

Aglutinación diferencial de promastigotes de una cepa venezolana de *Leishmania infantum* con lisados de intestino medio de *Lutzomyia evansi* y *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae)

Milagros Oviedo ¹, Gilberto Bastidas ^{1,2}, Claudia M. Sandoval ¹, Alejandra Vivenes ¹, Herminia Ben-dezu ¹

¹Laboratorio Biología de *Lutzomyia* e Insectario "Pablo Anduze", Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba", Universidad de Los Andes, Núcleo Trujillo, Venezuela. ²Departamento Clínico Integral de los Llanos, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo, Venezuela

RESUMEN

Introducción. El parásito *Leishmania sp.* debe adecuarse a las condiciones fisiológicas del tracto digestivo del insecto transmisor, como estrategia para su sobrevivencia y así garantizar posterior transmisión al hospedador vertebrado. La interacción *Leishmania*-vector depende de diversos factores, entre ellos, las aglutininas del tracto digestivo de los flebótomos, involucradas, junto con las moléculas de lipofosfoglicano de la superficie del parásito, en la adhesión de este último al epitelio intestinal del insecto, en donde ambas moléculas están implicadas en la susceptibilidad de las especies de flebótomos a la infección.

Objetivo. Medir y comparar el título de aglutinación entre lisados de intestino medio de *L. longipalpis* y *L. evansi*, silvestres y de colonia, con promastigotes de *L. infantum*.

Materiales y Métodos. La metodología empleada consistió en la evaluación de tres grupos de lisados de intestino medio de hembras de *Lutzomyia*, uno de hembras capturadas en el hábitat silvestre y otros dos de colonia, uno de hembras con 48 horas de tomada la ingesta sanguínea y otro de hembras mantenidas exclusivamente con una dieta azucarada durante 48 horas.

Resultados. Se encuentran distintos títulos de aglutinación entre promastigotes de distintos días de cultivo de *L. infantum* y lisados de intestino

medio de *L. evansi* y *L. longipalpis*. La única especie que registra aglutinación en diluciones de 1:64 es *L. longipalpis*.

Conclusiones. Este estudio evidencia la presencia de aglutininas contra promastigotes de *L. infantum* en poblaciones de hábitat silvestre y de colonia de *L. evansi* y *L. longipalpis*, pero más altos en esta última especie de flebótomos. Títulos de aglutinación que aumentan a medida que lo hace el tiempo de cultivo de los promastigotes de *Leishmania*.

Palabras clave: competencia vectorial, *Lutzomyia longipalpis*, *L. evansi*, aglutininas, leishmaniasis visceral

ABSTRACT

Differential agglutination of promastigotes of *Leishmania infantum* Venezuelan strain with lysates from midgut of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae)

Introduction. The parasite *Leishmania sp.* must adapt the physiological conditions of the digestive tract of the insect that transmits, to ensure their survival and subsequent transmission to the vertebrate host. *Leishmania*-vector interaction depends on several factors, including the agglutinins

Autor para correspondencia: Gilberto Bastidas Pacheco, Departamento Clínico Integral de los Llanos, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo, VenezuelannnE-mail: bastidasprotozoo@hotmail.com

Recibido: el 9 de diciembre de 2010. **Aceptado para publicación:** el 6 de diciembre de 2011

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb112233.pdf>

of the digestive tract of sandflies, involved along with lipophosphoglycan molecules of the parasite surface, the adhesion of the latter, the intestinal epithelium of the insect. Therefore, both molecules are involved in susceptibility of the sandfly species to infection.

Objective. To measure and compare the agglutination titer between midgut lysates *L. longipalpis* and *L. evansi* wild and colony with *L. infantum* promastigotes.

Materials and Methods. The methodology consisted in the evaluation of three groups of lysates of midgut *Lutzomyia* females, one of females captured in the wild, and two other colony, a females taken 48-hours blood ingest and the other females maintained with a sugary diet for 48 hours.

Results. Find different titles of agglutination between promastigotes of different days of colony of *L. infantum* and lysates of midgut of *L. evansi* and *L. longipalpis*. The only species that register agglutination in dilutions of 1:64 is *L. longipalpis*.

