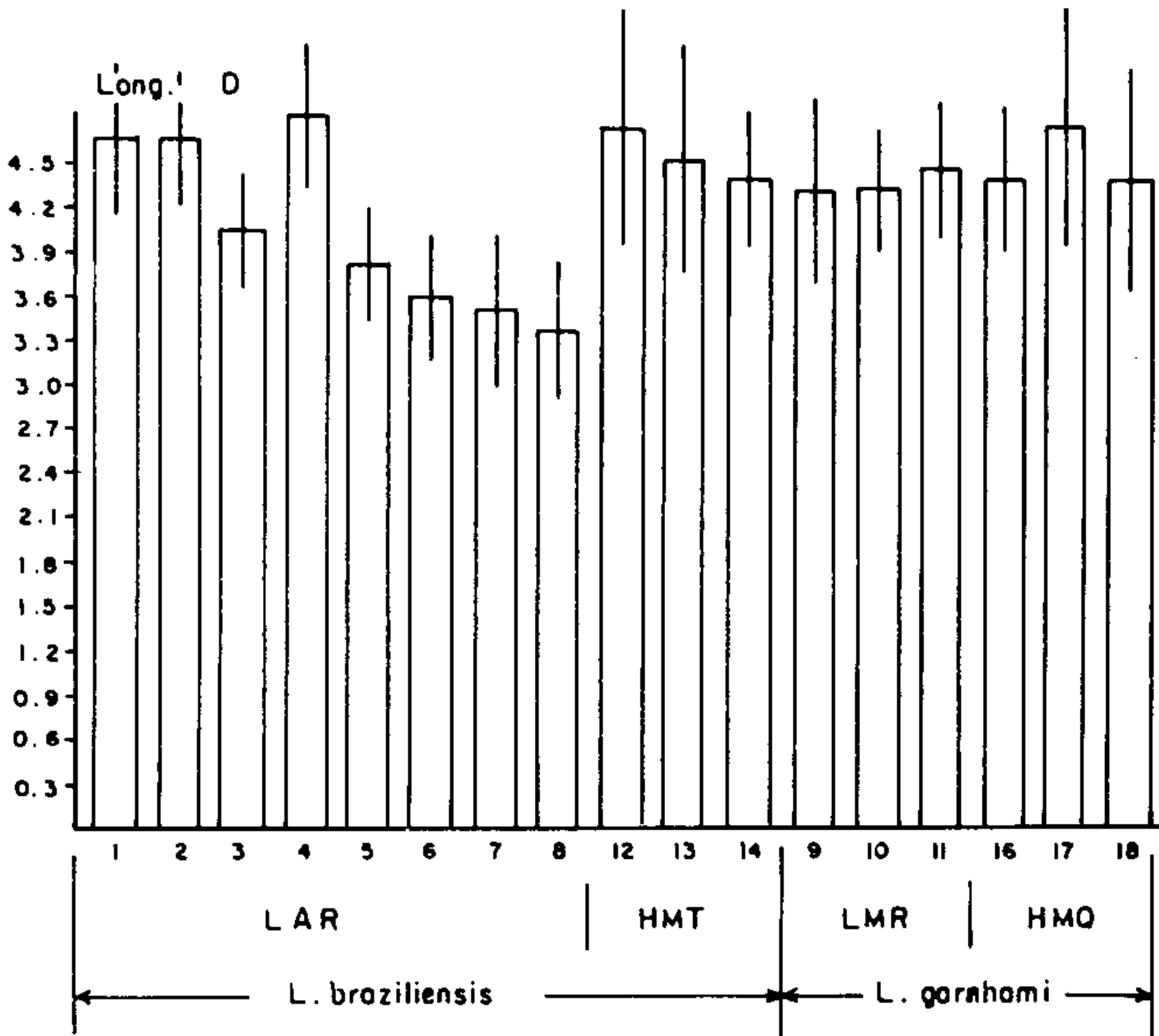


Fig. 1D —  $\bar{x}$  y s de las longitudes de los amastigotos de 17 poblaciones de *Leishmania* spp del Occidente Venezolano.

ficativo con los pasajes del aislado LAR de *L. braziliensis* a través del hamster. Los otros cinco parámetros morfométricos, con excepción de los índices nucleares y cinetoplásticos, segregan a las ocho poblaciones en más de dos subgrupos con diferencias estadísticamente significativas entre sí. El índice cinetoplástico agrupa seis de las ocho poblaciones dejando por fuera al primero y octavo pasajes en hamsteres; el índice nuclear agrupa en un único conjunto a siete de las ocho poblaciones, segregando a la población original de procedencia humana.

