

Avaliação da virulência de cepas de *Leishmania* spp. em hamster, *Mesocricetus auratus* (Rodentia: Cricetidae)

Ana Cláudia de Souza GAMA¹, Maricleide de Faria NAIFF², Liliane Coelho da Rocha NERY³, Flavia Regina Almeida Campos Naief MOREIRA³, Sônia Rolim REIS³, Antonia Maria Ramos FRANCO³

¹Bolsista PIBIC INPA/CNPq; ² Orientador INPA/CPCS ; ³ Colaborador INPA/CPCS;

Protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes causadores de um amplo espectro de doenças, abrangendo desde lesões de pele que podem se curar espontaneamente até infecções viscerais letais quando não tratadas. Essa doença é endêmica nas regiões tropicais, subtropicais e no sul da Europa. Nos últimos anos, a área endêmica da leishmaniose tem se espalhado e houve um aumento considerável no número de casos da doença, inclusive no Brasil (Basano e Camargo, 2004). Acredita-se que anualmente ocorram dois milhões de novos casos em todo o mundo, com um número estimado de 12 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2004). No ciclo da doença, o parasita é transmitido ao hospedeiro mamífero pelo flebotomíneo, sendo rapidamente interiorizado no macrófago transformando-se em amastigota causando então a doença. Sabe-se que moléculas da superfície das membranas dos parasitas são importantes no estabelecimento e propagação da infecção, bem como em sua virulência (Turco, 1988; Genestra *et al.*, 2004). Promastigotas avirulentas podem se interiorizar no macrófago e se transformar em amastigotas, mas não sobrevivem por longos períodos (Sanyal *et al.*, 1994). A virulência de promastigotas é diminuída quando estes são mantidos em cultivo *in vitro* por longos períodos e pode ser recuperada por sucessivas passagens do parasita pelo hospedeiro vertebrado. O acompanhamento da diferenciação do protozoário em relação a sua virulência auxiliarão na melhor compreensão da biologia deste parasito no que se refere à variação protéica e permitirá que cepas que antes não poderiam ser mantidas *in vivo*, passem a infectar e se manter em animais de laboratório. Assim a proposta do presente trabalho é avaliar a perda de virulência de amostras virulentas de *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* por sucessivas passagens *in vitro*, bem como a recuperação da virulência de amostras avirulentas de *L. (V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* através da inoculação em animais susceptíveis a infecção. Para avaliação da perda de virulência, formas promastigotas de *Leishmania* virulentas, obtidas de hamstes infectados, foram mantidos em meio RPMI 1640 por sucessivas passagens. Parasitas foram coletados em intervalos de tempo regulares e inoculados na concentração de 1×10^6 promastigotas/0,1mL na pata traseira direita de hamster da espécie *Mesocricetus auratus*. Semanalmente os hamsters foram avaliados quanto ao surgimento de lesão. Observou-se variação com relação ao tempo de aparecimento de lesão entre as espécies. No entanto, ainda não foi possível determinar o tempo necessário para a perda da virulência *in vitro*, visto que todos os hamsters inoculados desenvolveram lesões. Para avaliação da recuperação da virulência, promastigotas avirulentas foram amplificadas em meio líquido RPMI 1640 (Gibco), o inóculo foi ajustado em meio de cultivo para a concentração de 1×10^7 promastigotas/0,1mL e aplicado na pata traseira direita e focinho de hamster, depois de três dias foram feitas tentativas de recuperação de promastigotas do local inoculado. Após diversas tentativas para a recuperação da virulência, os parasitas foram recuperados de apenas uma amostra de tecido obtida de focinho de um hamster inoculado com *L. (V.) guyanensis* (R1). Estes foram amplificados em meio RPMI e reinoculados em hamster. Nessa segunda passagem *in vivo* não obtivemos nenhum parasita após o isolamento. Outras tentativas de reisolamentos estão sendo realizadas com a finalidade de recuperar a virulência das amostras. Posteriormente, o padrão de expressão de proteínas dos parasitas durante o processo de recuperação de virulência foi avaliado por SDS-PAGE. Na avaliação do perfil protéico das amostras de parasitas virulentos e avirulentos por SDS-PAGE, foram analisadas as amostras de *L. amazonensis* de 3^a, 9^a, 11^a, 13^a, 14^a, 16^a, 18^a passagens e avirulentos; e de *L. guyanensis* de 3^a, 8^a, 10^a, 12^a, 14^a, 32^a passagens, reisolado (R1) e avirulento. Para isso, 2×10^8 parasitas foram ressuspensos em 100 μ L de PBS contendo 0,4% de CHAPS. As amostras foram incubadas a 0°C por uma hora e em seguida, centrifugadas a 39.500 g por 1h. O sobrenadante obtido foi ressuspensão em tampão da amostra contendo 5% de β -mercaptoetanol, fervido por cinco minutos e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Observou-se que os perfis protéicos de promastigotas virulentas e avirulentas são diferentes, com aumento e diminuição na expressão de várias proteínas, conforme observado na figura 1. Com relação à perda da virulência, Silva e Sarks (1987), estudando a virulência em *L. major* com base na aglutinação de promastigotas pela ação da "lectin peanut agglutinin" (PNA), verificaram que só após 94 passagens *in vitro* foi possível diminuir de 90% PNA – (promastigotas não aglutinados) em cepas virulentas para 10% PNA- em cepas atenuadas. Em vista disto, concluímos que há necessidade de continuidade das passagens *in vitro* até obtenção de parasitas não virulentos. Soares *et al.* (2003), estudaram a expressão diferencial de proteinases e polipeptídios em promastigotas virulentos e não virulentos de *L. amazonensis*. Dentre as observações, verificaram a expressão de dois maiores

