

Presencia de nectomonadas metacíclicas de *L. pifanoi* en la hipofaringe de *Lutzomyia youngi* y la ingestión de azúcares*

Metacyclical forms of L. pifanoi in the hypopharynx of Lutzomyia youngi and their sugar consumption

Elina Rojas y José V. Scorza

Laboratorio de Quimioterapia y Control de Vectores. Centro de Investigaciones Parasitológicas "José W. Torrealba". Trujillo - Venezuela

Resumen

Se evidencia la presencia de promastigotos metacíclicos de *Leishmania pifanoi* en el conducto hipofaríngeo de *Lutzomyia youngi* infectados experimentalmente por ingurgitación sobre lesiones tarsales de hámsteres. La aparición de metacíclicos en la hipofaringe, cuya morfología se ilustra, ocurre entre los 5 y 9 días de desarrollo postprandial y es más frecuente en insectos alimentados con sacarosa comercial no refinada. Se investiga el papel de derivados aminados de glucosa y galactosa y también de aminoácidos, en la promoción y migración de los metacíclicos.

Psychodidae, parasitología. Leishmania mexicana, aislamiento. Sacaroso.

Abstract

The presence of metacyclical promastigotes of Leishmania pifanoi in the hypopharyngeal duct of Lutzomyia youngi is reported. The insects were experimentally infected by engorgement on the tarsal lesions of hamsters. The metacyclics, whose morphology is illustrated, appeared in the hypopharynx 5 to 9 days after engorgement; they were more frequently found in the insects fed on unrefined commercial sugar. They role of amino derivates of glucose and galactose, as well as of amino acids in the development and migration of metacyclics, is investigated.

Psychodidae, parasitology. Leishmania mexicana, isolation. Sucrose.

* Trabajo realizado con financiamiento del Proyecto NURR-C-60-88.

Correspondencia para / Correspondence to: Elina Rojas - Centro Trujillano de Investigaciones Parasitológicas "José W. Torrealba". Av. Camona Sector LosIlustres, Aptdo. Postal 100. Trujillo 3102 - Venezuela. Fax: (58-72) 33503

Recibido en 20.3.1995. Aprobado en 5.1.1996.

INTRODUCCIÓN

La ingestión natural de azúcares por flebotomos silvestres fue demostrada por Young et al.¹⁹ (1980) en *Phlebotomus ariasi* mediante el test antrona, que reacciona con fructosa o con sacarosa. Entre 71 y 75% de los insectos reaccionaron positivamente.

Lutzomyia youngi capturados en la vecindad de la ciudad de Trujillo, en el occidente de Venezuela, fueron también positivos al test de antrona en un 52% (N:68) (Rojas de C.⁹, 1989).

El azúcar ingerido por flebotomos provendría de savia o de nectarios (Schlein¹², 1987) o de excreciones de áfidos (Killick-Kendrick y Killick-Kendrick⁷, 1987). En ambos casos, directa o indirectamente, la ingesta es seguramente de sacarosa o de fructosa contaminada con aminoácidos libres y otros componentes nitrogenados presentes, por lo menos, en el sistema floémico de plantas diversas (Zimmerman²⁰, 1957). Entre los aminoácidos floémicos más comunes y abundantes se ha identificado alanina, glutamina, asparagina y laucina (Auclair¹, 1963).

Se ha especulado relación entre las concentraciones de azúcares ingeridos por flebotomos y la morfogénesis de *Leishmania*. Altas concentraciones de sacarosa promueven la morfogénesis de *L. major* en medio NNN. Con sacarosa 0,25M, a partir del 6º día a 28°C, culmina el desarrollo en cultivo con un estado terminal que no se divide (Schlein et al.¹¹, 1987), semejante a los observados en *P. papatasi* infectados por *L. major* mantenidos hasta 7 días con sacarosa al 30% (Shehata et al.¹⁴, 1988). En ambos casos, estos estadios serían similares a los reconocibles por un anticuerpo monoclonal (WIC, 79.3) que identifica a un ligando que enlaza los parásitos a macrófagos, en presencia de complemento (Schlein et al.¹¹, 1987). Estos trabajos confirman suposiciones previas sobre la necesidad de una dieta suplementada con sacarosa o con fructosa, para que los flebotomos puedan transmitir *Leishmania* sp. por picadura (Smith et al.¹⁵, 1940; Shortt et al.¹⁶, 1926; Killick-Kendrick⁵, 1979).