En el curso de los siete pasajes de un mismo aislado de *L. braziliensis* a través del hamster el cinetoplasto, que aparece colocado en posición ligeramente prenuclear, se desplaza hacia el extremo anterior aumentando la distancia entre los dos organelos. Tanto el cinetoplasto como el núcleo se desplazan anteriormente, se alejan ambos del extremo posterior del amastigoto y el cinetoplasto mismo se hace más largo. El tamaño del amastigoto aumenta.

#### Aislado HMT de *L. braziliensis*

Como en el caso anterior, disponemos solamente de la población de amastigotos original del caso clínico y de tres pasajes sucesivos en hamsteres. Los resultados del análisis de varianza entre estas poblaciones, medidos respectivamente los seis parámetros en

Fig. 1 E

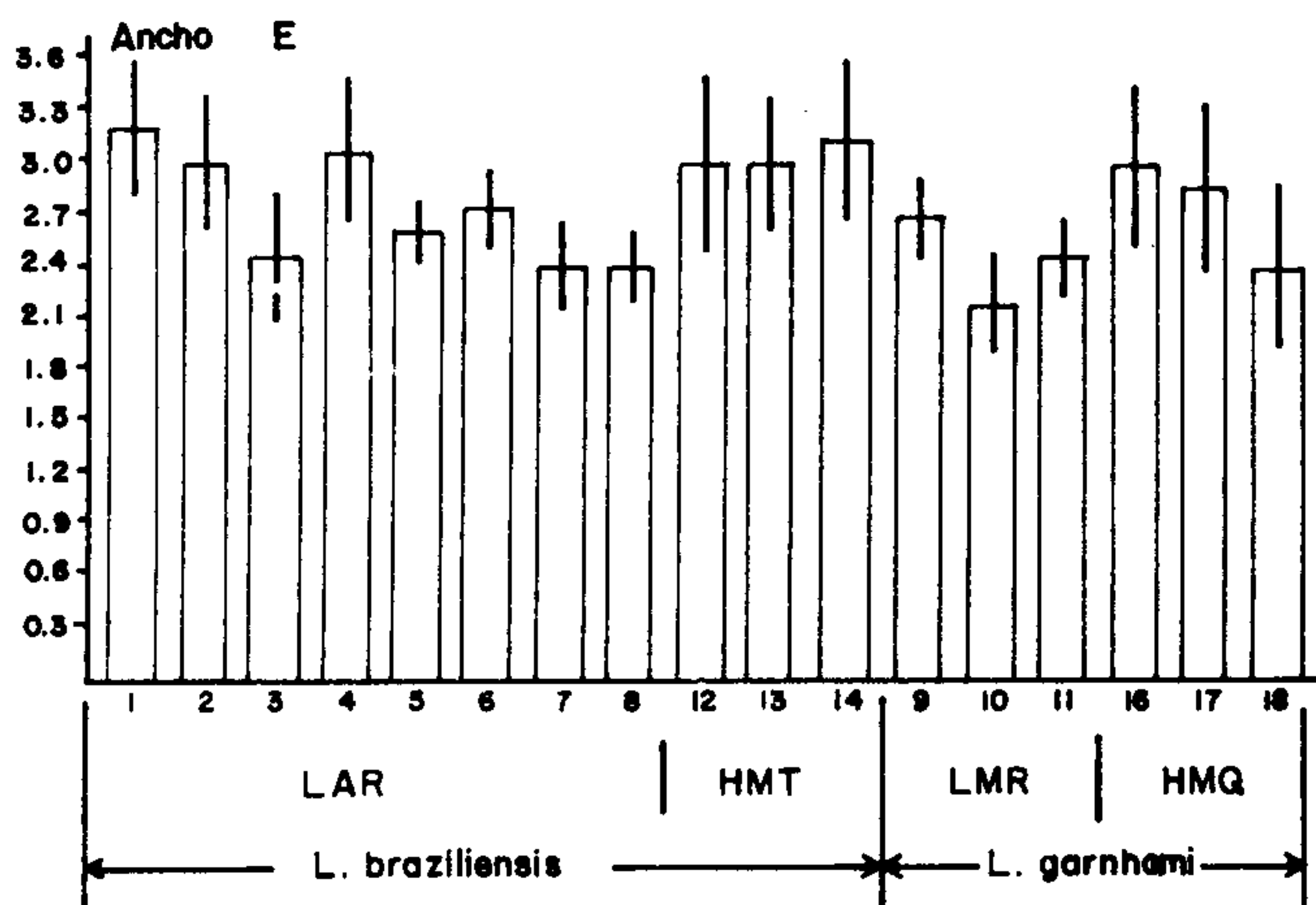


Fig. 1 E  $\bar{x}$  y  $s$  de las anchuras de los amastigotos en 17 poblaciones de *Leishmania* spp del Occidente Venezolano.

