

FACTORES DERMICOS QUE CONDICIONAN LA
INFECCION DE *LUTZOMYIA TOWNSENDI* —
(ORTIZ, 1959) POR *LEISHMANIA* SPP. DE VENEZUELA

MARITZA CARNEVALI *
J.V. SCORZA **

Se estudia la susceptibilidad de Lutzomyia townsendi a la infección con Leishmania spp. sobre lesiones experimentales de hamsteres. Se estudia la frecuencia y distribución de los amastigotos en la dermis, relacionándola con la profundidad que alcanza el estilete bucal del insecto. Una correlación positiva, con significativo coeficiente de correlación, se establece entre la frecuencia de los parásitos a una profundidad de 100-150 nm en la dermis y el éxito de la infección de los flebótomos.

En la Región Neotropical es bien conocida la alta susceptibilidad de flebótomos antropofílicos a la infección con cepas de *Leishmania spp.* de América. En México, Biagi, Biagi & Beltran (1965) lograron la transmisión de *Leishmania mexicana* por la *Lutzomyia flaviscutellata* y Williams (1966) logró también la transmisión de otra cepa de *L. mexicana* de Honduras Británica por la *Lu. cruciata*. En Brasil Coelho & Falcão (1962) transmitieron experimentalmente a la misma especie de parásito por la picadura de *Lu. longipalpis* y de *Lu. renei*.

La posibilidad de infectar diferentes especies de *Lutzomyia* de una misma localidad con especies de leishmanias fue comprobada por Hertig & McConnel (1963) y seguidamente Coelho (1964) la confirmó parcialmente al infectar *Lu. longipalpis* y *Lu. renei* con una cepa de *L. mexicana* procedente de Honduras Británica y otra de un caso de leishmaniasis difusa del estado de Bahia, en Brasil.

Se tiene la experiencia de que aún cuando se ingurgiten flebótomos sobre lesiones de hamsteres o de otros mamíferos intensamente infectados con amastigotos de *Leishmania*, no todos los insectos se infectan. Mas aún, alimentándolos artificialmente con promas-

*Facultad de Farmacia. ULA – Mérida – Venezuela.

**Facultad de Ciencias. ULA – Mérida – Venezuela.

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.

Recibido para publicación en 8 de Diciembre y acepto en 12 de Abril de 1982.

tigotos de varias cepas de *L. braziliensis* aisladas de pacientes de Panamá o de *Proechimys semispinosus panamensis*, cultivados en NNN, Hertig & McConnell (1963) lograron un máximo de 95% de infección en *L. panamensis* y un promedio de 81% de otras cinco especies de *Lutzomyia*.

La ingurgitación de *Lu. longipalpis* sobre lesiones de hamsteres infectados con *L. mexicana amazonensis* e incubados a diferentes temperaturas cercanas a la del ambiente, producen un máximo de 75% de infecciones a 25°C (Leaney, 1977). La circunstancia de que no todos los flebotomos se infectan cuando son alimentados sobre una fuente segura de infección, ha dado lugar a especulaciones sobre una innata insusceptibilidad de ciertos individuos de una población de flebotomos, la cual podría atribuirse a diferencias genéticamente controladas (Killick-Kendrick, 1979).

Lewis (1975) ha relacionado la morfología y tamaño de las piezas bucales de los flebotomos americanos con la habilidad de los insectos para picar a vertebrados terrestres y particularmente a los mamíferos y ha establecido cinco clases que toman en cuenta el número de dientes maxilares, la longitud del labro y la estructura de la hipofaringe.

En la región de los Andes venezolanos, donde la leishmaniasis cutánea es endémica, se han reconocido nueve especies de *Lutzomyia* antropófilas; entre éstas *Lu. panamensis* ha sido comprobada como transmisora en Venezuela (Pifano et al, 1959) y la *Lu. townsendi*, que ha sido hallada por Calderon (1973) en una zona endémica del Estado Mérida de la misma región, es susceptible de infectarse con *L. garnhami*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Scorza, 1981).

En esta misma región de los Andes, *Lu. panamensis* aparece en áreas de baja altitud, por debajo de 600 mts, mientras que *Lu. townsendi* predomina por encima de los 800 mts y su presencia aumenta con la altitud hasta los 1.700 mts (Mogollon, Manzanilla & Scorza, 1977). De otras localidades en donde tales especies existen predominantemente, hemos estudiado pacientes con lesiones cutáneas y de ellos se han aislado cepas de parásitos identificadas como *L. garnhami* y *L. braziliensis* que se mantienen en hamsteres por inoculación de los tarsos posteriores. En las mismas localidades de donde proceden los casos clínicos, hemos estudiado también la composición de la flebotomofauna antropófila.

Siendo más factible la infección experimental de *Lu. townsendi* con parásitos en hamsteres, nos hemos propuesto investigar si existe relación alguna entre la densidad y distribución de los amastigotos en las lesiones con *Leishmania spp.* y el porcentaje de flebotomos que se infectan tras ingurgitarse sobre esas lesiones, tomando como punto de partida a la profundidad de la penetración del estilete de esta especie cuando pica al hamster, incorporando al modelo una cepa de *Leishmania mexicana amazonensis* aislada por Pifano, Romero & Alvarez (1973) de *Lu. flaviscutellata* naturalmente infectadas.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de parásitos, su procedencia e identificación.

L. braziliensis: dos aislados "LA" y "EAA", obtenidos de dos mujeres radicadas en el Distrito Trujillo del Estado Trujillo; la primera en la propia ciudad de Trujillo a 720 m.s.n.m., donde contrajo la infección en Abril de 1978 y presentó una lesión en brazo izquierdo con dos meses de evolución, la segunda de la localidad de San Lázaro, próxima a la ciudad de Trujillo, a 810 m.s.n.m., quien presentó en Junio de 1978 una lesión en la pierna derecha con cinco meses de evolución. Ambos aislados fueron obtenidos por inoculación subcutánea de material biopsico de las lesiones, como triturado, en las patas posteriores de hamsteres. Ambas cepas evolucionaron experimentalmente en *Lu. townsendi* con el patrón de desarrollo característico de la *L. braziliensis* (Scorza & Macias, 1981).