Conclusion. This study revealed the presence of agglutinins against promastigotes of *L. infantum* in populations of wild habitat and of colony of *L. evansi* and *L. longipalpis*, but higher in the latter species of phlebotomies. Titles of agglutination increase as it does, the time of cultivation of the *Leishmania* promastigotes.

Key words: Vector competence, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia evansi*, agglutinins, visceral Leishmaniasis

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es considerada una de las enfermedades tropicales de mayor impacto en salud pública, pues se estima que aproximadamente 350 millones de personas están expuestas a riesgo de adquirir la enfermedad, especialmente en localidades con distribución tropical y subtropical; particularmente, en Asia, África, Cuenca del Mediterráneo y América. Los agentes etiológicos son parásitos digenéticos del género *Leishmania* porque en su ciclo de vida involucran dos hospedadores: uno vertebrado y otro invertebrado.

Revista Biomédica

El hospedador invertebrado que, a su vez funge como transmisor, es un insecto díptero del género *Lutzomyia* para América o *Phlebotomus* para África, Asia y Europa, pertenecientes ambos a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae (1,2).

Durante el proceso de transmisión del parásito, el insecto hembra toma una ingesta sanguínea sobre un hospedador vertebrado infectado e ingiere el parásito en su forma amastigota; una vez en el tracto digestivo, sufre cambios morfológicos y bioquímicos para hacerse infectivo para un segundo hospedador vertebrado, susceptible a la infección, por un proceso conocido como metacicloénesis. El amastigote se transforma en promastigote procíclico, que se multiplica y evoluciona a la forma infectiva o promastigote metacíclico (3-5). Inicialmente, los promastigotes procíclicos, el primer estadio flagelado del parásito, son encerrados por la membrana peritrófica del flebótomo (formada para la digestión de la ingesta sanguínea), la cual se desprende en pocos días; promastigotes de especies suprapilóricas de *Leishmania* (subgénero *Leishmania*) se unen al epitelio del intestino medio, a través de la inserción del flagelo entre las microvellosidades. Esta unión es parte esencial del ciclo de vida de las *Leishmanias*, pues evita su expulsión del intestino medio cuando los remanentes de la digestión sanguínea son defecados por el flebótomo (6-8).

Durante el proceso de metacicloénesis, el parásito debe adecuarse en un microambiente dentro del vector para compensar la acción de componentes de la saliva del insecto y evadir al sistema inmune de éste; debe acoplarse a la presencia de azúcares en el divertículo esofágico y al proceso de digestión sanguínea, pH, matriz peritrófica (que se forma sólo para descomponer la sangre en aminoácidos, necesarios para el desarrollo de huevos en las hembras de flebótomos; una vez terminado el proceso se desprende y se evacua del insecto) y macromoléculas específicas de adhesión (lectinas) (3).

Estas últimas moléculas, las lectinas y/o

aglutininas, son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune con capacidad para unirse a carbohidratos, presentes probablemente, en concentración variable, en todas las formas de vida. Por definición, las lectinas son polivalentes y oligoméricas; pueden aglutinar células o precipitar polisacáridos, glicoproteínas u otros glicoconjugados (9-11). Su función en los insectos se asocia con el reconocimiento celular, fagocitosis, encapsulamiento y aglutinación de organismos patógenos; por tanto, regulan el establecimiento de infecciones en el invertebrado (11,12).

En la interacción leishmania-vector, las lectinas intervienen en el proceso de adhesión de los parásitos al epitelio del intestino, al unirse a las moléculas de lipofosfoglicano (LPG), un glicoconjugado expuesto en la superficie del parásito, lo que garantiza la permanencia de éste dentro del tracto digestivo del flebótomo y evita su pérdida por excreción, luego de culminado el proceso de digestión sanguínea (7,13-16). Sin embargo, es prudente señalar que éste no es el único mecanismo de adhesión del parásito al epitelio del intestino del flebótomo; al respecto se mencionan otros independientes de LPG y recientemente señalados en flebótomos (17,18).