31, 37, 20 y 25 amastigotos, se presentan en el Cuadro IV. En este caso, con los pasajes sucesivos por hamsteres, aumenta la distancia entre el cinetoplasto y el núcleo; mientras el cinetoplasto se hace mas anterior, el núcleo por el contrario, se aproxima mas al extremo posterior del amastigoto. La longitud de la célula casi no se modifica en tanto que el protozoo se hace mas ancho. Aumenta ligeramente el diámetro mayor del cinetoplasto. Comparando los valores de  $F$  de los seis parámetros y exceptuando el correspondiente a la longitud, donde las diferencias entre las cuatro poblaciones no son significativas ( $< P:0,43$ ), los valores  $F$  del índice cinetoplástico y del índice nuclear (2,98 y 2,55) son relativamente bajos para probabilidades respectivas menores de 3% y 6%. Estos valores indican que, comparadas con las variaciones interpoblaciones del índice cinetoplasto-nuclear y del diámetro mayor del cinetoplasto, aquellos índices variaron en menor proporción.

#### Variaciones comunes a los cuatro aislados de *Leishmania* spp

Se han comparado las variaciones morfométricas de los amastigotos de *L. garnhami* y de *L. braziliensis* cuando dos aislados de cada una de estas especies se hacen pasar por manipulaciones en condiciones de laboratorio que incluyen pasajes por hamsteres, por ratón albino, por cultivo en medio NNN y por un vector, la *Lu. townsendi*.

En el caso de *L. garnhami*, el prolongado tratamiento por variadas condiciones *in vitro* e *in vivo* no introduce modificaciones estadísticamente significativas en tres de los

## CUADRO IV

Análisis de varianza y prueba de Duncan para seis parámetros biométricos de cuatro poblaciones (12, 13, 14 y 15) del aislado HMT de *L. braziliensis*

Parámetros	F	P	Agrupamientos de poblaciones	$\bar{x}$ extremas
Cep/Nep	6,19	0,0008	12-13; 14-15	1,05 - 1,64
Cep/Cea	2,98	0,03	12-13; 14-15	0,57 - 0,86
Nep/Nea	2,55	0,06	12-13; 14-15	0,57 - 0,39
Longitud	0,94	0,43	12; 13; 14-15 un único grupo	4,67 - 4,46
Anchura	1,71	0,16	12-13 y 14; 13-14 y 15	2,97 - 3,74
Diámetro mayor del cinetoplasto	7,22	0,0003	13-14 y 15; 12 y 15	2,20 - 2,36

