

Caracterização biológica de *Leishmania (Viannia)* isoladas de pacientes com a forma mucosa de Leishmaniose Tegumentar Americana

Paulo Augusto Souza Lara Leão¹, Anna Karoline Aguiar Fleuri², Grazielle Guimarães de Matos², Rodrigo Pereira de Almeida Rodrigues², Hericka de Paula Bento Myto², Miriam Leandro³

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás,
Goiânia, GO, Brasil

Email: pauloaugusto90@gmail.com

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana, *Leishmania (Viannia)*, caracterização biológica

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e/ou mucosas. *Leishmania* é um parasito transmitido pela picada de um inseto vetor dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. A maioria das infecções ocorre como zoonoses entre animais silvestres, geralmente roedores, sendo o homem um hospedeiro acidental no ciclo de transmissão (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Durante o seu ciclo de vida, *Leishmania* apresenta dois estágios morfológica e bioquimicamente distintos, a forma amastigota e a forma promastigota. A amastigota desenvolve-se intracelularmente, multiplicando-se especialmente em macrófagos, apresentando forma arredondada e sem flagelo. No intestino do flebotomíneo, as amastigotas, dentro das células ingeridas durante o repasto sanguíneo do inseto em hospedeiros infectados, são liberadas e se transformam em formas promastigotas, as quais se apresentam na forma alongada e com um flagelo bem desenvolvido. No intestino do vetor, a forma promastigota, recém-diferenciada a partir da forma amastigota ingerida, sofre um processo de diferenciação morfológica e funcional, passando da forma procíclica inicial, não infectante, para a forma metacíclica infectante, um processo chamado de metaciclogênese (da SILVA & SACKS, 1987). As formas metacíclicas migram para a peça bucal do inseto, que quando faz novo repasto sanguíneo transmite o parasito para o hospedeiro (ALMEIDA et al. 2003). As formas promastigotas procíclicas e metacíclicas são também encontradas em

Revisado pelo orientador

1. Graduando em Medicina na UFG; 2. Graduandos em Biomedicina na UFG; 3.Orientadora.

culturas axênicas, representado as formas em fase de crescimento logarítmico e em fase estacionária do crescimento, respectivamente.

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* causadoras de LTA pertencem a dois subgêneros: (1) *Viannia*, representado pelas espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, associadas com lesões cutâneas localizadas e ulceradas, disseminadas ou mucocutâneas e (2) *Leishmania*, representado pela espécie *L. (L.) amazonensis*, associada com o desenvolvimento de lesões cutâneas localizadas ou com a forma difusa. Dentre estas espécies, *L. (V.) braziliensis* é a mais prevalente e cerca de 5% dos pacientes com LTA apresentam a forma clínica mucosa devido a esta espécie. A forma mucosa ou mucocutânea acomete as mucosas oral, nasal e a faringe, havendo destruição tecidual e lesões desfigurantes (ASHFORD, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

As manifestações clínicas das leishmanioses no homem podem variar desde uma simples lesão cutânea até lesões destrutivas da mucosa ou formas viscerais, como consequência de uma complexa resposta imunológica do hospedeiro, de sua resistência natural e diversidade da espécie envolvida na infecção (GALLIMBERT et al., 1994). Assim, a doença passa a ter diversas variações clínicas, com prognóstico variável, indo desde formas que evoluem para cura espontânea até as formas resistentes à terapêutica convencional que podem levar à morte (CARVALHO et al., 1995; BAYLEY & LOCKWOOD, 2007). Estudos têm demonstrado que o espectro clínico da doença está relacionado com as diferentes espécies de *Leishmania* (LAISSON & SHAW, 1987; SILVEIRA et al., 2009) e com a interação entre o parasito e o hospedeiro (MURBACK et al., 2011). De acordo com as características clínicas, a LTA pode ser classificada principalmente em: Leishmaniose cutânea localizada (LCL), com lesão única ou múltipla (até 20 lesões), em geral cura espontaneamente, causada por todas as espécies acima citadas; Leishmaniose cutânea disseminada (LCD), caracterizada por lesões múltiplas ulceradas, podem ser centenas, disseminadas para áreas não contíguas, não raro ocorre comprometimento de mucosa, mas a LCD é uma condição rara, causada especialmente por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*; Leishmaniose cutânea difusa (LCDf), cuja severidade é dada pela ocorrência de lesões semelhantes às lepromatosas, múltiplas lesões não ulceradas, que nunca curam espontaneamente e o indivíduo tem recidivas após o tratamento com os fármacos frequentemente usados, concorrente com deficiente resposta imune específica mediada por células, uma doença rara, causada por *L. (L.) amazonensis*; e a Leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LM), também conhecida como “espúndia”, causa úlceras infiltrantes na mucosa das vias aéreas superiores, com extensa destruição da cavidade oronasal e faríngea, geralmente surge após a forma cutânea, como uma metástase da lesão

primária em cerca de 5% dos casos, sendo causada especialmente por *L. (V.) braziliensis* (TURETZ et al. 2002; HEPBURN, 2003; BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