Lutzomyia longipalpis es el principal vector de *Leishmania chagasi* y, en algunos focos, de *L. infantum* en el Neotrópico, un parásito responsable de la producción de leishmaniosis visceral; aunque, en algunos focos simpátridos de leishmaniosis visceral en Colombia y Venezuela, *Lutzomyia evansi* es considerado vector con solapamiento de nicho (19-21). Estudios de competencia vectorial han indicado que *L. evansi* es poco susceptible a la infección con *L. infantum*, mostrando grados variables de susceptibilidad (22). Dos factores han sido señalados como los responsables más importantes de las fallas en la infección experimental de *L. evansi*, la actividad lítica de algunas enzimas digestivas y la ineficiente adhesión de formas del parásito a las paredes del intestino medio (23).

Por tanto, y dada la importancia de la adhesión del parásito al intestino medio para

la competencia vectorial del flebótomo en la leishmaniosis visceral (24, 25), los objetivos del presente estudio fueron detectar *in vitro* la presencia de aglutininas y determinar sus títulos en lisados de intestino medio de poblaciones silvestres y de colonia de *L. evansi* y *L. longipalpis* contra promastigotes de un aislado de *L. infantum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones de *L. evansi*. Los ejemplares fueron colectados en la localidad de los Pajones (9°30'28" LN y 70°33'19" LO), área ubicada al Norte de la ciudad de Trujillo, Venezuela, a una altura de 110 msnm, temperatura de 27°C y donde se han reportado casos de leishmaniosis visceral. Se emplearon, además, ejemplares de colonia de *L. evansi* (segunda generación [G2]) establecida a partir de insectos capturados en la mencionada localidad.

Poblaciones de *L. longipalpis*. Se emplearon ejemplares capturados en la localidad del Batatillo (89°46'28" LN y 70°25'41" LO), área de transmisión activa de leishmaniosis visceral, ubicada al noreste de la ciudad de Trujillo, Venezuela, a una altitud de 310 msnm, con una temperatura de 26°C. Igualmente, se emplearon *L. longipalpis* de colonia (segunda generación [G2]) establecida a partir de los insectos capturados en la localidad del Batatillo.

Obtención de lisados de intestino medio de *L. evansi* y *L. longipalpis*. Para determinar la actividad de las aglutininas y debido a que el nivel de éstas puede diferir según el tipo de ingesta del flebótomo, fueron utilizados en los ensayos tres diferentes grupos de hembras para ambas especies de *Lutzomyia*: las capturadas en el ambiente silvestre (1 hora después de su captura), con 48 horas postingesta sanguínea, y hembras mantenidas exclusivamente con una dieta azucarada durante 48 horas (fructosa para *L. evansi* y sacarosa para *L. longipalpis*, azúcar que prefieren ingerir) (26). Para cada grupo de hembras, 50 de cada especie (ensayos previos mostraron aglutinación a partir

de este número de insectos; sin embargo, el título de aglutinación no incrementa al sobrepasar esta cantidad de insectos) fueron disecadas en buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.2, en frío para separar sus intestinos. Los intestinos medios (en infección experimental, los parásitos se adhieren preferentemente al intestino medio del flebótomo) fueron suspendidos en 50 μ L de PBS, lisados por tres ciclos de congelamiento/descongelamiento en nitrógeno líquido y fraccionados mediante centrifugación a razón de 2000 rpm por tres minutos y el sobrenadante obtenido se almacenó a -20 °C, en viales eppendorf siliconados, hasta su utilización.

Parásitos. Se usó *L. infantum* cepa MHOM/VEN/99/YUSBELIS, aislada de un caso clínico infantil de leishmaniasis visceral, procedente de la localidad de las Veras, estado Trujillo, Venezuela; mantenida por repiques sucesivos en hámster *Meosocricetus auratus* y tipificada por PCR como miembro del complejo *Leishmania donovani* (27).

Obtención de promastigotes de cultivo. Háms-teres entre dos a tres meses de edad fueron inoculados vía intraperitoneal con la cepa MHOM/VEN/99/YUSBELIS de *L. infantum*. Para cada ensayo un hámster fue sacrificado, lavado con jabón y abundante agua destilada. Posteriormente y en condiciones de esterilidad, se realizó disección y exéresis del bazo. Este órgano fue macerado en 2 mL de solución fisiológica con penicilina cristalina (350,000U). Evidenciada la presencia de parásitos por coloración con Giemsa, se tomaron muestras de 0,5 mL y se distribuyeron en tubos con medio de cultivo líquido Schneiders-Drosophila (SIG-MA®), suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado. Los cultivos fueron mantenidos en estufa a temperatura entre 25 y 26°C.

