

Padronização de cultivo e manutenção de *Leishmania braziliensis*

Amanda F. Perestrelo*, Aline P. Calarga, Marcelo Brocchi, Kamila C. S. Krywacz, Carlos Emilio Levy, Selma Giorgio.

Resumo

Leishmania braziliensis é a principal espécie causadora da leishmaniose mucocutânea, caracterizada por fases cutânea e mucosa. A doença é transmitida pela fêmea de flebotomíneos e acomete toda a América do Sul. As pesquisas relacionadas a esse parasita são escassas e, visto que é o mais incidente no Brasil, decidiu-se introduzi-lo e estudá-lo no Laboratório de Leishmaniose, padronizando técnicas de cultivo e analisando infecções *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-chave:

Leishmaniose mucocutânea, *Leishmania braziliensis*, cultivo.

Introdução

A leishmaniose é uma protozoose que causa infecções cutâneas, mucosas ou viscerais¹. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é uma das espécies que causam a leishmaniose mucocutânea (LMC), caracterizada por lesões cutâneas, com cicatrização espontânea, e mucosas, que acometem membranas do septo nasal e garganta. O vetor flebotomíneo é adaptado a ambientes antropizados e a LMC foi identificada em todo o Brasil². A *L. braziliensis* é pouco estudada: não há vacinas contra esse parasita e as pesquisas sobre seu tratamento são escassas. A baixa infectividade em animais e em macrófagos² explicam esse fato. Portanto, com base na experiência do nosso grupo, condições laboratoriais e protocolos de cultivo já padronizados para outras espécies de *Leishmania*, a *L. braziliensis* foi introduzida no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia. Protocolos foram adaptados para manutenção e expansão de parasitas, avaliando sua adaptação *in vitro* e *in vivo*, e sua infectividade. Além disso, foram congelados estoques de *L. braziliensis* para futuros estudos e análises.

Resultados e Discussão

Dos meios de cultivo testados: DMEM, Schneider, Mix 199 + LIT e RPMI 1640, o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino à 26°C apresentou melhores resultados em relação à proliferação de promastigotas de *L. braziliensis*: após 5 dias os parasitas ainda estavam em fase exponencial de proliferação (Figura 1A).

Durante o decorrer do projeto, o laboratório recebeu material de biópsia de um caso de LMC do Hospital das Clínicas da Unicamp que foi denominado Isolado HC, expandido e mantido em cultura, congelado e *in vivo*. Na Figura 1B, observa-se que as promastigotas cultivadas apresentam curvas semelhantes, com fase exponencial de proliferação após 4 dias e fase de queda da proliferação após 7 dias (Figura 1B).

Figura 1. (A) Curvas de Proliferação de *L. braziliensis* MHOM/BR/00/BA788 em diferentes meios de cultura. Cerca de 2×10^5 promastigotas/mL iniciais foram cultivadas em diferentes meios e contadas diariamente em câmara de Neubauer. **(B)** Curvas de Proliferação de *L. braziliensis* MHOM/BR/00/BA788 e *L. braziliensis* Isolado HC. Cerca de 2×10^5 promastigotas/mL iniciais foram cultivadas e contadas diariamente em câmara de Neubauer.

Foram realizadas infecções *in vivo* com 2×10^7 promastigotas de *L. braziliensis* MHOM/BR/00/BA788 e *L. braziliensis* Isolado HC em camundongos isogênicos BALB/c e C57Bl/6 e em camundongos C57Bl/6 INOS knockout (Figura 2A). Foi possível observar lesões cutâneas com variabilidades morfológicas.

As infecções *in vitro* realizadas demonstraram que, apesar da taxa de infectividade da *L. braziliensis* em macrófagos RAW 264.7 à 37°C e à 34°C ser baixa, as promastigotas conseguem se transformar em amastigotas dentro de vacúolos parasitíferos (Figura 2B).

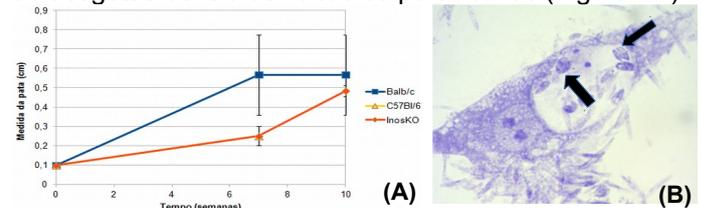


Figura 2. (A) Curvas de crescimento de lesões cutâneas em patas direitas de camundongos infectados com *L. braziliensis* MHOM/BR/00/BA788. **(B)** Macrófago RAW 264.7 infectado por 24h com *L. braziliensis* MHOM/BR/00/BA788 em proporção 1:10 à 34°C. Amastigotas apontadas.

Conclusões

Nesse trabalho foi padronizado o cultivo de *L. braziliensis* em meio RPMI com 10% de SFB à 26°C. Parasitas foram isolados de lesão de biópsia enviada pelo HC e foram cultivados, congelados e sua identificação foi iniciada. Camundongos BALB/c, C57Bl/6 e C57Bl/6 INOS knockout foram infectados com *L. braziliensis* e apresentaram lesões cutâneas. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com *L. braziliensis* e apresentaram baixa taxa de infecção. O principal objetivo foi alcançado: a espécie *L. braziliensis* foi introduzida com sucesso no Laboratório de Leishmaniose do IB.

¹ Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. J Am Acad Dermatol. 2015.

² <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