L. garnhami: dos aislados, "G.V." y "J.D.V." obtenidos de pacientes radicados en los distritos Pinto Salinas y Tovar del Estado Mérida. El primero procedente de Mesa Bolívar, a 900 m.s.n.m., presentó a fines de Febrero de 1976 dos lesiones en el miembro superior derecho con mes y medio de evolución y mostró parásitos con el liposoma característico de la *L. garnhami*. La segunda, proveniente de "Las Cuchillas de las Guacas" a 1200 m.s.n.m., con lesión en la pierna derecha a fines de Marzo de 1980, de cuatro meses de evolución, mostró también parásitos con las características de *L. garnhami*. Los aislados fueron mantenidos similarmente por inoculación y pasajes seriados en hamsteres. Ambas cepas exhiben en *Lu. townsendi* un patrón de desarrollo del tipo peripilórico.

L. mexicana amazonensis: aislada por Pifano, Romero & Alvarez (1973) de un lote de *Lu. flaviscutellata* de la Sierra de la Parima, al sur de Venezuela, cuyo triturado fue inyectado subcutáneamente en el hocico y región supracaudal de dos hamsteres que tres meses más tarde presentaron lesiones con abundantes amastigotos. El desarrollo de este aislado en *Lu. townsendi* corresponde al tipo suprapilórico con nectomonas y haptomonas en la faringe y sin colonización pilórica.

Captura y mantenimiento de Lu. townsendi en condiciones de laboratorio

Lu. townsendi hembras provinieron de los estados Trujillo y Mérida. En el primero, para el trabajo experimental, fueron capturadas por atracción con una trampa de Shannon provista con cebo luminoso fluorescente, en la localidad de Calderas, no endémica para leishmaniasis, a 16 km de la ciudad capital de Trujillo y a 1350 m.s.n.m.

Los insectos fueron manipulados, como se describe en el trabajo de Lugo-Yarbuh & Scorza (1981). En el Estado Mérida fueron capturadas, en la aldea "Santo Domingo" próxima a Mesa Bolívar, en sitios a 650 y 1230 m.s.n.m., también por atracción con trampa Shannon con cebo luminoso.

Morfometría del aparato bucal de Lu. townsendi hembras

Hembras de una o otra localidades en los estados Trujillo y Mérida fueron montadas en fresco con solución salina tras separarles la cabeza y disecarles con agujas entomológicas 000, el labio, el labro y las maxilas. Otras hembras fueron montadas con goma de Berlesse tras clarificarles con potasa al 10% y lactofenol. En ambos casos se midieron las longitudes del labro y del área serrada por los dientes internos de las maxilas, que se expresó como "profundidad dental"; también se contaron los dientes laterales externos en el extremo de las maxilas y a los internos de las mismas. Las mediciones se hicieron con un ocular calibrado y bajo aumento de 100 y 450X.

Estudio de la penetración de los estiletes bucales de Lu. townsendi en la piel de hamsteres infectados con Leishmania spp.

La técnica de alimentación de flebótomos sobre hamsteres ha sido descrita en otro trabajo (Lugo-Yarbuh & Scorza, 1981). Brevemente, los hamsteres con lesiones fueron anestesiados con Nembutal y toda la pata lesionada fue introducida, en un frasco con 50 flebótomos, durante 5 minutos y en la oscuridad. Una vez ingurgitados, se separó a los insectos para alimentarlos hasta el quinto día con sacarosa al 50%. La pata expuesta fue examinada para localizar el área con el mayor número de puntos hemorrágicos y se la disecó para fijarla en formaldehído al 10% durante 48 horas. Tiras de piel hasta de 15 mm de longitud fueron congeladas con nitrógeno líquido y cortadas en un criostato para preparar secciones seriadas de 5–6 μ m, transversales, que se colorearon con Giemsa al 5% en tampón de fosfato a pH 7,2 M/200 durante dos horas; se deshidrataron con acetona hasta xilol y se montaron con DPX. Se las estudió para localizar los sitios donde picaron los flebótomos mediante la búsqueda de microfocos hemorrágicos subepidérmicos.

Se midió la profundidad y tamaño de los focos hemorrágicos con relación a la epidermis y se observó la distribución de los parásitos en relación con tales lesiones.

Relación entre la distribución y densidad de los amastigotos en la piel con el porcentaje de flebótomos que se infectan

Utilizamos cinco hamsteres inoculados subcutáneamente, cada uno, en la cara dorsal de los tarsos, con no menos de 100.000 amastigotos de una de las cinco cepas de *Leishmania*. Se permitió el desarrollo de las lesiones hasta la aparición de una hipertrofia tarsal de 8-9 mm de diámetro, ulcerada o no. Sobre la pata infectada de cada hamster permitimos la ingurgitación de 50 hembras de *Lu. townsendi* que luego de picar en su mayoría, fueron mantenidas a 22°C y 85% H.R., dentro de envases cilíndricos revestidos internamente por una delgada lámina de corcho y colocados dentro de cavas de plástico isoporo; alimentamos los insectos adicionalmente con solución de sacarosa al 50%. Cinco días después de la ingesta infectante, se disecó a las hembras ovígeras que presumiblemente, por ello, habían ingerido sangre y se precisó la presencia de haptomonas en la faringe (válvula estomodeal), en el píloro o triángulo posterior o en ambos órganos, según el tipo de desarrollo del parásito. Se estimó así el porcentaje de flebótomos infectados a partir del número de los que habían ingerido sangre.

Inmediatamente después de la ingurgitación de los flebótomos, se sacrificaron los hamsteres por sobreenestesia con éter, para disecarles la piel de los tarsos infectados que había sido expuesta a la picadura de los insectos.