Se investigó el papel de una dieta suplementaria azucarada sobre la migración anterior *L. pifanoi* en *Lu. youngi*, prestando especial atención a la presencia de parásitos en la porción media y terminal del conducto de la hipofaringe en insectos alimentados con sacarosa desde el quinto hasta el séptimo día después de la ingesta infectante. Se propone investigar la presencia de *L. pifanoi* en el probóscido y la hipofaringe de *Lu. youngi* sobrealimentados con: (1) sacarosa comercial no refinada; (2) sacarosa comercial refinada; (3) sacarosa 99% de Sigma Chem. Co.;

(4) sacarosa 99% adicionada con tres de los aminoácidos más comunes del floema; (5) sacarosa mezclada con N-acetil-galactosamina o N-acetil-D-glucosamina; y (6) mezcla de sacarosa con galactosa, todos de Sigma. La inclusión de derivados aminoacetilados de glucosa y de galactosa obedece a la importancia de estas moléculas en la síntesis de precursores de la quitina por un lado, y de lipofosfoliguanos con importancia estratégica adaptativa para promastigotos de *Leishmania*, tanto en el vector como en el vertebrado (Turco¹⁷, 1990).

MATERIAL Y EXPERIMENTO

Flebotomos Infectados con *Leishmania pifanoi*

Hembras silvestres de *Lu. youngi*, capturadas en una localidad no endémica, en la época de mayor proporción de núlparas (Abril-Mayo), por atracción con trampa de Shannon cebada con luz fluorescente de. Se confinaron en envases acorchados, dentro de cavas de poliestireno 24°C y más de 80% H.R., en penumbra. Veinticuatro horas después de la captura fueron alimentadas sobre lesiones tarsales de hámsteres infectados cuatro semanas antes con *L. pifanoi*.

Azúcares, Aminoazúcares y Aminoácidos

Se prepararon separadamente soluciones de sacarosa comercial refinada y no refinada, se Sigma Chem. Co. al 34% (1M) y también mezclas de sacarosa Sigma con otros compuestos. En el caso de mezclas de sacarosa Sigma con derivados de azúcares, fueron preparados 10 ml. de solución 2M de sacarosa Sigma para mezclar con galactosa, N-acetil glucosamina y N-acetil galactosamina, disolviendo 50 mg de estos por separado en 1,0 ml de agua destilada. Se agregó 10 ml de solución de sacarosa 2M, 50 mg de DL-alanina, de L-glutamina, de L-asparagina o de DL-leucina, previamente disueltos en 1,0 ml de agua destilada tibia.

Investigación de Nectomonas de *L. pifanoi* en el Hexaqueto de *Lu. youngi* Sobrealimentados con Azúcares o sus Mezclas.

Los sacáridos simples o mezclados con otros compuestos, se ofrecieron a flebotomos previamente ingurgitados sobre lesiones de hámsteres cuatro días antes. En grupo desde 14 hasta 56 insectos, se les suministraron los azúcares en un trocito de espuma plástica prelavada con agua destilada e impregnada con la solución dulce, cambiando el plástico diariamente por otro nuevo hasta el 8º, para reducir su contaminación por microorganismo.

Desde los 3 y hasta los 9 días, los insectos se sacrificaron por sobreanestesia con éter y tras enjuagarlos con solución salina al 0,6% conteniendo 10.000 de detergente, fueron disecados para estudio. Se separó la cabeza con un fragmento de esófago para examinarla, bajo cubre-objeto con 400X. Se prestó especial atención a la presencia

del tapón estomodeal de haptomonas como evidencia de infección e se investigó por parásitos en el hexaqueto y en el conducto de la hipofaringe.

Se disecaron las piezas bucales del hexaqueto para montarlas en líquido de Berlesse, fotografiarlas y medirlas por comparación con fotografías en un micrómetro de platina, ampliada a la misma escala.

Morfología de Nectomonadas de *L. pifanoi* en el Hexaqueto de *Lu. youngi*

Cuando se observaron parásitos libres en hexaquetos se prestó especial atención a su morfología somático-flagelar con microscopía de contraste de fases bajo 400X y luego, después de levantar la laminilla, se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa al 10% de tampón de fosfato M/200, pH 7,2.

