

Diagnosis de *Herpetomonas* sp. en *Musca domestica*, y su implicación en terapia larval

Adriana Reyes^{1,2}, Adalberto Gonzalez¹, Gianna Martiradonna³, Milagros Oviedo¹, Ana Soto-Vivas³ & Jazzmin Arrivillaga²

Los flagelados del género *Herpetomonas* sp. son parásitos de insectos, y generalmente no son patógenos para el hombre. Sin embargo, tienen importancia médica en la actualidad derivada en primer lugar del uso de varias especies de moscas en terapia larval, desde las cuales han sido aisladas, ejemplo *Musca domestica*, y en segundo lugar dado a los nuevos registros de casos humanos de co-infección de VIH y *Herpetomonas* sp., pero con una clínica y sintomatología semejante a la leishmaniasis tipo visceral y cutáneo-difusa. En el presente trabajo, se evaluó un material de colonia de *M. domestica*, colectado en la localidad de Maracay, Edo. Aragua, y colonizado con fines de terapia larval en un modelo animal de leishmaniasis. La búsqueda parasitológica en frotis preparados a partir de los macerados del tubo digestivo, evidencia la existencia de *Herpetomonas* sp. y *Octosporea* sp. en un 90% de los ejemplares evaluados en diferentes estadios de vida, y a todo lo largo del tracto digestivo. Los resultados obtenidos indican la necesidad de evaluar a priori el material de moscas colectado en el campo antes de estabilizar una colonia con fines de terapia larval. Adicionalmente, se recomienda el uso de herramientas moleculares para el diagnóstico de leishmaniasis en zonas de alta casuística de SIDA y alta endemicidad de leishmaniasis con el fin de descartar infecciones cruzadas, dado a la co-circulación de *Herpetomonas* y *Leishmania*.

Palabras clave: *Herpetomonas* sp.; *M. domestica*; terapia larval; SIDA, leishmaniasis.

La Familia Trypanosomatiade comprende un gran grupo de protozoos flagelados que están separados en 12 géneros cuyo ciclo de vida pueden ser digenéticos o monogenéticos (Souto-Padrón, 2002. *An. Acad. Bras. Cienc.* **74**: 649-675). Dentro del grupo de los monogenéticos destaca el Género *Herpetomonas* (Leidy, 1856), parásito de insectos presente en los órdenes Hemiptera y Díptera (Tanada & Kaya, 1993, *Insect Pathology*. Academic Press, Inc. USA). En el caso de los Dípteros las especies de parásitos del género

Herpetomonas no son patogénicos (Ferreira *et al.*, 2003. *Curr. Microbiol.* **47**: 265-271). Sin embargo, hoy en día este grupo tiene gran importancia médica debido a que han sido aislados desde pacientes humanos infectados con VIH, con una clínica semejante a la producida por especies de parásitos del género *Leishmania*, (Chicharro & Alvar, 2003, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **97**: 75-78). Varias especies de moscas de los géneros de *Lucilia* y *Musca* han sido señaladas como hospedadores naturales de *Herpetomonas* spp (Wallace & Clark, 2007. *J. Eukaryot. Microbiol.* **6**: 58-61). Estas especies de moscas son utilizadas en tratamientos médicos, como terapia larval para pie diabético, úlceras de presión, quemaduras y úlceras infectadas con bacterias resistentes a antibióticos (Sherman *et al.*, 2000, *Ann. Rev. Entomol.* **45**: 55-81; Sherman, 2002, *Lower Extremity Wound.* **2**: 135-142; Sherman, 2002, *Diabetes Care.* **26**: 446-451; Sherman *et al.*, 2007, *Vet. J.* **173**: 138-143; Li *et al.*, 2008, *Surgery Letters.* **145**: 122-123). Las investigaciones

¹ Laboratorio de Ecología Molecular de Vectores, Departamento de Estudios Ambientales, División de Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Sartenejas, Venezuela.

² Laboratorio Biología de Lutzomyia e "Insectario Pablo Anduze", Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba", Universidad de los Andes, Trujillo, Venezuela.

³ Laboratorio de Control de Vectores y Reservorios. Centro de Investigaciones. Instituto de Altos Estudios. MPPS.

*Autor de correspondencia: adriserpientes@gmail.com

en *Herpetomonas* no solo son de índole médico, sino también farmacológicas ya que estas especies de patógeno pueden ser utilizadas como modelos en estudios bioquímicos para evaluar la respuesta parásito-hospedador basado en la presencia de metabolitos y enzimas similares a los eucariotas superiores, y a otros miembros de la familia Trypanosomatidae (Souto-Padrón, 2002. *Op.cit.*), como la *Leishmania* sp, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Entamoeba histolitica* (Ferreira et al., 2003. *Op.cit.*).