Em modelo murino de infecção por *L. major*, foi demonstrado que a infecção de camundongos da linhagem C57Bl/6 causa lesão localizada que cura após algumas semanas. Esta resolução da infecção é associada ao desenvolvimento de células T CD4⁺ auxiliares do tipo 1 (Th1, *T helper*), produtoras de interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), citocinas ativadores de macrófagos. Em contraste, a suscetibilidade à infecção foi observada em camundongos da linhagem BALB/c, os quais desenvolvem lesões persistentes, progressivas e pode ocorrer a disseminação dos parasitos para os órgãos viscerais. A falta de controle da infecção é associada ao desenvolvimento de células T CD4⁺ auxiliares do tipo 2 (Th2), produtores de Interleucina 4 e 13 (IL-4, IL-13), que inibem a ativação dos macrófagos pelo IFN γ . O IFN γ e o TNF atuam sinergicamente para a eliminação dos parasitos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) e o peróxido de hidrogênio formam peroxinitritos, todas importantes moléculas microbicidas produzidas pelos macrófagos (HEINZEL et al., 1989; VOULDOUKIS et al., 1997; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

Para diagnóstico da LTA, dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais devem ser frequentemente associados. Uma extensa anamnese, com colheita de dados clínicos e epidemiológicos, seguida de diagnóstico diferencial de várias outras doenças que causam lesões cutâneas ou mucosas, deve ser feita inicialmente. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano. Nos casos de infecção por *L. (V.) braziliensis* a probabilidade está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos doze meses (FURTADO, 1980). No entanto, encontrar o parasito em fragmentos de biópsias ou aspirados das lesões, é o único diagnóstico de certeza de infecção por *Leishmania sp.* Assim, o método parasitológico mais simples é o exame direto, feito por escarificação, biópsia com impressão em lâmina ou punção aspirativa, sendo o material corado por corantes *Giemsa* ou *Leishman*, para análise microscópica à procura do parasito. A inoculação do material obtido da lesão em meios de cultura ou animais de laboratório permite a confirmação do diagnóstico e a posterior identificação da espécie do parasito. A pesquisa de parasitos também é feita em cortes histológicos dos fragmentos das biópsias, porém, nem sempre é possível visualizar o parasito. Apesar disto, os aspectos histopatológicos podem favorecer o diagnóstico de leishmaniose e descartar outras doenças cutâneas (ROMERO et al. 2001; SILVEIRA et al 2004; ANDRADE et al 2005; BAILEY et al 2007).

Os métodos moleculares, que empregam a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polimerase chain reaction*), também têm sido usados no diagnóstico de leishmaniose, apresentando uma elevada sensibilidade. Além de poder indicar a presença do parasito, os métodos moleculares permitem a identificação da espécie destes parasitos, o que é relevante do ponto de vista epidemiológico e para a terapia. Métodos indiretos para demonstrar a presença do parasito incluem os testes imunológicos, tais como reações sorológicas e a intradermorreação de Montenegro. As técnicas sorológicas abrangem especialmente o ensaio imunoenzimático e a reação de imunofluorescência indireta (IFI), para pesquisa de anticorpos anti-antígenos de *Leishmania sp.*

Um dos problemas para se avaliar a infecção por *L. (V.) braziliensis* é a dificuldade do isolamento desta espécie a partir de lesões mucosas de pacientes com LTA e sua manutenção em culturas axênicas. Isto faz com que não haja muitos estudos sobre o comportamento biológico dos isolados da forma mucosa, cuja relevância se justifica pela alta prevalência e pelo elevado número de casos de LTA causados por *L. (V.) braziliensis* no Brasil. Recentemente, foi demonstrado que camundongos C57BL/6 deficientes do gene funcional para IFN- γ desenvolviam uma lesão crescente sem capacidade de conter os parasitos quando desafiados com *L. (V.) braziliensis* (MAIOLI et al., 2004, OLIVEIRA et al, 2010). Nesse sentido esses animais foram utilizados nesse trabalho para isolamento de leishmanias provenientes da biopsia de pacientes com a forma mucosa de LTA. Outro aspecto fundamental é avaliar as características biológicas do parasito, pois há uma diversidade genética intra-espécie que leva à variabilidade na virulência e manifestações clínicas (SCHRIEFER et al., 2004).

2 OBJETIVO

Analisar o comportamento biológico dos isolados ASL9 e NFS10, quanto ao crescimento *in vitro* em culturas axênicas e *in vivo* em camundongos isogênicos BALB/c e C57Bl/6, C57Bl/6 IFN γ KO e C57Bl/6 iNOS-KO

3 METODOLOGIA

3.1 Pacientes

Os isolados de *Leishmania spp.* foram obtidos de pacientes com LTA, atendidos no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad (HDT) de Goiânia, Goiás, entre os anos de 2009 e 2010. A LTA foi diagnosticada por meio dos aspectos clínicos, dados epidemiológicos e exames laboratoriais, sendo estes a intradermorreação de Montenegro (IRM), histopatológico

(Histop) e Imunofluorescência indireta (IFI). O projeto é associado ao projeto “Banco imunobiológico (*Leishbank*) das leishmanioses da região Centro-Oeste e projetos associados”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal e Humana do Hospital das Clínicas (HC-UFG) e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para participarem da pesquisa (Protocolo 126/04).