Fig. 1 F

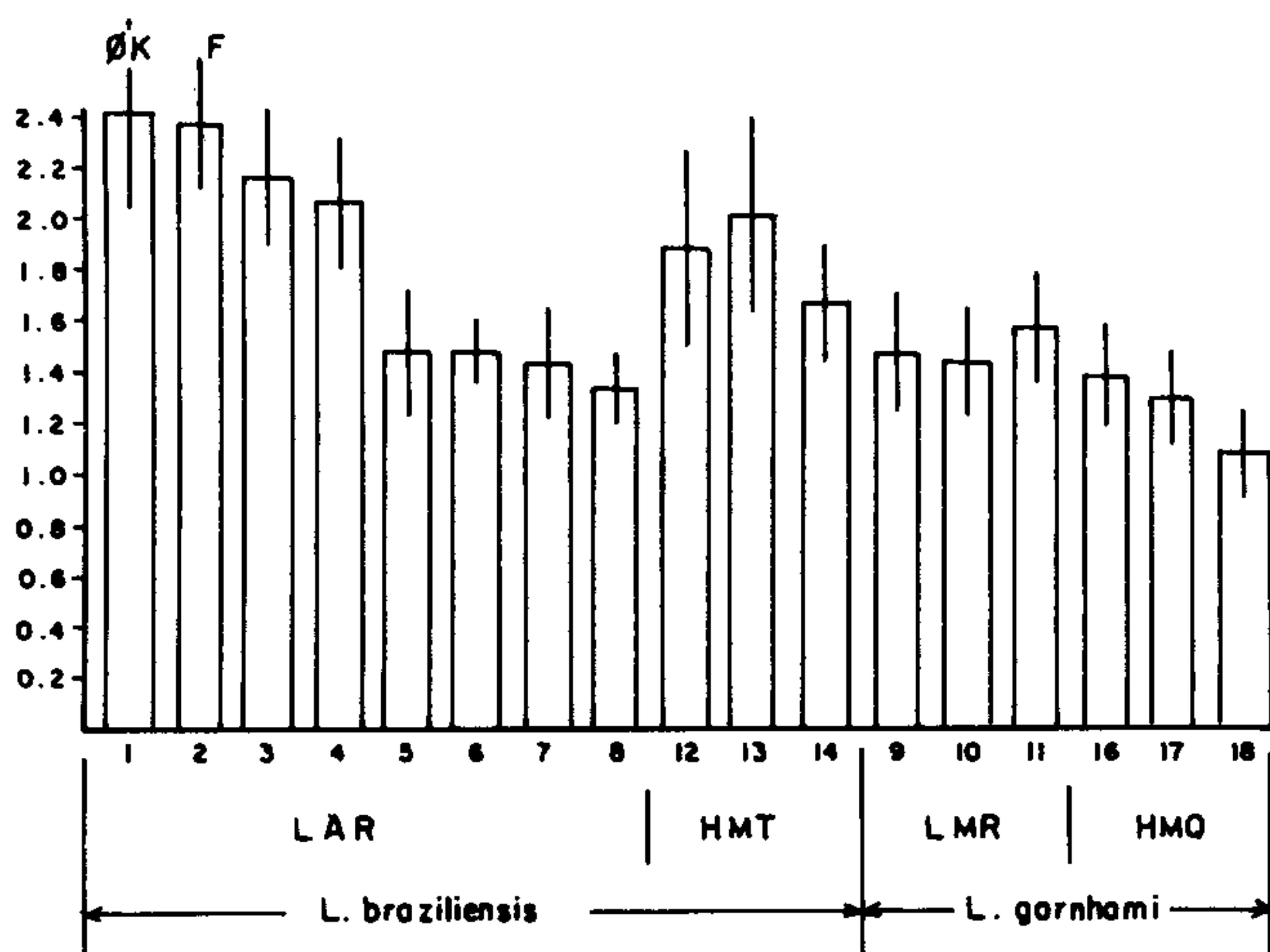


Fig. 1 F —  $\bar{x}$  y s del diámetro mayor de los cinetoplastos de los amastigotos de 17 poblaciones de *Leishmania* spp del Occidente Venezolano.

seis parámetros que se han tomado en cuenta para compararlos biométricamente con los amastigotos hallados originalmente en las lesiones de pacientes de los cuales se los aisló. No se registraron variaciones en la relación entre las distancias del cinetoplasto al extremo posterior y la del núcleo al extremo posterior del amastigoto, en el índice cinetoplástico, como tampoco en la longitud total del amastigoto.

En el caso de *L. braziliensis*, las variaciones morfométricas de dos aislados mantenidos en hamsteres son mayores que las de los aislados de *L. garnhami*. No se registraron variaciones notables en los índices nucleares y cinetoplásticos únicamente. Esto significa que, estadísticamente, el índice nuclear y el índice cinetoplástico sufren poca o ninguna variación en el curso de los pasajes de los aislados por los hamsteres. Las variaciones de tamaño no son regulares; mientras en un aislado (LAR) la longitud total aumenta ligeramente (3, 28-4, 57 nm), en otro (HMT) no se modifica substancialmente. La anchura, en ambos aislados aumenta ligeramente y también el diámetro mayor del cinetoplasto.

Considerando en un solo conjunto a las 737 observaciones que comprenden 16 poblaciones de los cuatro aislados, el análisis de varianza y la prueba de Duncan arrojan información sobre agrupamientos cuando se analizan los valores de las relaciones cinetoplasto-nuclear, de los índices nucleares y de los índices cinetoplásticos. En esta comparación no hemos considerado a los aislados 17 y 15. Al número 17 por ser los de una segunda infección en un mismo paciente, aun cuando estos parásitos parecieron pertenecer al mismo demos que produjo la primera infección y al aislado 15 por estar representado únicamente por siete amastigotos. En el Cuadro V se ordenan en orden decreciente las medias de las relaciones cinetoplasto-núcleo con respecto al extremo posterior de los amasti-

