

Artículo original

Metaciclologénesis y desarrollo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae)

Elsa Nieves*, Maritza Rondón

Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Recibido 4 de mayo de 2010; aceptado 16 de diciembre de 2010

Resumen: La interacción *Leishmania*-vector es un proceso complejo y multifactorial. En los últimos años se han logrado avances importantes en la relación *Leishmania*-vector, pero aún se desconocen algunos aspectos. Este trabajo estudia la interacción de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae). Hembras de *L. ovallesi* fueron infectadas artificialmente y se determinó el patrón de desarrollo, densidad parasitaria, secuencia de morfotipos de promastigotes en las regiones del intestino, efecto de la realimentación, y el patrón de carbohidratos de la superficie de las leptomonas usando lectinas fluorescentes. Los resultados mostraron desarrollo suprapilórico de *L. (L.) amazonensis*. La densidad parasitaria mostró dos ciclos de división separados en tiempo y espacio, se observaron morfotipos caracterizados como paramastigotes en división. La realimentación no alteró la migración de los morfotipos y la mayor proporción de leptomonas en el intestino medio torácico sugiere migración natural que pudiera ser modulada por el gradiente de carbohidratos en el intestino del flebótopo y por la exposición de saliva. Las leptomonas exhibieron diferentes patrones de unión de glicoconjugados, que sugieren presencia de distintos residuos de carbohidratos en la superficie celular del parásito y/o flagelo, que pueden tener funciones importantes en la interacción y estabilidad de los parásitos en el lumen del intestino y su migración a las diferentes regiones del mismo. Se aportan diferentes aspectos del desarrollo de *L. (L.) amazonensis* en *L. ovallesi* importantes para entender su potencial vectorial.

Palabras clave: Flebótopos, *Leishmania*, metaciclologénesis, *Lutzomyia*, interacción

Metacyclogenesis and development of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae)

Abstract: *Leishmania*-vector interaction is a complex and multifactorial process. During the last few years important advances in the *Leishmania*-vector interaction have been reached but there still some unknown aspects. This work studies the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) interaction in *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae). *L. ovallesi* females were artificially infected and the development pattern, parasite density, and promastigote morphotype sequence in the intestinal regions were determined, as well as the effect of re-feeding, and the carbohydrate pattern of the leptomonad surface using fluorescent lectins. The results showed suprapiloric development of *L. (L.) amazonensis*. Parasite density showed two division cycles separated in time and space, morphotypes characterized as dividing paramastigotes were observed. Re-feeding did not alter the migration of morphotypes and the greater proportion of leptomonads in the middle intestine suggests a natural migration which could be modulated by the carbohydrate gradient in the phlebotom intestine and by exposure to saliva. Leptomonads exhibited different glyconjugate union patterns which suggest the presence of various carbohydrate residues in the cell surface of the parasite and/or flagellum, which can have important functions in the interaction and stability of the parasites in the intestinal lumen and their migration to the different intestinal regions. Several aspects of *L. (L.) amazonensis* development in *L. ovallesi* important for understanding its vectorial potency are discussed.

Keywords: Sand flies, *Leishmania*, metacyclogenesis, *Lutzomyia*, interaction

* Correspondencia:
E-mail: nevelsa@ula.ve

Introducción

Lutzomyia ovallesi (Diptera: Psychodidae) es un flebótopo

que posee una amplia distribución desde Centro América hasta la parte norte de Sur América; ha sido incriminado como transmisor de *Leishmania* (Kinetoplastida:

Trypanosomatidae) en Venezuela, Guatemala, Panamá, Belice y Colombia [1]. En Venezuela, *L. ovallesi* es el principal vector de leishmaniasis cutánea [2,3], y es una de las especies más abundante en diferentes sitios y altitudes de los andes venezolanos [4,5], encontrándose frecuentemente en las proximidades de las viviendas [6]. Se ha reportado infección natural de este flebotomino con *L. (Viannia) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* y es altamente susceptible a infección experimental con ambas especies [3,7-9].