RESULTADOS

Infecciones y Sobrealimentación con Sacarosa Comercial

Se disecaron 610 insectos, 271 con infecciones hasta 5 días y 339 con infecciones entre 6 y 9 días. En la Tabla 1 se presentan los resultados de las disecciones de 16 lotes de hembras con porcentajes de infección comprendidas entre 18 y 100% a juzgar por la presencia del tapón estomodeal con parásitos. Se observaron parásitos en el proboscide, más frecuentemente en los disecados entre 6 y 9 días de infectados. En estos mismos fue también mayor la frecuencia de promastigotos cortos con largos flagelos desplazándose áctivamente desde el ápice

hasta la base del conducto hipofaríngeo, sin escapar al exterior del conducto y sin invadir las glándulas salivales. De nueve lotes de flebótomos entre 156 infectados con infecciones de 6 hasta 9 días, se hallaron 54% de infecciones con 13% presentando parásitos libres en el proboscide y de estos, 7% con promastigotos libres en el conducto hipofaríngeo.

La infección de Flebótomos y su Realimentación con Tres Diferentes Calidades de Sacarosa

Se disecaron 576 insectos en tres lotes alimentados respectiva y complementariamente con tres diferentes tipos de sacarosa y disecados entre 6 y 7 días: 152 con sacarosa Sigma, 200 con sacarosa comercial refinada y 224 con sacarosa comercial no refinada (azúcar morena). Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Entre 152 hembras de *Lu. youngi* sobrealimentadas con sacarosa Sigma, se hallaron tapones con parásitos en 42 (27,8%) y de éstas 4 con promastigotos en la hipofaringe (2,6%).

Entre 200 hembras que fueron alimentadas con sacarosa comercial refinada, se hallaron 65 con parásitos en el tapón estomodeal (32,5%) y entre éstas, 8 que poseían promastigotos hipofaríngeos (11,7%).

De 224 hembras sobrealimentadas con sacarosa no refinada, 101 resultaron positivas (45,0%) y de éstas 16 (16,1%) mostraron parásitos libres en el conducto hipofaríngeo.

Las diferencias entre los porcentajes de invasión hipofaríngea son altamente significativas, sugeri-

Tabla 1 - Frecuencia de promastigotos de *L. mexicana* en proboscide e hipofaringe de *L. youngi* infectados.

Días después de la infección	Nº de flebótomos disecados	Flebótomos con tapón estomodeal	%	Flebótomos con promastigotos en:			
				Proboscide	%	Hipofaringe	%
3	48	24	50	5	2	-	-
3	23	12	52	-	-	-	-
4	50	36	72	-	-	-	-
4	21	14	67	-	-	-	-
4	30	30	100	-	-	-	-
5	20	7	35	3	43	-	-
5	79	21	27	5	24	-	5
3 hasta 5 días	271	144	53	13	9	1	7
6	38	7	18	-	-	-	-
6	12	13	52	1	8	1	8
7	20	16	80	4	25	2	13
7	17	9	53	2	22	2	22
8	21	11	52	4	36	1	9
8	62	42	68	3	5	3	5
8	81	56	69	6	11	1	2
8	20	11	55	2	18	1	9
9	55	21	38	2	7	2	7
6 hasta 9 días	339	186	55	24	13	13	7
Gran total	610	330	54	37	11	14	4

