

# Excreción de promastigotos de *Leishmania pifanoi* por *Lutzomyia youngi* experimentalmente infectada\*

*Excretion of promastigotos of Leishmania pifanoi by experimentally infected Lutzomyia youngi*

Elina Rojas, Jose V. Scorza y Alba Espinoza

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

Se describe el desarrollo poblacional promastigótico de *Leishmania pifanoi* en *Lutzomyia youngi* experimentalmente infectada y mantenida con sacarosa al 50% bajo condiciones constantes de temperatura y humedad. Se reconocen dos etapas para la diferenciación y el crecimiento de los parásitos entre las dos y ciento veinte horas postprandiales. Hasta 48 horas tiene lugar la diferenciación pleomórfica de amastigotos en promastigotos cortos, que se multiplican por división binaria hasta las 60 horas, cuando ocurre la ruptura de la membrana peritrófica. La segunda etapa tiene lugar entre las 72 y 96 horas cuando algunos parásitos migran hacia la válvula esofágica y los demás parásitos libres son excretados en gotitas fecales como promastigotos grandes y activos. Las primeras gotitas excretadas dan reacción positiva a glucosa o contienen cristales de urato. El exceso de promastigotos de la segunda fase de desarrollo es eliminado en las últimas excretas que dan reacción positiva con las pruebas Hemoscreen y Biuret para proteínas totales y también para glucosa, y constituyen el 82% del total de gotas excretadas. La excreción de parásitos por *Lu. youngi* es fase normal del desarrollo de *L. pifanoi* en un vector.

*Leishmania. Psychodidae, parasitología. Relaciones hospedero-parásitos.*

## Introducción

Los primeros trabajos sobre el curso de la infección de *Leishmania donovani* en *Phlebotomus argentipes* (Shortt et al.<sup>o</sup>, 1926) y de *L. infantum* en *P. perniciosus* (Adler & Theodor<sup>1</sup>, 1931) describieron su desarrollo en la porción anterior del tubo digestivo, particularmente en el aparato bucal concluyendo que los ciclos de ambos parásitos eran continuamente progresivos, por lo menos hasta el noveno día de la infección, con activa multiplicación como promastigotos entre el tercero y quinto día, formando rosetas en el estómago, con final migración hacia el cardias y la faringe.

La excreción fecal de flagelados de *L. mexicana mexicana*, por *Lutzomyia youngi* (entonces considerada como *L. townsendi*), fue descrita por

Lugo & Scorza<sup>o</sup> (1982) a partir de las 60 y hasta las 132 horas postinfección.

Si el desarrollo de estos flagelados en los flebotomos vectores es continuamente progresivo, cada etapa del proceso debe poseer su propio significado e incidir sobre el proceso subsiguiente (Shortt et al.<sup>o</sup>, 1926). El estudio de tal secuencia, en parásitos morfológicamente similares y con escasa sincronización, es complejo e irregular atribuyéndose estas últimas condiciones a diferencias específicas entre los mismos parásitos o a diferencias entre las especies de flebotomos donde el proceso tiene lugar.

Este trabajo, contribuye a precisar detalles del desarrollo *L. pifanoi* en *L. youngi* desde las primeras 2 hasta las 120 horas, después de la ingesta infectante.

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

Separatas/Reprints: Elina Rojas - Centro Trujilano de Investigaciones Parasitológicas "José W. Torrealba". Av. Camona Sector Los Ilustres, Apto. Postal 100, Trujillo 3102 - Venezuela. Fax: 58-72-33503.

Recibido em 20.3.1995. Aprobado en 31.5.1995

**Material y Metodo**

1. Parásitos. *Leishmania pifanoi* (H HOM/VE/86/MH) aislados por la Dra Olinda Delgado de un caso de leishmaniasis difusa, con desarrollo suprapilórico en *L. youngi* y confirmado por PCR por la Dra. Palmira Guevara.

2. Flebótomos. Hembras silvestres de *Lutzomyia youngi* (Murillo y Zeledon, 1985) capturadas en períodos de eclosión poblacional (Abril-Mayo y Julio-Agosto) con trampa de Shannon en una localidad a 1300 m.s.n.m., no endémica para leishmaniasis. También se utilizó *Lu. youngi* nacidas en el laboratorio.

