

CLASIFICACION ISOENZIMATICA POR ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA DE AISLADOS DE LEISHMANIA REALIZADOS EN ANTIOQUIA

S. Jaramillo V. *

PALABRAS CLAVES: *Leishmaniasis cutánea, isoenzimas, clasificación, electrofóresis*

RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo, en el que se clasificaron por la técnica de electrofóresis de isoenzimas en acetato de celulosa, 77 aislados de Leishmania provenientes de pacientes de diferentes zonas endémicas del Departamento de Antioquia y de otros Departamentos. Todas las lesiones de estos pacientes fueron cutáneas, sin presentar compromiso mucoso.

Para su identificación se usaron las enzimas Glucosa Fosfato Isomerasa, Aspartato Amino Transferasa y 6 Fosfogluconato Deshidrogenasa (GPI, ASAT y 6PGDH) y en algunos casos Manosa Fosfato Isomerasa y Fosfoglucomutasa (MPI y PGM). Todos los 77 aislados fueron clasificados como *L. panamensis*; con las enzimas GPI, ASAT y 6PGDH se identificaron 73 aislados y con la ayuda de PGM y MPI los 4 restantes. No se identificó *L. colombiensis* ni otras especies.

SUMMARY

A retrospective and descriptive study was made. 77 Leishmania isolates were classified using an isoenzyme electrophoretic technique in cellulose acetate. The isolates were obtained from patients living at endemic zones of North Western area of Colombia, South America. All patients had cutaneous leishmanian's without mucosal involvement.

Glucose phosphate isomerase, Glutamateoxaloacetate transaminase and Phosphogluconate dehydrogenase (GPI, ASAT, 6PGDH) and in some isolates Mannose phosphate isomerase and phosphoglucomutase (MPI and PGM) were used for enzyme identification. All isolates were classified as *L. panamensis*; 73 were identified using GPI, ASAT and 6PGDH and 4 were identified using PGM and MPI enzymes in addition *L. colombiensis* and others were not identified.

KEY WORDS: Cutaneous Leishmaniasis - Isoenzymes - Classification - Electrophoresis

* Dr. Sergio Jaramillo V.
Residente Medicina de Laboratorio
Instituto de Ciencias de la Salud CES

Asesores:
Bacterióloga Diana María Isaza G.
G.I.B.
Dr. Marcos Restrepo I.
Director Científico I.M.T.
Medellín - Colombia

INTRODUCCION

La Leishmaniasis Tegumentaria Americana (L.T.A.) es una enfermedad parasitaria producida por un protozoo perteneciente a la familia *Tripanosomatidae* y al género *Leishmania*, el cual es transmitido por la hembra de un vector flebotomíneo del género *Lutzomyia* y *Psychodopygus* y que puede causar manifestaciones cutáneas, mucosas o mucocutáneas (1-4).

La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) ha identificado la leishmaniasis como una enfermedad tropical de importancia internacional y como la menos entendida de las principales enfermedades parasitarias del hombre (5).

Desde 1980 el Ministerio de Salud de Colombia, hace a la Leishmaniasis una enfermedad de notificación obligatoria ya que el número de casos aumentaba dramáticamente (6).

Su diagnóstico requiere de la visualización del parásito; para lo cual se cuenta con varios métodos (7-11). También se puede evaluar la respuesta inmunológica del paciente, lo que muestra indirectamente el contacto del agente con el paciente (12-14). Una vez hecho el diagnóstico y aislado el parásito, es importante clasificarlo, porque sirve para estudiar su epidemiología, comportamiento, inmunología y la resistencia que puede tener a diferentes medicamentos.

El propósito de este trabajo fue determinar la distribución de la leishmaniasis en Antioquia y hacer el mapa de la distribución geográfica de las varias especies que causan la enfermedad; para ello se hizo la clasificación por electroforesis de isoenzimas por la técnica descrita por Kreutzer y colaboradores (15-17).

Recientemente se describieron 9 aislados de *Leishmania colombiensis* (18) de los cuales dos fueron en humanos en el Departamento de Antioquia, por lo que fue importante buscar esta especie en el presente trabajo.

METODOLOGIA

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo, el cual incluyó 77 aislados de *Leishmania* procedentes de pacientes con leishmaniasis cutánea, mucosa o mucocutánea captados en la consulta del Laboratorio Departamental de Salud Pública y en los Laboratorios del Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

Con las cepas de *Leishmania* aisladas en el medio NNN modificado por Restrepo y Gómez (19) y luego mantenidas en el laboratorio en el medio de Schneider suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 20% y antibióticos (20), los cuales son repicados mensualmente, o con los aislamientos que se conservan en congelación en N2 líquido, se procedió a hacer cultivo en masa para su identificación bioquímica ya que se requieren abundantes organismos para la obtención de buena cantidad de extractos solubles.