Desarrollo de *L. infantum* en medio de cultivo monofásico y población parasitaria utilizada en ensayos de aglutinación. Una vez aislados los parásitos en medio de cultivo, cada 24 horas se tomó una alícuota del medio y se fijó con una solu-

ción de formaldehído al 4% en PBS para inmovilizar y contar los parásitos en un hematocitómetro y de esta manera obtener la curva de crecimiento. Una vez establecida la curva de crecimiento de los parásitos, se tomaron promastigotes de la fase logarítmica temprana (tres días), fase logarítmica intermedia (cuatro días) y fase logarítmica tardía a los cinco días. Se precisó la densidad de promastigotes, para lo cual los parásitos fueron centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos y lavados tres veces con PBS pH 7.2, una alícuota del medio fue fijada con una solución de formaldehído al 4% y los parásitos contados en un hematocitómetro.

Determinación de aglutinación de promastigotes de *L. infantum* por lisados del intestino medio de *L. evansi* y *L. longipalpis*. La metodología empleada para evaluar la aglutinación fue la descrita por Svobodová (16). Consistió en hacer diluciones seriadas de lisados del intestino medio en PBS a pH 7.2 en microplacas de titulación (NUNC®), las diluciones hechas se ubicaron entre 1:2 y 1:128. Posteriormente, fue adicionada una suspensión con 100 promastigotes por cada día de cultivo (entre tres y cinco días) y se incubó durante dos horas a 25°C. Como control negativo se empleó medio PBS a pH 7.2 y como positivo se recurrió a la aglutinación de lectinas con lipofosfoglicano purificado según Talamas (28). La lectura de la aglutinación fue realizada bajo microscopio invertido (Carl Zeiss, Modelo: Axiovert®) a 240X; hubo aglutinación o la prueba fue positiva cuando se observó un botón en el pozo. Este mismo procedimiento fue seguido con cada uno de los sistemas propuestos y las reacciones se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico. Además de la determinación de estadísticos descriptivos, como la varianza y la desviación estándar, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para establecer la existencia o no de diferencias entre las medias de las diluciones de las variables en estudio. Los cálculos de las pruebas estadísticas se realizaron

usando el programa SPSS versión 14.0; se consideró un $P < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

Curva de crecimiento de *L. infantum* en cultivo monofásico. La cepa de *L. infantum* (MHOM/VEN/99/YUSBELIS) utilizada tuvo un patrón de desarrollo en medio de cultivo continuamente progresivo, polimórfico y limitado al agotamiento de nutrientes en el medio. La densidad poblacional de promastigotes de *L. infantum* obedeció claramente a tres fases: la primera de crecimiento logarítmico desde el primero hasta el quinto día, caracterizada por la transformación masiva de amastigotes a promastigotes flagelados y el crecimiento ex-

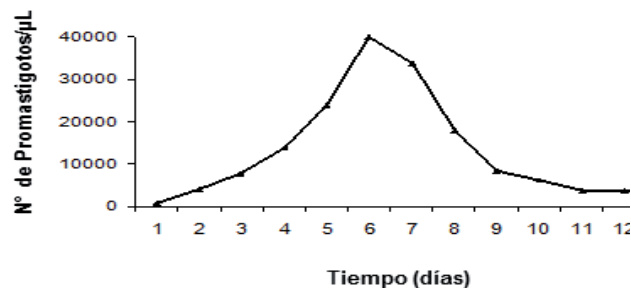


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa de *Leishmania infantum* (MHOM/VEN/99/YUSBELIS) en medio de cultivo monofásico

ponencial, con una población que aumenta de 800 a 24,000 parásitos/ μL con una varianza de 8,5 y una desviación estándar de $\pm 9.197, 71$; la segunda fase, estacionaria, se caracterizó por menor multiplicación exponencial parasitaria respecto a la fase anterior, ocurrió entre el sexto y séptimo día con una densidad poblacional que osciló entre 24,000 a 39,996 parásitos/ μL , con una varianza de 1,3 y una desviación estándar de $\pm 11.285,42$; la tercera fase, a partir del séptimo día, caracterizada por descenso de la densidad poblacional (Figura 1).