Tiras de piel de 8 hasta 15 mm de largo fueron cortadas en sentido transversal a 5 mm de espesor y coloreadas con Giemsa para destacar los cinetoplastos y núcleos de los amastigotos. La extensión de la sección fue dibujada esquemáticamente para precisar cinco hasta diez sitios equidistantes en donde se contaron los amastigotos. Con ayuda de una retícula ocular que permitió delimitar un área cuadrangular de 50 mm (2500 mm²) se contaron los parásitos observables en tres profundidades sucesivas de 50-100 mm, 100-150 mm; se estimó el porcentaje de parásitos presentes en cada nivel y en cada área de 2500 mm², para sumarlos con los hallados en los distintos niveles equidistantes y de la suma total, a cada profundidad, se calculó el porcentaje respectivo. Seguidamente y tomando en cuenta que los flebótomos ingieren sangre entre 100 y 150 mm de profundidad, medidos a partir de la capa córnea, se contó el número de amastigotos por área de 2500 mm² (campos rectangulares) en no menos de 30 campos a lo largo de la dermis superficial para estimar la frecuencia de parásitos en la dermis a las profundidades de 50-100 mm y de 100-150 mm.; a esas profundidades como los porcentajes de cuadraditos que muestran parásitos con respecto al número total de cuadrados examinados, y también a la densidad de parásitos por área, como el número promedio de parásitos por áreas parasitadas de 2500 mm².

Estudio de las relaciones entre la frecuencia y la abundancia de los amastigotos en la dermis y la infección de los flebótomos

Patas posteriores de hamsteres machos mostrando lesiones hipertróficas hasta de 9,0 mm de diámetro producidas por cada una de las cinco cepas de *Leishmania* spp, fueron expuestas a lotes de 50 hembras de *Lu. townsendi* para dejarlas ingurgitar. Los roedores fueron sacrificados para el estudio de la distribución de parásitos en las lesiones y los flebótomos fueron disecados cinco días después para precisar el número de los infectados con cada cepa. La técnica de la disección es la convencional; los flebótomos se anestesiaron con cloroformo para ser volcados en solución salina con Tritón x-100 1:10.000. Después de agitados para desprenderles las escamas, se enjuagaron con solución salina y se di-

secaron bajo la lupa binocular (20X a 50X) para separar la cabeza con un fragmento de esófago y extraer el estómago e intestino posterior, incluidos los tubos de Malpighio.

Xenodiagnósticos con Lu. townsendi en hamsteres infectados con Leishmania spp.

Las distintas cepas de parásitos utilizadas en este trabajo, con excepción de la mas reciente (J.D.V.), han sido repetidas veces expuestas como lesiones tarsales en hamsteres, a la picadura de lotes de 20–25 flebótomos (*Lu. townsendi*) para determinar el número de insectos que, habiéndose ingurgitado, presentaban parásitos con desarrollo suprapilórico o peripilórico según la especie del parásito.

RESULTADOS

En la Fig. 1 mostramos las localidades de donde proceden los casos de leishmaniasis en la región de los Andes, la cepa de *Leishmania mexicana amazonensis* y las colecciones de *Lu. townsendi*.

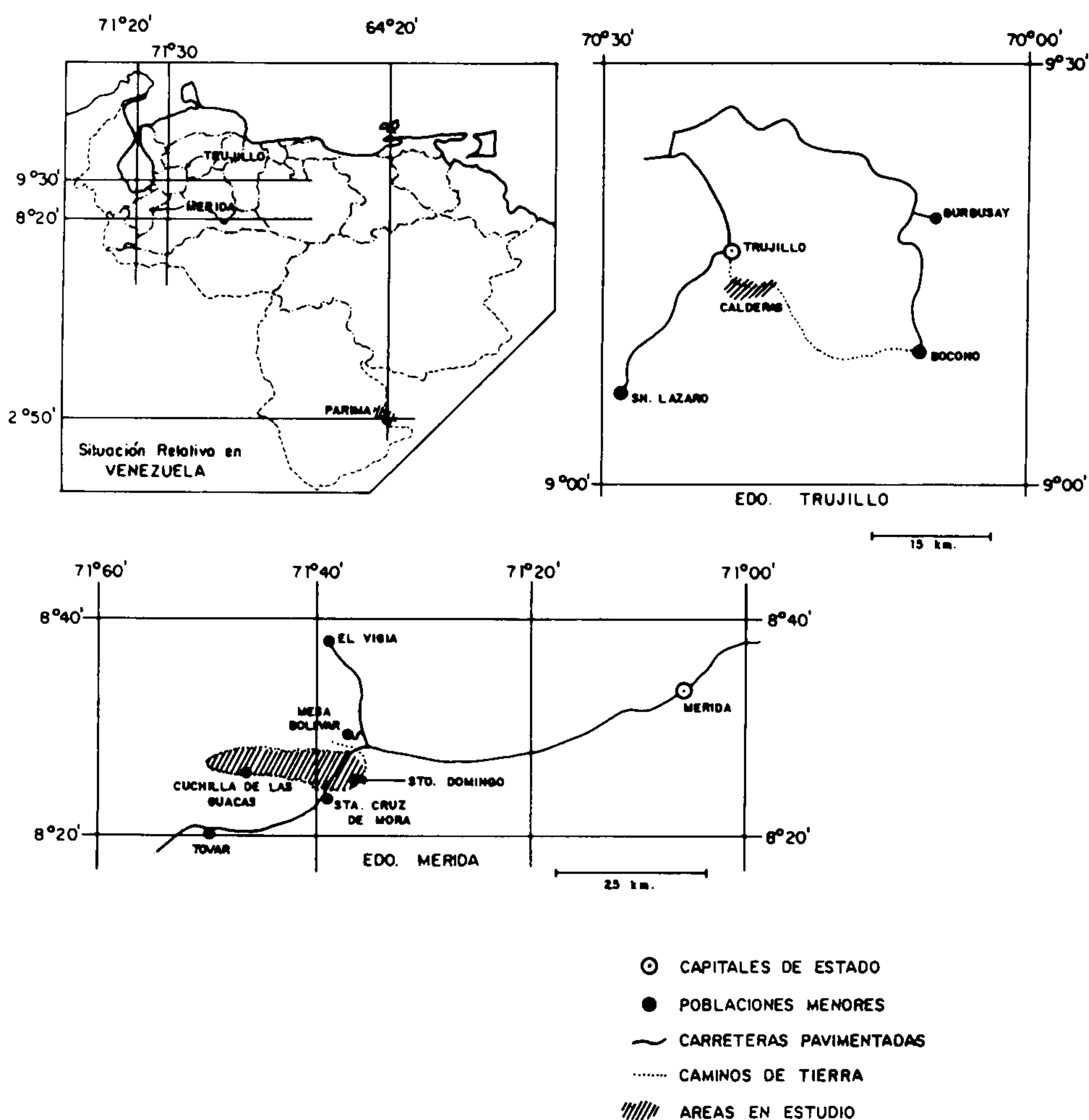


Fig. 1 – Ubicación relativa de las localidades citadas en este trabajo.

