

# ***Leishmania braziliensis*: aislamiento de lesiones por inoculación de hámsteres con o sin adición de lisado de glándulas salivares de *Lutzomyia youngi*\***

*Leishmania braziliensis*: isolation of lesions by inoculation of hamsters with and without the addition of salivary gland lysates of *Lutzomyia youngi*

Elina Rojas, José V. Scorza

Centro Trujillano de Investigaciones "José W. Torrealba" - Venezuela

Homogeneizados de biopsias de lesiones cutáneas de 50 casos de leishmaniasis tegumentaria de Trujillo, Venezuela, han sido inoculados en hámsteres machos. Se ha comparado la infectividad de *Leishmania braziliensis*, de homogeneizados simples, con la de los mezclados con lisado de glándula salival de *Lutzomyia youngi*, registrándose un 58,5% de infecciones para una media de 12 semanas de prepatencia con los homogeneizados simples, contra 92% de infecciones con una media de 3 semanas de prepatencia, cuando cada uno de los inóculos de homogeneizado se mezcló con lisado equivalente al de una glándula salival de flebotomo.

*Leishmania braziliensis*, patogenicidad. Psychodidae. Glándulas salivares.

## **Introducción**

La leishmaniasis cutánea localizada es una endemia frecuente en Venezuela, particularmente en la ciudad de Trujillo de la Región de los Andes (Scorza et al.<sup>11</sup>, 1985), donde en los últimos doce años se han atendido 675 casos urbanos y suburbanos, en una población de 57.846 habitantes para 1990.

Se desconoce la distribución urbana del agente etiológico aunque se sabe que circulan localmente cepas de *Leishmania braziliensis braziliensis* y de *L. b. guyanensis* (Scorza & Rojas<sup>12</sup>, 1990).

Para aislar cepas de pacientes de la localidad se inoculó subcutáneamente triturados de biopsias de lesiones en el tarso de hámsteres, con la adición de lisado de glándulas salivares de *Lutzomyia youngi*, principal vector en la ciudad (Scorza et al.<sup>10</sup> 1984). Con el objetivo de comparar la infectividad de los parásitos en estos animales, se desarrolló un estudio experimental con inóculos de leishmania de 50 pacientes, mezclándolos o no con lisado de

glándulas salivales de *Lutzomyia youngi*.

Se ha demostrado que la inoculación de una mezcla de promastigotos de *L. major* con lisado de glándulas salivales de *Lu. longipalpis*, en ratones, incrementa la infectividad del inóculo (Titus & Ribeiro<sup>14</sup>, 1988). La respuesta inflamatoria en el sitio de inoculación en tarsos de hámsteres, de promastigotos de *L. chagasi* mezclados con lisado de glándulas de *L. longipalpis*, aumenta la fagocitosis de los parásitos por los macrófagos (Laurenti et al.<sup>3</sup> 1992).

La presencia de promastigotos metacíclicos en el conducto hipofaríngeo de *Lu. youngi* experimentalmente infectados con *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Rojas & Scorza<sup>8</sup>, 1991), sustenta el papel de la saliva en la inoculación de los parásitos (James & Rossignol<sup>2</sup>, 1991).

En el presente trabajo se describen resultados que comparan la infectividad en hámsteres de inóculos de leishmanias de lesiones de cincuenta pacientes, mezclándolos o no, con lisado de glándulas salivales de *Lu. youngi*.

\* Investigación subsidiada por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico, ULA y T de la Universidad de los Andes (Proyecto NURR-c-60-88).

Separatas/Reprints: Elina Rojas - Apartado 100 - Trujillo - Venezuela

Recibido en 21.6.1994. Aprobado en 24.11.1994.

**Material y Metodos**

**Pacientes** - 50 casos clínicos de leishmaniasis cutánea localizada atendidos en la Consulta Externa del Centro de Investigaciones "José W. Torrealba" de Trujillo, Venezuela, durante 1992-1994, diagnosticados parasitológicamente por examen microscópico. Se incluyen 25 hombres y 25 mujeres con edades comprendidas entre 8 y 61 años.

