

Título: Leishmaniasis y Biodiversidad.

Área. Biodiversidad

Autores: Juana Ortiz Avalos**, Norma del C. Galindo Sevilla*, Miroslava Avila Garcia*

Instituciones: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco**, Centro de Estudios Tecnológico industrial y de Servicios No. 70*.

Teléfono y Fax: 3531022

Correo: jortizavalos@todito

No afiliado.

Leishmaniasis y Biodiversidad.

INTRODUCCION

Nuestro planeta goza de una enorme diversidad de terrenos y climas pero sobre todo de organismos vivos, se calcula que las especies habitantes en la tierra oscilan entre tres y cuatro y medio millones, de las cuales han sido descritas mas de un millón por lo que es entendible que las tareas de, describir y clasificar no son actividades fáciles, y se debe actuar dentro de las Normas internacionales establecidas tomando en cuenta todas sus características capaces de evidenciar su pertenencia a una especie determinada y se dará nombre latinizado que incluye el nombre del género y la especie, de esta manera se adopta un lenguaje universal que permite a los científicos de todo el mundo hablar de tal o cual organismo, no es raro que a diversas localidades de un país a la misma especie se les llame de diversas maneras.

En el estado de Tabasco las papalotillas que habitan en comunidades pertenecientes principalmente a los municipios de Comalcalco, Cunduacán y Cárdenas, en el área conocida como La Chontalpa, los hogares se encuentran muy cercanos las plantaciones de cacao, y que transmite mediante su picadura e el parásito que provoca la enfermedad llamada leishmaniasis.

El parásito un protozooario del género *Leishmania*, pertenece a la clase mastigophora (flagelado), a la familia Tripanosomatidae (uniflagelado), (Leishman, 1903). Posee dos formas amastigote y promastigote.

Los promastigotes, son fusiformes y miden de 15 a 30 micras de largo por 3 a 4 de ancho, posee un núcleo central y cinetoplasto desplazado hacia el extremo anterior, del cual emerge un largo flagelo sin formar membrana ondulante previa, confieren motilidad al parásito.

Los parásitos proliferan y se desarrollan en el intestino del insecto vector, en donde forman agregados en forma de rosetas. Posteriormente, los parásitos migran hacia el aparato digestivo y cuando succionan sangre, al picar regurgitan parásitos contenidos en el aparato bucal, de manera que estos quedan libres en la piel de de las personas, algunos parásitos son destruidos, pero otros disponen de moléculas en su membrana que les permiten sobrevivir. Estos últimos, inician un proceso de diferenciación, dentro del humano, que consiste en la perdida de su flagelo con la consecuente pérdida de la movilidad y la reducción de tamaño del cuerpo del parásito que mide ahora de 2 a 6 micras de longitud por 3 de ancho, transformándose así en la forma de amastigote de forma ovoide (Narváez-Díaz et al. 1994; Sacks et al. 1998; Symons-Fioma et al, 1994).

La Leishmaniasis se manifiesta de diferentes formas dependiendo de las subespecies del género *Leishmania* que sea responsable de la infección. La enfermedad se caracteriza por sus diversas manifestaciones patológicas tanto en su expresión clínica como en su gravedad, dependiendo del área geográfica en que ocurren, la especie de *Leishmania* que infecta al organismo y el tipo de vector involucrado en la transmisión. (Almeida, P.R.; et al. 1993). Se clasifica en:

Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), afecta solo piel y produce en la mayoría de los casos lesiones cutáneas ulcerosas localizadas, que pueden ser producidas por cualquiera de las especies de *Leishmania* que infectan al hombre

en América. El período de incubación después de la infección ha sido estimado entre dos semanas y cuatro meses con un promedio de cuatro a seis semanas.

Las lesiones pueden ser únicas o múltiples, la úlcera clásica tiene bordes descoloridos prominentes y un cráter central que pareciera haber sido cortado con un sacabocado, por ser de borde nítido, los parásitos diseminan lateralmente por debajo del epitelio en forma continua y a una velocidad uniforme, la úlcera crece y mantiene su forma circular, cuando tiene más o menos 1 cm de diámetro y cuatro semanas de evolución desarrolla una pequeña costra en el centro, habitualmente la costra se desprende varias veces y cada vez se reemplaza cubriendo una úlcera un poco más grande, las lesiones varían su aspecto dependiendo de su localización anatómica, el tipo de piel y las grandes variaciones que existen en cuanto a la respuesta inmunológica del huésped. La curación espontánea puede ocurrir después de seis a nueve meses de la infección inicial y en ocasiones hasta muchos años después. (Narváez, A. y col. 1984).

Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) se caracteriza por producir lesiones tipo nodular no ulcerosas en piel, con placas despigmentadas, que generalmente no curan. La piel es habitualmente lisa, brillante, extremadamente frágil y fácilmente traumatizable, los traumas frecuentemente afectan la apariencia de la lesión, y las abrasiones pueden ser confundidas con ulceraciones. Las lesiones tienen una tendencia a diseminarse y aparecen en otras partes del cuerpo. Se desarrollan en forma extremadamente lenta, pero por lo general son progresivas, aunque algunas parecen desaparecer.

Leishmaniasis mucocutánea (LMC), también llamada espundia, se manifiesta por la destrucción de las membranas nasofaríngeas con severa destrucción de los tejidos. Las metástasis a las regiones mucosas pueden ocurrir simultáneamente con una lesión inicial de LCL, o pueden presentarse muchos años después involucrando la destrucción del tejido nasofaríngeo.

Leishmaniasis visceral (LV), una infección sistémica que es frecuentemente fatal. Los síntomas más comunes son fiebre crónica irregular, malestar general, escalofríos y temblores, pérdida de peso, anorexia, malestar en el hipocondrio izquierdo, y esplenomegalia generalmente no dolorosa. (Monrroy, O.A. et al.; 1990, Sacks et al, 1998.).

La leishmaniasis es de distribución cosmopolita, afecta a individuos de 80 países. Se ha comprobado que hay tantos casos que no se notifican o no se llegan a diagnosticar, que las estadísticas oficiales tienen poco valor para determinar el número real de enfermos. Sin embargo la Organización Mundial de la Salud estima una prevalencia global en 12 millones por año. Lamentablemente no se dispone por ahora de una estimación precisa sobre el número de casos que podrían ocurrir en México.

La importancia de la leishmaniasis radica no solo en el número de casos, sino también en su trascendencia mediada por las consecuencias socioeconómicas y psicológicas que las caracterizan. (Delgado, et al; 1993.1979).

En nuestro país se han reportado casos de Leishmaniasis en 17 estados, la LCL y LMC ocurren principalmente en el sureste en los estados de: Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo y Campeche. También se registran casos en estados del norte: Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, San

Luis Potosí y Jalisco, en la costa occidental: Michoacán, Nayarit, y Guerrero, en la zona centro: Morelos y Puebla. (Velasco-Castrejón, 1994, Chable-Santos 1995).

En el estado de Tabasco, la leishmaniasis es una enfermedad que ha prevalecido, las diferentes variedades que se presentan, son: cutánea localizada (LCL), diseminada (LCD), y mucocutánea (LMC), las dos últimas son altamente agresivas para los pacientes, ocasionándoles desfiguraciones físicas, y afectación al estado general de salud. En los últimos tres años (la Secretaría de Salud) ha incrementado la realización de improntas, y se ha observado que existe una relación directamente proporcional entre el número de casos positivos y el número de improntas que se realizan, en el año 2000:1174 improntas con 131 casos positivos, en el 2001: 3120 improntas con 309 positivos, y en el 2002: 4345 improntas con 485 casos confirmados, del total de casos positivos más del 90% se encuentran focalizados en la zona Chontalpa, los municipios con mayor incidencia fueron durante los tres años, Cunduacan, Cárdenas y Comalcalco, (donde se observan plantaciones de cacao cercanas a los hogares, condiciones propicias para la proliferación del vector conocido por los pobladores como papalotillas) seguidos de Jalpa de Méndez y Huimanguillo. De los últimos 10 años fue en 1995 donde se reportaron más casos de leishmaniasis en el estado (SS de Tabasco).

El único diagnóstico definitivo de cualquier forma clínica de Leishmaniasis es el diagnóstico parasitológico, que consiste en la demostración del parásito, en un frotis, una impronta o biopsia teñida, o bien en su forma móvil en medio de cultivo. Para caracterizarlos se emplean con frecuencia anticuerpos monoclonales (AcMo) con inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Diversos estudios han reportado únicamente la presencia de la subespecie *L. mex. mexicana*, sin embargo, dada las diferentes manifestaciones de LCL y LCD en la región es necesario la realización de estudios con cepas procedentes de estos pacientes, caracterizarlas y compararlas con cepas de referencia.

OBJETIVO

Aislar cepas de *Leishmania* en cultivo Seneckjie a partir de lesiones de pacientes con LCL y LCD para caracterizarlas con AcMo por IFI.

DISEÑO; Estudio descriptivo, prospectivo. Como variable independiente: pacientes de Leishmaniasis de diferentes tipos. Y variable dependiente: reactividad de los AcMo por IFI.