El desarrollo de *Leishmania* en el hospedero invertebrado ha sido estudiado utilizando diferentes especies de *Leishmania* y flebotomos [10-12]. La interacción *Leishmania* vector es un proceso complejo que incluye transformación de los amastigotes, metacicloogénesis, desarrollo primario de *Leishmania* en el intestino y transmisión por picadura de los flebotomos [13,14]. La metacicloogénesis constituye un aspecto vital para la transmisión de *Leishmania*: consiste en un proceso de transformación y multiplicación de los promastigotes no infectivos, procíclicos, nectomonas, paramastigotes y leptomonas=haptomonas, a formas infectivas de promastigotes metacíclicos, que poseen diferencias bioquímicas y funcionales [15,16].

Para el establecimiento de la infección, los parásitos deben adherirse al intestino. Existen varios tipos de adhesión descritos: uno para los promastigotes procíclicos, a través de las microvellosidades del epitelio, (por la inserción flagelar y/o adherencia del cuerpo de los promastigotes), dependiente de la molécula de LPG (lipofosfoglicano) [17,18], y otro para las leptomonas=haptomonas, mediante formación de hemidesmosomas a través del contacto del parásito con el epitelio quitinizado [19]. Sin embargo, parecen existir otros tipos de asociaciones: un tercer tipo representado por las uniones a la matriz del gel [10,11,20] y un cuarto tipo, donde los parásitos se encuentran adheridos entre sí por el flagelo y/o el cuerpo celular del parásito, formando rosetas [21], probablemente controladas por las fuerzas de atracción y repulsión de los componentes aniónicos presentes en la superficie de los promastigotes [11].

La interacción *Leishmania*-vector está determinada por factores propios de la especie de *Leishmania* y del insecto vector. Las diferentes especies de *Leishmania* poseen la capacidad de expresar y/o secretar proteínas determinantes para el establecimiento y sobrevivencia del parásito en el sistema digestivo del insecto, tales como la inhibición de tripsina, presencia de fosfoglicanos de superficie, secreción de quitinasa, y formación de una matriz de gel, entre otras secreciones proteicas [16,20,22-24]. Por otro lado, existen factores del insecto, como la presencia de la matriz peritrófica, movimientos peristálticos, disminución de nutrientes y de pH en el intestino del vector, secreción de enzimas digestivas, participación de carbohidratos que se almacenan en el divertículo y la saliva del insecto, entre otros [16,25,26]. Finalmente, para que la transmisión de *Leishmania* se efectúe debe ocurrir la migración de los promastigotes metacíclicos infectivos a la región anterior del sistema digestivo y la válvula estomodeal [25]. La transmisión ocurre cuando los metacíclicos embebidos

en la matriz del gel son regurgitados en el momento de la ingesta sanguínea como sugieren Bates y Rogers [13]. El reflujo de los parásitos en el intestino del vector ocurre por el daño ocasionado a la capa de quitina de la válvula estomodeal por las enzimas quitinolíticas secretadas por el parásito [27,28], permitiendo así, la salida de un mayor número de metacíclicos. Por otro lado, diferentes especies de *Leishmania* poseen la capacidad de modular el comportamiento alimenticio del flebotomo y garantizar la transmisión [28,29], provocando en el insecto dificultad para alimentarse, al inducirlo a realizar más intentos de picadura con la salida de promastigotes metacíclicos [27]. Aunque existen evidencias que apoyan este mecanismo de interacción y transmisión de *Leishmania*, aún persisten aspectos que requieren ser clarificados. El presente trabajo tiene como objetivo determinar algunos aspectos de la interacción *Leishmania*-vector, al estudiar el desarrollo y metacicloogénesis de *L. (L.) amazonensis* en *L. ovallesi*.

Materiales y métodos

Flebotomos: Se utilizaron un total de 4500 hembras de *L. ovallesi* de 5 días de edad, provenientes de una colonia de laboratorio, iniciada con ejemplares capturados en la localidad de Arenal a una altura de 1360 msnm, ubicada en Ejido, Mérida, Venezuela (8°35'N, 71°9'O). La colonia cerrada, iniciada en el 2003 de 20 generaciones en el laboratorio, se mantiene utilizando la técnica descrita por Killick-Kendrick *et al* [30], en incubadora a 25°C±1 y a 80%±10 de humedad relativa, en el Laboratorio de Parasitología Experimental de la Universidad de Los Andes (LAPEX-ULA), Mérida, Venezuela.