**Hámsteres** - Hámsteres machos de seis semanas, dos por cada paciente. Proviene del Bioterio de la Universidad de los Andes, y son mantenidos separados, por pares, con alimento concentrado para ratas y agua *ad libitum*.

**Lisado de glándulas salivales de *Lu. youngi*** - Hembras silvestres de *Lu. youngi*, capturadas en una localidad no endémica para leishmaniasis, se disecaron en solución hipotónica de NaCl (0,6%) para separar las nulíparas (Marquez & Scorza<sup>4</sup>, 1982). De estas nulíparas, en fechas diferentes, se extrajeron las glándulas salivales por lotes de 10 hembras, para suspenderlas en 1,0 ml de solución salina isotónica, congelándolas y descongelándolas tres veces para conservarlas a -8°C.

**Inoculación de hámsteres** - Cuando un paciente presentó mas de una úlcera, seleccionó siempre la lesion con la apariencia de ser la menos contaminada para extraer un fragmento del borde de la úlcera, previa anestesia subcutánea con xilocaína. Con cada biopsia de cada paciente se preparou dos inóculos homogeneizados, tomando aproximadamente 50 mg de tejido para triturarlo con un mortero de porcelana en 0,5 ml de solución salina.

Inmediatamente, en la cara dorsal del tarso derecho de un hamster, se inyectó subcutáneamente 0,05 ml de la suspensión del homogeneizado con 0,05 ml de solución isotónica. En el tarso izquierdo del mismo animal se inyectó 0,1 ml de solución salina. Similarmente, en otro hamster *experimental*, se inoculó una mezcla de 0,05 ml de lisado de glándula salival de *Lu. youngi*, con 0,05 ml del homogeneizado de la biopsia en el tarso derecho y 0,1 ml de solución salina en el tarso izquierdo.

**Seguimiento de los animales experimentales** - A partir de quince días de la inoculación, cuando hubo desaparecido la inflamación inespecífica producida por el trauma de la inyección, se examinaron semanalmente los animales durante los primeros seis meses y luego quincenalmente, hasta detectar la aparición de una induración en el sitio de inoculación en la cara dorsal del tarso derecho. Se anotó la fecha de aparición de la lesión tarsal y se confirmó su origen parasitario por examen microscópico de improntas de cada lesión en los animales sacrificados por sobreenestesia con cloroformo. Algunas de estas cepas se mantienen aún hasta 14 pases en hámsteres. Los animales que no desarrollaron lesiones fueron mantenidos en observación hasta doce meses y luego fueron sacrificados.

**Resultados**

**Pacientes, Lesiones y Edad de las Lesiones**

En la Tabla 1 se informó para pacientes masculinos y femeninos, la media etárea, la media del número de lesiones y la edad media de las mismas, en el momento de acudir a la consulta.

**Desarrollo de las Lesiones Tarsales en Hámsteres Controles y Experimentales**

Con material biópsico de los 50 pacientes, se inoculó 100 hámsteres.

Veinticuatro de cincuenta animales inoculados solamente con homogeneizado de biópsias de lesiones, desarrollaron induraciones con parásitos en una media de 11,75 + 7,3 semanas, para un 48% de inoculaciones positivas. De los 26 hámsteres que no desarrollaron lesiones, nueve murieron antes de ocho semanas probablemente por causa de contaminación bacteriana. Los diecisiete restantes se mantuvieron sanos y negativos durante mas de seis meses. En los tarsos izquierdos no se observaron lesiones de ningún tipo.

De los 50 hámsteres inoculados con la mezcla de triturado de material biópsico y lisado de glándulas salivales de *Lu. youngi*, 46

**Tabla 1.** Edad de los pacientes con el número de lesiones por paciente y tiempo de evolución de las mismas.

Sexo	No.	Edad en años	No. de lesiones $\bar{x}$	Edad de las lesiones (meses) $\bar{x}$
Varones	25	30,8 ± 14,4	1,52 ± 0,8	2,48 ± 1,1
Hembras	25	31,1 ± 22,6	1,32 ± 0,6	2,30 ± 1,5

desarrollaron lesiones tempranas en una media de  $3,3 \pm 0,9$  semanas y fueron sacrificados a medida que exhibieron granulomas. La gran mayoría de los animales con lesiones mostraron parásitos para un 92% de inoculaciones positivas. Cuatro hámsteres que se comportaron como animales negativos hasta los seis meses de observación después de la inoculación, fueron sacrificados. La improntas de piel tarsal de estos animales no mostraron amastigotos.