3. Infección de los flebótomos. Alimentándolos sobre lesiones tarsales de 30 días de evolución en hámsteres machos. Se conservaron los insectos en envases de vidrio acorchados interiormente (Lugo & Scorza<sup>6</sup>, 1982) dentro de cajas de poliestireno con humedad de 80% y 24°C.

4. Desarrollo de *L. pifanoi* en *L. youngi* entre 2 y 48 horas postprandiales.

Se disecaron insectos ingurgitados dilacerando el contenido de cada estómago, con ruptura de la membrana peritrófica sobre una gota de solución de albúmina bovina al 10% en solución salina al 0,6%. Secada la preparación, se tiñó con Giemsa al 5% en tapón de fosfato M/200 a pH 7.2 durante una hora y se la lavó cuidadosamente con agua destilada evitando el desprendimiento del material. Se examinó la preparación, bajo aumento 100X con inmersión. Se disecaron insectos a las 2, 4, 8, 17, 22 y 48 horas de digestión postprandial y se midieron, cada vez, más de 20 parásitos.

5. Estudio de las excretas de *L. youngi* infectadas con *L. pifanoi*.

Tres lotes de 40, 60, y 70 hembras silvestres de *Lu. youngi* fueron alimentadas sobre lesiones tarsales de hámsteres. Las excretas de los insectos que reposaron sobre el revestimiento interno de corcho, fueron recogidas a las 24 y luego cada 12 horas postprandiales hasta 120 horas, sobre láminas de vidrio de 50 x 50 mm que se cambiaron cada vez. Los insectos fueron sobrealimentados con sacarosa comercial al 50%. Las gotitas de excretas se fijaron con metanol absoluto para teñirlas con Giemsa al 10% en tampón de fosfato M/200 a pH 7,2.

6. Estudio de la excreción de *L. youngi* infectados con *L. pifanoi* y aisladas individualmente.

Se utilizó *L. youngi* nacidas en el laboratorio y silvestres, alimentadas sobre hámsteres infectados con *L. pifanoi*. Una vez ingurgitados fueron mantenidos individualmente dentro de cilindros de vidrio,

recubiertos internamente con corcho de 2mm de espesor y 15 mm de diámetro, con un porta-objeto a modo de fondo inferior y tela fina de nylon cubriendo en el extremo superior. Los porta-objetos fueron sustituidos cada 12 horas para contar las deyecciones. El estudio sobre la naturaleza de las excretas se hizo con microtests de Biuret y Hemoscreen para proteínas y para glucosa. Se estudió separadamente 20 hembras de colonia y 20 hembras silvestres que fueron investigadas desde las 24 hasta las 120 horas, cuando se retiró la novena lámina y se disecó cada hembra sobreviviente para precisar si estaba infectada o no. La presencia de flagelados en los insectos fue constatada por examen en fresco con 450X. El estudio morfométrico de los parásitos se hizo en las mismas láminas fijadas con metanol, teñidas con Giemsa al 10%.

**Resultados**

**Diferenciación y Pleomorfismo, Hasta 48 Horas de Desarrollo de *L. pifanoi* en *Lu. youngi***

En la Figura 1 se presentan esquemáticamente los estadios de diferenciación de amastigotos en promastigotos de *L. pifanoi* en los frottes de contenido estomacal junto con los valores porcentuales de dichas formas, y el número de parásitos examinados.

Horas después de la ingurgitación						Numero de formas
2	55	10	-	22	13	152
4	11	44	-	18	22	180
8	-	-	-	29	71	92
17	-	-	37	16	47	176
22	-	1	-	20	78	312
48	-	-	-	-	100	108

**Figura 1** - Pleomorfismo y diferenciación de *L. mexicana* en *L. youngi* entre las dos y cuarenta y ocho horas de postinfección.

Se detectó un pleomorfismo con predominio de amastigotos y su transformación en promastigotos cortos, indivisos entre las 2 y 4 horas. Formas de división de amastigotos o de promastigotos flagelados, se vieron en bajo porcentaje (73%) entre las 2 y 4 horas siendo más frecuentes a partir de las 8 horas. Entre las 17 y 48 horas se incrementó la frecuencia y el número de promastigotos en división, llegando a formar rosetas (25%).