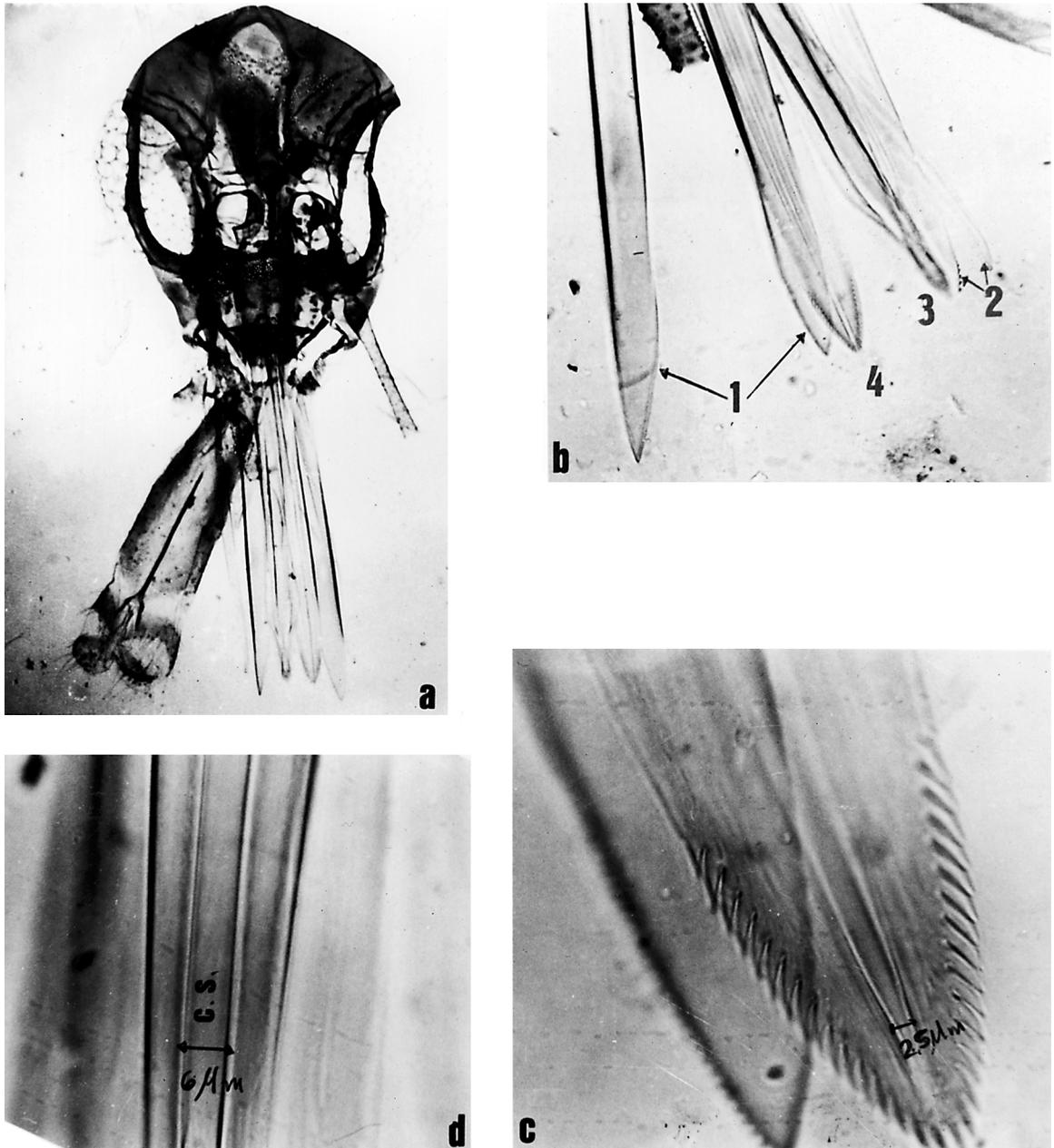


Figura 1 - Piezas de fascículo bucal o hexaqueto de *L. youngi*.

- a - Cabeza mostrando el labro y hexaqueto.
- b - Mandíbulas (1) maxilas (2) epofaringe (3) e hipofaringe (4).
- c - Hipefaringe.
- d - Detalhe de la hipofaringe mostrando el conducto slival (c.s.).

Tabla 2 - Influencia de la calidad de la sacarosa como sobrealimento en el desarrollo de la infección hipofaríngea de *L. mexicana* en *L. youngi*.

Sacarosa	Nº de <i>L. youngi</i> examinados	<i>L. youngi</i> positivos		<i>L. youngi</i> con parásitos en la hipofaringe	
		Nº	%	Nº	%
Sigma	152	42	27,8	4	2,6
Comercial refinada	200	65	32,5	8	11,7
Comercial no refinada	224	101	45,0	16	16,1

Tabla 3 - Acidez, conductividad y N_2 en tres muestras de sacarosa suministradas a *L. youngi* que mostraron promastigotos de *L. mexicana* en la hipofaringe.

Sacarosa	Acidez pH	Conductividad $\mu \Omega/cm$	N_2 %	<i>L. youngi</i>	
				Infectados Nº	Hipofaringe Nº (%)
Sigma Ch	6,52	11	0,054	42	4 (2,6)
Comercial refinada	6,77	25	0,057	65	8 (11,7)
Comercial no refinada	6,42	35	0,059	101	16 (16,1)

endo ello que las impurezas de azúcar no refinada contribuyan a mayor migración hipofaríngea de parásitos.