Prueba de aglutinación de promastigotes de *L. infantum* por lisados de intestino medio de *L. evansi* y *L. longipalpis*. Primeramente, se observan distintos títulos de aglutinación con lisados de *L. evansi* y *L. longipalpis*, de hembras silvestres,

de las alimentadas con carbohidratos y post ingesta sanguínea, pero al comparar las medias se demostró que no existen diferencias significativas. En tanto que *L. longipalpis* (las hembras silvestres y las alimentadas con carbohidrato) es la única que registra aglutinación en diluciones de 1:64. Asimismo, la aglutinación fue más evidente en la medida en que aumenta la edad de las poblaciones de parásitos de cultivo, a tal punto que el título más alto se observa cuando se emplean promastigotes de la fase logarítmica de cinco días (con diferencias significativas entre el cultivo de este día y la sumatoria de las diluciones de los cultivos de 3 y 4 días [$p < 0.05$]), tanto para las hembras silvestres, las alimentadas con carbohidratos y el grupo de hembras post ingesta sanguínea. Por otro lado, para aglutinaciones con el mismo día de cultivo (quinto día), pero con hembras que tomaron una ingesta sanguínea, *L. evansi* obtuvo su más bajo título, 1:8, y *L. longipalpis* sólo alcanzó 1:32 (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Aunque las dos especies de flebótomos estudiadas han sido señaladas transmisores naturales de *L. infantum*, sólo *L. longipalpis* reúne todas las características fisiológicas para ser considerada una especie vectora principal, mientras que, en *L. evansi* se tienen fallas en la infección experimental, porque ésta no ha sido eficiente y constantemente lograda, pues muestra grados variables de susceptibilidad, lo que lo cataloga como un vector secundario en la dinámica de transmisión desde el contexto fisiológico (22,29).

La adhesión de los parásitos a las células epiteliales intestinales del flebótomo es un factor clave para el establecimiento de la infección, dado el recíproco reconocimiento entre receptores de membranas de parásitos (LPG) y las células epiteliales en el intestino medio del flebótomo (lectinas) (11,14,30), acción que evita que los parásitos sean evacuados con los desechos de la ingesta sanguínea digerida (31).

En este sentido, en la presente investigación, se evidencia actividad aglutinante entre

Cuadro 1
Títulos de aglutinación de promastigotes de *L. infantum* a diferentes diluciones de lisados de intestino medio de *L. evansi* y *L. longipalpis*.

Diluciones	Hembras silvestres						Hembras post-ingesta de carbohidratos						Hembras post-ingesta sanguínea					
	<i>L. evansi</i>			<i>L. longipalpis</i>			<i>L. evansi</i>			<i>L. longipalpis</i>			<i>L. evansi</i>			<i>L. longipalpis</i>		
	Días																	
	3	4	5	3	4	5	3	4	5	3	4	5	3	4	5	3	4	5
1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	∅	∅	+
1:4	+	+	+	∅	+	+	+	+	+	∅	+	+	+	∅	+	∅	∅	+
1:8	∅	∅	+	∅	+	+	∅	∅	+	∅	+	+	∅	∅	+	∅	∅	+
1:16	∅	∅	+	∅	∅	+	∅	∅	+	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	+
1:32	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	+
1:64	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
1:128	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

+: Indica aglutinación.

∅: Indica ausencia de aglutinación

promastigotes de una cepa autóctona de *L. infantum* y lisados de intestino medio de *L. evansi* y *L. longipalpis* de poblaciones procedentes de áreas endémicas de Venezuela y de colonias establecidas a partir de ellas. En general, los títulos con extractos de *L. longipalpis* aglutinan en una o dos diluciones más que los extractos de *L. evansi* ($P < 0.05$). Títulos estos que superan a los reportados por Svobodova (16), pero en poblaciones de *L. longipalpis* de Brasil y Colombia y con aislados de *L. donovani* y *L. infantum*. Estas variaciones pueden explicarse por las diferencias de comportamiento existentes entre especies geográficamente separadas y sobre la base de que *L. longipalpis* es considerado un complejo de especies (32-34).