**Tabla 1** - Excretas blancas, negras y transparentes eliminadas por *L. youngi* entre 24 y 120 horas, con indicación de las contaminadas con promastigotos de *L. mexicana*.

Numero del experimento y de las hembras de <i>L. youngi</i> por envase	Períodos de excreción entre horas	Excretas por lámina				Excretas con flagelados por lámina				
		Blancas	Negras	Transp.	Totales	Blancas	Negras	Transp.	Totales	
I N: 40 Excretas/Flebótomo: 24,5 Excretas positivas por Flebótomo 6,9	24	27	6	-	33	-	-	-	-	
	48	30	18	1	49	-	-	-	-	
	60	66	234	60	360	-	30	60	90	
	61,5	72	46	137	60	243	-	1	20	21 **
	84	49	20	88	157	-	7	86	93 42,3	
	96	8	1	81	90	-	-	67	67	
	108	1	-	18	19 Σ	-	-	-	-	
	120	-	-	30	30 981	-	-	1	1 274	
	<hr/>									
	II N: 60 Excretas/Flebótomo: 12,3 Excretas positivas por Flebótomo 3,2	24	22	9	-	31	-	-	-	-
48		28	1	-	29	-	-	-	-	
60		65	102	32	219	-	9	11	20 **	
53,5		72	23	95	58	176	-	26	28 26,3	
84		40	78	45	163	-	61	20	81	
96		-	10	67	77	-	10	36	46	
108		3	-	16	19 Σ	-	-	12	12	
120		-	-	24	24 738	-	-	3	3 190	
<hr/>										
III N: 70 Excretas/Flebótomo: 8,1 Excretas positivas por Flebótomo 1,9		24	39	7	-	46	-	-	-	-
	48	22	4	-	26	-	-	-	-	
	60	16	42	48	106	-	-	12	12 **	
	50,3	72	16	115	48	179	-	59	38 82,6	
	84	6	20	43	69	-	7	5	12	
	96	3	-	38	41	-	-	10	10	
	108	1	-	51	52 Σ	-	-	1	1	
	120	-	3	45	48 567	-	-	-	- 132	

\* Porcentaje del total de excretas entre 60 y 72 horas Σ = total  
 \*\* Porcentaje del total de excretas con parásitos entre 60 y 72 horas

**Excreción de Promastigotos de *L. pifanoi* por *L. youngi* Mantenido en Grupo**

Se utilizaron 3 lotes de 40, 60 y 70 hembras silvestres de *L. youngi* para contar gotitas excretadas

**Tabla 2** - Excretas eliminadas por *L. youngi* aislados entre 24 y 120 horas postingestión señalándose las gotitas con *L. mexicana* (en círculos).

Hembras Silvestres					Hembras Cultivadas																	
Hembras Nº	Períodos de excreción entre horas				Total	Positivas	Positivas por disección	Hembras Nº	Períodos de excreción entre horas				Total	Positivas	Positivas por disección							
	24	48	60	72	84	96	108	120		24	48	60	72	84	96	108	120					
1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	2	4	6	8	4	-	-	27	7	posit.		
2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	3	4	3	3	2	1	16	6	posit.		
3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	negat.		
4	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	8	-	13	7	7	35	4	posit.		
5	-	-	-	10	3	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	negat.		
6	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	1	1	3	2	3	1	-	11	5	negat.		
7	-	-	5	2	3	1	3	6	7	-	-	7	15	12	17	16	8	71	21	posit.		
8	-	9	11	8	7	9	6	10	60	18	18	2	2	2	3	-	-	10	-	posit.		
9	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	1	2	4	-	6	5	18	-	posit.		
10	5	2	6	-	-	8	5	-	26	10	10	3	1	1	6	2	14	-	-	posit.		
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	posit.		
12	3	3	4	12	9	3	10	-	44	10	10	-	7	6	8	5	27	7	-	posit.		
13	1	2	3	3	4	10	muerta	20	6	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
14	-	-	3	-	1	-	-	4	-	-	-	1	3	2	3	1	-	10	2	negat.		
15	2	-	5	2	2	5	4	M	20	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	posit.		
16	-	-	6	3	6	10	6	-	31	7	7	-	1	3	13	9	3	32	9	posit.		
17	-	2	13	23	14	5	3	6	66	17	17	1	1	6	18	13	5	3	2	49	6	posit.
18	-	-	-	4	5	3	1	3	16	-	-	2	4	3	6	13	5	5	3	41	13	posit.
19	-	-	2	2	9	9	5	3	30	6	6	2	4	5	15	9	6	3	-	44	8	negat.
20	-	1	-	-	-	2	5	3	11	-	-	-	-	4	20	11	3	2	40	2	posit.	

