

## 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 viscerais<sup>1</sup>. 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 Brasil<sup>2</sup>. 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 macrófagos<sup>2</sup> 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

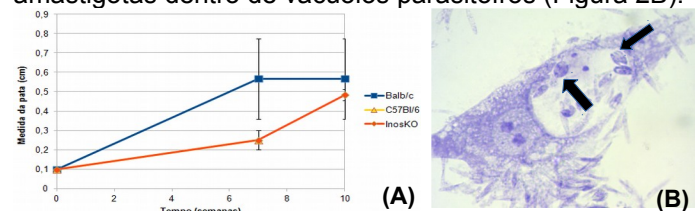
Dos meios de cultivo testados: DMEM, Schneider, Mix 199 + LIT e RPMI 1640, o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino à 26°C apresentou melhores resultados em relação à proliferação de promastigotas de *L. braziliensis*: após 5 dias os parasitas ainda estavam em fase exponencial de proliferação (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  $2 \times 10^5$  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  $2 \times 10^5$  promastigotas/mL iniciais foram cultivadas e contadas diariamente em câmara de Neubauer.

Foram realizadas infecções *in vivo* com  $2 \times 10^7$  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.

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

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

