

## ISOLAMENTO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LEISHMANIAS A PARTIR DA BIOPSIA DE PACIENTES DA REGIÃO CENTRO-OESTE.

PIRES, Alause Silva<sup>1</sup>; BASTOS, Rosidete Pereira<sup>2</sup>; Lima, Gloria Maria Araujo Collet<sup>3</sup>.

Palavras-chave: Leishmania, Caracterização Biológica e Molecular.

### 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Apresentam manifestações que vão desde lesões cutâneas de cura espontânea (leishmaniose cutânea localizada) à severa doença sistêmica (leishmaniose visceral). A elevada incidência do número de casos da doença na região Centro-Oeste, entre os anos de 1997 a 1999, classificou a região como sendo a segunda maior em coeficiente de detecção da doença no país. Dentre as espécies encontradas no Brasil a espécie *L. (V.) braziliensis* é a que possui maior distribuição geográfica no país, incluindo a região Centro-Oeste (BARBOSA *et al.*, 1976; GRIMALDI *et al.*, 1987). Nosso trabalho consistiu em isolar leishmanias a partir de biopsias de pacientes atendidos no Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia (HDT), com o intuito de quantificar melhor a incidência da doença, identificar os isolados quanto a espécie do parasito e estocá-los para estudo, utilizando camundongos C57Bl/6 deficientes para o IFN- $\gamma$  ou isolamento *in vitro*. Obtivemos 5 isolados de *Leishmania* que foram caracterizados como *L. (V.) braziliensis*.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1- Pacientes, Camundongos e Parasitos

Os isolados de *Leishmania* foram obtidos de pacientes da região Centro-Oeste atendidos HDT, Goiás e inoculados no coxim plantar de camundongos isogênicos das linhagens C57Bl/6 geneticamente deficientes de Interferon-gama (IFN- $\gamma$  KO) e BALB/c. Foram isolados parasitos de 5 pacientes aqui representados pelas suas iniciais e ano de isolamento, são eles: UAF5, WSS5, EFSF6, PLR6 e HPV6.

#### 2.4 - Curva de crescimento in vitro e in vivo

Iniciou-se uma cultura de parasitos em meio Grace Completo com  $5 \times 10^5$  parasitos/mL e realizou-se a contagem diária do número de parasitos por mL durante 15 dias. *In vivo* a concentração do inoculo foi de  $5 \times 10^6$  parasitos em fase estacionária por pata (50 $\mu$ L) e, após o inóculo, acompanhou-se semanalmente o tamanho das patas desses animais.

#### 2.5 Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction, PCR) para identificação do subgênero e da espécie.

Foi realizado a extração do DNA genômico e posterior amplificação por PCR em que foram usados iniciadores que amplificam regiões conservadas dos minicírculos do kDNA de *Leishmania*, produzindo fragmentos de 120 pb para subgênero *Viannia* e 116 pb para o subgênero *Leishmania*.

#### 2.4.4-Infecção de células peritoniais de camundongos das linhagens BALB/c e C57Bl/6 IFN- $\gamma$ KO.

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP - Laboratório de Imunologia, [alausepires@hotmail.com](mailto:alausepires@hotmail.com)

<sup>2</sup> Bolsista de mestrado. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP - Laboratório de Imunologia, [rpbastos@hotmail.com](mailto:rpbastos@hotmail.com)

<sup>3</sup> Orientador/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG, [gmcal@icb.usp.br](mailto:gmcal@icb.usp.br)

Células peritoniais foram obtidas e plaqueadas sobre lamínulas de vidro na concentração de  $2 \times 10^6$  células/ mL e após 2 h a 35°C e à 5% de CO<sub>2</sub> as células não aderentes foram retiradas e adicionou-se os parasitos na concentração de  $2 \times 10^6$  parasitos/mL. Após 6h os parasitos extracelulares foram retirados, o meio repostado e as placas re-incubadas por mais 24 h. Retirou-se as lamínulas para a avaliação do índice de infecção e do crescimento intracelular das leishmanias após a infecção.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção de isolados de *Leishmania* a partir da biópsias de pacientes

Dos 12 pacientes atendidos com suspeita de leishmaniose, 4 apresentaram exames clínicos e laboratoriais negativos, 4 não voltaram com os exames, sendo que 3 desses foram positivos para isolamento do parasito *in vivo* e *in vitro* e os outros 4 pacientes apresentaram positividade pelos exames clínicos e laboratoriais, mas apenas 2 desses foram isolados em cultura. Assim das 12 biópsias processada 5 resultaram em isolados, *in vivo* e *in vitro*.