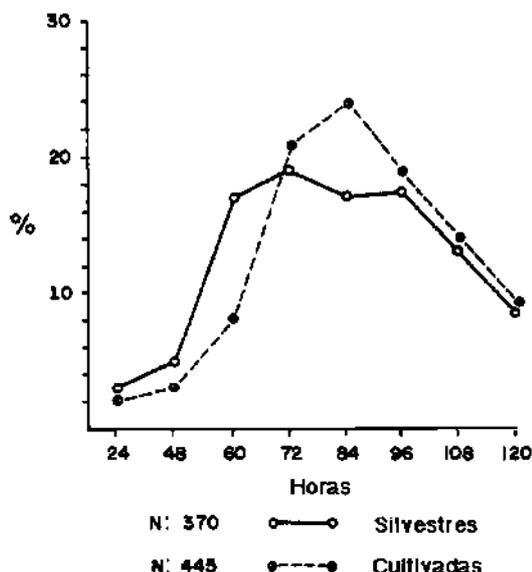


Figura 2 - Frecuencias porcentuales de excreción de gotitas por *L. youngi*.

entre las 24 y 120 horas después de la ingesta infectante. Se distinguen excretas blancas u orina, negras o heces con hemina y transparentes con azúcar. Los resultados se presentan en la Tabla 1 con señalamiento de las gotitas contaminadas con promastigotos.

El más alto porcentaje de excretas de cualquier naturaleza ocurrió, en los tres lotes, entre las 60 y 72 horas y fue siempre mayor del 50% en este lapso. El número de gotitas totales excretadas por flebótomo, fue de 24,5, 12,3, y 8,1 respectivamente. La data sobre excretas contaminadas con promastigotos se presentan en las Tablas 1 y 2 en columnas a la derecha. El más alto porcentaje de excretas positivas ocurrió entre las 60 y 72 horas, siendo respectivamente de 42,3, 25,3 y 82,6. El número de gotitas excretadas por flebótomos y el de las contaminadas con promastigotos, es inversamente proporcional al número de *L. youngi* confinados por envase, de 6,9, 3,2 y 1,9 respectivamente el número de gotitas con parásitos.

**Excreción de Flagelados por Hembras Aisladas**

Para estudiar posibles efectos de hacinamiento y descartar los debidos a la edad cronológica en las hembras silvestres se hizo un tercer experimento con 20 hembras capturadas la noche anterior a la infección y 20 hembras de cultivo con edades entre 2 y 6 días.

Las mortalidades espontáneas, y los porcentajes de infección son similares entre hembras silvestres o de cultivo (Tabla 2).

En las hembras silvestres, de 15 sobrevivientes a las 120 horas, 10 fueron positivas por excreción y 9 solamente mostraron flagelados por disección. De 20 hembras de cultivo 18 sobrevivieron hasta 120 horas, 13 fueron positivas por disección, y 12 habían eliminado flagelados. Otras 3 con heces positivas resultaron negativas a disección, lo cual sugiere que eliminaron todos los flagelados por excreción.

Las hembras silvestres hicieron 24,7 excretas por flebótomo, en tanto que las de cultivo eliminaron 21,8 gotitas por hembra.

Las silvestres eliminaron 6,2 gotas positivas por hembra y las de colonia 6,0 gotitas por individuo.

Los períodos de mayor actividad excretora, se ilustran en la Figura 2. En las silvestres, el 70% de las deyecciones se expulsaron entre las 60 y 108 horas, mientras que en las de colonia ocurrió en un 64% entre las 72 y 96 horas.