En la Tabla 2 se resumió esta información, destacando que la incorporación de lisado de glándulas salivales de *Lu. youngi*, en inóculos de parásitos de lesiones de pacientes de misma área de distribución del vector, eleva la infectividad de los parásitos en los hámsteres hasta un 92% de los casos, en comparación con un 48% de positividad en las inoculaciones con homogeneizado de tejido de las lesiones sin lisado de glándulas salivales. Se destaca además el extraordinario acortamiento del periodo de incubación para la formación del granuloma parasitario en los animales experimentales, hasta menos de un mes. En cambio, en los hámsteres controles, la duración media del periodo prepatente para la aparición de una induración por granuloma parasitario fue de tres meses.

#### Edad de los Lisados de Glándulas Salivales y la Duración de la Prepatencia de los Granulomas Parasitarios Producidos

Se usó seis lotes de glándulas salivales de 10 hembras de *Lu. youngi* homogeneizados en 1,0 ml de solución isotónica. En la Tabla 3 se informó sobre las fechas de preparación de los lotes, el tiempo medio en semanas de su conservación a  $-8^{\circ}$  C para el momento de uso en mezclas con homogeneizados de lesiones cutáneas y el periodo medio de la aparición de lesiones tarsales, en semanas, en los hámsteres inoculados

Se utilizó lisados de glándulas salivales de una hasta diecinueve semanas en congelación a  $-8^{\circ}$  C. Lisados de glándulas salivales mantenidos durante  $4,1 \pm 2,9$  hasta  $17,8 \pm 0,9$  semanas,

potenciaron granulomas con  $3,4 \pm 0,7$  hasta  $3,6 \pm 0,9$  semanas de prepatencia.

#### Discusión

El hamster dorado (*Cricetus auratus*) es altamente susceptible a la inoculación con amastigotos de *Leishmania* spp. del Continente Americano C. Wilson et al.<sup>16</sup>, 1979). La inoculación intradérmica de  $10^2$  amastigotos de *L. braziliensis* produjo lesiones visibles después de 30 días y el porcentaje de infecciones fue relativamente alto (88,95%). No obstante, la inoculación subcutánea de hámsteres con parásitos de material biopsico de 38 pacientes con lesiones positivas, todos de la Región de los Andes, produjo un 47,4% infecciones (Valera et al.<sup>15</sup>, 1978). La inoculación subcutánea de  $2,5 \times 10^4$  amastigotos de un aislado local de *L. braziliensis* en los tarsos de diez hámsteres, produjo lesiones permanentes en todos a los 30 días de inoculados (Rezzano & Scorza<sup>7</sup>, 1985).

El aislamiento directo de parásitos de lesiones positivas por cultivo de aspirados en medio de Schneider, ha sido exitoso en 83% de 209 casos de leishmaniasis cutánea localizada de Guatemala (Navin et al.<sup>5</sup>, 1990).

Sanchez et al.<sup>9</sup> (1992) aislaron parásitos, por cultivo de aspirados de lesiones en once de diecisiete pacientes infectados en Panamá (65%), en tanto que el cultivo de piel de los mismos casos, fue positivo para un 41% de los pacientes parasitológicamente comprobados. En ninguno de estos dos trabajos sobre epidemiología y diagnóstico se hizo la inoculación de material clínico en hámsteres para aislar los parásitos.

La inoculación de hámsteres con promastigotos de cinco diferentes cepas en cultivo, como una medida de seguridad para preservar cepas de lesiones de pacientes con lesiones cutáneas (Gomez et al.<sup>1</sup>, 1987), produjo lesiones de muy lento desarrollo sugiriendo ello que la evolución de tales parásitos del Ecuador en hámsteres, es un proceso extremadamente lento.