3.2 Camundongos

Camundongos isogênicos, machos com idade entre 6 a 8 semanas, das linhagens BALB/c, C57Bl/6 e C57BL/6 deficientes em interferon-gama (C57BL/6 IFN- γ KO), C57BL/6 deficientes de iNOS (C57BL/6 iNOS KO), criados e mantidos no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), foram usados neste estudo.

3.3 Manutenção dos Parasitos *in vitro*

Os parasitos eram mantidos *in vitro* em garrafas de cultura, em meio Grace completo, suplementado com 20% de SFB inativado, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 200 U/mL de penicilina (Sigma) e 200 μ g/mL de estreptomicina (Sigma), em estufa BOD à 26°C, sendo repicados pela primeira vez quando havia alta densidade de parasitos. Após a adaptação às culturas *in vitro*, os parasitos passaram a ser repicados iniciando a cultura com 5×10^5 parasitos/mL ou com 1×10^6 parasitos/mL (em caso de isolados que apresentavam menor taxa crescimento *in vitro*). A quantificação dos parasitos era realizada, após diluição de uma alíquota da cultura em formalina 2%, em hematocitômetro.

3.4 Caracterização biológica dos isolados de *Leishmania*

3.4.1 Curva de crescimento dos parasitos *in vitro*

Os parasitos foram cultivados em meio Grace completo à 26°C em garrafas de cultura, iniciando a cultura com 1×10^6 parasitos/mL. As curvas de crescimento *in vitro* foram feitas em triplicata, sendo o crescimento avaliado por contagem diária do número de parasitos em hematocitômetro, durante 12 dias de cultivo. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos/mL. Para cada parasito foram determinadas a fase logarítmica e a estacionária do crescimento, as quais são caracterizadas, respectivamente, pelas formas procíclicas e metacíclicas (infectantes) dos parasitos. Foram preparadas lâminas contendo os parasitos, usando citocentrífuga Fanem (1×10^6 parasitos/100 μ L de meio Grace Completo,

400 rpm, 50 segundos), as quais foram coradas usando kit Instant Prov (Pinhais, PR, Brasil), sendo visualizadas e fotografadas sob microscopia de luz.

3.4.2 Curva de crescimento dos parasitos *in vivo*

Os parasitos, no sexto dia de cultivo, foram inoculados na pata traseira direita de camundongos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c (5×10^5 parasitos por pata /50 μ L). Para cada isolado foram usados 10 animais, sendo cinco de cada linhagem. Após o inóculo, foi acompanhado semanalmente o tamanho das patas desses animais com o auxílio de um paquímetro. Os dados representam o tamanho da lesão, sendo a média das diferenças entre as patas infectadas (pata direita) e as patas controles não inoculada (pata esquerda). Quando as patas apresentavam lesão de 5 mm, lesão ulcerada ou os animais atingiam 12 semanas de crescimento, os animais eram sacrificados.

3.5 Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como medianas e interquartis (25% e 75%) e valores mínimos e máximos. Os resultados foram avaliados pelo teste pareado de Wilcoxon ou por ANOVA Kruskal-Wallis, seguida de teste de Dunn para variáveis não paramétricas. Para variáveis paramétricas, os dados foram apresentados como média \pm EPM, sendo analisados por teste t de Student ou ANOVA/Bonferoni. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 4.0 Software (San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

A partir da biópsia de pacientes com lesões sugestivas de LTA associado com dados clínicos compatíveis com esse diagnóstico, foi realizado o processamento, isolamento e cultivo do parasita. Em seguida foi feita a caracterização biológica do isolado, que consistiu na análise de sua morfologia, na avaliação da curva de crescimento *in vitro* e curva de crescimento *in vivo*. Relacionado a esses dados, mostra-se o quadro clínico dos pacientes.

4.1 Dados clínicos dos pacientes

4.1.1 Isolado ASL9

Paciente, ASL, 60 anos, sexo masculino, casado, pardo, natural de Porto Franco - MA, procedente de Minaçu – GO, fazendeiro e com ensino médio incompleto. Foi encaminhado

para o ambulatório de infectologia do Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia, onde relatou que há mais ou menos 5 anos fez tratamento para leishmaniose com Glucantime por 25 dias. Nos últimos dois anos apresentou piora das lesões que se encontravam em septo nasal. Ao Exame Físico, paciente em bom estado geral, corado, hidratado, sem alterações do trato respiratório, cardíaco, gastrointestinal e genitourinário. Apresentava lesão de crosta amarelada e hemática em assoalho de narinas e septo nasal destruído.