Al final de los experimentos con excepción de parásitos formando tapones faríngeos, no se hallaron otros flagelados en el tubo digestivo, aunque excepcionalmente se vieron muy escasas formas inmóviles en ampolla rectal.

**Morfometría de Promastigotos de *L. pifanoi* Excretados por *Lu. youngi***

Se contó el número de flagelados eliminados en las gotitas de excretas de *Lu. youngi* silvestres o de colonia, y su cantidad varió desde decenas hasta

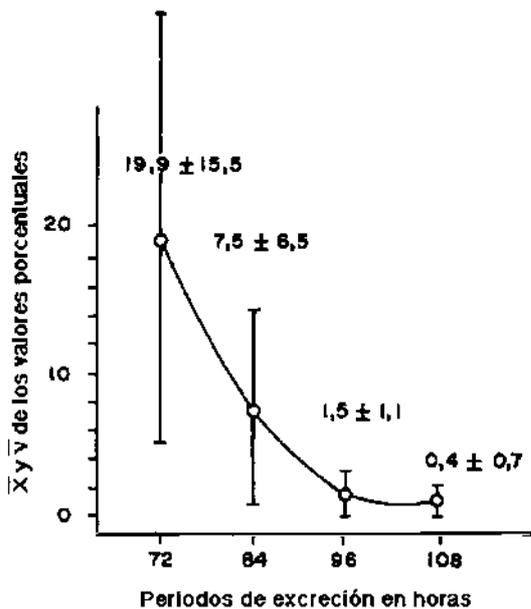
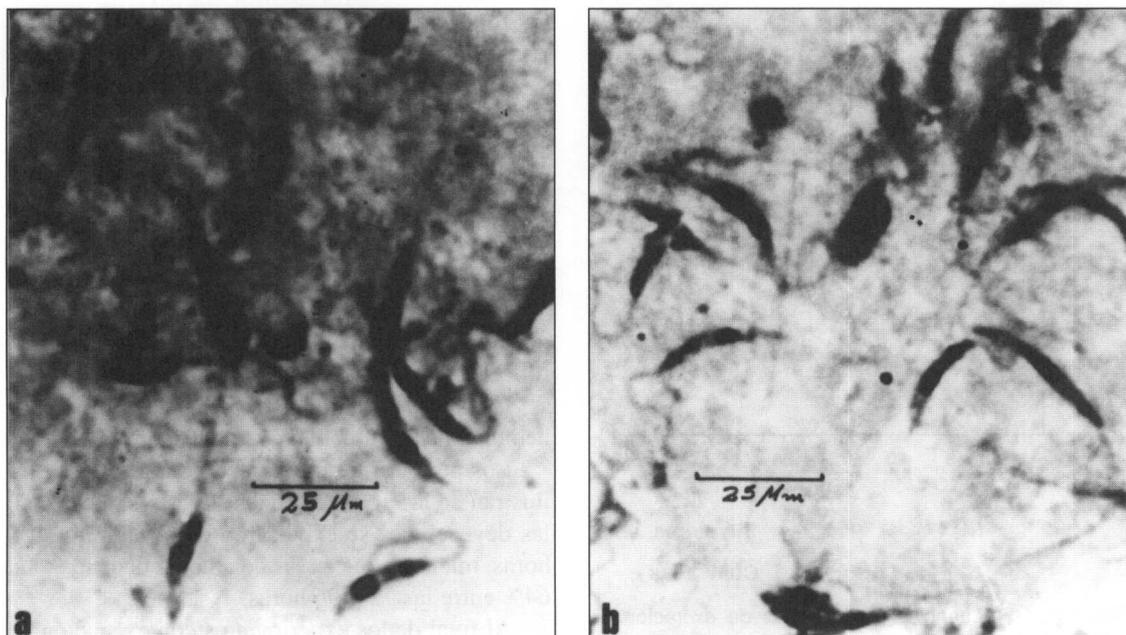


Figura 3 - Porcentuales de formas en división en promastigotos de *L. mexicana* excretados por *L. youngi* entre 72 y 108 horas postingesta infectante.