Cultivo en masa

Con este procedimiento se pretende obtener una gran cantidad de promastigotes (entre 2×10^6 - 2×10^8) suficientes para obtener el material para la clasificación isoenzimática. El cultivo en masa se hace en medio de Schneider suplementado con SBF al 20%, y antibióticos en cajas de cultivo celular de 25 cm² con tapa de resca. Estas cajas son inoculadas con los promastigotes de las cepas a estudiar y se dejan 6 días en cultivo a temperatura ambiente entre 24°C y 26°C.

Preparación del lisado

Centrifugar el material de las cajas de cultivo en tubos plásticos de 50 cc., a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) x 15 minutos. Descartar el sobrenadante y hacer 3 lavados con solución salina 0.85% por 15 minutos a 3.000 rpm.

Resuspender el sedimento en 0.5 - 1 ml. de Solución Salina 0.85%. Transferir a un tubo plástico de 2 ml. y centrifugar como antes. Remover todo el líquido sobrenadante con pipeta Pasteur.

Agregar 15 ul de tampón membrana para GPI (14 partes de agua destilada: 1 parte de 0.1 M Tris/Ácido Maleico/EDTA/MgCl₂, pH 7.4). Homogenizar y hacer 3 congelaciones y descongelaciones sucesivas con el fin de hacer ruptura de las membranas y permitir la liberación de las isoenzimas.

Centrifugar nuevamente a 3.000 rpm x 5 minutos, separar el sobrenadante a otro vial y congelarlo en N2 líquido.

La electroforesis se realizó con el sistema de Helena Laboratories, (Beaumont, Texas); teniendo en cuenta que la membrana no quedara con burbujas y haciendo una aplicación de una o dos lamdas; pasado el tiempo que requería el corrido electroforético se procedía a revelar bien fuera a la luz de día o a la luz ultravioleta como en el caso de la ASAT; luego las membranas se jugaban con agua y se dejaban secar.

CONTROLES

Se usaron los siguientes controles:

Leishmania panamensis
MHOM/CO/84/CL132 MHOM/CO/87/CL412

Leishmania braziliensis
MHOM/CO/86/CL250

Leishmania guyanensis
MHOM/CO/86/CL293 MHOM/CO/90/CL662

Leishmania mexicana Cepa control recibida en donación por la doctora Clara Gorodetzky del Departamento de Inmunogenética del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

Los controles se usaron en el centro; las muestras en estudio se usaron en los extremos. En cada acetato de celulosa se corrieron aislados desconocidos y controles.

Para este estudio se usaron 3 enzimas; ellas son:

GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA

GPI (5.3.1.9)

ASPARTATO AMINO TRANSFERASA

ASAT (2.6.1.1.)

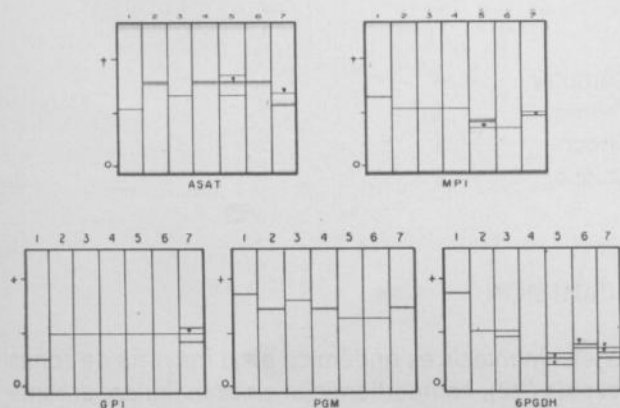
6 FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA

6PGDH (1.1.1.44.)

La GPI fue la primera en correrse para cada aislado, puesto que esta enzima separa los complejos *Leishmania braziliensis* y *mexicana*; luego se corrió la enzima 6PGDH que separa *Leishmania panamensis* de *Leishmania guyanensis* y de *Leishmania braziliensis*. La ASAT separa electroforéticamente *L. colombienseis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis* de *L. braziliensis*. La PGM nos permite separar *L. colombienseis* y *L. brazilienseis* de *L. panamensis* y *L. guyanensis*. En algunos casos se corrió también la enzima MPI que separa las subespecies *Leishmania panamensis* y *Leishmania guyanensis* de la *Leishmania braziliensis* y *Leishmania colombienseis*.