Se hicieron capturas de flebótomos en dos sitios del caserío Sto. Domingo, con altitudes de 550 y 1350 m.s.n.m. respectivamente, donde han aparecido, durante 1980, veintiun casos activos de leishmaniasis cutánea en una población de 396 habitantes. La composición de la flebotomofauna atraída hacia la trampa de Shannon, en el mes de Enero de 1980, cuando comenzaron a aparecer los primeros casos activos para ese año, se presenta en el Cuadro I.

CUADRO I

Composición de la flebotomofauna antropofílica atraída por la trampa de Shannon en dos sitios de la localidad endémica de Santo Domingo

Altitudes de los sitios y cantidades de ejemplares capturados

<i>Altitudes m.s.n.m.</i>	550		1350	
<i>L. townsendi</i>	354	99,16%	1.104	100%
<i>L. ovallesi</i>	3	0,84%	—	—
<i>Totales</i>	357	100%	1.104	100%

El estudio morfométrico de las piezas bucales de 20 hembras de *Lu. townsendi* arroja los siguientes valores: $359,0 \pm 15,2$ nm para la longitud del labro, $119,4 \pm 6,6$ nm para la profundidad dental de la maxila, $25,7 \pm 2,4$ dientes internos y $6,1 \pm 0,4$ dientes terminales externos en los mismos apéndices (Fig. 2).

El estudio de secciones seriadas de la piel del dorso de los tarsos de hamsteres infectados con *L. garnhami* (G.V.) reveló la presencia de varios focos hemorrágicos producidos por las picaduras de *Lu. townsendi* durante la ingurgitación. Durante la hematofagia, el insecto penetra la epidermis con el estilete mediante rápidos movimientos similares a los de una máquina de coser, delaminando la capa córnea mas externa, levantando una masa de queratina que aparece por debajo del labio como un grumo amorfo (Fig. 3). La sección transversal de la piel, a ese nivel exhibe un profundo surco de penetración y desde luego, la capa córnea levantada (Fig. 4); inmediatamente por debajo de la capa basal y entre las 100 y 150 nm de profundidad, sangre extravasada formando diminutos pocitos (Fig. 5). El estudio de la profundidad media de diez "pozos" o puntos hemorrágicos revela que ellos se producen a una media de \bar{x} : $132,8 \pm 16,3$ nm con valores extremos comprendidos entre 104 y 158 nm. Esta medida sugiere que *Lu. townsendi* penetra el estilete bucal hasta un 10% más de la longitud total del borde serrado interno y que al hacerlo, atraviesa el espesor de la epidermis del tarso que tiene una media de 50 nm de espesor. El movimiento de las maxilas en forma de tijeras, descrito por Lewis (1975), rompe los pequeños vasos de la dermis superficial y otras células de la dermis. En la Fig. 6 mostramos un macrófago conteniendo por lo menos nueve amastigotos de *L. garnhami* dentro de una vacuola y a esta célula fagocítica parasitada, rodeada por eritrocitos.

El estudio de secciones de piel de cinco hamsteres infectados con cinco aislados de *Leishmania spp.* revela, a la luz de la información obtenida anteriormente, datos que permiten relacionar a la distribución y frecuencia de los amastigotos en la dermis, con el éxito de la infección de los flebótomos que sobre esa piel se alimentan.

Estas observaciones revelan que *Lu. townsendi* penetra la piel con el estilete bucal hasta 130 nm de profundidad y que es, a ese nivel, de donde ingiere la sangre y parásitos que eventualmente se hallan presentes.

En el Cuadro II presentamos los resultados del recuento de amastigotos para la estimación del porcentaje de los mismos desde las 50 hasta las 200 nm, de su frecuencia