**Figura 4** - Forma y tamaño de parásitos en excretas de *Lutzomyia youngi* a las 72 horas post-infección con *Leishmania mexicana*.

centenares. Los flagelados se hallaron solamente en las deyecciones negras o en las transparentes y nunca en las excreciones con uratos. En las deyecciones transparentes, los promastigotos fueron mejor observados

Se contaron los parásitos en división, en gotitas eliminadas entre las 72 y 108 h y se examinaron cada vez más de 500 parásitos claramente visibles en el borde de las gotas, para diferenciar los que se hallaron en división con dos núcleos, dos cinetoplastos o con dos flagelos. En la Figura 3 se ilustraron medias y varianzas calculadas para las formas en división entre 72 y 108 h cuando disminuye cuasi exponencialmente el número de parásitos en división y no se detectan parásitos en división a partir de las 96 horas. Son promastigotos monomórficos, grandes, anchos, con núcleo esférico u ovalado y cinetoplasto voluminoso (Fig.4a y b). La medida de 28 hasta 35 parásitos dió  $23,6 \pm 7,6\mu\text{m}$  de longitud total para el soma y  $22,0 \pm 5,3\mu\text{m}$  para el flagelo.

## Discusión

Adler & Theodor<sup>1</sup> (1931) describieron flagelados largos de *L. infantum* en *P. perniciosus*, con 22 hasta  $30,5\mu$  de longitud y con flagelos relativamente más cortos que la longitud del soma, numerosos en el digestivo medio entre los 2 y 6 días después de la ingesta infectante. Shortt<sup>9</sup> et al. (1926)

señalaron que a las 72 horas, en *P. argentipes* infectados con *L. donovani*, los flagelados eran alargados y activamente móviles, con multiplicación evidente por la formación de rosetas en grandes proporciones. Después del 3er día, que pareció marcar una fase definitiva, hallaron diferentes estadios aunque en pequeño número. Los autores coinciden en señalar la súbita disminución de la población de parásitos largos y móviles.

Usando microscopía de rastreado, Warburg<sup>14</sup> et al. (1986), en infecciones de tres de días en *P. papatasi* por *L. major*, ilustran enjambres desde 200.000 hasta 800.000 promastigotos libres de 15 a  $20\mu\text{m}$  de largo en el estómago medio y al mismo tiempo alfombras de parásitos más cortos, con 5 a  $7\mu\text{m}$  de longitud, adheridos a la válvula estomodeal y al esófago, donde el polimorfismo contrasta con el monomorfismo de los estadios largos y libres. Aunque se discute la importancia del polimorfismo, su relación con los opistomastigotos y paramastigotos y también con formas pequeñas con largos flagelos cuya importancia consideran crucial para la transmisión por picadura, no hay información con respecto a los largos promastigotos de cortos flagelos existentes en el estómago medio, cuando ya la válvula estomodeal está saturada por otras formas.

Lawyer<sup>9</sup> et al. (1987) estiman, en medio millón el número de promastigotos largos y altamente móviles de *L. mexicana* en *Lu. diabólica* a las 72 horas de desarrollo. Describen, masas de flagela-

dos envueltos por una matriz gelatinosa adheridos a la válvula estomodeal y plantean que la asociación de nectomonas grandes con las microvellosidades del estómago, impedirían su excreción con la ingesta digerida; es la única referencia con respecto a estas formas y más aparece sugerir su retención, que su expulsión. Walters<sup>13</sup> et al. (1989), refiriéndose a *L. braziliensis panamensis* parásito que se adhiere a las crestas pilóricas de *Lutzomyia gomezi*, distinguen dos tipos de promastigotos nectomonados, unos cortos y espatulados con 5-8µm de longitud somática y otros más largos, con 13 hasta 19 µm, que "aparentemente representan productos finales de la multiplicación" y señalan que ninguna de estas formas se interdigita con las microvellosidades, ni parece ocupar el nicho del digestivo medio por más tiempo, después de la ruptura de la membrana peritrófica.