#### CUADRO V

Análisis de varianza entre poblaciones y prueba de Duncan para el índice cinetoplastico-nuclear entre cuatro aislados de *Leishmania* spp. de los Andes de Venezuela

Nivel de significación: 0,05 N° de observaciones: 737

Agrupamientos	Medias	Poblaciones	Aislados	Procedencia
A	1,68	16	HMQ	Mérida
A B	1,54	18	HMQ	
B	1,41	9	LMR	
B	1,34	14	HMT	
B C	1,28	10	LMR	
B C D	1,23	3	LAR	Trujillo
B C D	1,22	5	LAR	
B C D	1,22	11	LMR	
B C D	1,21	2	LAR	
B C D	1,17	1	LAR	
B C D	1,14	4	LAR	
B C D	1,10	8	LAR	
B C D	1,07	7	LAR	
C D	1,06	6	LAR	
C D	1,05	12	HMT	
	1,00	13	HMT	

gotos (Cep/Nep) que van desde 1,68 hasta 1,00; esto es, desde amastigotos con cinetoplastos prenucleares hasta aquellos con distancia al extremo posterior exactamente igual a la distancia de la parte media del núcleo al extremo posterior. Se observa que las poblaciones de Trujillo, correspondientes a los dos aislados de *L. braziliensis* (LAR y HMT), se agrupan con medias de 1,23 hasta 1,00. Las poblaciones de *L. granhami* del Estado Mérida, con excepción de la población 10, que comparte individuos con índices iguales a los de Trujillo (agrupamiento C), constituyen un solo grupo A-B. Amastigotos con atributos B también aparecen en las poblaciones de Trujillo (LAR y HMT). Dentro de estos últimos el aislado LMR-11 aparece incluido dentro del agrupamiento *L. braziliensis*. Lo mismo ocurre con el aislado HMT-14 que perteneciendo a *L. granhami*, aparece con atributos de *L. braziliensis*. En resumen, la distancia relativa del cinetoplasto y del núcleo con respecto al extremo posterior del amastigoto no separa nítidamente a los aislados de *L. granhami* de los de *L. braziliensis*.

Con respecto a los índices nucleares de las 16 poblaciones, en el Cuadro VI se organizan las medias desde 0,60, con núcleos centrales o alejados del extremo posterior, hasta 0,35 con núcleos definitivamente colocados en el extremo posterior del parásito. Aquí otra vez se agrupan los aislados de Trujillo con individuos C y D que van desde 0,57 hasta 0,35 y que poseen también amastigotos A-B de los aislados de *L. granhami* del Estado Mérida. Los amastigotos con índices de 0,59 hasta 0,50 se ubican, por el índice nuclear, dentro de *L. braziliensis* o *L. granhami*.

CUADRO VI

Análisis de varianza entre poblaciones y prueba de Duncan para el índice nuclear entre cuatro aislados de *Leishmania* spp. de los Andes de Venezuela

Nivel de significación: 0,05 N° de observaciones: 737

Agrupamientos	Medias	Poblaciones	Aislados	Procedencia
A	0,60	10	LMR	Mérida
A	0,59	13	*HMT	
A B	0,59	11	LMR	
A B C	0,57	4	LAR	Trujillo
A B C	0,57	12	HMT	
A B C	0,52	8	LAR	
B C	0,50	2	LAR	
C D	0,47	6	LAR	
C D	0,46	5	LAR	
C D	0,46	9	LMR	
C D	0,46	7	LAR	
C D	0,45	16	*HMQ	
C D	0,44	14	HMT	
C D	0,44	3	LAR	
D	0,42	18	*HMQ	
D	0,35	1	LAR	

El índice cinetoplástico (Cuadro VII) es el que separa mas claramente a las poblaciones de *L. braziliensis* del Estado Trujillo, de los *L. garnhami* del Estado Mérida.