ANÁLISIS: Ya que las cepas de aislamiento propio se obtienen después del curso natural de la enfermedad no se realiza manipulación en forma activa de la variable independiente. Examinando la relación entre las variables se comienza por formar grupos según su relación con la reactividad presentada ante los 10 AcMo empleados con los aislados provenientes de LCL y LCD, y comparando dicha reactividad con su parecido a 6 cepas de referencia.

MATERIAL Y METODO

a) Pacientes: Los enfermos fueron visitados en comunidades de los municipios de Comalcalco, Cunduacán y Cárdenas, en sus hogares donde otorgaron su consentimiento, o el de sus padres en caso de los menores, para que una biopsia por aspiración con jeringa de insulina les fuera tomada de las lesiones

de Leishmaniasis cutánea localizada, sin tratamiento y con diagnóstico positivo por impronta (Velazco Castrejón, 1987).

b) Aislamiento primario de Leishmania:

Para el aislamiento de los aislados se utilizaron un total de 135 tubos de medio de cultivo, y se muestreo una población de 45 personas. El aislamiento primario se realizó por triplicado. El material obtenido durante la biopsia se depositó sobre la fase líquida del medio de cultivo primario, medio de cultivo bifásico de Seneckjie, (Shaw & Laison, 1981; Chavez et al, 1982.) preparado con reactivos grado cultivo celular (SIGMA Chemical Co., St. Luis Missouri, USA), sangre humana y antibiótico/antimicótico (SIGMA Chemical Co., St. Luis Missouri, USA) y se cultivó a 25°C en posición inclinada, los cultivos se revisaron periódicamente cada 72 h hasta que se observaron promastigotes creciendo en fase estacionaria y presentaron densidades de parásitos cercanas a 10⁷/ml.

c) Tipificación de la cepa con anticuerpos monoclonales por IFI:

Parásitos cultivados en medio de Senekjie, a una concentración de 10⁶ parásitos/ml, para su caracterización por IFI con anticuerpos monoclonales, se depositaron 10 µl de la suspensión de Leishmanias vivas lavadas y resuspendidas en PBS en cada pozo del portaobjeto para inmunofluorescencia. Las laminillas se secaron a temperatura ambiente, se fijaron con metanol a -20°C durante 10 minutos, y se guardaron en congelación hasta su uso.

Las laminillas se rehidrataron con PBS pH 7.2 y se incubaron en cámara húmeda durante una hora a 37°C (estufa Fisher 413 D) con 10 µl de cada uno de los anticuerpos monoclonales tipificadores (donados por la Dra. Diane McMahon-Pratt) diluidos 1:1000, se lavaron y se incubaron durante una hora a 37°C con suero anti ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA Chemical Co., St. Luis Missouri, USA) a una dilución 1:50.

Por último para su montaje se añadió p-fenilendiamina-glicerol pH 9 (PBS 1.5 ml, o-fenilendiamina dihidroclorado 15 mg, glicerol 13.5 ml, pH ajustado con amortiguador de bicarbonato). Las laminillas se leyeron en un microscopio con sistema de epifluorescencia con objetivos de 10 y 40x.

d) Anticuerpos monoclonales tipificadores y cepas de referencia:

Se usaron los anticuerpos M2, M7, M9, M11, B2, B4, B5, B19, T1 y T3.

EL anticuerpo monoclonal M7 reacciona con las cepas pertenecientes al género *L. mexicana* M2 distingue a *L. mexicana amazonensis*, B4 reacciona con la subespecie *L. braziliensis braziliensis*, B19 con *L. brasiliensis guyanensis*, , M9 y M11 reaccionan con el complejo *L. mexicana*, B2 reconoce a varias subespecies del complejo *L. braziliensis* como son *L. braziliensis panamensis*, *L. braziliensis guyanensis*, y *L. braziliensis braziliensis*, y B5 con *L. braziliensis panamensis* y *L. braziliensis braziliensis*. Anticuerpos T1 y T3 son específicos con *L. tropica mayor*.

Cepas de Referencia: 3 cepas de *L. mexicana*: 3453 (aislada en Colombia), M2903, Be121 y M379 (aisladas en Belice), una cepa PH18 *L. mexicana amazonensis*, una PMH3 *L. mexicana venezuelensis*.

RESULTADOS

a) Pacientes:

De los 45 pacientes muestreados, 2 presentaron lesiones clínicamente compatibles con LCD y los restantes correspondían a LCL, ninguno había recibido tratamiento previo. Los pacientes mostraron lesiones únicas, nodulares o ulceradas, que en todos los casos se encontraron en partes no cubiertas por la ropa, como brazos, piernas, cara y pabellón de la oreja, en la mayoría de los casos había habido intentos de eliminación con remedios caseros, sin éxito.