**Tabla 2.** Desarrollo de lesiones tarsales en hamsteres inoculados con material biopsico, con y sin lisado de glándulas salivales de *L. youngi*.

Hamsteres inoculados	No.	Infecciones positivas	Tiempo medio de Inoculación (semanas) $\bar{x}$	Mortalidad espontánea
Con lisados	50	46	$3,3 \pm 0,9$	0
Sin lisado	50	24	$11,8 \pm 7,3$	9

**Tabla 3.** Tiempo de criopresevación de los lisados de glándulas salivales de *L. youngi* y periodo de prepatencia de los granulomas producidos en hamsteres experimentales.

Lote	Fecha de preparación	Crioconservación (semanas) $\bar{x}$	Prepatencia (semanas) $\bar{x}$
I	28-5-90	4,1 $\pm$ 2,9 (n:10)	3,4 $\pm$ 0,7(n:10)
II	10-9-90	5,6 $\pm$ 1,96 (n:10)	2,75 $\pm$ 0,9 (n:8)
III	10-9-90	17,8 $\pm$ 0,9 (n:8)	3,6 $\pm$ 0,92(n:8)
IV	10-9-90	6,7 $\pm$ 3,0 (n:10)	3,5 $\pm$ 1,1(n:10)
V	01-2-91	13,4 $\pm$ 3,15 (n:7)	3,0 $\pm$ 0,6 (n:7)
VI	03-3-93	8,5 $\pm$ 5,0 (n:6)	2,6 $\pm$ 0,4 (n:3)

En casos de leishmaniasis cutánea canina americana de Rio Janeiro (Pirmez et al<sup>6</sup>, 1988), el cultivo *in vitro* de parásitos de biopsias de 35 perros naturalmente infectados fué posible para 28 animales (80%), en tanto que la demostración de los parásitos en la piel, por método directo, ocurrió en 32 casos (91%).

Nuestros hallazgos sobre aislamiento *in vivo* de cepas de *L. braziliensis* provenientes de casos cutáneos localizados, inoculando hámsteres machos con homogeneizado de material biopsico de lesiones mezclado con lisado glándulas salivales del vector de la localidad, demuestra la efectividad de esta técnica de aislamiento, cuando se la compara con la tradicional inoculación de hámsteres con homogeneizados de lesiones o con formas de cultivo *in vitro*.

La técnica de aislamiento *in vivo* de *L. braziliensis*, utilizando lisado de glándulas salivales como adyuvante para incrementar su infectividad en hámsteres, no solamente constituye una técnica de seguro resultado, sino reduce el tiempo para el desarrollo de la infección, convirtiéndose en un procedimiento útil en condiciones de campo para localidades endémicas, donde los parásitos y sus vectores están presentes.

Hace setenta años (Smyly & Young<sup>13</sup> 1924), se demostró la utilidad del hamster para el aislamiento de *L. donovani* a partir de la inoculación intraperitoneal de material de punción esplénica de un caso mortal, originario de China. Desde entonces, el hamster constituye un modelo susceptible para el aislamiento y conservación *in vivo* de estos parásitos. En este caso, la adición de lisado de glándula salival de flebotomos al inóculo, duplica el rendimiento de cepas por aislar y reduce considerablemente desde 3 meses hasta 3 semanas, el período de espera para el desarrollo de las lesiones. La actividad del factor salival que incrementa la infectividad de los amastigotos de lesiones cutáneas, no parece alterarse durante cuatro meses a -8°C.

## Conclusiones

Se demuestra la existencia de un factor incrementador de la infectividad de cepas de *L. braziliensis* en el lisado de glándulas salivales de *Lutzomyia youngi*, confirmándose hallazgos originales hechos con *L. major* y *Lu. longipalpis* (Titus & Ribeiro<sup>14</sup>, 1988).

La inoculación en hámsteres de homogeneizado de lesiones clínicas de 50 pacientes con leishmaniasis tegumentaria de la ciudad de Trujillo (Venezuela), mezclados con el equivalente al lisado de una glándula salival de *Lu. youngi*, produjo lesiones tarsales en el 92% de las inoculaciones con una media de tres semanas de prepatencia. La inoculación de los mismos homogeneizados sin el lisado de glándula salival, produjo infecciones en el 48% de los ensayos con una media de 12 semanas para los periodos prepatentes.