#### CUADRO VII

Análisis de varianza entre poblaciones y prueba de Duncan para el índice cinetoplástico entre cuatro aislados de *Leishmania* spp. de los Andes de Venezuela

Nivel de significación: 0,05 N° de observaciones: 737

Agrupamientos	Medias	Poblaciones	Aislados	Procedencia
A B	0,96	16	HMQ	Mérida
B C	0,86	18	HMQ	
B C	0,86	10	LMR	
B C	0,85	11	LMR	
B C	0,80	9	LMR	
C	0,69	14	HMT	Trujillo
C	0,66	8	LAR	
C	0,64	2	LAR	
C	0,60	3	LAR	
C	0,59	4	LAR	
C	0,57	12	HMT	
C	0,56	5	LAR	
C	0,52	7	LAR	
C	0,52	13	HMT	
C	0,50	6	LAR	
C	0,44	1	LAR	

Los primeros poseen índices cinetoplásticos que van desde 0,69 hasta 0,44. Las poblaciones de *L. garnhami* poseen índices que van desde 0,96 hasta 0,80. El índice cinetoplástico, por lo tanto, separa a *L. garnhami* de *L. braziliensis*; algunos amastigotos de esta última especie poseen índices similares a los de *L. garnhami* (B-C). Esto significa que los amastigotos de *L. garnhami* se identifican por poseer el cinetoplasto en la parte media del amastigoto, mientras que en *L. braziliensis* el cinetoplasto se ubica posteriormente.

#### DISCUSION

En las regiones intertropicales del Nuevo Mundo, donde existen simpátricamente subespecies de *Leishmania* de los complejos "mexicana" y "braziliensis" (Zuckerman & Lainson, 1977), la correcta identificación del agente etiológico de las lesiones cutáneas tiene importancia particular para el pronóstico de las infecciones, para la quimioterapia que se use y para el seguimiento que merecen los pacientes, particularmente aquellos que han contraído infecciones producidas por *L. braziliensis*.

Se conocen criterios variados, con dificultades prácticas, para identificar taxonómicamente a nivel de especies a las *Leishmania* que producen lesiones cutáneas. Por el

lado de la serología, el test de Adler, Foner y Montiglio (1966) exige el cultivo de los parásitos o la obtención de sobrenadante de los mismos medios en cultivo para los ensayos con factores de excreción, desarrollados por Schnur, Zuckerman & Greeblatt (1972), que además demandan técnicas de inmunodifusión con sueros hiperinmunes contra las glicoproteínas segregadas por los mismos parásitos en los medios en que se cultivan.

La inoculación de *Leishmania* en hamsteres y el tipo de lesiones que en ellos se producen, es otra técnica que arroja información confiable (Lainson & Shaw, 1972). Otros procedimientos exigen equipamiento costoso y técnicas bioquímicas más elaboradas, como los criterios de densidad de flotación del DNA cinetoplástico y nuclear (Chance, Shchroy & Peters, 1974) o el estudio de las isoenzimas (Gardener, Chance & Peters, 1974) que también arrojan resultados taxonómicos de gran valor. Todas estas técnicas, sin embargo, son de resultados tardíos, costosos y escasamente prácticos. Lo ideal es que al lado del diagnóstico clínico, de la aplicación de la prueba de Montenegro y de la confirmación del diagnóstico por la visualización de los parásitos, hecho éste que siempre es posible, la observación cuidadosa de la morfología de los amastigotos pueda informar sobre la identidad de los parásitos.

El hallazgo de Yakimoff (1915), precisando diferencias de tamaño en las leishmanias de casos clínicos de Turkestan y la confirmación de estos mismos resultados por Kellina (1962), sirve de antecedente al trabajo de Shaw & Lainson (1976) quienes aplican los índices morfométricos de tripanosomas al estudio de las leishmanias del Nuevo Mundo. Este último trabajo toma en cuenta parásitos aislados de un reservorio natural, de un vector y de casos clínicos y concluye, señalando específicamente, que el tamaño de los amastigotos y el diámetro del cinetoplasto constituyen caracteres confiables para la separación de los dos complejos de *Leishmania* que producen lesiones clínicas en el Neotrópico; añaden además que las posiciones del núcleo y del cinetoplasto — consideradas secundariamente — también sirven para separar a los dos complejos.

Nosotros hemos estudiado la variabilidad de estos parámetros y de otros índices en cuatro aislados de *L. garnhami* y de *L. braziliensis*, cuando a tales parásitos se les somete a diferentes manipulaciones de laboratorio. De este estudio se deriva, como aportación esencial, que el índice cinetoplástico y la posición relativa de este organelo con respecto al núcleo, es un parámetro relativamente rígido y estable que no se modifica tras cultivar prolongadamente a un aislado dado o subinocularlo sucesivamente en un hospedador susceptible como el hamster.