Experimentos con Sacarosa de Sigma Mezclada con Otros Azúcares y Compuestos Nitrogenados

Fueron separados 289 *Lu. youngi* alimentados sobre hámsteres infectados con *L. pifanoi* y se distribuyeron en cuatro grupos experimentales: 1) 62 sobrealimentados entre 4º y 7º días con sacarosa más galactosa; 2) 83 sobrealimentados con sacarosa y N-acetilgalactosamina también por el mismo periodo; 3) 82 sobrealimentados con sacarosa y acetilglucosamina; y 4) 62 alimentados con sacarosa más cuatro aminoácidos. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 3. Fue prestada especial atención a la presencia de parásitos adheridos a 1ª región estomodeal y también libres en la hipofaringe. La heterogeneidad de los compuestos suministrados con la sacarosa no parece modificar los porcentajes de las infecciones, aunque estas fueron relativamente más bajas (18,1%) en los flebotomos que recibieron sacarosa con N-acetilgalactosamina donde tampoco se observaron parásitos en la válvula estomodeal. No así en los sobrealimentados con sacarosa y N-acetilglucosamina donde tuvo lugar la formación de tapones faríngeos y se vieron parásitos libres en el probóscide y en el ducto hipofaríngeo, en forma similar a los observados en los experimentos con sacarosa comercial.

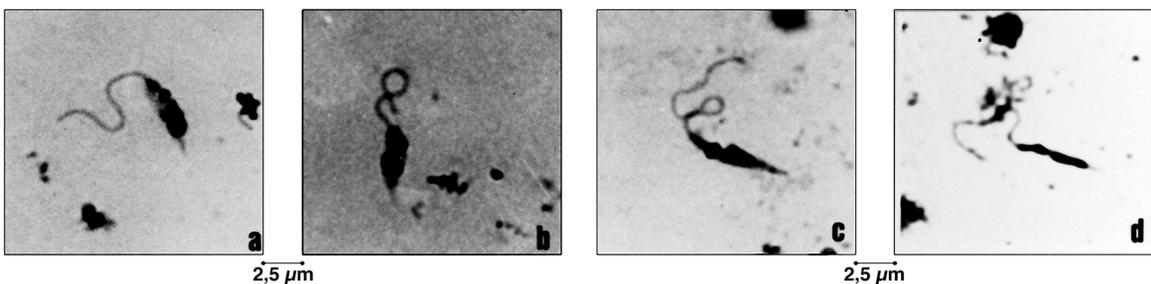
La adición de aminoácidos a 1ª dieta sacarosada, así como la inclusión de galactosa, pareció inhibir igualmente la migración anterior de los parásitos.

Morfometría del Hexaqueto de *L. youngi* y de los Promastigotos Hipofaríngeos

Las longitudes del labio y de las piezas del fascículo de la cabeza de las hembras de *L. youngi* montadas en medio de Berlesse, miden entre 0,30 y 0,40 mm (N:10) (Fig. 1a). De las seis piezas del fascículo o hexaqueto (Fig. 1b) las mandíbulas sobrepasan a las demás en longitud por más de 40 μm , siendo las maxilas las piezas con menor longitud.

La longitud total de la hipofaringe de *Lu. youngi*, pieza del hexaqueto que penetra hasta la dermis, es de 390 μm y remata en su extremo aguzado por una doble fila de 16 dientes (Fig. 1c). Su conducto mide 6 μm de diámetro interno en su tercio medio y 2,5 μm en el extremo distal (Fig. 1d).

En preparaciones con tapones de *L. pifanoi*, disecados y separados, se observaron promastigotos con núcleos ovoides, cinetoplastos pequeños colocados lateralmente en posición critidioides y flagelos un poco más largos que la longitud del cuerpo, con 5 μm y 1,2 μm de anchura y 10 μm para el flagelo (N:10) (Figs. 2a y b). En los tapones mismos, los promastigotos se adhieren en hileras complejas, por fijación de los extremos de los flagelos de unos al trayecto flagelar de otros.

**Figura 2** - *L. Mexicana* de la válvula estomodeal y de la hipofaringe de *L. youngi*.

a y b - Formas critidioides (Final fase migratoria)

c y d - Estadios metacíclicos (Fases metacíclogénica)

No ha sido raro el hallazgo de parásitos libres y activos dentro del conducto de la hipofaringe. A lo largo de este conducto, y sin invadir el conducto salival propiamente dicho, decenas hasta centenares de promastigotos se desplazan incesantemente dentro del conducto, en ambas direcciones, desde el ápice de la hipofaringe hasta su base. Son parásitos finos, delgados, aguzados, con núcleo estrecho y alargado, cinetoplasto siempre prenuclear o típicamente leptomonoides y flagelo cerca de dos veces tan largo como el cuerpo (Fig. 2c). En algunos casos los parásitos son simplemente aciculares (Fig. 2d). La longitud del cuerpo alcanza $4,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$, con una anchura máxima de $1,07 \pm 0,19 \mu\text{m}$ y la del flagelo $8,8 \pm 1,3 \mu\text{m}$.