4.1.2 Isolado NFS10

Paciente, 19 anos, sexo masculino, solteiro, procedente de Serra Nova Dourada – MT, onde trabalha com cerâmica. Veio ao ambulatório de infectologia com história progressiva de LTA em palato duro e em membros inferiores, tratado com Glucantime, porém lesões voltaram a aparecer há um mês, apresentando concomitantemente hepatoesplenomegalia, e pancitopenia. Tratado com Anfotericina B, porém com piora da função renal, o que agravou o seu quadro. Realizado mielograma que teve como resultado uma medula óssea hipocelular com aumento de linfócitos e aumento da série eritrocítica; sorologia para calazar negativo. Em biópsia de lesão de palato duro, observou-se intenso infiltrado histiolinfocitário e incontáveis parasitos intracitoplasmáticos. A partir desses dados pensou-se inicialmente em uma LTA que posteriormente visceralizou. Realizou exames para confirmação diagnóstica para LTA, que apresentaram os seguintes resultados: IRM de 15 mm, RIFI de 1/40 e análise Histopatológica positiva. Foi realizado tratamento com Glucantime. Após seis meses de evolução, apresentou melhora da lesão.

4.2 Curso temporal de crescimento do isolado *in vitro*

Os isolados ASL9 e NFS10 foram cultivados a 26°C durante 12 dias. Os parasitos foram repicados inicialmente na concentração de 5×10^5 parasitos/mL em fase logarítmica do crescimento e quantificados diariamente. A Figura 1 mostra que as curvas de crescimento *in vitro* foram similares para todos os isolados. Foi detectada intensa proliferação entre um e quatro dias das culturas, sendo esta fase denominada de fase logarítmica do crescimento. A partir do 4º dia de cultura, a proliferação dos parasitos diminuiu, iniciando a fase estacionária do crescimento. O máximo de parasitos na cultura variou de $\sim 4 - 7 \times 10^7$ parasitos/mL. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os perfis das curvas de crescimento ou entre as quantidades de parasitos obtidos nas culturas.

Parasitas no sexto dia de cultura (fase estacionária) foram usados para a infecção dos camundongos. A concentração de parasitos na fase estacionária foi de cerca de 5×10^7 parasitos/mL.

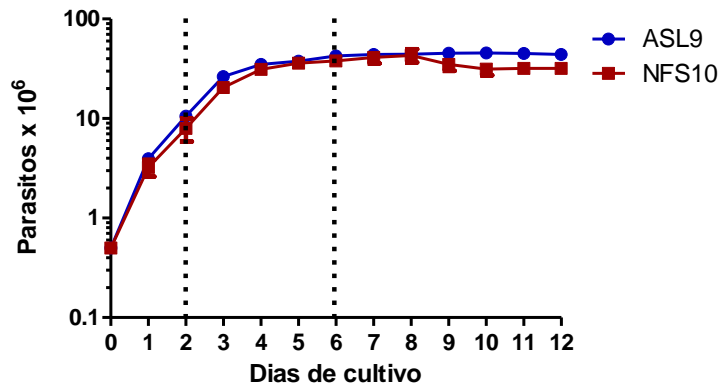


Figura 1. Curva de crescimento *in vitro* dos isolados ASL9 e NFS10. Os parasitos foram cultivados na concentração inicial de 5×10^5 parasitos/mL em meio Grace completo, a 26°C. A quantificação dos parasitos foi realizada pela contagem diária, sob microscopia de luz, em hematocítmetro. Os dados representam as médias \pm DP de três curvas independentes. As duas linhas pontilhadas representam os dias em que foram atingidas as fases logarítmica e estacionária de crescimento dos parasitos, respectivamente.

A análise da curva de crescimento dos parasitos *in vitro* mostrou similaridade no curso temporal do crescimento entre todos os isolados, não havendo diferenças significantes entre os perfis das curvas de crescimento ou entre as quantidades de parasitos obtidos nas culturas, mesmo comparando espécies diferentes.

Foi estabelecido que a fase logarítmica do crescimento ocorreu até o quarto dia da cultura (fase de intensa proliferação dos parasitos), iniciando a fase estacionária a partir deste dia de cultura.

4.3. Caracterização da Morfologia dos isolados

Na análise morfológica dos isolados, durante a curva de crescimento, o desenvolvimento dos parasitos em cultura foi acompanhado por observações periódicas em microscópio de luz invertido. Alíquotas das culturas foram submetidas à centrifugação (citospin) e em seguida as lâminas foram coradas por *Instant Prov* e fotografadas. São apresentadas na Figura 2 fotomicrografias das culturas dos isolados ASL9 (Fig. 2A) e NFS10 (Fig. 2B), mostrando crescimento dos parasitos em pequenos cachos. A maioria dos parasitos apresentou uma forma ovalada ou arredondada, com pequenos ou longos flagelos e a maior parte deles ficavam aglomerados em cachos no 3º dia de cultura (fase logarítmica de

crescimento) (Fig1 A1 e B1). Na Figura 1 A2 e B2 os parasitos correspondem ao 6º dia de cultura (fase estacionária de crescimento) os mesmos apresentam formas arredondas e forma mais alongada com flagelos longos. Os parasitos, no 6º dia de cultivo foram utilizados para a realização da infecção dos camundongos.