Los componentes y cantidades de reactivos (SIGMA, Chemical Company St. Louis, Mo) utilizados para preparar los distintos sistemas electroforéticos se hicieron según las recomendaciones de Kreutzer (15-18-21).

Representación diagramática del patrón de las enzimas usadas en este estudio:



Más de una banda en una columna indica polimorfismo (más de un alomorfo); bandas únicas en una columna indican que todos los aislados de las subespecies producían una banda de migración idéntica de actividad enzimática (monomórfica). La flecha indica el alomorfo más común entre los aislados de estas especies. El ánodo está donde indica la cruz y la O indica el origen. En cada zimograma: Columna 1: *L. mexicana*, 2: *L. colombienseis*, 3: *L. MCHO/ec/82/Lsp1*, 4: *L. lainsoni*, 5: *L. panamensis*, 6: *L. guyanensis*, 7: *L. brazilienseis*.

Los datos obtenidos se procesaron en un computador CLON compatible con I.B.M. con memoria RAM: 1.024 K Bytes, disco duro de 20 megas, impresora EPSON 1.050.

RESULTADOS

Se estudiaron en total 77 aislados de *Leishmania*, provenientes de pacientes de diferentes zonas endémicas: del Departamento de Antioquia 91% y de otros Departamentos 9%. Todas las lesiones de estos pacientes fueron cutáneas, sin presentar compromiso mucoso.

Al hacer los cultivos en masa en medio de Schneider, se consiguió una buena concentración de parásitos para la preparación del extracto proteico o lisado; el recuento total de células de *Leishmania* estuvo entre 7.1×10^6 y 171.72×10^8 , obteniendo los promastigotes durante la fase logarítmica de crecimiento, que se alcanzó entre el quinto y séptimo día; para esto se utilizó un volumen de medio de cultivo por aislado, entre 50 y 120 ml.

La mayoría de subespecies de *Leishmania* incluyendo *L. colombienseis* (16, 21) pueden ser identificadas certeramente por estudio de tres enzimas GPI, MPI y 6PGDH.

La enzima Glucosa Fosfato Isomerasa (GPI), identificó todos los aislados dentro del complejo *L. brazilienseis* y descartó la posibilidad de que fuera *L. mexicana*.

La enzima Manosa Fosfato Isomerasa (MPI), empleada para diferenciar las subespecies, presentó problemas para su interpretación, pues aparecieron bandas dobles y migraciones que no correspondían a lo descrito, aun con las cepas patrones, lo cual se atribuyó a calidad del sustrato. Se tomó entonces la decisión de reemplazar esta enzima por la enzima Aspartato Aminotransferasa (ASAT), que cumple la función de separar *L. colombienseis*, *L. panamensis*, y *L.*

guyanensis de *L. braziliensis*. En este estudio cambiando la enzima MPI por ASAT se logró identificar 73 aislados, los cuales correspondieron a *L. panamensis*.

Con respecto a la enzima 6PGDH se observó la aparición de una banda de migración menor a la esperada en 4 aislamientos que fueron clasificados como *L. panamensis*, con especial atención por su poca migración anódica en uno de ellos.

Hubo también 4 aislamientos que tuvieron una migración que se localizó entre *L. braziliensis* y *L. panamensis*, pero fueron confirmados como *L. panamensis* con base en el comportamiento con la PGM.

La lista de Municipios Antioqueños de donde procedieron los pacientes y el número de aislados de *Leishmania* que fueron estudiados, fue el siguiente (Mapa 1):

MAPA 1

MUNICIPIOS ANTIOQUEÑOS DE DONDE PROCEDIAN LOS PACIENTES CON LEISHMANIA



Necoclí	1	Zaragoza	1
Nachí	1	San Pedro de Urabá	2
Segovia	2	El Bagre	2
Turbo	2	Remedios	4

Apartadó	3	Vegachi	1
Carepa	3	Maceo	1
Frontino	1	San Roque	3
Urrao	1	Puerto Berrío	3
Ituango	2	San Carlos	8
Tarazá	10	Puerto Triunfo	1
Briceño	2	Sonsón	3
Valdivia	0	Argelia	1
Anorí	2	Yarumal	2
Caucasia	1	Amalfi	1

Unos pocos aislamientos procedían de otros Departamentos (Mapa 2).

MAPA 2

ASILAMIENTO DE LEISHMANIA DE PACIENTES QUE PROVENIAN DE OTROS DEPARTAMENTOS



Córdoba	4
Tolima	1
Chocó	1
Caldas	1

DISCUSION

La leishmaniasis es endémica en la mayoría de zonas del país (22), compartiendo la zona malarica; durante 1981 en Colombia pasó a ser una enfermedad de

notificación obligatoria (6). momento desde el cual los casos vienen en aumento.