Ao lado de parásitos intrahipofaríngeos suele observarse entre las piezas mismas del probóscide, otras formas a las cuales no se prestó especial atención por su escasez y polimorfismo.

DISCUSIÓN

La secuencia del desarrollo y migración de promastigotos de *L. pifanoi* hacia el probóscide de *L. youngi*, ha sido estudiada en flebotomos alimentados sobre hámsteres infectados, manteniendo los insectos con sacarosa comercial desde 3 hasta 9 días. Los resultados de las disecciones de 16 ensayos, donde se estudiaron 610 insectos han arrojado resultados sorprendentes. Los flebotomos infectados mostraron siempre un tapón de parásitos en el cardias o válvula estomodeal, siguiendo el patrón suprapilórico de desarrollo. Entre 144 *L. youngi* infectados hasta con 5 días de desarrollo, se hallaron un 9% con promastigotos libres en proboscide y uno solo con la hipofaringe infectada (0,7%). Las invasiones a la hipofaringe han sido más frecuentes a partir del sexto día de la infección. Entre 186 insectos, con duración de desarrollo entre 6 y 9 días, se detectaron 24 con parásitos en proboscide (13%) con 13 de ellos (54%) presentando parásitos en el conducto, hipofaríngeo para un 7% de positividad en este conducto en el total de los 186 infectados. Esto es, que en términos porcentuales, la frecuencia de promastigotos en la hipofaringe es diez veces mayor en *L. youngi* infectados con 6 o más días de evolución. Es importante destacar, para la elaboración de conceptos, que la invasión de la hipofaringe acontece como una tercera fase del desarrollo de la infección. La primera fase sería la de transformación de amastigotos tisulares en promastigotos entomoentéricos. La segunda fase sería de crecimiento exponencial de la

población con transformación de amastigotos tisulares ingeridos por el insecto en promastigotos endoentéricos y con activa reproducción hasta la conclusión de la ingesta sanguínea, terminando esta fase con la excreción masiva de flagelados (Rojas et al.¹⁰). La segunda fase, concluiría con la gelificación o formación de un tapón gléico estomodeal, entre 60 y 120 horas postinfección.

La tercera fase, que actualmente se describe y que anticipadamente debe llamarse de metaciclogenesis, ocurriría a partir del 5º día y más seguramente del 6º. Se expresa cuasi simultáneamente con la presencia de flagelados libres entre piezas del probóscide y también en la hipofaringe. La mitad del número de flebotomos con parásitos en el hexaqueto, lo presenta también en la hipofaringe. Todo esto sugiere que algunos de los promastigotos que se detectan en el probóscide estarían en tránsito hacia la hipofaringe. Estos últimos deben ser lo suficientemente delgados como para penetrar a través de un conducto hipofaríngeo terminal que mide 2,5 μm de diámetro.

La presencia de promastigotos hipofaríngeos parece ser más frecuente en flebotomos alimentados con sacarosa comercial que con sacarosa de alta pureza (Sigma). Considerando como una "contaminación" nitrogenada para la sacarosa, la adición de N-acetilgalactosamina o de la N-acetilglucosamina, se registraron efectos diferentes sobre el desarrollo, migración y presencia de *L. pifanoi* libres en la región estomodeal de *L. youngi*. El derivado galactosado inhibe la formación de un tapón faríngeo. La N-acetil glucosamina no interfiere la formación del tapón ni la aparición de parásitos libres en la hipofaringe.