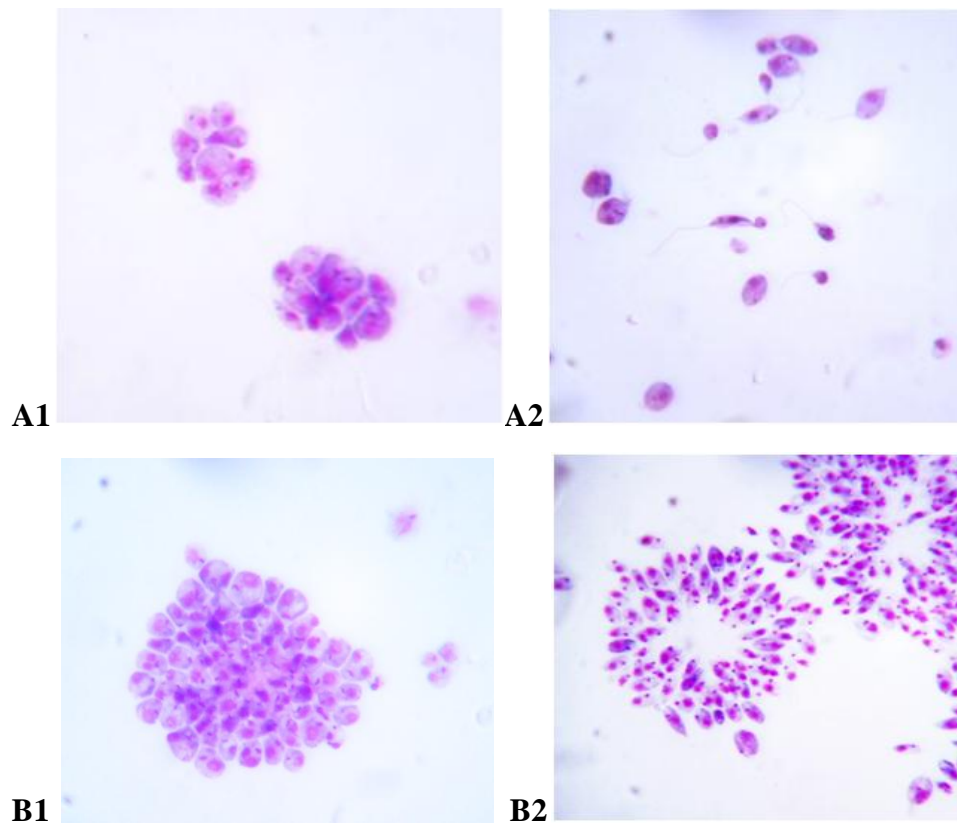


Figura 2. Morfologia dos isolados de *Leishmania (Viannia)*. Os parasitos foram cultivados em meio Grace a 26°C, centrifugadas em citocentrífuga, corados (Kit Instant Prov) e fotografados (aumento de 1000x). Em A, o isolado ASL9: A1 formas promastigotas no 3º dia de cultivo e A2: formas promastigotas no 6º dia de cultivo. Em B, o isolado NFS10: B1 formas promastigotas no 3º dia de cultivo e B2: formas promastigotas no 6º dia de cultivo.

4.4 Curso temporal do desenvolvimento das lesões causadas pelos isolados *in vivo*

A avaliação do comportamento dos isolados *in vivo*, foi feita pelo acompanhamento semanal do desenvolvimento das lesões das patas de camundongos BALB/c, C57BL/6 e C57BL/6 IFN- γ KO com infecção com o isolado ASL9 e nos camundongos BALB/c, C57BL/6 IFN- γ KO e C57BL/6 iNOS KO, infectadas com 5×10^6 parasitos em fase estacionária do crescimento (contendo formas procíclicas e metacíclicas), até a 12ª semana. Não foi feita a infecção de camundongos C57BL/6 com o isolado NFS10 por que o biotério

do IPTSP está com dificuldades em fornecer esta linhagem de camundongos e assim que seja possível será feito este experimento.

Como pode ser observado na Figura 3A, as lesões em camundongos C57BL/6 e BALB/C infectados com o isolado ASL9 apresentaram um crescimento gradual até a 4ª semana e depois mantiveram o tamanho da lesão. As lesões atingiram o tamanho máximo de ~0,6 mm, reduziram cerca de 0,3 mm e se mantiveram em 12 semanas. Nos camundongos C57BL/6 KO IFN- γ , o pico da lesão foi observado na 7ª semana, apresentando lesões em torno de 2,3 mm.

A avaliação do comportamento do isolado NFS10 *in vivo*, foi feita pelo acompanhamento semanal do desenvolvimento da lesão das patas de camundongos BALB/c, C57BL/6 KO IFN- γ e C57BL/6 KO iNOS infectadas com 5×10^6 parasitos em fase estacionária do crescimento até a 12ª semana para a maioria dos camundongos BALB/c e C57BL/6 e até que a lesão ulcerasse ou atingisse 5 mm para os camundongos C57BL/6 IFN- γ KO (Fig. 3B). As patas inoculadas dos camundongos C57BL/6 KO IFN- γ e C57BL/6 KO iNOS ulceraram a partir da 2ª semana de infecção e foram sacrificados logo em seguida. As patas dos camundongos BALB/c foram mensuradas até a 6ª semana de infecção e serão acompanhadas até a 12ª semana.