polipeptídeos de 65-60 e 50-47 kDa em ambas as formas promastigotas. Contudo, polipeptídeos de 115, 52, 45, 32 e 25 kDa foram preferencialmente expressos em formas virulentas. Dentre estes, alguns demonstraram afinidade com anticorpos de proteínas relacionados à infectividade do parasita, sugerindo um papel importante na virulência do protozoário. É possível que as proteínas encontradas em nosso estudo estejam relacionadas com a infectividade e virulência dos parasitas, porém, esse é um parâmetro que ainda precisa ser investigado.

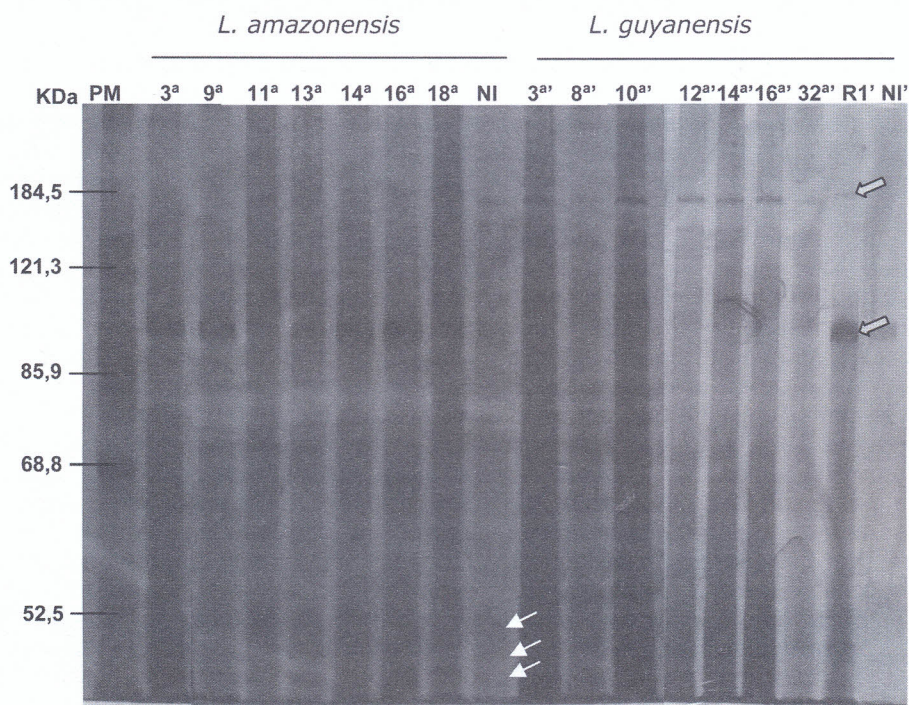


Figura 1- Perfil eletroforético de extratos de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* virulentas (números) e avirulentas (R1 e NI). \blacktriangleright proteínas expressas em amostras avirulentas de *L. amazonensis*, \blacktriangleright proteínas expressas em amostras avirulentas de *L. guyanensis*. KDa= padrão de peso molecular.

Palavras-chaves: Cepas – Virulência - Leishmania – Hamster

Bibliografias citadas

- Basano, S.A.; Camargo, L.M.A. 2004. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3):328-337.
- Genestra, M.; Cysne-Finkelstein, L; Leon L. 2004. Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell Biochemistry and Function*, 22: 315-320.
- Sanyal, T.; Gangopadhyay, P.; Ghost, D.; Sarkar D. 1994. Expression of antigens in virulent and avirulent India strains of *Leishmania donovani*. *Journal of Biosciences*, 19(3): 291-299.
- Silva, R.; Sacks, D. L. 1987. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity*. 55 (11): 2802-2806.
- Soares R.M.A.; Santos A.L.S.; Bonaldo M.C.; Andrade A.F.B.; Alviano C.S.; Angluster J.; Goldenberg S. 2003. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Experimental Parasitology*, 104 (3): 104-112.
- Turco, S.J. 1988. The lipophosphoglycan in *Leishmania*. *Parasitology Today* 4: 255-257.
- World Health Organization (WHO), (<http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/em/>). Acesso: 10/03/07.