La enorme masa de nectomonas largas y activamente móviles cuyo destino es controvertido, pudiera ser retenida por las microvellosidades del tubo digestivo medio aunque no se interdigiten con ellas y desplazarse hacia el píloro, como producto final del ciclo vital de los parásitos, sin ocupar espacio físico o nidal alguno. Lainson & Shaw<sup>3</sup> (1988), al estudiar el desarrollo de *L. chagasi* en *Lutzomyia longipalpis*, señalaron la presencia de numerosos promastigotos alargados e indivisos, identificados como las formas a<sup>2</sup>P, sin explicar su destino o función.

Se confirmaron observaciones ya publicadas por Lugo & Scorza<sup>6</sup> (1982) sobre el fenómeno de la excreción de flagelados no se funcionales por *Lutzomyia youngi* infectados con diferentes especies de *Leishmania* suprapilóricas y peripilóricas.

Siendo este fenómeno parte importante de su desarrollo en flebótomos, considera que con la excreción de las nectomonas monomórficas, culmina la fase exponencial de crecimiento, coincidiendo ello con el inicio de una fase estacionaria que a su vez concluiría con la producción de parásitos infectantes por picadura natural.

Los flagelados tripanosomátinos comprenden un complejo conjunto de géneros de parásitos monoxénicos o heteroxénicos bien caracterizados por su morfología (Wallace<sup>12</sup>, 1966). Las formas parásitas de invertebrados concluyen sus ciclos en estación posterior y se propagan por contaminación fecal dentro de la población de hospedadores (Wallace<sup>12</sup>, 1966).

Entre los Trypanosomatidae heteroxénicos más primitivos, *Sauroleishmania* spp., por su parasitismo en reptiles y su evolución en *Sergentomyia* spp. (Killick-Kendrick et al., 1986) con presencia de amastigotos en la sangre de reptiles (Telford<sup>10</sup>, 1979)

constituye un ejemplo de parásitos con estación posterior siendo típica *S. tarentolae* del gecko *Tarentola mauritanica*, con desarrollo en *Phlebotomus* sp. (Vickerman<sup>11</sup>, 1965; Pozio<sup>8</sup> et al., 1986).

La excreción de nectomonas grandes por *L. pifanoi* al final de la digestión de la ingesta sanguínea infectante de *Lu. youngi*, además de ser un fenómeno general y común en otras especies, está determinada por la cinética y la aparición de un excesivo número de promastigotos en el estómago medio (Molineux et al., 1986). En algunos casos, como acontece en las especies de *Viannia* la colonización del píloro es parte importante del ciclo natural (Lainson et al., 1977) y se presume que tales haptomonas pilóricas puedan migrar eventualmente hasta la porción anterior del tubo digestivo.

Es especulable que las nectomonas excretadas en gotitas azucaradas constituyan una fuente de contaminación entre flebótomos por la gran avidez de estos insectos por azúcares y su tendencia a reposar en grupos en los refugios naturales. Se ha tenido la oportunidad de examinar gotitas fecales azucaradas contaminadas y recientemente expulsadas, y constatar presencia de parásitos con activos movimientos.

En conclusión la ingestión de amastigotos de *Leishmania pifanoi* por *L. youngi*, junto con sangre del hospedador, conduce a la diferenciación hasta promastigotos, cuya fase de crecimiento exponencial, dentro del estómago con o sin membrana peritrófica intacta y a juzgar por el número de formas en división, concluye hacia las 96 h. Entre las 24 h y hasta las 96 h después de la ingesta, los flebótomos excretan gotitas fecales blancas con uratos, gotas oscuras con restos de hemina y gotas transparentes conteniendo glucosa. Entre las 60 y 96 h, en las gotitas de los dos últimos tipos se eliminan promastigotos grandes y monomórficos. La eliminación fecal de promastigotos en exceso, al final de la digestión de sangre, es fase obligada del desarrollo del parásito.

## Agradecimientos

A la Dra. Olinda Delgado, del Instituto de Medicina Tropical "Félix Pifano" Caracas, la cepa de *Leishmania pifanoi* MH-86- que sirvió como base para este estudio; a la Dra. Palmira Guevara de la U.C.V. por su interés para la identificación del parásito y del Dr. Rafael Bonfante de U.C.L.A. por la donación de los animales experimentales, sin los cuales no hubiera sido posible mantener la cepa en las condiciones para nuestro ensayo.