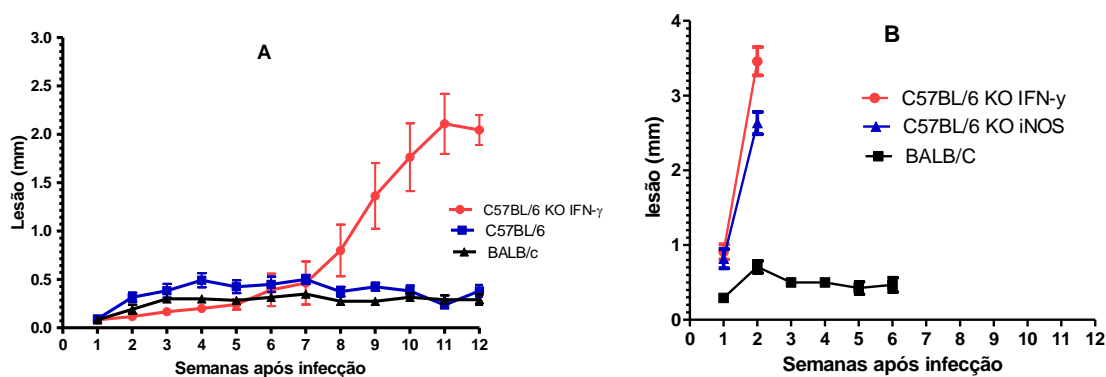


Figura 3. Curso temporal da infecção pelos isolados de *Leishmania (Viannia)*. Os camundongos foram inoculados na pata traseira direita dos camundongos com 5×10^5 promastigotas na fase estacionária de crescimento. O tamanho da lesão é a subtração da medida da pata não inoculada daquela da pata infectada (mm). Em A, infecção de camundongos BALB/c, C57BL/6 e C57BL/6 IFN- γ KO com o isolado ASL9. Em B, infecção de camundongos BALB/c, C57BL/6 IFN- γ KO e C57BL/6 iNOS KO com o isolado NFS10.

4.5 Avaliação da carga parasitária das lesões causadas pela infecção *in vivo*

Para quantificar os parasitos após 12 semanas de infecção a carga parasitária foi estimada nas patas e nos linfonodos drenantes da lesão dos camundongos C57BL/6 e/ou C57Bl/6 IFN- γ KO e/ou C57Bl/6 iNOS KO e BALB/c.

Em acordo com os resultados da Figura 4A, tanto as patas quanto os linfonodos drenantes das lesões causadas pela infecção com o isolado ASL9 em camundongos C57BL/6, C57Bl/6 IFN- γ KO e BALB/c. apresentavam parasitos (Fig. 4A). A carga parasitária das patas e linfonodos do camundongo C57Bl/6 IFN- γ KO foi superior as patas e linfonodos dos demais camundongos (C57BL/6 e BALB/c), $p > 0,001$. Houve diferença significativa entre a carga parasitária das patas e linfonodos dos camundongos C57Bl/6 IFN- γ KO ($p > 0,01$). Não houve diferença entre o número de parasitos nas duas linhagens de camundongos, C57BL/6 e BALB/c.

Na Figura 4B podemos observar que a carga parasitária das patas e linfonodos drenantes das lesões causadas pela infecção com o isolado NFS10 em camundongos C57Bl/6 IFN- γ KO e IFN iNOS KO apresentavam parasitos. A carga parasitária das patas e linfonodos do camundongo C57Bl/6 IFN- γ KO foi superior as patas e linfonodos dos camundongos C57BL/6 iNOS KO ($p > 0,01$). Houve diferença significativa entre a carga parasitária das patas e linfonodos dos camundongos C57Bl/6 IFN- γ KO ($p > 0,01$). Não houve diferença significativa entre a carga parasitária das patas e linfonodos dos camundongos C57Bl/6 iNOS KO.