Sin duda, en este estudio, los más altos títulos de aglutinación fueron encontrados con la combinación parásito/vector natural, es decir, *L. infantum*/*L. longipalpis*, en detrimento de los bajos títulos registrados en la combinación *L. infantum*/*L. evansi* ($P < 0.05$); esto pudiera explicar la aparente incapacidad de este flebótomo para transmitir eficientemente el parásito; no obstante, la competencia vectora es el resultado de un

conjunto de factores, entre los que, también, se encuentran las lectinas (14). De hecho, estudios recientes sugieren que *L. longipalpis* presenta mecanismos alternativos de adhesión, independientes del LPG, que la hacen una especie permisible a diferentes especies de parásitos y que, probablemente, contribuye a su importante papel epidemiológico como principal vector de leishmaniasis visceral en América (35).

La situación es aún más compleja, porque modificaciones especie-específica del mayor glico-conjugado de superficie de promastigote de leishmania, el LPG, controlan la adhesión; por ejemplo, estudios realizados con *Leishmania major* en *Phlebotomus papatasi* mostraron, en este dúo, que la modificación de unidades repetidas de fosfoglicanos de LPG, por residuos de galactosa, permite al parásito unirse selectivamente al receptor galectina PpGalec del intestino medio de ese único vector (36). Sin embargo, otras especies de flebótomos soportan el desarrollo de una amplia gama de especies de *Leishmania*, entre ellas: *L. longipalpis*, *P. argentipes*, *P. halepensis* y *P. arabicus*, los llamados vectores permisivos,

porque en ellos accionan, además de lectinas, otros mecanismos de adhesión (17, 24, 29, 37, 38).

Igualmente, no se hallaron diferencias en los títulos de aglutinación con el empleo de hembras de colonias y silvestres, al igual que en *Phlebotomus papatasi*, porque el entrecruzamiento en colonias de laboratorio parece no afectar la actividad aglutinante de esta especie (15). Asimismo, los resultados de este estudio fueron consistentes con los reportados por Volf (15) y Svobodova (16), respecto a que los más altos títulos de aglutinación corresponden a reacciones donde se emplearon promastigotes de cultivo de 5 días de desarrollo, con diferencias significativas entre el cultivo de este día y la suma de las diluciones de los cultivos de 3 y 4 días ($P < 0.05$) y sin distinción entre hembras silvestres, alimentadas con carbohidratos o postingesta sanguínea, porque es el periodo en el cual predomina la forma procíclica del parásito de cultivo, forma a la que se otorga la mayor capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino medio del flebótomo (39).

Se evidenció que no hubo influencia sobre los títulos de aglutinación, según el tipo de azúcar preferido por ambas especies de flebótomos ($p = 0.66$), probablemente porque no se bloqueó la unión de las moléculas de superficie del parásito a receptores lectínicos en la superficie del intestino del insecto, es decir, no hubo competencia por receptores (40) o, posiblemente, por la presencia del carbohidrato galactosamina, un inhibidor de la actividad lítica de las proteasas en el intestino medio del flebótomo, que puede afectar al parásito e impedir el establecimiento de la infección, como sucede en el binomio *P. duboscqi* por *L. major* (41,42).

Los títulos obtenidos con lisados de intestinos de hembras que tomaron una ingesta sanguínea estuvieron por debajo de los obtenidos con poblaciones que no hicieron la misma ($P < 0.05$), resultados que difieren de los obtenidos por Volf (43), quien señala un incremento en los títulos de aglutinación, con pico máximo a los dos días post ingesta sanguínea, el cual cae por debajo

de éste después de la defecación. Fenómeno que está, la pobre aglutinación, entre parásitos de 3-5 días y *L. evansi*; y entre parásitos de 3 a 4 días y *L. longipalpis*, posiblemente influenciado por la velocidad de la digestión sanguínea y la actividad proteolítica de las enzimas del intestino medio (42); en este sentido, el proceso de digestión sanguínea en *L. evansi* es corto, de tres días en promedio (44), y en el caso de *L. longipalpis* es largo, pues requiere de 5-6 días para hacer la digestión sanguínea; por tanto, en el primer caso, los eritrocitos pueden ocupar mayor número de receptores lectínicos (14), lo que impide la aglutinación.