## Referencias Bibliográficas

1. ADLER, S. & THEODOR, O. Investigations on the Mediterranean Kala-Azar. IV- Infection of Sandflies with *Leishmania infantum*. Natural parasites of wild sandflies in Catania. Observations on *Trypanosoma platyductyli* Catonillar. *Proc. R. Soc.*, **8**: 481-93, 1931.
2. KILLICK-KENDRICK, R.; LAINSON, R.; RIOUX, J.A.; SAFJANOVA, V. M. The taxonomy of *Leishmania* - like parasites of reptiles. In: Colloque International. *Leishmania. Taxonomie et phylogenèse; Applications éco-épidémiologiques*. 1984. Montpellier, IMEEE, 1986. p. 143-8.
3. LAINSON, R. & SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania* (L) *chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpus* (Lutz and Neiva). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **63**: 134-45, 1988.
4. LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi* causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*, **266**: 628-30, 1977.
5. LAWYER, P.; YOUNG, D.; BUTLER, J.; AKIN, D. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia shannoni* (Diptera:Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, **24**: 347-55, 1987.
6. LUGO de Y. A. & SCORZA, J. V. Ensayos metodológicos para la investigación de reservorios de *Leishmania* spp. en Los Andes venezolanos. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*, **77**: 367-84, 1982.
7. MOLYNEUX, D. H.; RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. The *Leishmania*-sandfly interface. In: Colloque International. *Leishmania. Taxonomie et phylogenèse; Applications éco-épidémiologiques*. 1984. Montpellier, IMEEE, 1986. p. 311-24.
8. POZIO, E.; GRAMICIA, L.; Maroli, M. Hemoflagellés de *Tarentola mauritanica* L., 1758 (Reptilia, Gekkonidae). In: Colloque International. *Leishmania. Taxonomie et phylogenèse; A pplications éco-épidémiologiques*. 1984. Montpellier, IMEEE, 1986. p. 149-5.
9. SHORT, H. E. & BARRAND, P. J. The life history and morphology of *Herpetomonas donovani* in the sandfly *Phlebotomus argentipes*. *Ind. J. Med. Res.*, **13**: 947-59, 1926.
10. TELFORD, S.R. Evolutionary implications of *Leishmania* amastigotes in circulatory blood cells of lizards. *Parasitola*, **79**: 317-24, 1979.
11. VICKERMAN, K. The identify of *Leishmania chamaelconis* Wenyon, 1921: laboratory demonstration. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **59**: 372, 1965.
12. WALLACE, F. G. The trypanosomatides parasites of insects and arachnids. *Exptl. Parasitol.*, **18**: 124-93, 1966.
13. WALTERS, L. L.; CHAPLIN, G. L.; MODI, G. B.; TESH, R. Ultrastructural biology of *Leishmania* (Viannia) *panamensis* in *Lutzomyia gomezi* (Diptera:Psychodidae) a natural host-parasite association. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **40**: 19-39, 1989.
13. WARBURG, G. S. H.; SCHELI, Y.; SAIRE, D. Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitenk.*, **72**: 423-31, 1986.

## Abstract

The increase in the promastigotes population of *Leishmania pitanoi* in *Lutzomyia youngi* experimentally infected and kept on 50% saccharose under constant conditions of temperature and humidity is described. Two stages in the differentiation and growth of the parasites are recognised between two and twenty-four hours after meals. The pleomorphic differentiation of the amastigotes in short promastigotes which multiply by binary division for 60 hours, when the rupture of the peritrophic membrane occurs, takes place within 48 hours. The second stage occurs between 72 and 96 hours when some of the parasites migrate to the esophageic valve and the rest of the free parasites are excreted in fecal drops as large, active promastigotes. The first drops excreted react positively to glucose or contain crystals of urate. The excess promastigotes of the second stage of development are eliminated in the last excretions and react positively to the Hemoscreen and Biuret tests for total proteins as also for glucose and account for 82% of the drops excreted. The excretion of parasites by *Lu. youngi* is a normal stage in the growth of *L. pitanoi* into a vector.

*Leishmania. Psychodidae, parasitology. Host-parasite relations.*