Los estudios en el género *Herpetomonas* en insectos indican una asociación con su hospedador especie-específico, sin embargo, existen discrepancias en relación a este punto (Becker, 1923. *J Parasitol.* **1**: 25-34). Han sido descritas aproximadamente 40 especies de *Herpetomonas*, aisladas desde ejemplares pertenecientes a diferentes géneros de Díptera, ejemplos, *Herpetomonas muscarum* para *Musca domestica*, *Herpetomonas megaceliae* descrita en *Megacelia scalaris*, y *Herpetomonas luciliae*, hallada en *Lucilia sericata* (Becker, 1923. *Op.cit.*; Pierre et al., 1972. *J Parasitol.* **58**: 946-949; Tanada & Kaya, 1993. *Op.cit.*).

En la actualidad se han llevado a cabo algunos experimentos en el ámbito biomédico en relación a la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis en su forma cutánea, dentro de los cuales se señala la terapia larval, debido a su potencialidad terapéutica bajo un modelo animal (Arrivillaga et al., 2008. *Biomédica.* **28**: 305-10), esto nos llevo a evaluar la ocurrencia de *Herpetomonas* sp. en un colonia de *M. domestica*, establecida para fines de terapia larval (Li et al., 2008. *Op.cit.*), con base en la existencia de dos registros del protozoo en Venezuela (Gabaldón, 1929, *Gac. Méd. de Caracas.* **36**: 10-14; Scorza & Dagert, 1954, *Acta Cient. Venez.* **5**: 127-131). El mantenimiento de la colonia de *M. domestica* se llevó a cabo según un protocolo ya descrito (Martiradonna et al., 2009. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 317-319). Para la búsqueda parasitológica de *Herpetomonas* spp, los ejemplares inmaduros (larvas) y adultos fueron esterilizados con una solución de hipoclorito de sodio al 5%, por cinco minutos, seguido de cuatro lavados con solución fisiológica isotónica estéril. Posteriormente, se realizaron disecciones del tracto digestivo de cada individuo, sobre una lámina portaobjetos con una gota de solución salina estéril, para observar in vivo la presencia de los parásitos en todo el tracto digestivo. Luego, de la visualización de las formas flageladas, se procedió a su aislamiento en medio de cultivo NNN

a partir de los macerado del tracto digestivo de larvas I y II estadio (parte del material se fijó y se coloreó con Giemsa). Los aislados en cultivo se caracterizaron por presentar tres formas evolutivas: promastigotos, paramastigotos y opistomatigos como los tres morfotipos característicos del género *Herpetomonas* (Ferreira et al., 2003 *Op.cit.*; Souza et al., 2001. *Curr. Microbiol.* **42**: 111-116), pero observándose un pleomorfismo marcado, todas las formas flageladas evidencian la existencia de movimientos sincronizados de manera circular y zigzagueantes. La morfología de parásito evidencia la presencia de un núcleo central o ligeramente excéntrico, un blefaroplasto y un granulo basal hacia la parte anterior, cercano a la base del flagelo característico del género *Herpetomonas* (Fig. 1). Sin embargo, estudios moleculares en progreso son necesarios para la identificación de la especie aislada. Dentro del intestino del 50% de las larvas disecadas se observó agregaciones en forma de roseta (Fig. 2), muchas de estas se ubicaban en la porción media del intestino medio y paralelo al epitelio interno que recubre la pared intestinal de la larva y con la capacidad de traspasar la pared del tubo digestivo, para salir al medio extra-intestinal (Fig. 3).

Observaciones adicionales mostraron en todo el tracto intestinal de las larvas la presencia de un microsporideo, con envoltura de formas cilíndricas y ovaladas (Fig. 4), con características binucleadas lo que supone la presencia de una *Octosporaea* sp. en una frecuencia inferior a la presencia de *Herpetomonas* spp. (Cárdenas & Martínez, 2001. *Rev. Peru. Biol.* **8**: 1). Por otro lado, se realizaron macerados de huevos de moscas previamente esterilizados con 0,5 % de hipoclorito, los cuales fueron coloreados con Giemsa para evaluar la ocurrencia del patógeno y evaluados para aislamiento en medio de cultivo, a fin de evaluar la transmisión vía parental. Los frotis y los medios de cultivo a las 24 y 48 horas, evidencia la ocurrencia de *Herpetomonas* observándose un polimorfismo y pleomorfismo al igual que en los aislados desde larvas y adultos, lo que sugiere la transmisión transovárica. Adicionalmente, los tractos digestivos de larvas de estadio I y II que eclosionaron de las oviposturas esterilizadas, se revisaron en un microscopio óptico, observándose resultados negativos para *Herpetomonas*, sin embargo se encontró la persistencia de *Octosporaea* sp. posterior a la esterilización, con un aumento en la carga parasitaria dentro de la larva en comparación a las muestras sin esterilizar.

Fig. 1. *Herpetomonas* spp. Presentes en la porción posterior de larva (L II).