Finalmente, se observaron diferentes títulos de aglutinación, tanto para *L. evansi* como para *L. longipalpis*, con poblaciones de promastigotes de diferentes días de cultivo. En todos los sistemas estudiados, los más altos títulos de aglutinación se encontraron con promastigotes de cinco días de cultivo, explicable esto por el incremento exponencial de la población total, pero con predominio de promastigotes procíclicos. Ya que estas formas procíclicas, aunque no infectivas para el hospedador vertebrado, tienen la capacidad de adherirse a las células epiteliales del intestino medio del flebótomo para evitar ser evacuados durante la ingesta sanguínea digerida (37,44).

En resumen, este estudio evidenció la presencia de aglutininas contra promastigotes de *L. infantum* en poblaciones de hábitat silvestres y de colonia de *L. evansi* y *L. longipalpis*, pero más altos en esta última especie de flebótomos. Además, los títulos de aglutinación aumentan a medida que lo hace el tiempo de cultivo de los promastigotes de *Leishmania*.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero con el proyecto FONACYT-S1-2002000501.

REFERENCIAS

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol*

- Microbiol Infect Dis 2004; 27: 305-18.
2. **WHO.** Of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis. Disponible: http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research_publications/swg-report-leishmaniasis/pdf/swg_leish. 2004.
 3. **Sacks D, Kamhawi S.** 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Ann Rev Microbiol* 2001; 55:453-83.
 4. **Soares RP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, et al.** *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 121: 213-24.
 5. **Bates PA.** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007; 37(10):1097-106.
 6. **Warburg A, Tesh RB, McMahon-Pratt D.** Studies on the attachment of *Leishmania* flagella to sand fly midgut epithelium. *J Protozool* 1989; 36:613-7.
 7. **Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, et al.** The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sandfly interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:406-11.
 8. **Kamhawi S.** Phlebotominae sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 2006; 22:439-45.
 9. **Sharon N, Lis H.** Lectins as cell recognition molecules. *Science* 1989; 246(4927):227-34.
 10. **Basseri HR.** 2002. Role of lectins in interaction between parasites and important insects' vectors. *Iranian J Publ Health* 2002; 31: 69-74.
 11. **Volf P, Skarupova S, Man P.** Characterization of the lectin from females of *Phlebotomus duboscqi* sand flies. *Eur J Biochem* 2002; 269(24):6294-301.
 12. **Nieves S, Rondon M.** Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares. *Rev Soc Ven Microbiol* 2007; 27:66-72.
 13. **Sacks DL, Hieny S, Sher A.** Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective development stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol* 1985; 135: 564-9.
 14. **Wallbanks K, Ingram GA, Molyneux DH.** The agglutination of erythrocytes and *Leishmania* parasites by sandfly gut extracts: evidence for lectin activity. *Trop Med Parasitol* 1986; 37:409-18.
 15. **Volf P, Killick-Kendrick R, Bates PA, Molineux D.** Comparison of the haemagglutination activities in gut and head extracts of various species and geographic populations of phlebotominae sandflies. *Ann Trop Med Parasitol* 1994; 88:337-40.
 16. **Svobodová M, Volf P, Killick-Kendrick R.** Agglutination of *Leishmania* promastigotes by midgut lectins from various species of Phlebotominae. *Ann Trop Med Parasitol* 1996; 90(3): 329-36.
 17. **Svobodova M, Votypka J, Peckova J, Dvorak V, Nasereddin A, Baneth G, et al.** Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, northern Israel. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1860-8.
 18. **Volf P, Peckova J.** Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol* 2007; 23:91-92.
 19. **Moreno G, Oviedo M.** Bionomy of vectors of american visceral leishmaniasis in Trujillo state, Venezuela. II. Longitudinal study of *Lutzomyia evansi* in endemic situation. *Rev Talleres* 1995; 4: 66.
 20. **Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Velez ID.** Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia *J Med Entomol* 1996; 33(3):278-85.
 21. **Feliciangeli MD, Rodriguez N, de Guglielmo Z, Rodriguez A.** The re-emergence of American visceral leishmaniasis in a old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. *Parasite* 1999; 6:113-20.
 22. **Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Barazarte R, Bruno T, Ready P, et al.** Comparative vectorial eficiencia *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* transmitting *Leishmania chagasi* parasites. *Acta Trop* 2003; 85: 19-29.
 23. **Montoya-Lerma, J.** The biology of Leishmaniasis vectors in the San Andres de Sotavento focus, Colombia. Thesis PhD. Department of Medical Parasitology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, 182 pp. 1986
 24. **Pimenta PF, Saravia EMB, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley S, et al.** Evidence that vectorial competence of phlebotominae sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 9155-9.
 25. **Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PFP, Rowton E, Sacks DL.** The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan mediated midgut attachment. *Parasitology* 2000; 121: 25-33.
 26. **Bastidas G, Oviedo M, Vivenes A, González A.** Determinación del azúcar preferencial en la dieta de *Lutzomyia evansi* (Nuñeztovar) (Diptera: Psychodidae). *Rev Colomb Entomol* 2004; 30(2): 193-6.
 27. **GenBank Sequence.** *Leishmania chagasi* AF308682. Disponible: [//www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html).