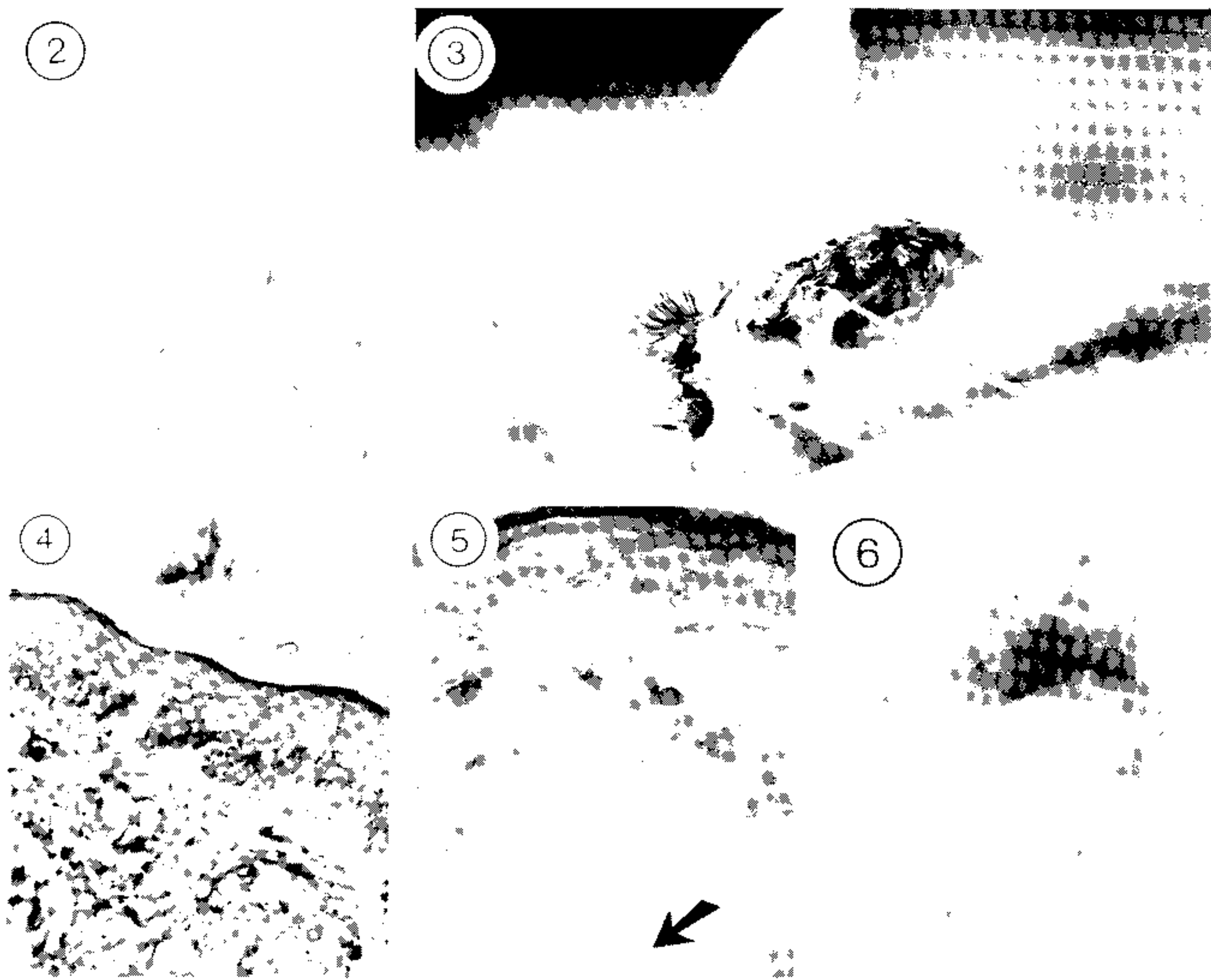


Fig. 2 – Maxila de *Lu. townsendi* mostrando los dientes internos y externos. 300X.

Fig. 3 – Hembra de *Lu. townsendi* alimentándose sobre piel humana. Nótese la masa de material queratinizado en el estilete. 80X.

Fig. 4 – Sección de piel de hamster picado por *Lu. townsendi* mostrando el surco de penetración del estilete y grumos de queratina en la porción superior de la epidermis. 600X.

Fig. 5 – Sección de piel de hamster infectado con *Leishmania garnhami* que fue picado por *Lu. townsendi* mostrando un foco hemorrágico dérmico con eritrocitos y macrófagos infectados (flecha) 1200X.

Fig. 6 – Detalle de la figura anterior mostrando un macrófago con varios amastigotos de *Leishmania garnhami*. 6000X.

en la dermis a 50–100 nm y 100–150 nm, sus densidades por áreas de 2.500 nm² y el porcentaje de flebótomos que se infectaron en cada caso.

El estudio revela un comportamiento similar para todas las cepas de parásitos que comprenden tres especies. En general, el número de amastigotos va aumentando con la profundidad de la dermis; entre 50 y 100 nm se hallan desde un 10,8 hasta un 21,4% de los observados a tres niveles de profundidad hasta las 200 nm. Entre 100 y 150 nm, sitio donde suele penetrar el estilete bucal de *Lu. townsendi*, se hallan desde un 32,8 hasta un 45,9% de los amastigotos y entre 150 y 200 nm, no menos del 40,7%. La frecuencia de parásitos en la dermis, a nivel de 50–100 nm es superior al 50% y también lo es a nivel de 100–150 nm. Las densidades oscilan entre 3 y 11 para 50–100 nm y entre 3 y 17 para 100 y 150 nm. La densidad de amastigotos de *L. mexicana amazonensis* parece baja si se toma en cuenta que esta especie tiende a producir grandes hipertrofias tarsales; debe con-

siderarse, sin embargo, que habiéndose seleccionado lesiones de tamaños comparables, la producida por esta especie de *Leishmania* apenas tenía 20 días de evolución, comparada con las de las otras cepas que tenían más de 60 días.

CUADRO II

Relacion entre la densidad y distribución de los amastigotos en piel de hamsteres infectados con *Leishmania* spp. Y el porcentaje de *Lu. townsendi* que se infectan

Cepa de parásito	% de amastigotos en piel a:			Frecuencia de amastigotos a profundidad dérmica de:		% de flebótomos infectados/número de expuestos	% de flebótomos infectados en otros xenodiagnósticos	Parásitos por campo a:	
	100	150	200 nm	50 100 nm.	100 150 nm.			50 100 nm.	100 150 nm.
<i>L. mexicana amazonensis</i>	16,5	35,5	48,0	53,3	76,4	38,5/39	48,6/52	2,6	6,9
<i>L. braziliensis</i> (E.A.A.) 810 m.	12,7	45,9	41,5	80,0	85,6	52,3/21	31,3/118	10,5	17,2
<i>L. braziliensis</i> (L.A.) 700 m.	21,4	35,5	44,2	83,1	48,0	25,0/16	37,0/86	8,3	6,3
<i>L. garnhami</i> (J.D.V.) 450 m.	10,8	32,8	56,4	50,0	47,7	20,0/25	—	4,20	4,23
<i>L. garnhami</i> (G.V.) 900m.	20,7	38,6	40,7	72,5	50,7	33,3/27	35,7/138	2,97	2,94

Los porcentajes de flebótomos infectados sobre las pieles de esos mismos animales fueron siempre superiores al 20%, llegando hasta un 52,3% como los que se alimentaron sobre el hamster infectado con la cepa E.A.A. de *L. braziliensis*, que por cierto fue la que exhibió la mas alta frecuencia de parásitos dérmicos (85,6%) y la mayor densidad parasitaria (17,2). El hallazgo de esta relación, al compararla con los resultados obtenidos con la cepa J.D.V. de *L. garnhami*, con baja frecuencia de amastigotos, también relativamente baja densidad de parásitos y bajo porcentaje de flebótomos, nos planteó la posibilidad de un análisis de correlación entre el porcentaje de flebótomos que se infectan, como variable independiente, y los porcentajes de amastigotos a profundidad de 100–150 nm por una parte, la frecuencia de amastigotos en la dermis a ese mismo nivel y la densidad parasitaria por la otra.