La formación del tapón faríngeo, cuya frecuencia parece estar relacionada con el éxito de la infección y a su vez con la colonización del conducto hipofaríngeo por los parásitos, tiene que ver de algún modo con el desarrollo de los promastigotos metacíclicos o con el mecanismo de transmisión (Walter¹⁸, 1993). Una explicación posible que relacione estos fenómenos con la actividad lectínica y en este caso el tracto estomodeal, ha sido producida por (Howard et al.³, 1987) quienes trabajaron con formas estacionarias en cultivo de *L. donovani*. Han destacado estos autores que los "metacíclicos" de cultivo son aglutinados particularmente por la lectina de maní cuyo azúcar inhibidor específico es la N-acetilgalactosamina. Los mismos estadios, por el contrario, no son aglutinados por la lectina de trigo cuyo inhibidor es la N-acetilglucosamina. Podría suponerse, análogamente, que la cutícula estomodeal de *L. youngi* posea actividad lectínica afín a la del

maní, saturable por N-acetil-galactosamina y por ende inactivada para el reconocimiento de los promastigotos estacionarios de *L. pifanoi*. Refuerza este punto de vista la demostración de Shottelius¹³ (1982) quien evidenció que un aislado de *L. pifanoi* (LRC-L90) es aglutinado por la lectina de *Ricinus communis*-120 y de *Arachis hypogea*, ambas inhibidas por N-acetil-galactosamina; en cambio, el mismo aislado no es aglutinado por la lectina de *Aaptos papillata* que tiene por inhibidor la N-acetilglucamina. Similares espectros de aglutinación e inhibición exhibieron varios aislados de *L. donovani*.

Es improbable que los contaminantes nitrogenados de las muestras de sacarosa comercial contengan algún derivado acetilaminado, como tampoco que la cutícula estomodeal de *L. youngi* contenga lectinas similares a la de maní o del tártago. Estas especulaciones solamente pretenden ofrecer una explicación o hipótesis racional para el fenómeno de la migración de promastigotos hacia la hipofaringe y su presencia en el ducto mismo, fenómeno de considerable importancia para la comprensión del mecanismo de la transmisión leishmánica.

No obstante, por la extraordinaria variedad y riqueza de los componentes del fluido de floema, no se descarta que azúcares o sus derivados — aún no investigados deliberadamente — pueden intervenir en la morfogénesis y migración de parásitos tan específicamente reconocibles por lectinas, también de origen vegetal.

No sería exagerado especular que junto con la sacarosa, los flebotomos puedan ingerir factores que favorezcan la migración de los parásitos hacia la hipofaringe. Molyneux et al.⁸ (1990) han detectado en el rocío meloso la presencia de alcaloides; uno de estos la castanospermina, es un potente inhibidor de la α - y β - glucosidasa cuya ingestión pudiera impedir la síntesis de polímeros o glucanos. Mientras no se conozca a ciencia cierta la naturaleza del material que forma el tapón estomodeal, no se podría hacer conjeturas importantes; sin embargo, la ingestión de azúcares debe estar relacionada, en alguna manera con el complejo que se forma, precisamente, en la desembocadura del divertículo esofágico.

Una revisión actualizada sobre el ciclo vital de *Leishmania* en flebotomos, con particular referencia a las formas infectantes para el hospedador vertebrado, ha sido producida por Killick-Kendrick⁶ (1990). Recientemente Walters¹⁸ (1993), comparando infecciones por *Leishmania* spp. en asociaciones naturales y no naturales con flebotomos, describe pequeñas diferencias entre ambos ciclos que con-

cluyen con la producción de promastigotos nectomonados metacíclicos solamente en las asociaciones naturales. Killick-Kendrick⁶ (1990) replantea especulaciones sobre los posibles mecanismos de inoculación de parásitos metacíclicos, señalando que éste podría ocurrir realmente cuando los parásitos se hallan en las piezas bucales por la regurgitación de promastigotos infectantes. El hallazgo del presente estudio contribuye a aclarar, en modo explícito, el posible mecanismo de inoculación por el vector; mecanismo que no es otro que el usual en todos los protozoos que se transmiten por picadura y durante la picadura, a través de la inoculación de formas presentes en el conducto de la hipofaringe. La regurgitación de parásitos durante la ingestión de sangre por flebotomos infectados, tan discutida desde el punto de vista de la mecánica de fluidos por Jefferies et al.⁴ (1986), se hace totalmente innecesaria, como hipótesis, a la luz de estos hallazgos. La sospecha de que la transmisión de *Leishmania* por flebotominos vectores pudiera ser similar a los de los tripanosomas salivarios, ya había sido especulada por Basker² (1977).