Es interesante anotar que la forma cutánea de la enfermedad que se presenta en el Departamento de Antioquia, se debe en su gran mayoría a *L. panamensis* (3, 23, 24, 25). No obtuvimos pacientes con compromiso de mucosa, no obstante que esta subespecie se ha reportado produciendo lesión mucosa (24, 26). En los informes publicados (27) se menciona la existencia de *L. braziliensis* en el Municipio de Montebello; sin embargo en nuestro estudio no hubo aislamientos de esta subespecie, ni pacientes procedentes de este lugar.

El cultivo de los parásitos en material de las lesiones cutáneas es fácil de realizar, pero en la gran mayoría de los aislamientos que se obtienen en los centros de leishmaniasis en Antioquia, corresponden a *L. panamensis* (4, 28, 29, 30). en las mucosas es difícil de obtener una buena muestra y existe una flora bacteriana acompañante, que no favorece el crecimiento de los parásitos en los cultivos. En pacientes que presentan compromiso cutáneo y mucocutáneo, es más fácil el crecimiento de los parásitos tomados de la lesión de piel que de la mucosa. En lesiones crónicas de muchos años de evolución, es también difícil hacer el diagnóstico parasitológico por métodos directos y conseguir un aislamiento en los cultivos.

Puede explicar también el predominio de *L. panamensis* la labilidad de *L. braziliensis* en cultivo, puesto que, la *L. braziliensis* se pierde fácilmente en líneas que sean solamente cultivo y que además no es fácil su aislamiento (31).

Aunque algunos aislados presentaron poca migración anódica con 6PGDH y se clasificaron como *L.*

panamensis interpretándose como una variante de la subespecie.

L. mexicana y *L. guyanensis* no se han reportado en Antioquia, pero sí se ha identificado en Departamentos de Colombia como Nariño, Risaralda, Meta, Santanderes, Caquetá, Guainía y Amazonas (24). También se ha informado de países localizados alrededor de Colombia, como Venezuela, Brazil, Ecuador, Panamá, Perú y algunos del Caribe (3, 32).

Otra subespecie de *Leishmania* que se ha identificado en Antioquia, es *L. colombiensis* de la cual se han informado dos casos humanos (18); a dicha subespecie se le puso especial cuidado, pero no fue posible identificarla, no obstante disponer de ocho pacientes que procedían de San Carlos, la misma región donde fue aislada por primera vez *L. colombiensis*.

Con el método de electroforesis de isoenzimas en acetato de celulosa se puede clasificar gran número de aislados por lo que es un método que se debe tener como referencia para clasificación de las subespecies de *Leishmania*. La utilización de tres enzimas (GPI, 6PGDH y ASAT) para la clasificación de aislados de *Leishmania* es altamente confiable y disminuye los costos del procedimiento sin detrimento de la calidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor José María Maya Mejía por su excelente guía antes y durante el estudio. A la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) y al Instituto Colombiano de Medicina Tropical, los que siempre me ofrecieron apoyo. A Clarita Aramburo Correa por sus mapas. A la doctora María Teresa Palau por el suministro de las cepas de referencia y a Juan Pablo Ortiz Velásquez por su computador.

BIBLIOGRAFIA

1. O. M. S. Las Leishmaniasis. Serie de informes técnicos 1984; N° 701: 1-151.
2. RODRIGUEZ G. Leishmaniasis. Biomédica 1983; 3: 77-99.
3. GRIMALDI G. TESH R and McMAHON - PRATT D. A review of the Geographic Distribution and Epidemiology of Leishmaniasis in the New World. Am. J. Trop. Med. Hyg 1989: 687-725.
4. RAMIREZ E., VARGAS P., GILMA S. y ARANGO E. Vigilancia Epidemiológica. Control de la Leishmaniasis en Antioquia. Evaluación 1989. Bol. Epidemiol. Antioquia, SSSA. Medellín 1990; 15: 211-215.
5. World Health Organization. Report of the Third Meeting of the Scientific Working Group of Leishmaniasis. 1981.
6. Servicio Seccional de Salud de Antioquia. Leishmaniasis. Normas Técnicas y Administrativas. Medellín, 1987.
7. PONCE C., RESTREPO M., OROZCO B. e ISAZA D. El caso de Infecciosas. Leishmaniasis cutánea. Medicina UPB. 1989; 8 (1): 39-43.
8. WALTON, B. C. New World Cutaneous Leishmaniasis in GOLDSMITH R. and HEYNEMAN. D. Tropical Medicine and Parasitology. East Norwalk, Connecticut, Appleton and Lange, 1989: 276-287.
9. CUBA C., NETO E., COSTA J., BARRETO A. y MARSDEN P. El cultivo "in vitro" como instrumento práctico para el diagnóstico y aislamiento primario de *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2. Estudio en pacientes de áreas endémicas. Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo 1986; 28 (5): 317-324.
10. POULTER L. W., PANDOLPH C. R. Mecanismos of Immunity to Leishmaniasis. IV Significance of lymphatic drainage from the site of infection. Clin. Exp. Immunol. 1982; 48: 396-402.