Los resultados de los análisis de regresión se muestran en el Cuadro III. El mayor coeficiente de correlación (0,92) se obtuvo entre el porcentaje de flebótomos que se infectan y la frecuencia de los amastigotos en la dermis a una profundidad entre 100 y 150 nm. Un coeficiente similar se obtuvo al comparar el éxito de la infección de los insectos con el porcentaje de amastigotos que se hallan a ese mismo nivel, comparado con los que se observan entre 50 y 100 nm o entre 150 y 200 nm, profundidades que son sobrepasadas o no alcanzadas, respectivamente, por el estilete bucal de la *Lu. townsendi*. El mas bajo coeficiente de correlación y no por ello descartable, se obtuvo al comparar el éxito de la infección por *Lu. townsendi* y la densidad de parásitos a nivel de 100 y 150 nm de la dermis.

Estas relaciones, en conjunto, indican claramente que el éxito de la infección de flebótomos, en este caso *Lu. townsendi*, está directamente relacionada con la frecuencia y densidad de los amastigotos que se localizan entre 100 y 150 nm de profundidad de la piel.

Apenas hemos examinado secciones de piel infectada de 5–6 nm de espesor y considerando que el tamaño de los puntos hemorrágicos es un poco mayor de 50 nm de diámetro, con forma casi esférica, es probable que haya lugar alguno sin parásitos en la

dermis de los animales infectados. Es importante señalar que la inoculación de los parásitos se hizo en la cara dorsal del tarso y que las tiras de piel fueron sacadas de las áreas donde se observó al mayor número de puntos hemorrágicos. Esto deja dudas de que, por ejemplo, en la cara plantar de los tarsos pueda haber menos número de parásitos o ser éstos menos frecuentes. En todo caso, hay desde un 17 hasta un 50%, para el nivel mas superficial de la dermis y entre un 82 hasta un 14%, de áreas "profundas" de 2.500 nm², donde no fue posible observar parásitos. El tamaño del punto hemorrágico es considerablemente menor, en cuanto a volumen se refiere, al de la cantidad de sangre que pudiera ingerir el insecto. Según Adler & Theodor (1927) el peso de la sangre ingerida por *Phlebotomus papatasi* es de 0,1 mg., volumen aproximadamente 80 veces mayor que el del foco hemorrágico. Esto sugiere que *Lu. townsendi* probablemente ingiere mucho más sangre que la que se encuentra extravasada en el sitio de la picadura y que la cantidad de tejidos dérmicos ingeridos sea mucho menor que el tamaño que sugiere el foco hemorrágico. El gran volumen de sangre que ingiere el flebótomo no se explica sino por una activísima succión; el tamaño del foco hemorrágico puede deberse a la presión sanguínea una vez que el insecto se ha ingurgitado completamente. Observaciones hechas con nuestra misma especie de flebótomo, examinando extendidos de la sangre ingerida una o dos horas antes, después de picar a un hamster infectado con una cepa de *L. garnhami* con gran número de parásitos, revelan que menos del 40% de los insectos no ingieren parásitos en cantidades suficientes como para ser detectados tras un examen cuidadoso y prolongado; el número de amastigotos hallados nunca sobrepasa a la veintena. Todo lo expuesto sugiere una distribución no agregada de los parásitos en la dermis y la existencia de sitios sin parásitos o con una bajísima densidad no suficiente para promover una infección en los flebótomos que de tales sitios se ingurgitan. Nuestros resultados sugieren, por otra parte, y a nivel de 100-150 nm., que densidades tan bajas como 4,23 y 2,94 con también frecuencias no mayores del 50% no permiten infecciones mayores del 33% de los insectos que se ingurgitan. En cambio, densidades tan altas como 17,2 y frecuencias de 86% permiten la infección de mas del 50% de los insectos a ese mismo nivel.

CUADRO III

Análisis de regresión y coeficientes de correlación entre el porcentaje de flebótomos infectados (x) y las variables dadas por los números de amastigotos en la dermis

X	Y ₁	Y ₂	Y ₃
38,5	35,5	76,4	6,9
52,3	45,9	85,6	17,2
25,0	35,5	48,0	6,3
20,0	32,8	47,7	4,2
33,0	38,6	50,7	2,9

$Y_1 = -50,5 + 2,24 x$ $r = 0,90$
 $Y_2 = -6,05 + 0,65 x$ $r = 0,92$
 $Y_3 = 19,84 + 1,85 x$ $r = 0,83$

Y₁ = porcentaje de los amastigotos hallados entre 100 y 150 nm de profundidad dérmica.

Y₂ = frecuencia de los amastigotos a nivel de 100 y 150 nm de la dermis.

Y₃ = media de parásitos dérmicos en 2.500nm² entre 100 y 150 nm de profundidad dérmica.

Los porcentajes de infección de los flebótomos alimentados sobre las lesiones en estudio no son muy diferentes de los que se obtienen en xenodiagnósticos hechos sobre todos hamsteres infectados con las mismas cepas o especies de parásitos. Los mas altos porcentajes se obtienen con *L. mexicana amazonensis* (49%), siendo mas bajos los registrados con *L. braziliensis* y *L. garnhami* (31 hasta 37%). Siendo *L. mexicana* una especie que produce lesiones hipertróficas muy ricas en parásitos y pobres las lesiones de las otras especies, las lecturas de otros xenodiagnósticos hechos con *Lu. townsendi* en otras ocasiones, confirman la apreciación general de que el éxito de la infección de este flebótomo esta determinado por la riqueza y regular distribución de los parásitos en la dermis e la profundidad de 100–150 nm. Densidades menores de 5,0 parásitos por 2.500 nm² y frecuencias también menores de 50%, producen bajos porcentajes de infecciones en este insecto susceptible.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Es bien conocido para la Región Neotrópica, que no todos los flebótomos antropófilos, sean los obtenidos de colonias de laboratorio como los silvestres, se infectan cuando se los alimenta sobre lesiones de hamsteres infectados con aislados de *Leishmania* autóctonas o del Viejo Mundo. Johnson, MacConnell & Hertig (1962) expusieron *Lu. sanguinaria* y *Lu. gomezi* a la infección con cepas de *Leishmania* de Guatemala, Panamá y Perú, registrando infecciones en aproximadamente un tercio de los insectos ingurgitados. Esta proporción puede elevarse ligeramente cuando se toman medidas para impedir que los insectos se alimenten sobre piel sana (Johnson & Hertig, 1970). En estos casos, empleando las mismas especies de flebótomos cultivados de colonias, los porcentajes pueden alcanzar hasta un 50% y pareciera que de las dos especies de *Lutzomyia*, la *L. gomezi* fuese mas susceptible a la infección que la *L. sanguinaria* cuando se los expone a distintas cepas de *Leishmania* que exhiben desarrollo anterior (*L. mexicana*) e pilórico (*L. braziliensis*).