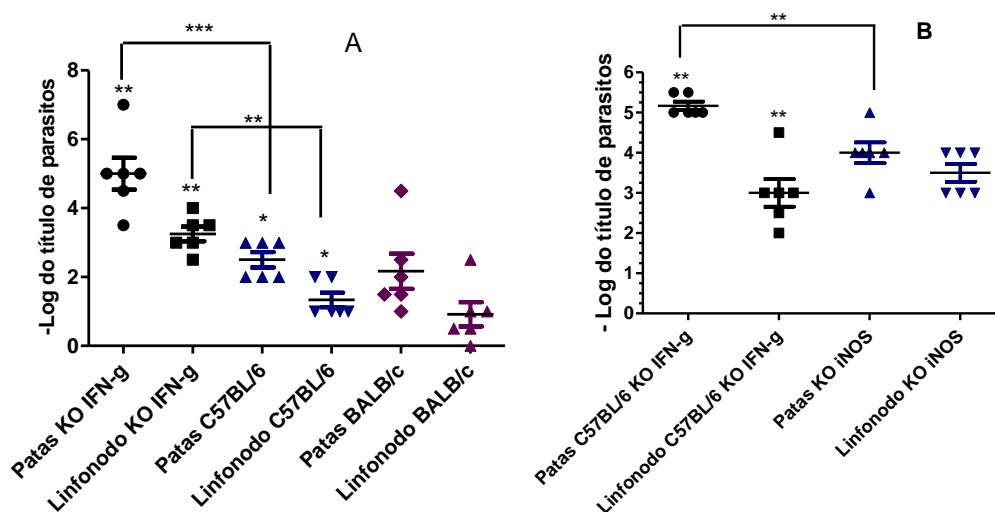


Figura 4. Avaliação da carga parasitária nas patas e linfonodos drenantes da lesão de camundongos C57BL/6, BALB/c ou C57BL/6 IFN γ KO infectados com o isolado ASL9. Camundongos C57BL/6, BALB/c ou C57BL/6 IFN- γ KO foram infectados na pata direita com ASL9 (5×10^6 parasitos). As patas (A) e linfonodos drenantes da lesão (B) foram macerados e cultivados por 15 dias, em várias diluições. Os camundongos foram sacrificados na 12^a segunda semana de infecção. São apresentados os valores individuais e as medianas (n = 6).

A diluição limitante demonstra a carga parasitária da lesão tanto na pata como no linfonodo drenante, comprovando a presença do parasito na lesão e seu papel no desenvolvimento da mesma. Sendo assim, percebe-se uma maior carga parasitária nas patas e linfonodos de camundongos C57BL/6 KO IFN- γ , condizendo com o maior tamanho das lesões apresentada nas patas. Os camundongos C57BL/6 iNOS KO infectados com o isolado NFS10 apresentou uma carga parasitária elevada (Fig. 4B) o que explica o aumento no tamanho da lesão (Fig. 3B) e a rápida ulceração da pata. Como o experimento dos camundongos BALB/C ainda estão em andamento, não foi possível ter a sua diluição limitante deste grupo.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisados o comportamento biológico dos isolados ASL9 e NFS10, quanto ao crescimento *in vitro* em culturas axênicas e *in vivo* em camundongos isogênicos BALB/c e C57Bl/6, C57Bl/6 IFN γ KO e C57Bl/6 iNOS-KO. O isolado ASL era proveniente de um paciente com 60 anos, sexo masculino, procedente de Minaçu – GO e era fazendeiro, o tempo de doença relatado foi de 5 anos e nos últimos dois anos apresentou piora das lesões que se encontravam em septo nasal, apresentava lesão de crosta amarelada e hemática em assoalho de narinas e septo nasal destruído. O isolado NFS10 era oriundo de paciente com 19 anos, sexo masculino, procedente de Serra Nova Dourada – MT, onde trabalhava com cerâmica, apresentava história progressiva de LTA em palato duro e em membros inferiores, tratado com Glucantime, porém lesões voltaram a aparecer há um mês, apresentando concomitantemente hepatoesplenomegalia, e pancitopenia. Em biópsia de lesão de palato duro, observou-se intenso infiltrado histiolinfocitário e incontáveis parasitos intracitoplasmáticos. A partir desses dados pensou-se inicialmente em uma LTA que posteriormente visceralizou. Condição essa já citada na literatura por VEXENA et al. (1991), que registrou a visceralização de LTA em fígado de primatas. Além de Silva et al. (2002) que relatou uma paciente com leishmaniose visceral atípica causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* não apresentando lesões cutâneas ou em mucosas

A análise da curva de crescimento dos parasitos *in vitro* mostrou similaridade no curso temporal do crescimento entre todos os isolados. O perfil de crescimento dos isolados, obtido nas condições do presente estudo, foi similar àquele descrito anteriormente por Gosh (2005) que também avaliou o comportamento biológico de isolados de *Leishmania* sp. obtidos de biópsias de pacientes procedentes dos Estados de Goiás e Mato Grosso.

Na análise morfológica dos isolados, durante a curva de crescimento, o desenvolvimento dos parasitos em cultura foi acompanhado por observações periódicas em microscópio de luz invertido. No presente trabalho, foram visualizados na fase logarítmica do crescimento, grumos sólidos e grandes de parasitos com corpo celular grande, arredondado e pequenos flagelos. É possível que no meio de cultura utilizado falte algum nutriente importante para a o parasito e por isso estes se mantêm grumados (RODRIGUEZ & O'DALY, 1988) ou que esta é a característica das leishmânias da espécie *L. (V.) braziliensis* em meio Grace suplementado com soro fetal bovino. No período da fase estacionária, numerosos parasitos livres dos aglomerados típicos da fase log do crescimento, eram observados, movimentando-se rapidamente. Essas mudanças coincidem com aquelas descritas durante o processo de metaciclogênese descrito por Almeida et al. (1993) para *L. (V.) braziliensis*, em que o processo de adaptação dos parasitos ao meio de cultura é acompanhado por mudanças bioquímicas e morfológicas, que os tornam potencialmente mais infectantes.