Parásitos: Se usó la cepa de referencia OMS, IFLA/BR/67/PH8 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, mantenida mediante periódicas inoculaciones experimentales en hámster (*Mesocricetus aureus*) en el mencionado Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX). El uso de los animales de experimentación se realizó cumpliendo con las normas y códigos internacionales sobre el cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio y contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Los Andes.

Infección experimental: Un total de 23 grupos de 200 hembras de *L. ovallesi* se expusieron por alimentación artificial con *L. (L.) amazonensis* a través de membrana de pollo [26]. Se prepararon inóculos de 1x10⁷ amastigotes/mL y se mezclaron con sangre heparinizada (1%). Los amastigotes de *Leishmania* se aislaron de las lesiones podales de hámster experimentalmente infectados con el parásito. Los tejidos se homogenizaron en tampón salino PBS, pH 7,2 a 4°C, se centrifugaron a 14.000 rpm y se mezclaron con la sangre heparinizada de machos sanos de ratón (*Mus musculus*) provenientes del bioterio de cría de la Universidad de Los Andes. Después de la alimentación, las hembras se mantuvieron a 25°C, 80-95% de humedad

relativa, con suplemento azucarado de sacarosa al 50% *ad libitum*.

Disección y observación microscópica de los intestinos infectados: Se disecaron grupos de ~ 50 sobrevivientes de *L. ovallesi* diariamente entre 1 a 9 días después de la infección experimental de 1600 hembras. Para la disección de los intestinos, las hembras se inmovilizaron en frío a 4°C y se disecaron en una gota de solución de tampón salino PBS pH 7,2 sobre láminas porta-objeto, usando estiletes entomológicos, bajo observación en microscopio estereoscópico.

Se registraron la presencia y localización de los parásitos dentro de las diferentes regiones de los intestinos de *L. ovallesi*. Fueron recolectados 30 intestinos por día bajo microscopio óptico a 40X. Se utilizó la terminología descrita por Nieves y Pimenta [31].

Densidad y morfotipos de promastigotes: Luego de la confirmación al microscopio óptico de la infección de los intestinos, las diferentes regiones se individualizaron bajo microscopio estereoscópico y se colocaron en tubos con 10 µL de PBS a pH 7,2, y se homogenizaron. Los parásitos se contaron en un hemocitómetro para estimar la densidad parasitaria. Con el resto del homogeneizado se prepararon muestras en láminas porta-objeto. Las muestras secas se fijaron con metanol, se colorearon con Giemsa al 10% y se determinaron los morfotipos de los promastigotes bajo microscopio óptico a 100X [31,32].

Realimentación sanguínea: Un total de 500 hembras fueron infectadas; al séptimo día post infección, un grupo entre 60-80 hembras de *L. ovallesi* fue sometido a realimentación sanguínea forzada utilizando la técnica de microcapilar y un segundo grupo similar al primero se realimentó sobre hámsteres sanos. Un total de 30 hembras realimentadas por grupo fueron disecadas inmediatamente y se determinó la distribución de los parásitos en el intestino, esófago y probóscide bajo microscopio óptico. Simultáneamente, se disecaron grupos controles de 30 hembras sin realimentación sanguínea.

Lectinas fluorescentes: Se utilizaron cinco lectinas fluorescentes: Concanavalina A (Con A), *Bandeiraea simplicifolia* (BS-I), *Triticum vulgare* (WGA), *Lens culinaris* (LCA) y *Arachis hypogaea* (PNA), todas procedentes de Sigma, a una concentración final de 10 µg por mL en tampón salino pH 7,2.