11. MAGALHAES A. V., MORAES M. A., LLANOS CUENTAS A., M. L. COSTA J., CUBA C. and MARSDEN P. D. Histopatología de leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. Patrones histopatológicos y estudio evolutivo das lesões. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 1986; 28 (4): 253-262.
12. SOKAL J. Measurement of Delayed Skin test Responses. N. Engl. J. Med 1975; 293 (10): 501-502.
13. RESTREPO M. y GÓMEZ M. E. La reacción de inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Biomédica 1983; vol 3 No. 1 y 2: 15-21.
14. WEIGLE K. A., BAVALOS M., HEREDIA P., MOLINEROS R., SARAVIA N. and D'ALESSANDRO A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Colombia. A Comparison of Seven Methods. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 36: 489-496.
15. KREUTZER R. D., SEMKO M. E., HENDRICKS L. D. and WRIGHT N. Identification of *Leishmania* spp by multiple isozyme analysis. Am. J. Trop. Med. Hyg 1983; 32 (4): 703-715.
16. KREUTZER R. D., SOURATY N. and SEMKO M. E. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. Am. J. Trop. Med. Hyg 1987; 39 (1): 22-32.
17. KREUTZER R. D. and CHRISTENSEN H. A. Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg 1980; 29 (2): 199-208.
18. KREUTZER R. D., CORREDOR A., GRIMALDI G. Jr, GROGL M., ROWTON E., YOUNG D. et al. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). A new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia y Panama. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1991; 44 (6): 662-675.
19. RESTREPO M. y GOMEZ M. E. Comunicación personal. 1984.
20. GIBCO BRL. Catalogue & Reference Guide. Life Technologies. Inc 1990: 71, 127.
21. KREUTZER R. D. Comunicación personal. 1991.
22. Ministerio de Salud. Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Boletín Epidemiológico Nacional. Bogotá, 1986.
23. PALAU M. KREUTZER R. y CORREDOR A. Distribución geográfica de 268 cepas de *Leishmania* aisladas en la República de Colombia (Octubre/84 - Febrero/87). II Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, Bogotá, Biomédica. 1987 Suplemento No. 1: 21.
24. CORREDOR A., KREUTZER R., TESH R. B., BOSHELL J., PALAU MT, CACEREZ E., ET AL. Distribution and Etiology of Leishmaniasis in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg 1990; 43 (3): 206-214.
25. VELEZ I. B., RIQUX J. A., SARAVIA N. y MORENO B. Identificación de Leishmaniasis de Colombia. Biomédica. 1987: 21.
26. SARAVIA N. G., HOLGIN A. F., McMAHON-PRATT D. AND D'ALESSANDRO A. Mucocutaneous Leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* Subspecies diversity. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; 34 (4): 714-729.
27. VELEZ I. D., ECHAVARRIA E., LEON W. y GAÑAS L. Leishmaniasis tegumentaria en Montebello (Antioquia). Biomédica. 1987 Sup 1: 29.
28. WERNER J. K. and BARRETO P. Leishmaniasis in Colombia, a Review. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1984; 30 (4): 754-764.
29. RESTREPO M., VELASQUEZ J. P., CORTÉZ A., CÁRDENAS V. y ROBLEDO M. Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Tribuna Médica 1975; 52: A13-A16.
30. ESCOBAR J. P., RAMIREZ E. y VARGAS B. Estudio de foco de Leishmaniasis Vereda La Manguita, Amalfi, Antioquia. Bol. Epid. Ant. 1989; 218-226.
31. LAINSON R. AND SHAW J. J. Evolution, Classification and Geographical Distribution. In: PETERS W. and Killik-Kandriak R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Volume I. Biology and Epidemiology. Academia Press Inc, London, 1987: 95-96.
32. GRIMALDI G., DAVID J. and McMAHON PRATT D. Identification and Distribution of New World *Leishmania* Species Characterized by Serodeme Analysis Using Monoclonal Antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 32 (2): 270-287.