Se considera de gran utilidad el uso del lisado de glándulas salivales de flebotomos para incrementar el éxito de las inoculaciones de amastigotos de lesiones clínicas en hámsteres, acortándose considerablemente la duración del período prepatente.

## Agradecimiento

Los autores agradecen al técnico de Laboratorio Sr. Armando Torres, por su colaboración con el manejo de los animales experimentales.

## Referencias Bibliográficas

- GOMEZ, E. A. et al. Parasitology. 1. *Leishmania* isolates from humans. In: Studies on New World Leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador, Y. Hashiguch, Kyowa Printing & Co., 1987. p. 44-51.
- JAMES, A. & ROSSIGNOL, P. Mosquito salivary glands: parasitological and molecular aspects. *Parasitol Today*, 7: 267-71, 1991.
- LAURENTI, M. D. et al. Inflammatory response at the

- subcutaneous inoculation site in *L. (L.) chagasi* infection with *Lutzomyia* salivary gland lysates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87 (Supl 2), 1992.
4. MARQUEZ, M. & SCORZA, J. V. Criterios de nuliparidad y de paridad en *Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959) del Occidente de Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 77: 229-46 1982.
  5. NAVIN, T. et al. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 42: 36-42, 1990.
  6. PIRMEZ, C. et al. Canine American cutaneous leishmaniasis: clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 38: 52 - 8, 1988.
  7. REZZANO, S. & SCORZA, J. V. Comportamiento de *Leishmania chagasi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* en hámsteres machos inoculados subcutáneamente. *Bol. Dir. Malaria. y Saneam. Amb.*, 25 (3/4): 59 - 66, 1985.
  8. ROJAS, E. & SCORZA, J. V. Metacíclicos de *Leishmania mexicana* experimentalmente infectada. *Parasitología*, 33 (Supl 1): 493 - 500, 1991.
  9. SANCHEZ, J. V. et al. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 47 : 47 - 54, 1992.
  10. SCORZA, J. V. et al. Hallazgo de *Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959) naturalmente infectada con *Leishmania braziliensis* en el area suburbana de Trujillo. *Bol. Dir. Malaria. y Saneam. Amb.*, 24: 21-8, 1984.
  11. SCORZA, J. V. et al. Encuesta epidemiológica sobre Leishmaniasis cutánea urbana en la ciudad de Trujillo, Venezuela. *Bol. Dir. Malaria. y Saneam. Amb.*, 25: 73 -81, 1985.
  12. SCORZA, J. V. & ROJAS, E. La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el Estado Trujillo: soluciones. *Bol. Dir. Malar. Dir. Malaria. Saneam. Amb.*, 30: 1-6, 1990.
  13. SMYLY, H. J. & YOUNG, CH. N. The experimental transmission of leishmaniasis to animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 21: 354-6, 1924.
  14. TITUS, R. & RIBEIRO, J. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, 239: 1306 -8, 1988.
  15. VALERA, M. et al. Cincuenta y seis casos de leishmaniasis tegumentaria en la cuenca de los ríos Chara - Mocoties (Estado Mérida, Venezuela) . *Bol. Dir. Malaria. y Saneam. Amb.*, 28: 238-47, 1978.
  16. WILSON, R. et al. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Exp. Parasitol.*, 47: 270-83, 1997.

---

## Abstract

Homogenized biopsy tissue from the cutaneous leishmaniasis lesions of 50 patients from Trujillo, Venezuela, were inoculated subcutaneously into the tarsi of male hamsters. Homogenized tissue either alone or mixed with salivary gland lysates of *Lutzomyia youngi* were used for inoculation. Homogenized tissue alone yielded 58.5% of infections with a mean of twelve weeks for prepatency, while those mixed with sandfly lysate resulted in 92% of infections with a mean prepatency of three weeks.

*Leishmania braziliensis*, pathogenicity. *Psychodidae*. Salivary glands.