Una cantidad predominante de promastigotes de leptomonas >60% fueron aislados del intestino medio torácico y del intestino medio abdominal de *L. ovallesi* con 6 días post infección. Los parásitos se colocaron en lámina porta-objeto y se fijaron con p-formaldehído al 1% en tampón salino pH 7,2 a 4°C; las muestras se incubaron con albúmina al 1% por 20 minutos y posteriormente con medio de cultivo RPMI por 20 minutos. Seguidamente, se incubaron con solución de lectinas marcadas-FITC por 60

minutos a temperatura ambiente. Las láminas se montaron en solución de glicerol tamponado y se observaron en un microscopio de epifluorescencia y con contraste de fase. La intensidad del marcaje fluorescente se registró usando una escala arbitraria: alta fluorescencia escala 3, fluorescencia intermedia escala 2, escasa fluorescencia escala 1 y negativo 0. Luego de la observación, las láminas se colorearon con Giemsa al 10% y las formas morfológicas se corroboraron bajo observación al microscopio óptico. Todos los experimentos se realizaron por triplicado con muestra de 30 intestinos para cada lectina.

Resultados

Para determinar la densidad y los morfotipos de promastigotes, un total de 1.600 hembras se infectaron artificialmente, registrándose el 71% de mortalidad. Se disecaron el 29% (451), de las cuales, el 59% (270) presentó infección. La infección de *L. ovallesi* con *L. (L.) amazonensis* mostró un patrón de desarrollo primario, característico de las especies suprapilóricas: gran parte del ciclo se cumplió en el intestino medio abdominal e intestino medio torácico del insecto vector. También se observó migración temprana al tercer día al intestino medio torácico con subsiguiente desplazamiento de los parásitos a la válvula estomodeal y esófago. A partir de 6 días, se observó una gran acumulación de parásitos en la válvula estomodeal y la presencia del gel en el intestino (Figura 1).

Los resultados de la densidad de *L. (L.) amazonensis* en los intestinos de *L. ovallesi* mostraron un incremento de 7.900 parásitos/intestino al segundo día post infección, con una leve disminución al tercer día y masiva eliminación fecal de parásitos. Posteriormente, un aumento hasta alcanzar un máximo a los 4 días de 11.000 parásitos/intestino, seguido por una disminución hasta los 7 días, manteniendo una densidad de parásitos de < 4.000 parásitos por intestino (Figura 2).

En relación a la secuencia de morfotipos, a las 24 horas post infección se detectó, que los amastigotes ingeridos

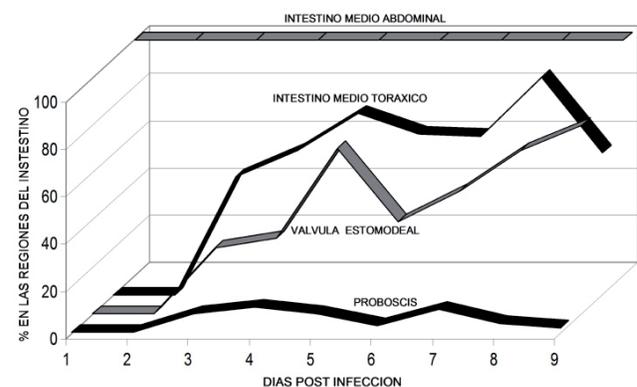


Fig. 1 Desarrollo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Proporción de parásitos detectados en las diferentes regiones en el intestino de *Lutzomyia ovallesi* a 1-9 días post infección.

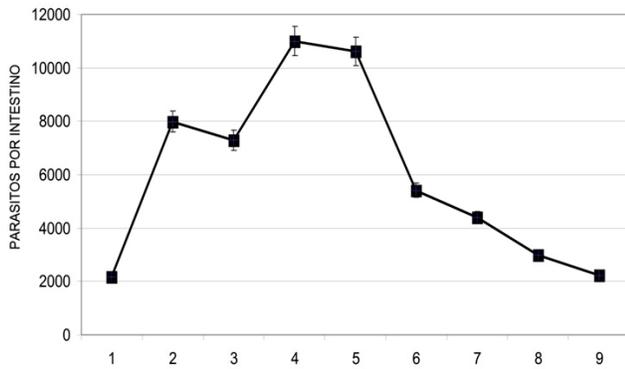


Fig. 2 Densidad de parásitos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cuantificados en el intestino de *Lutzomyia ovallesi* a 1-9 días post infección con amastigotes.