La distancia del cinetoplasto al extremo posterior de los tripanosomas y la distancia entre este mismo organelo y el núcleo han sido comúnmente utilizadas para diferenciar tripanosomas de mamíferos (Bruce, Hamarton & Bateman, 1909; Hoare & Broom, 1938). Estos índices han sido repetidamente empleados como herramientas morfométricas para caracterizar, por ejemplo, a los tripanosomas que parasitan al hombre en América. Renjifo, Groot & Uribe (1950), Pifano (1954) y Grewal (1956) han usado estos valores para caracterizar al *Trypanosoma rangeli* (1,2-1,7 para el índice cinetoplástico y 1,6-2,0 para el índice nuclear). En el caso de *T. cruzi*, Hoare (1972) transcribe valores de siete referencias de protozoológicos latinoamericanos que calcularon los índices nucleares de parásitos sanguícolas.

En el caso de las *Leishmania* que producen lesiones cutáneas, los parásitos de mayor tamaño, como acontece entre *L. trópica major* y *L. trópica minor*, parecen ser más patógenos que los pequeños (Moskovski & Southgate, 1971). Algo similar acontece con *L. mexicana* y *L. braziliensis* en los hamsteres; la primera produce lesiones hipertróficas con metástasis, en tanto que la *L. braziliensis* provoca pequeñas lesiones nodulares (Lainson & Shaw, 1972). En el caso de *L. garnhami*, la inoculación en el hamster sigue un curso de tipo intermedio con producción de hipertrofias de lento desarrollo y metástasis tardías a los seis meses de evolución (Moreno & Scorza, 1981). En este mismo trabajo, los índices cinetoplásticos de los amastigotos, en siete aislados de *L. garnhami*, van desde 0,81 hasta

1,07 y se sitúan dentro de los cuatro aislados de *L. mexicana amazonensis* a los cuales Shaw & Lainson (1972) asignan valores entre 0,85 y 0,95. Por otra parte los mismos autores dan valores de 0,69 y 0,78 para dos aislados de *L. braziliensis braziliensis*, en tanto que nosotros calculamos valores entre 0,43 y 0,86 para otros dos aislados de *L. braziliensis* del Estado Trujillo; así pues, mientras los valores de los autores británicos diferencian a *L. mexicana amazonensis* de *L. braziliensis braziliensis*, los nuestros también revelan diferencias claras entre *L. garnhami* y *L. braziliensis* de la región de los Andes de Venezuela y son sensiblemente inferiores a los de los aislados brasileños. En todo caso, los cinetoplastos de los aislados brasileños y venezolanos de *L. braziliensis* se sitúan posteriormente en los amastigotos con respecto a la posición más anterior de los aislados de *L. mexicana amazonensis* y *L. garnhami*. Para efectos prácticos, los amastigotos de *L. garnhami* y de *L. mexicana amazonensis* se diferencian de los de *L. braziliensis* por la posición relativa de los cinetoplastos en los estadios amastigotos y esta diferencia permite distinguir parásitos que producen lesiones mucoso-cutáneas, de otros que tan solo afectan a la piel, como las lesiones producidas por *L. garnhami* o por *L. mexicana amazonensis*.

En conclusión, podemos afirmar que los amastigotos de aislados de *L. garnhami* del Estado Mérida y de *L. braziliensis* del Estado Trujillo, poseen índices cinetoplásticos que poco o nada se modifican en el curso del mantenimiento de tales parásitos en condiciones de laboratorio; que existen diferencias significativas entre estos índices para ambas especies y que esas diferencias son comparables a las que se hallan entre aislados de *L. mexicana amazonensis* y *L. braziliensis braziliensis* de Brasil. Los resultados acá descritos permiten diferenciar, a nivel de microscopía de luz, amastigotos de *Leishmania* spp. que producen cuadros clínicos diferentes, señalando su utilidad para el diagnóstico diferencial de parásitos que producen lesiones relativamente benignas como *L. garnhami* (Valera, Moreno & Scorza, 1978; Scorza et al, 1979).

#### AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su reconocimiento a las siguientes personas que hicieron posible la realización de este trabajo: Pablo Macías, M.D.; Ernesto Rodríguez, M.Sc., Jerry Burguera del Centro de Computación de la U.L.A.; al Lcdo. Elio Moreno y a Manuel Valera M.D. A la Srta. Leyla Abchi por su ayuda en la preparación del manuscrito.