Se observó que los enfermos vivían cerca de plantaciones de cacao, con condiciones propicias para la proliferación de *Lutzomyia olmeca*, vector comprobado en México (Velazco Castrejón, 1987).

b) Parásitos:

De 45 biopsias por punción, 22 aislados de *Leishmania* crecieron sin contaminación microbiana, en medio de cultivo bifásico de Seneckjje.

Con microscopio de luz transmitida se observó en el sobrenadante, gran cantidad de promastigotes en las que podía distinguirse un hábil flagelo que les permitía moverse con mucha facilidad en muchas direcciones, así como gran cantidad de promastigotes unidos formando grandes y pequeñas rosetas, a las 72 h de cultivo alcanzaron concentraciones de hasta 10^6 parásitos/ml.

c) Reactividad con AcMo

En base a los resultados obtenidos según la reactividad con los AcMo los 22 aislados se separaron en cuatro grupos:

Grupo I: Los aislados considerados en este primer grupo son 1, 3, 5, 9, 11, 12, 15, 23, 24, 25, 26 y 29. Los 12 aislados presentan pobre reactividad por el anticuerpo monoclonal M7 a la dilución 1:1000, pero con reacción a una dilución 1:500 del anticuerpo. El patrón de reactividad de estos aislados es similar al de la cepa de referencia de *Leishmania mexicana*, Bel21, por lo que se presentan como parecidas a Bel21. Los aislados de este grupo también reaccionaron fuertemente con el anticuerpo monoclonal T3, la cepa de referencia lo hizo pobremente, aunque otra cepa de referencia de *Leishmania mexicana*, la HM3, reacciona intensamente con este anticuerpo, pero difiere de las cepas de este grupo en su reactividad con M7, que es intensa.

Grupo II se consideraron 7 aislados: 4, 13, 14, 18, 20, 22 y 27 que reaccionaron con el anticuerpo M7 en la dilución 1:1000, (figura 1) de manera similar en que lo hizo la cepa de referencia de *Leishmania mexicana* M379.

Grupo III se incluyeron los aislados 2 y 16, que reaccionaron con el anticuerpo monoclonal M7 en la dilución 1:1000 y también con el M2 de forma similar a la cepa de referencia de *L. m. amazonensis* PH8.

Grupo IV se clasificó el aislado 10, que solo reaccionó pobremente con M7. Pero el suero del ratón infectado con este aislado reaccionó fuertemente con la cepa 3453 de *Leishmania mexicana* aislada en Colombia y el suero no presentó reacción con las cepas de Tabasco Tab1, Tab2, Tab3 ó Tab4. Algunos aislados

reaccionaron de manera inconsistente con B5, por lo que no consideramos que tengan características de *Leishmania braziliensis*. (McMahon-Pratt and David J. 1985; Mutul, P. 1997 ; Jaffe C. L. et al 1983).

(IMÁGEN SUPRIMIDA PARA ALIGERAR EL ARCHIVO)

Figura 1. IFI *Leishmanias* obtenidas *in vitro*. En forma de promastigotes mostrando su flagelo. AcMo: M7 (Microscopio Neofluar).

CONCLUSIONES:

Existe biodiversidad de los aislados de *Leishmania* circulantes en los municipios de Comalcalco, Cunduacan y Cárdenas, aunque se identificaron como *Leishmania mexicana*, no presentaron reacción homogénea a los anticuerpos monoclonales.

BIBLIOGRAFIA

Chable, S. J.; Van Wynsberghe, R. N.; Canto, L. S.; Narvaez, A. F. : Isolation of *Leishmania mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. 1995. Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol.53 No.2 pp 141-145.

Delgado, O.; Marinela, C.; Clinton, W.A.; Kreutzer: *Leishmania Colombiensis* in Venezuela . Am. J. Trop. Med. Hyg., Vol 48 No. 1 pp 509-512.

McMahon-Pratt D, Bennett E, David J. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. Nature 1981. 581-583.

Narváez, A.; Diaz S.; Aguilar, R. S.: Tropical Medicine and Higiene. Indence of localized cutaneous Leishmaniasis (chiclero 's ulcer) .México.1984. 219-220 p.

Velasco-Castrejon O.; Walton B.C.; Rivas-Sánchez B.; Garcia M.E.; Lazaro G.J.; Hobart O.; Roldan S. Florián-Verdugo J. Munguía-Saldana A.; Berzaluce R. Treatment of cutaneous Leishmaniasis with localized current field (radio frequency) in Tabasco, México. Am J Trop Med Hyg 1997. 57:309-312.