O acompanhamento das lesões nas diferentes linhagens de camundongos infectadas com os isolados mostrou que a infecção nos camundongos BALB/c e C57Bl/6 é controlada, enquanto, nos camundongos C57Bl/6 IFN- γ KO ela é progressiva. A citocina IFN- γ é muito importante para o controle da infecção por *Leishmania* e sua ausência pode causar disseminação dos parasitos do local da infecção para outros tecidos e órgãos (SCHARTON; SCOTT, 1993; SOUZA-NETO et al. 2004; ROCHA et al. 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

Os dados encontrados no presente trabalho mostram que características dos parasitos influenciam a evolução da infecção, e indicam que os isolados aqui estudados, ASL9 e NFS10 infectam eficientemente os camundongos C57Bl/6 IFN- γ KO, BALB/c, C57Bl/6 e C57Bl/6 IFN- γ KO C57Bl/6 iNOS KO e BALB/c, respectivamente, podendo ser usados para estudo da infecção por *L. (V.) braziliensis*, o que tem sido difícil devido à baixa capacidade de infecção murina por esta espécie. Os isolados causaram lesões que foram controladas nos camundongos C57Bl/6 e BALB/c. O perfil de resistência pode estar associado ao estabelecimento de resposta imune do tipo Th1 com forte resposta imune celular, sendo o INF- γ e iNOS importantes no mecanismo de controle da infecção, conforme descrito em trabalhos de infecção com *L. major* (SCOTT, 1991; SCHARTON; SCOTT, 1993; VON STEBUT; UDEY, 2004). De fato, no presente trabalho, a ausência de IFN- γ nos camundongos C57Bl/6 e de iNOS causaram lesões que se desenvolveram rapidamente, havendo necessidade de sacrificar os animais infectados com NFS10, os quais apresentaram ulceração.

6 CONCLUSÕES

- Os dois isolados ASL9 e NFS10 tiveram curvas de crescimento *in vitro* semelhantes,
- Foi observada diferenças no curso temporal do desenvolvimento das lesões causadas pelos isolados ASL9 e NFS10 *in vivo*,
- A carga parasitária das patas e linfonodos do camundongo C57Bl/6 IFN γ -KO infectados com o isolado NFS10 foi significativamente maior que as patas e linfonodos dos camundongos C57BL/6 iNOS KO (p<0,001).

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA R.P. et al. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous mucosal or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg*, Bahia, v. 54(2), p. 178-184, fev. 1996.

BARBOSA W. et al. Note on the classification of the *Leishmania* sp. responsible for cutaneous leishmaniasis in the East Central Region of Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 70(4), p. 389-399, 1976.

BARRAL A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*, Bahia, v. 44(5), p. 536-546, maio 1991.

COELHO L.I.C. et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res.*, v. 108(3), p. 671-677 Março, 2011.

DEKREY G.K. et al. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, Colorado, EUA, v. 66(2), p. 827-829, fev. 1998.

DORTA ML et al. American cutaneous leishmaniasis in a rural area of Goiás state, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v 45(13), p. 149. 2003

FUNASA. Manual de controle de leishmaniose tegumentar Americana. Brasília: 5ª edição, p. 1-62, 2000.

GONTIJO B. & CARVALHO M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Belo Horizonte, v. 36, p. 71-80, jan-fev 2003.

GOSCH C.S. Caracterização imunobiológica de isolados de leishmanias de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Dissertação de mestrado, 55 páginas, *Instituto de patologia tropical e saúde pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.*

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.*, v. 32(2), p. 270-287, mar. 1987.

LEMESRE J.L. et al. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. *Acta Trop.*, França, v. 45(2), p. 99-108, jun. 1988.

LOPES, A.C. Tratado de Clínica Médica. 2ª edição. São Paulo: Editora ROCCA, 2009. Volume III

MAIOLI T.U. et al. 2004. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res.*, Ouro Preto, v. 94(3), p. 207-212, out. 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana, disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927> Acesso em: 13/06/2011.

MOSMANN T.R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* v. 136(7), p. 2348-2357, abr. 1986.

MURBACK, N.D.N. et al. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, Feb. 2011.

NUNES V.L. et al. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul – Estudo da população humana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Campo Grande, v. 28(3), p. 185-193, jul.-set.1995.

O'DALY J.A.; RODRIGUEZ M.B. Differential growth requirements of several Leishmania spp. In chemically defined culture media. *Acta Trop.*, Caracas, Venezuela, v. 45(2), p. 109-126, jun. 1988.

OLIVEIRA C.C. et al. Changing epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of urban-rural interface. *Acta Tropica*, Natal, v. 90, p. 155-162, abr. 2004.

OLIVEIRA M.A.P. et al. Leishmania spp. Parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 83-88, mar.-abr. 2010.

PEREIRA, C.G. et al. Imunohistoquímica revela formas amastigotas de Leishmania do complexo braziliensis em modelo murino. *XII Seminário de Iniciação Científica, UFU*, Uberlândia, 2008.

REIS, Luiza de Campos et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 41, n. 5, Out. 2008.

SACKS D.; NOBEN-TRAUTH N., The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.*, EUA, v. 2(11), p. 845-858, nov. 2002.

SCOTT P.; SACKS D.; SHER A., Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* EUA, v. 131(2), p. 966-971, ago. 1983.

SHAW J.J. Taxonomy of genus Leishmania; present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, set. 1994.

SILVA, Eduardo Sérgio da et al. Visceral leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, São Paulo, v. 44, n. 3, 2002.

WHO information, by topic or disease. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmanias>>. Acesso em: 5 de março 2006.