se transformaron a promastigotes procíclicos en un 100% dentro de la matriz peritrófica del intestino medio abdominal. Los resultados de la comparación de los morfotipos del intestino medio abdominal revelaron que a partir del sexto día, la proporción de leptomonas fue cercana al 60%, mientras que los otros morfotipos no alcanzaron más del 20%. En el intestino medio torácico se observó un mayor porcentaje de leptomonas, más del 80%, mientras que los otros morfotipos no superaron el 10% (Figura 3). Se observaron abundantes formas en división durante los primeros días de infección (1-3 días), correspondiendo a los promastigotes procíclicos, y entre 5 a 7 días se observaron promastigotes de leptomonas. Es importante resaltar, que durante este período, también se observaron en división formas pequeñas redondas u ovaladas con dos flagelos, de diferentes tamaños y material nuclear denso caracterizado como paramastigotes.

Con respecto al efecto de la realimentación sanguínea, artificial o sobre hámsteres, se observaron parásitos, en su mayoría, concentrados en el intestino medio abdominal, y semejantes porcentajes (8%) de parásitos se observaron en la región de la válvula estomodeal, esófago y probóscis, en relación a los controles.

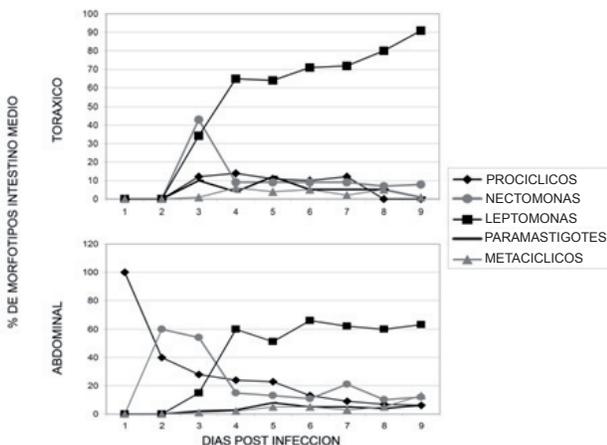


Fig. 3. Porcentajes de morfotipos de promastigotes en el intestino medio abdominal y torácico de *Lutzomyia ovallesi* infectados con *Leishmania (Leishmania) amazonensis* detectados a 1-9 días post infección. Morfotipos: ◆=Procíclicos, ○=Neptomonas, □=Leptomonas, —= Paramastigotes y Δ=Metacíclicos.

El patrón de fluorescencia para los promastigotes de leptomonas provenientes del intestino medio torácico e intestino medio abdominal de *L. ovallesi*, mostró un 100% de marcaje con la lectina Con-A, a una escala predominante de 2. En contraste, con las lectinas LCN y WGA, se registró a lo largo de la superficie del cuerpo una menor intensidad en la fluorescencia (escala 1). Con la lectina BS-I, la fluorescencia no fue homogénea sobre la superficie del cuerpo y se evidenció a lo largo de la superficie del flagelo, mientras que con la lectina PNA no se detectó fluorescencia alguna (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil de fluorescencia de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* obtenido con diferentes lectinas sobre leptomonas provenientes del intestino medio torácico de *Lutzomyia ovallesi* a 6 días post infección.

Lectina	Fluorescencia %	Intensidad %	Localización		
			Cuerpo	Superficie	Flagelo
ConA	100	3 (71) 2 (29)	100	-	-
LEN	60	2 (54) 1 (46)	65	17	18
WGA	50	2 (26) 1 (74)	60	12	28
BSI	30	2 (12) 1 (88)	37	53	10
PNA	0	0	-	-	-

Con A= Concanavalina A, BS-I= *Bandeiraea simplicifolia*, WGA= *Triticum vulgaris*, LCA= *Lens culinaris* y PNA= *Arachis hipogaea*. Intensidad del marcaje fluorescente: 1=escasa, 2=intermedia, 3= alta.

Discusión

El desarrollo primario de *Leishmania* en el sistema digestivo de los flebótomos corresponde a la capacidad del parásito de invadir las diferentes regiones del intestino del insecto vector y es característico del sub género [33]. Los resultados muestran que el desarrollo de *L. (L) amazonensis* en el intestino de *L. ovallesi* es suprapilórico, sin invasión a los túbulos de Malpighi, como ha sido reportado en el desarrollo de *L. (L.) amazonensis* en *L. migonei* [31].