CONCLUSIONES

Los resultados en este trabajo de infecciones experimentales con *Lutzomyia youngi* con un aislado de *Leishmania pifanoi* contribuyen a explicar el mecanismo de transmisión de este tipo de parásitos por picadura. No es descartable que en otras especies de *Leishmania* y con vectores en donde el ciclo concluya con la formación de un tapón de parásitos en la región estomodeal, se confirme la presencia de promastigotos metacíclicos en el conducto de la hipofaringe, sobre todo en infecciones con más de cinco días de evolución. La irregular abundancia o la ausencia misma de metacíclicos en el conducto hipofaríngeo podría ser consecuencia de su pérdida cuando los insectos infectados hacen pruebas para ingerir azúcares por punción de tejidos vegetales tiernos. La penetración de la hipofaringe con las otras piezas del hexaqueto, es condición necesaria para la ingestión de líquidos azucarados o de sangre. Las evidencias encontradas no hacen sino confirmar procesos biológicos ancestrales. Es forzado admitir la tesis de la regurgitación y explicaciones mecánicas, cuando todos los Kinetoplastida de estación anterior y los Hemosporidida que se transmiten por inoculación, lo hacen a través de formas infectantes metacíclicas o esporozoitos inyectados por la hipofaringe.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. AUCLAIR, J.L. Applied feeding and nutrition. *Ann. Rev. Entomol.*, **8**:439-91, 1963.
2. BAKER, J.R. Factors affecting transmission of vector-borne blood parasites. *Acta Trop.*, **34**:7-19, 1977.
3. HOWARD, M.K. et al. *Leishmania donovani* metacyclic promastigote: transformation in vitro lectin agglutination, complement resistance and infectivity. *Exp. Parasitol.*, **64**:147-56, 1987.
4. JEFFERIES, D. et al. Fluid mechanics of blood meal uptake by *Leishmania* infected sandflies. *Acta Trop.*, **43**:43-5, 1986.
5. KILLICK-KENDRICK, R. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: Lumsden, W. H. R & Evans, D. A. ed. *Biology of Kinetoplastida*. London, Academic Press, 1979. p. 395-449.
6. KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle with special references to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**:37-42, 1990.
7. KILLICK-KENDRICK, R & KILLICK-KENDRICK, M. Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus atiasi*. *Med. & Veter.*, **1**:197-302, 1987.
8. MOLYNEUX, D.H. et al. Honeydew analysis for detecting phloem transport of plant natural product. *J. Off. Chem. Ecol.*, **16**:1899-1909, 1990.
9. ROJAS DE C., L. Mecanismo de adhesión de *Leishmania braziliensis* en *Lutzomyia youngi*. [Trabajo de ascenso ULA Trujillo, Venezuela].
10. ROJAS, et al. Excreción de promastigotos de *Leishmania pifanoi* por *L. youngi* experimentalmente infectado. *Rev. Saúde Pública*, **29**:496-502, 1995.
11. SCHLEIM, Y. et al. Development of sandfly forms of *Leishmania major* in sucrose solutions. *J. Parasitol.*, **73**:797-805, 1987.
12. SCHLEIM, Y. Sandfly diet and *Leishmania*. *Parasitol. Today*, **2**: 175-7, 1987.
13. SCHOTTELIUS, J. Lectin binding strain-specific carbohydrates on the cell surfaces of *Leishmania* strains from the Old World. *Parasitenk.*, **66**: 237-47, 1982.
14. SHEHATA, M.G. et al. Development of *Leishmania major* in the phlebotomine sandflies, *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) and *Phlebotomus langeroni* (Nitzulescu). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **63**:146-51, 1988.
15. SHMITH, R.O. et al. Further investigation on the transmission of Kala-azar. Part III: The phenomenon of the blocked sandfly. *Ind. J. Med. Res.*, **28**:581-4, 1940.
16. SHORTT, H. et al. The life-history and morphology of *Herpetomonas donovani* in the sandfly *Phlebotomus argentipes*. *Ind. J. Med. Res.*, **13**:947-59, 1926.
17. TURCO, S.J. The leishmania 1 lipophosphoglycan: a multifunctional molecule. *Exp. Parasitol.*, **70**:241-5, 1990.
18. WALTERS, L.L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly hosts. *J. Euk. Microbiol.*, **40**:196-205, 1993.
19. YOUNG, C. et al. Fructose in *Phlebotomus ariasi* and the possible relevance of sugar taken by sandflies to the transmission of leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**:363-6, 1980.
20. ZIMMERMAN, M.H. Translocation of organic substances in trees. I the nature of sugar in the sieve tube exudate of trees. *Plant. Physiol.*, **32**:288-91, 1957.