Con flebótomos capturados en la naturaleza y cepas locales de *L. braziliensis* Coelho, Falcão & Falcão (1967a) obtuvieron porcentajes de infecciones en hamsteres que fueron desde un 100% para *Lu. intermedia* hasta un 43% con *Lu. shannoni*, con valores intermedios de 61% con *L. renei*. Los mismos investigadores brasileños (Coelho, Falcão & Falcão, 1967b) con ejemplares silvestres de dos especies de flebótomos, una local y asociada a las infecciones cutáneas (*Lu. renei*) y otra regional asociada a las infecciones viscerales (*Lu. longipalpis*), encuentran porcentajes de infecciones ligeramente superiores con la *Lu. renei*, especie local, que con *L. longipalpis* cuando ensayan ambas con una cepa dermatopía de *Leishmania*. En cambio, cuando ambas especies de *Lutzomyia* se ensayan contra un parásito exótico (*L. tropica*), la especie que se halla asociada a la transmisión de parásitos dermatopos (*Lu. renei*), arroja un mayor porcentaje de infecciones (78%) que la *Lu. longipalpis* que es el transmisor del parásito que produce infecciones viscerales (Coelho, Falcão & Falcão, 1967c). A juzgar por los datos expuestos, pareciera existir una mayor e intrínseca susceptibilidad a la infección de flebótomos cuando se emplean especies locales en infecciones también con parásitos locales; con los casos de *Lu. intermedia*, *Lu. renei* y *Lu. shannoni* con cepas brasileñas de *Leishmania braziliensis*.

La relación entre los parásitos y los vectores, en cuanto a susceptibilidad a la infección de estos últimos se refiere, podría ser debida también a adaptaciones del aparato bucal para la picadura en los reservorios u hospedadores naturales de los parásitos. Los resultados del modelo que comentamos y que también comparamos con los ensayados por otros investigadores, se basan en la presencia del hamster como hospedador experimental, en este caso el término común, mientras que las diferencias consisten en las especies de parásitos por una parte y de los flebótomos por la otra. En cuanto a los parásitos se refiere, la distribución de los mismos en la dermis parece seguir un patrón general; son mas abundantes en la parte relativamente profunda de la dermis que en la zona inmediata por

debajo de la epidermis. Con respecto a la morfología y el tamaño del estilete bucal, utilizando los valores de Lewis (1975) para las especies de flebótomos que comentamos, se observa que aquellas especies como *Lu. gomezi* y *Lu. intermedia*, que parecen ser más susceptibles a las infecciones con *L. braziliensis* y *L. mexicana* en hamsteres, poseen estiletes de tamaño similar y también parecidas profundidades dentales maxilares, 290 y 90 nm respectivamente para ambas; en cambio especies como *Lu. sanguinaria* y *Lu. shannoni* con relativamente más baja susceptibilidad, poseen más largos estiletes y también más larga profundidad dental (370–350 y 110–110 nm). En nuestro trabajo hallamos correlación con alta significación, solamente, entre el porcentaje de *Lu. townsendi* que se infectan y la frecuencia y densidad del parasitismo dérmico entre las 100 y 150 nm de profundidad; tal correlación no aparece con parásitos más superficiales o más profundos. El éxito de las infecciones apenas alcanza a un 50% como máximo, porcentaje similar a los que se obtienen con flebótomos con morfometría bucal parecida, como son los casos de *Lu. sanguinaria* en Panamá y de *L. shannoni* en Brasil, donde los éxitos de las infecciones con *Leishmania* no alcanzan al 50% de los flebótomos que se ingurgitan sobre la piel infectada.

Si tomamos en cuenta estos factores, podemos especular que aquellas especies antropofílicas con estiletes relativamente cortos, con menos de 300 nm de longitud para el labro y profundidad dental de 90 nm para las maxilas, son más susceptibles a la infección con *leishmania* dermatropas cuando pican a hamsteres infectados, que aquellas otras especies con labros más largos y más grandes profundidades dentales maxilares, habida cuenta de que la frecuencia de amastigotos, a nivel de 50–100 nm parece ser mayor que a 100–150 nm de profundidad.

El número de parásitos que pueda ingerir un flebótomo cuando se alimenta sobre piel infectada con *leishmania*, se ha considerado como un factor condicionante de la susceptibilidad a la infección (Strangways-Dixon & Lainson, 1966). Las evidencias que sobre este fenómeno se poseen provienen de los clásicos experimentos de Adler & Theodor (1927, 1930 y 1939) y de Adler (1947). Deane (1956) se aproximó al estudio de la relación vector-hospedador, a nivel de la piel de este último, en casos clínicos de Kala-azar y perros naturalmente infectados con *L. donovani*, relacionando la distribución de los parásitos en la dermis con la longitud del estilete de *Lu. longipalpis*; desde luego, el autor considera sus observaciones como asunto académico porque en el caso del Kala-azar los parásitos circulan sanguíneamente en monocitos.

Las evidencias que presentamos en este trabajo demuestran que el éxito de la infección de *Lu. townsendi*, un flebótomo antropofílico de las cordilleras andinas de Venezuela, con cepas locales de *Leishmania* en hamsteres, es una función de la frecuencia de los amastigotos a una profundidad de la dermis relacionada con la profundidad dental de las maxilas del estilete bucal y también, aun cuando en menor grado, con la densidad de los parásitos en la dermis. Los resultados indican, además, que la distribución de los parásitos es irregular y que a pesar de la hipertrofia de la lesión y de la aparente riqueza de parásitos, es posible que los insectos, alimentándose sobre el área densamente infectada, puedan picar e ingurgitarse en sitios donde no hay parásitos o su número sea considerablemente bajo. La comparación de *Lu. townsendi* con otras especies de flebótomos antropofílicos del Neotrópico, sugiere que la especie puede ser menos eficiente que otras que poseen el estilete más largo, habida cuenta que en las lesiones experimentales en la piel de hamsteres, los amastigotos son más frecuentes en las zonas más profundas de la dermis.