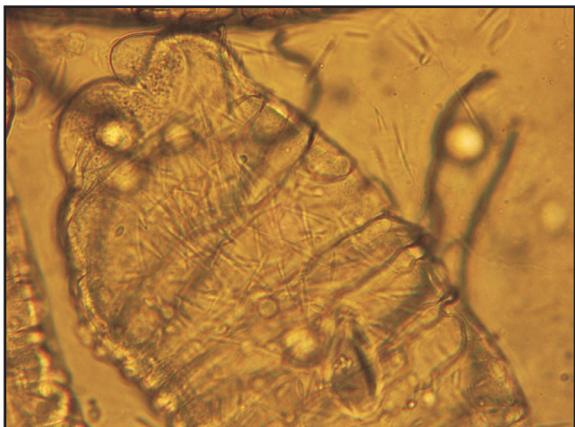


Fig. 2. Agregación de *Herpetomonas* spp. en intestino medio de larva.



Fig. 3. Agregación parasitaria atravesando intestino de larva de *M. domestica*; A: medio externo con solución salina estéril pH 7.2; B: epitelio del tubo digestivo; C. *Herpetomonas* atravesando desde el interior del intestino medio hacia el exterior.

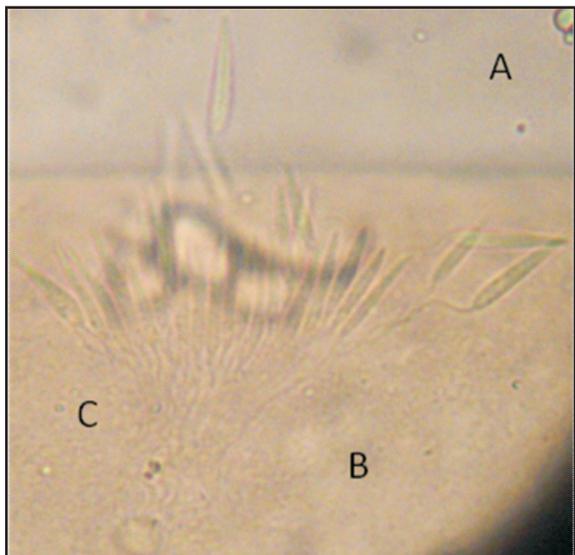
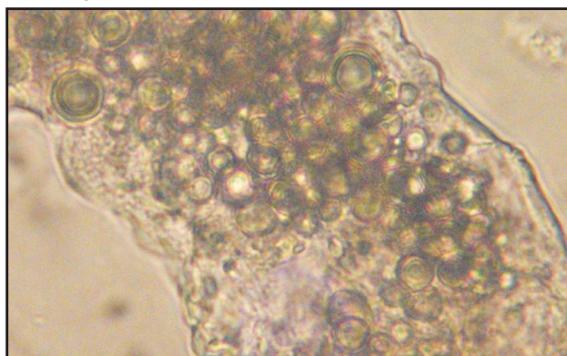


Fig. 4. *Octosporea* sp. en la porción del intestino medio y posterior de larvas de *M. domestica*.



Este hallazgo es importante para terapia larval, ya que aun cuando *Herpetomonas* spp. nunca se habían reportado como patógenos para el hombre; estudios recientes describen patogenicidad de *Herpetomonas* en pacientes inmunosuprimidos ocasionando características clínicas similares a la de la leishmaniasis cutánea difusa y visceral (Chicharro & Alvar, 2003, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **97**: 75-78;

Morio *et al.* 2003. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 3845-3847) debido a que a nivel de la membrana estos dos parásito comparten enzimas y metabolitos (Ferreira *et al.* 2003. *Op.cit.*). La esterilización de las ovipostura de mosca, pareciera seguir siendo una excelente opción para eliminar a las *Herpetomonas* de la fase larval antes de su uso en terapia larval, sin embargo, es necesario evaluar a largo plazo si esta metodología de esterilización es efectiva para mantener a una colonia libre de este patógeno. Por otro lado en zonas de alta endemicidad de leishmaniasis y alta casuística de SIDA deben realizarse aislamientos y tipificación del parásito utilizando técnicas moleculares para evitar un diagnóstico clínico erróneo o descartar una infección mixta, por la ocurrencia en el foco de la co-circulación de *Herpetomonas* spp. en humanos.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por FONACIT S1-2001000688.

Diagnosis of *Herpetomonas* sp. in *Musca domestica*, and its implication on larval therapy

SUMMARY

Herpetomonas are insect parasites. Although they usually are not pathogenic to man, now they have become very important due to the use of barium species of flies in larval therapy and there are new reports of HIV coinfection of *Herpetomonas* sp. in whom a similar clinical symptoms and one which

causes visceral leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis. From a colony of *Musca domestica*, mounted in the city of Trujillo Venezuela, took out the search of the protozoan along the entire digestive tract of adult and immature, resulting *Herpetomonas* positive. sp 90% of those reviewed. The presence of parasites, both *Herpetomonas* spp. as *Octosporea* sp. was confirmed by Giemsa staining of smears from intestinal homogenates of adult flies and immature stages. We recommend the use of molecular tools for diagnosis of leishmaniasis in areas of high incidence of AIDS and leishmaniasis are endemic to rule out cross-infection.

Key words: *Herpetomonas* sp.; *M. domestica*, larval therapy, AIDS.

Recibido el 08/08/2010
Aceptado el 15/10/2010