#### 3.2 -Caracterização biológica das espécies das *Leishmanias* isoladas

##### 3.2.1- Morfologia das culturas dos isolados

Houve diferenças no tempo de adaptação ao meio de cultura que não alteraram o aspecto morfológico das culturas. Todas apresentaram grumos sólidos e grandes. É possível que em nosso meio falte algum nutriente e por isso os parasitos se mantêm grumados ou que esta é a característica das leishmanias da espécie *L. (V) braziliensis*. Observamos ainda que a maioria dos parasitos apresentava uma forma ovalada; formavam grandes rosetas com um centro denso, difícil de ser desfeita após forçada e repetida agitação.

##### 3.2.2 Curva de crescimento *in vitro*

A fase estacionária foi alcançada no 4º dia de cultura para os isolados UAF5, PLR6 e WSS5, no 5º dia para o EFSF6 e no 6º dia para o HPV6, sendo sua duração semelhante para os todos isolados, terminando no 11º dia.

##### 3.2.3 Curva de crescimento *in vivo*

A infecção nos camundongos BALB/c, na maioria dos isolados, evoluiu até a 5ª.– 6ª. semanas, regredindo após esse período; exceto para o isolado PLR6 que foi até a 3ª semana. Os camundongos C57Bl/6 IFN $\gamma$  KO inoculados foram sacrificados quando a lesão abriu, sendo na 5ª semana de infecção para os isolados PLR6, na 6ª semana para UAF5 HPV6 e EFSF6; e na 10ª semana para WSS5. A infecção com *Leishmania* mostrou ser mais agressiva em camundongos C57Bl/6 deficientes em IFN $\gamma$  do que em camundongos BALB/c selvagens, sendo que nos últimos a citocina interferon-gama faz parte dos mecanismos de defesa contra a infecção por *L. (V.) braziliensis* (Titus et al. 1998).

##### 3.2.4 Avaliação Histopatológica

A avaliação histopatológica da pata infectada e do linfonodo poplíteo drenante de camundongos C57Bl/6 IFN- $\gamma$  KO infectados com um dos isolados mostrou a região da derme com muitas formas amastigotas de leishmania no interstício e com intenso infiltrado inflamatório difuso composto de macrófagos com essas formas amastigotas no seu interior. No corte histológico do linfonodo observou-

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP - Laboratório de Imunologia, [alausepires@hotmail.com](mailto:alausepires@hotmail.com)

<sup>2</sup> Bolsista de mestrado. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP – Laboratório de Imunologia, [rpbastos@hotmail.com](mailto:rpbastos@hotmail.com)

<sup>3</sup> Orientador/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG, [gmcal@icb.usp.br](mailto:gmcal@icb.usp.br)

se a ausência de folículos que se deve à hiperplasia do órgão que ocorreu em função de um processo inflamatório.

### 3.2.5 Células peritoniais de camundongos das linhagens C57Bl/6 IFN- $\gamma$ KO e BALB/c são infectados pelos diferentes isolados.

Houve uma maior aderência de células peritoniais de camundongos C57Bl/6 IFN- $\gamma$  KO que às de camundongos BALB/c às lamínulas, sendo que nos dois casos houve alta infectividade das células, o que levou a um grande número de células rompidas.

### 3.3 Caracterização Molecular das espécies das *Leishmanias* isoladas

No PCR dos 5 isolados observou-se os produtos amplificados com cerca de 120 pares de bases que caracterizam os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Na restrição, foram visualizados os fragmentos de DNA tratados com a enzima *Hae III* identificando todos os isolados pertenciam ao subgênero *Viannia*. Para confirmar a espécie foram utilizados iniciadores específicos para a espécie de *L. (V.) braziliensis*. Todos os isolados do subgênero *Viannia* obtidos pertencem à espécie *L. (V.) braziliensis*.

## 4. CONCLUSÕES

- É possível isolar e cultivar *L. (V.) braziliensis* a partir de biopsia de pacientes tanto in vivo quanto in vitro, sendo a espécie *L. (V.) braziliensis* a mais comum dentre os pacientes com LTA na região Centro-Oeste.
- A citocina IFN $\gamma$  é importante no controle da infecção por *L. (V.) braziliensis*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, W.; MOREIRA, M. C.; SOUZA, M.; SOUZA, J. M.; RASSI, D. M.; GERAIS, B. B; OLIVEIRA, R. L. Note on the classification of the *Leishmania* sp. responsible for cutaneous leishmaniasis in the East Central Region of Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 70(4):389-399, 1976.

GRIMALDI J. R. G, DAVID J. R., MCMAHON-PRATT D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 32(2):270-287, 1987.

TITUS R.G., DEKREY G. K., LIMA H. C. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 66(2):827-829, 1998.

## FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP - Laboratório de Imunologia, [alausepires@hotmail.com](mailto:alausepires@hotmail.com)

<sup>2</sup> Bolsista de mestrado. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP – Laboratório de Imunologia, [rpbastos@hotmail.com](mailto:rpbastos@hotmail.com)

<sup>3</sup> Orientador/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG, [gmcgal@icb.usp.br](mailto:gmcgal@icb.usp.br)