28. **Talamas-Rohana P, Wright SD, Lennartz MK, Russell DG.** Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150, 95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J. Immunol* 1990; 144:4817-24.
29. **Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Barazarte R, Travi B, Lane R.** Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi* parasites. *Acta Trópica* 2003; 85(1):19-29.
30. **Ingram GA, Molyneux DH.** Insect lectins: Role in parasite-vector interaction. *Lectin Reviews* 1991; 1:103-27.
31. **Molyneux DH, Killick-Kendrick R.** Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters, W. y Killick-Kendrick, R(ed). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academy Press, London, England. 1987; 1:121-76.
32. **Ward RD, Phillips, A, Burnet B, Marcondes CB.** The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution Pp. 257-269. in *Biosystematics of Haematophagous Insects*, ed. Service, M. W. Oxford. Clarendon Press. 1988.
33. **Jacobson R.** Lectin-*Leishmania* interaction. In *Lectin-microorganisms Interactions*, eds Doyle, R. J Slifkin, M. pp 191-223. New York: Marcel Decker. 1994.
34. **Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Bauzer LG, Peixoto AA.** The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? *Trends Parasitol* 2008; 24(1):12-7.
35. **Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P.** A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect* 2007; 9(3): 317-24.
36. **Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, et al.** A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 2004; 119:329-41.
37. **Walters LL, Irons KP, Chaplin G, Tesh RB.** Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1993; 30:699-718.
38. **Sadlova J, Hajmova M, Volf P.** *Phlebotomus* (Adlerius) *halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *L. tropica*. *Med Vet Entomol* 2003; 17:244-50.
39. **Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL.** Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 1992; 256:1812.
40. **Muskus CE.** Papel del LPG y carbohidratos en la virulencia de *Leishmania* del Subgénero Vianna. Tesis de Magíster en Microbiología y Parasitología. Mimeografiado. Universidad del Valle, Departamento de Microbiología, Corporación CIDEIM, Santiago de Cali – Colombia. Pp 72. 1997.
41. **Svobodova, M.** Influence of lectin inhibitors on *Leishmania major* growth and morphology. *Acta Trop* 2000; 76(3):285-8.
42. **Volf P, Svobodová M, Dvoráková E.** Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus duboscqi*: effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. *Med Vet Entomol* 2001; 15(3):281-6.
43. **Volf P, Palonova L, Svobodova M.** Midgut lectins of sandflies. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 88:337-40.
44. **Oviedo M, Moreno G, Graterol D.** Bionomía de los vectores de leishmaniasis visceral en el Estado Trujillo, Venezuela. III. Colonización de *Lutzomyia evansi*. *Bol Dir Malareol San Amb* 1995; 25(1):269-75.
45. **Mahoney AB, Sacks DL, Saraiva E, Modi G, Turco SJ.** 1999. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry* 1999; 38(31):9813-23.