Se ha descrito que la infección de *L. (L.) amazonensis* en *L. ovallesi* causa daño celular en el intestino medio abdominal, mostrando gran distensión del diámetro de la luz intestinal, con pérdida parcial o total de las microvellosidades y engrosamiento de la capa basal de toda la porción del intestino, con degeneración vacuolar y mitocondrial de las células epiteliales y presencia de desechos epiteliales en la luz intestinal [34]. Los resultados en el presente trabajo mostraron una baja densidad parasitaria (<40000 parásitos/intestino) concordando con la reportada para *L. migonei* infectada con *L. (L.) amazonensis* usando sangre de ratón [35]. Por otro lado, Gossage *et al* [32] sugieren dos ciclos independientes de división celular de los promastigotes durante el desarrollo de la metacicloogénesis. Los ciclos están separados en tiempo y espacio. El primero corresponde a los promastigotes procíclicos durante la digestión sanguínea; la disminución de parásitos es causada por la muerte de los

parásitos, ocasionada a su vez, por la secreción de proteínas enzimáticas durante el proceso de digestión sanguínea y a los movimientos peristálticos del intestino. El otro ciclo post digestión sanguínea, corresponde a los promastigotes de leptomonas [13,26]. Estos ciclos parecen ocurrir en *L. (L.) amazonensis* durante el transcurso de su desarrollo en el intestino de *L. ovallesi*; los resultados muestran picos en la densidad de parásitos durante el transcurso de la infección en el intestino, para luego disminuir y estabilizarse después de 7 días. Es importante resaltar, que con cierta frecuencia se observaron morfotipos de paramastigotes, lo cual sugiere que se encuentran en división. Se desconoce la función de los paramastigotes: éstos se encuentran en el intestino, adheridos o sueltos y se cree se originan de las leptomonas. Los paramastigotes han sido descritos por otros autores en baja proporción en el esófago, válvula estomodeal y probóscide de otras especies de flebotomos [24,25]. Aunque los paramastigotes se encuentren en bajo porcentaje, no se les debe restar importancia, ya que la proporción es semejante a la de los promastigotes metacíclicos. Se requieren más estudios para dilucidar el papel de los paramastigotes en la metaciclogénesis de *Leishmania*.

La comparación de los morfotipos de promastigotes, mostró mayor proporción de leptomonas a partir de 6 días en el intestino medio torácico y menor proporción de los otros morfotipos en el intestino medio abdominal. Esto pudiera ser causado por diferencias en la migración de las leptomonas hacia el intestino medio torácico y a su capacidad de división [36]. Para que la transmisión de *Leishmania* ocurra, se deben desarrollar promastigotes metacíclicos infectivos en el intestino que deben migrar a la región torácica del insecto. Los resultados en *L. ovallesi* realimentadas a los 6 días post infección con *L. (L.) amazonensis* e inmediatamente disecados, mostraron porcentajes similares de infección en la región de la válvula estomodeal, esófago y probóscide en relación a los controles. Los hallazgos sugieren que existe un mecanismo de migración natural y colonización del intestino medio torácico, válvula estomodeal y probóscide por parte de *L. (L.) amazonensis*, controlado posiblemente por la constante exposición al gradiente de carbohidratos proveniente desde el divertículo hacia el intestino del flebotomo, y a la exposición a la saliva deglutida durante la alimentación con carbohidratos [16,25,37], que proveen señales para la diferenciación, división y modulación de la migración de los parásitos. La estabilidad de los parásitos en el lumen del intestino, se debe a las finas microfibras desarrolladas en la matriz del gel que se forman en el intestino, permitiendo la adherencia [13]. Por otro lado, un elemento importante de aclarar es la posible existencia de los dos morfotipos, las llamadas haptomonas y leptomonas. Los promastigotes de haptomonas podrían encontrarse adheridos al revestimiento cuticular de la válvula estomodeal [25,38] y los promastigotes de leptomonas estarían insertos en la matriz del gel; las moléculas implicadas en la adhesión de estos parásitos son desconocidas [32,38].