#### SUMMARY

Morphometric studies on amastigotes of eighteen populations from four isolates of two species of Venezuelan *Leishmania* (*L. braziliensis* and *L. garnhami*) indicate that the position of the kinetoplast is not significantly modified when parasites are submitted to passages into hamsters, and culture in NNN medium or infection in a vector (*Lu. townsendi*). The location of the kinetoplast measured as the distance from the posterior end of the amastigote to the kinetoplast divided by the distance of the same organoid to the anterior end of the amastigote allows to differentiate *L. braziliensis* from *L. mexicana* and *L. garnhami*. Other morphometric parameters are not so confiable.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADLER, S.; FONER, A. & MONTIGLIO, B., 1966. The relationship between human and animal strains of *Leishmania* from the Sudan. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 60 :380-386.
- BRUCE, D.; HAMARTON, A.E. & BATEMAN, H.R., 1909. A trypanosome from Zanzibar. *Proc. Roy. Soc.*, 81 :14-26.
- CHANCE, M.L.; SHCHORRY, L. & PETERS, W., 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 68 :307-316.



- GARDENER, 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.
- GARDENER, P.J.; SHCHORRY, L. & CHANCE, M.L., 1976. Species differentiation in the genus *Leishmania* by morphometric studies with the electron microscope. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 71 :147-155.
- GARNHAM, P.C.C., 1965. The leishmanias, with special reference to the role of animal reservoirs. *Am. Zool.*, 5 :141-151.
- GREWAL, M.S., 1956. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in its vertebrate and invertebrate hosts. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 50 :301-316.
- HOARE, C., 1972. The trypanosomes of mammals. Blackwell Sci. Publ. Oxford – Edinburg, 749 pp.
- HOARE, C.A. & BROOM, J.C., 1938. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. IV. Biometrical study of the relationship between *Trypanosoma uniforme* and *T. vivax*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 31 :517-534.
- HOMMEL, M., 1978. The genus *Leishmania*: biology of the parasites and clinical aspects. *Bull. L'Inst. Pasteur*, 76 :5-102.
- KELLINA, O.I., 1962. Sobre las dimensiones de *Leishmania trópica major* y *Leishmania trópica minor*. *Med. Paraz. i Parazit. Bol.*, 31 :716-718 (En ruso).
- LAINSON, R. & SHAW, J.J., 1972. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. *Brit. Med. Bull.*, 28 :44-48.
- MORENO, E. & SCORZA, J.V., 1981. Comportamiento *in vivo* e *in vitro* de siete aislados de *Leishmania garnhami* del occidente de Venezuela. *Bol. Dir. Malar. y Saneam. Amb.*, en prensa.
- MOSKOVSKY, S.D. & SOUTHGATE, B.A., 1971. Clinical aspects of leishmaniasis with special references to the URSS. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 44 :491-497.
- PIFANO, F., 1954. Nueva trypanosomiasis humana de la región neotropical producida por el *Trypanosoma rangeli*, con especial referencia a Venezuela. *Arch. Venez. Patol. Trop. y Parasit. Med.*, 2 :89.
- RENJIFO, S.; GROOT, H. & URIBE, C., 1950. Contribución al estudio de tripanosomas humanos y animales en Colombia. I. Tripanosomas humanos. *Rev. Hig. (Bogotá)*, 24 :4-19.
- SAF'JANOVA, V.M. & ALIEV, E.I., 1973. Comparative study of biological characteristics of the causal agents of zoonotic and anthroponotic cutaneous leishmaniasis in the URSS. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 43 :499-506.
- SCHNUR, L.F.; ZUCKERMAN, A. & GREEBLATT, C.L., 1972. Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted *in vitro* and *in vivo*. *Israel J. Med. Sci.*, 8 :932-942.
- SCORZA, J.V.; VALERA, M.; DE SCORZA, C.; CARNEVALI, M.; MORENO, E. & LUGO, A., 1979. A new species of *Leishmania* parasite from the Venezuelan Andes region. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 73 :293-298.
- 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.
- VALERA, M.; MORENO, E. & SCORZA, J.V., 1978. Cuarenta y seis casos de leishmaniasis tegumentaria en la cuenca de los ríos Chama-Mocoties (Estado Mérida, Venezuela) *Bol. Dir. Malar. y San. Amb.*, 18 :238-247.
- WILLIAMS, P. & COELHO, M. de V., 1978. Taxonomy and transmission of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.*, 16 :1-42.
- YAKIMOFF, W.L., 1915. Contribution a l'étude des leishmanioses de l'homme et du chien dans le Turkestan russe. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 8 :474-503.
- ZUCKERMAN, A. & LAINSON, R., 1977. *Leishmania*. En *Protozoa of Veterinary and Medical Interest*. Ed. por J.P. Kriev. Acad. Press. New York – London.