SUMMARY

The susceptibility of *Lutzomyia townsendi* to infection with amastigotes of *Leishmania* spp. from experimental lesions in hamsters is studied. A good correlation is found when the number of infected sandflies are compared with the distribution and density of parasites in the dermis, taking into account the size of the fascicle, particularly the length of labrum and dental depth in maxillae. Considerations are made on the susceptibilities of some anthropophilic sandflies from America that are considered as good vectors.

AGRADECIMIENTOS

A los técnicos J.C. Márquez, Maritza Rondón y Elex Rondón por su asidua colaboración. Al Sr. J. V. Scorza jr. por su asistencia microtécnica. A la Br. Leyla Abchi por la ayuda en la preparación del manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADLER, S., 1947. The behaviour of a Sudan strain of *Leishmania donovani* in *Phlebotomus papatasi*. A comparison of strains of *Leishmania*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 40 :701-712.
- ADLER, S. & THEODOR, O., 1927. The behaviour of cultures of *Leishmania* sp. in *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 21 :111-134.
- ADLER, S. & THEODOR, O., 1930. Infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead with *Leishmania infantum*. *Nature*, 126 :437.
- ADLER, S. & THEODOR, O., 1939. The behaviour of *Leishmania chagasi* in *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 33 :45-47.
- BIAGI, F.; BIAGI, A.M. & BELTRAN, F., 1965. *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmisor natural de *Leishmania mexicana*. *Prensa Med. Mex.*, 30 :267-272.
- CALDERON, L., 1973. *Phlebotomus townsendi* Ortiz, 1959, en una zona endémica de leishmaniasis tegumentaria del Estado Mérida, Venezuela. *Acta Cient. Venez.*, 24 (Suppl.) :87.
- COELHO, M. de V., 1964. Pesquisas recentes sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Bras. Malariol. & Doenças Trop.*, 16 :13-18.
- COELHO, M. de V. & FALCÃO, A.R., 1962. Transmissão experimental de *Leishmania braziliensis*. II. Transmissão de amostra mexicana por picada de *Phlebotomus longipalpis* & de *Phlebotomus renei*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 4 :220-224.
- COELHO, M. de V.; FALCÃO, A.R. & FALCÃO, A.L., 1967a. Desenvolvimento de especies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebotomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. I. Evolução de *L. braziliensis* em flebotomos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 9 :177-191.
- COELHO, M. de V.; FALCÃO, A.R. & FALCÃO, A.L., 1967b. Desenvolvimento de especies do gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebotomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. III. Ciclo vital de *L. mexicana* em *L. longipalpis* e *L. renei*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 9 :299-303.
- COELHO, M. de V.; FALCÃO, A.R. & FALCÃO, A.L., 1967c. Desenvolvimento de especies de gênero *Leishmania* em espécies brasileiras de flebotomos do gênero *Lutzomyia* França, 1924. II. Ciclo vital de *L. tropica* em *L. longipalpis* e *L. renei*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 9 :192-196.
- DEANE, L. de M., 1956. *Leishmaniose visceral no Brasil*. Serv. Nac. Educação Sanitária, Brasil. Tesis. 162 pp.
- HERTIG, M. & McCONNELL, E., 1963. Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus* sandflies with *Leishmania*. *Exper. Parasit.*, 14 :92-106.
- JOHNSON, P.T. & HERTIG, M., 1970. Behaviour of *Leishmania* in Panamanian phlebotomine sandflies fed on infected animals. *Exper. Parasit.*, 27 :281-300.
- JOHNSON, P.T.; McCONNEL, E. & HERTIG, M., 1962. Natural and experimental infections of leptomonal flagellates in Panamanian *Phlebotomus* sandflies. *J. Parasit.*, 48 :158.
- KILLICK-KENDRICK, R., 1979. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. En *Biology of the Kinetoplastida*, ed. por W.H.R. Lumsden & D.A. Evans. Acad. Press., 396-460 pp.

- LEANNEY, A.J., 1977. The effect of temperature on *Leishmania* in sandflies. *Parasitology*, 75 (2), XXVIII-XXIX.
- LEWIS, D.J., 1975. Functional morphology of the mouth parts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) *Trans. R. ent. Soc. London*, 126 :497-532.
- LUGO-YARBUG, A. & SCORZA, J.V., 1981. Ensayos metodológicos para la investigación de reservorios de *Leishmania* en los Andes venezolanos. En prensa.
- MOGOLLON, J.; MANZANILLA, P. & SCORZA, J.V., 1977. Distribución altitudinal de nueve especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el Estado Trujillo, Venezuela. *Bol. Dir. Malar. y Saneamiento Amb.*, 17 :206-223.
- PIFANO, F.C.; 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.
- PIFANO, F.C.; ROMERO, J. & ALVAREZ, A., 1973. Comprobación de una cepa de *Leishmania* dermatropa en *Phlebotomus flaviscutellata* Mangabeira, 1942 de la Sierra Parima, Territorio Federal Amazonas, Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. y Parasit. Med.*, 5 :145-170.
- SCORZA, J.V., 1981. Rasgos biológicos particulares de la leishmaniasis cutánea en Mérida, Venezuela. *Bol. Salud Pública*, 14: (Nº 43) :40-46.
- SCORZA, J.V. & MACIAS, P., 1981. Identificación del parásito que produce la leishmaniasis cutánea en el Estado Trujillo, Venezuela. En preparación.
- STRANGWAYS-DISON, J. & LAINSON, R., 1966. The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras. Part III. The transmission of *Leishmania mexicana* to man by *Phlebotomus pessoanus*, with observations on the development of the parasite in different species of *Phlebotomus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 60 :192-207.
- WILLIAMS, P., 1966. Experimental transmission of *Leishmania mexicana* by *Lutzomyia cruciata*. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 60 :365-372.