La adherencia de *Leishmania* al epitelio de los insectos vectores, está relacionada con la presencia de glicoproteínas

terminales N-acetil-galactosamina y con la presencia de proteínas semejantes a lectina en la superficie del parásito [39]. Los resultados obtenidos con los promastigotes de leptomonas de *L. (L.) amazonensis* provenientes de intestino medio torácico y del intestino medio abdominal de *L. ovallesi*, a los 6 días post infección, exhibieron diferentes patrones de uniones a glicoconjugados, que sugieren la presencia de distintos residuos de carbohidratos en la superficie celular del parásito y/o flagelo. Las leptomonas mostraron la presencia de moléculas de carbohidratos que incluyen, α -D-manosa y D-glucosa en mayor proporción, la presencia de moléculas de α -manosa, glucosa y α -N-acetil-glucosamina (GlcNAc) en la superficie del parásito y/o flagelo y la distribución selectiva de residuos de carbohidratos de α -D-galactosa en la superficie celular o del flagelo. Las leptomonas no se unieron a la lectina PNA, lo que sugiere que no presentan sitios de unión para D-galactosa y N-acetilgalactosamina.

Leishmania expresa en su superficie celular moléculas de lipofosfoglicano especie específico y moléculas de metaloproteasa gp63 [40,41], entre otras, lo cual sugiere cambios constantes de los distintos morfotipos durante el transcurso de su desarrollo en el intestino de los flebotomos, provocados principalmente por la glicosilación. Los carbohidratos cumplen funciones muy importantes en el reconocimiento biológico y unen, específicamente, a diferentes moléculas, tales como lectinas y glicoproteínas, mediando interacciones. La glicosilación es una modificación pos-traduccional más frecuente en las proteínas, dada la variedad de glicanos que se pueden producir a partir de un número relativamente limitado de monosacáridos [42]. El patrón de glicosilación de una proteína puede modificarse ante diversas situaciones fisiológicas, contribuyendo a mayor estabilidad ante modificaciones físico-químicas del medio [15]. La glicosilación sería de tipo mucina, que determina la unión de las numerosas cadenas oligosacáridas presentes en las mucinas que recubren la superficie de diferentes tipos de células y de parásitos [39,42]. Estas pequeñas diferencias en la expresión de glicoconjugados encontradas en las leptomonas pueden tener funciones importantes permitiendo mantener a los parásitos en posiciones estables en el intestino medio torácico, mediante adhesiones con el gel en el intestino y entre los parásitos a través del flagelo o del cuerpo, formando rosetas.

Para un mayor conocimiento sobre metaciclogénesis y transmisión de *Leishmania* es necesario profundizar en los estudios moleculares de la interacción *Leishmania*-vector. En este trabajo se aportan diferentes aspectos del desarrollo e interacción de *L. (L.) amazonensis* en *L. ovallesi* importantes para entender su potencial vectorial.

Agradecimientos

Al proyecto CDCHT-ULA (Cod: C-1606-08-03-B) y Proyecto LOCTI (CODIGO- L-C-13-07-03-MRW) por el financiamiento.

Referencias

1. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Ent Inst. 1994; 54:1-881.
2. Añez N, Cazorla D, Nieves E. Registro de especies de flebotomos en focos endémicos para leishmaniasis en el Estado Mérida, Venezuela. Bol Dir Mal San Amb. 1989; 29:12-34.
3. Feliciangeli MD, Reyes RM, Limongi JE. Natural infection of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) with parasites of the *Leishmania braziliensis* complex in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988; 83:393-4.
4. Añez N, Cazorla D, Nieves E, Chataing B, Castro M, Yarbuh AL. Epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria en Mérida, Venezuela. I. Diversidad y dispersión de especies flebotomias en tres pisos altitudinales y su posible rol en la transmisión de la enfermedad. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988; 83:455-63.
5. Nieves E, Villarreal N, Rondon M, Sanchez M, Carrero J. Factores de riesgo y evaluación de conocimiento sobre la leishmaniasis tegumentaria en un área endémica de Venezuela. Biomédica. 2008; 28:347-56.
6. Feliciangeli M. Hourly activity of *Lutzomyia ovallesi* and *L. gomezi* (Diptera: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in northcentral Venezuela. J Med Entomol. 1997; 34:110-5.
7. Bonfante-Garrido R, Spinetti H, Cupillo E, Momen H, Grimaldi G Jr. *Lutzomyia ovallesi* (Diptera, Psychodidae) as a vector of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. Parasitologia. 1991; 33:99-104.
8. Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100:43-6.
9. Olivero JL. Estudio comparativo de la digestión sanguínea de flebotominos vectores de *Leishmania*. Tesis de Grado. Universidad de Los Andes, Merida-Venezuela 2007. 130pp.
10. Lawyer PG, Young DG, Butler JF, Akin DE. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) J Med Entomol. 1987; 24:347-55.
11. 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.
12. Cihakova J, Volf P. Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*. Ann Trop Med Parasitol. 1997; 91:267-79.
13. Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr Mol Med. 2004; 4:601-9.
14. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol. 2006; 22:439-45.
15. Nieves E, Rondon M. Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares. Rev Soc Ven. Microbiol. 2007; 27:66-72.
16. Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. Curr Opin Microbiol. 2008; 11:340-4.
17. Pimenta PFP, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM *et al* The vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proc Nat Acad Sci. 1994; 91:9155-9.
18. 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.
19. Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW. *Leishmania* in phlebotomid sandflies I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and esophageal valve of the sandfly. Proc R Soc Lond Biol Sci. 1974; 187:409-19.
20. Stierhof YD, Bates PA, Jacobson RL, Rogers ME, Schlein Y, Handman E. *et al* Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstructs the digestive tract of infected sandfly vectors. Eur Cell Biol. 1999; 7:675-89.
21. Nieves E. A biología do desenvolvimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no flebotomíneo *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Tesis de Doctorado en Ciencias. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte-Brasil. 2000. 148 pp.
22. Schlein Y, Jacobson RL, Shlomai J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. Proc R Soc Lond B. 1991; 245:121-26.
23. Ilg T, Harbecke D, Wiese M, Overath P. Monoclonal antibodies directed against *Leishmania* secreted acid phosphatase and lipophosphoglycan. Eur J Biochem. 1993; 217:603-15.
24. Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MAJ, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature. 2004; 430:463-7.
25. Schlein Y. *Leishmania* and sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. Parasitol Today. 1993; 9:255-8.
26. Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. Parasitology. 1997; 115:359-69.
27. Schlein Y, Jacobson RL, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and implement parasite transmission by bite. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:9944-8.
28. Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votypka J. Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. Int J Parasitol. 2004; 34:1221-7.
29. Rogers ME, Bates PA. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. PLoS Pathog. 2007; 3:818-25.
30. Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 1977; 13:429-40.
31. Nieves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the Sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 2000; 37:134-40.
32. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth

- phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol.* 2003; 33:1027-34.
33. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Petter, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.) *The leishmaniasis in biology and medicine. Vol 1 Biology and Epidemiology.* New York: Academic Press 1987. pp 1-111.
 34. Nieves E, Dávila-Vera D, Palacios-Prü E. Daño ultraestructural del intestino medio abdominal de *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz) (Diptera: Psychodidae) ocasionado por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitol Latinoam.* 2004; 59:115-22.
 35. Nieves E, Pimenta FPP. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67:640-7.
 36. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology.* 2002; 124:495-507.
 37. Cavalcante RR, Pereira MH, Freitas JM, Gontijo NF. Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101:85-7.
 38. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007; 37:1097-106.
 39. Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect.* 2007; 9:317-24.
 40. Sádlová J, Volf P, Victoir K, Dujardin JC, Votýpka J. Virulent and attenuated lines of *Leishmania major*: DNA karyotypes and differences in metalloproteinase GP63. *Folia Parasitol.* 2006; 53:81-90.
 41. Rodrigo PS, Margonari C, Secundino NC, Macêdo ME, Da Cost SM, Rangel EF *et al.* Differential Midgut Attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the Sand Flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:1-7.
 42. Freire T, Robello C, Casaravilla C, Alvarez DE, Medeiros A, Carmona C *et al* Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas Fisiol.* 2002; 8:89-107.