



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
Coordenadoria Geral de Pesquisa – CGP
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga
Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 215-5564 – Fone/Fax (86) 215-5560
E-mail: pesquisa@ufpi.br; pesquisa@ufpi.edu.br

IMUNOPATOGENICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE CEPAS DE *Leishmania chagasi*

José Wilson Costa Azevedo Júnior (bolsista do PIBIQ/UFPI), Gabriela Santos-Gomes (IHMT / UNL), Kellen Matuzzy Silva (colaborador, UFPI), Maria do Socorro Pires e Cruz (Orientador, DMV/ CCA/ UFPI).

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma zoonose difundida mundialmente, primariamente de canídeos silvestres e domésticos, causada por um protozoário do gênero *Leishmania* (REY, 2001). Os vetores da doença são insetos denominados flebotomíneos, onde no Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (BRASIL, 2006).

As principais síndromes clínicas encontradas em seres humanos são a leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, mas estas podem apresentar uma grande variedade de formas (BATES E ROGERS, 2004).

Várias técnicas moleculares tem sido desenvolvidas para detectar e identificar parasitas do gênero *Leishmania*. A reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido amplamente empregado no diagnostico de parasitas, pesquisas sobre tratamentos e inquérito epidemiológico destes. (DUJARDIN, 2002). Os avanços na Biologia Molecular estão fornecendo informações importantes sobre as populações genéticas e epidemiologia molecular de *Leishmania* a partir de diferentes hospedeiros e regiões geográficas (CUPOLILLO, 2003).

Diante do exposto este projeto tem como objetivo geral estudar as características de crescimento e patogenicidade de diferentes cepas de *L. infantum chagasi*, que induzem distintos padrões de doença clínica.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sanidade Animal-LASAN e Laboratório de Patologia Animal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em parceria com o Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP – PI).

Utilizando vinte e quatro camundongos (*Mus domesticus domesticus*) isogênicos, machos,

com 8 semanas de idade, da linhagem BALB/c que foram divididos em 4 grupos sendo G-1 controle, composto por 3 animais; G2 – calazar cura espontânea, G-3 – calazar normal e G-4 – Calazar Grave, sendo cada grupo composto por 6 animais. Aos animais pertencentes a cada grupo infectado, procedeu-se a inoculação com 5×10^6 promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, por via intraperitoneal (IP), diluídos em 0,1mL de meio Schneider's®, sendo que o grupo controle recebeu somente 0,1mL do meio, pela mesma via. As cepas foram diferenciadas em perfis grave, perfil normal e perfil de cura espontânea, além do grupo controle. Aos animais pertencentes a cada grupo infectado, procedeu-se a inoculação com 5×10^6 promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, por via intraperitoneal (IP), diluídos em 0,1mL de meio Schneider's®, sendo que o grupo controle recebeu somente 0,1mL do meio. Os grupos foram avaliados diariamente para anotação das possíveis manifestações clínicas dos animais e após 45 dias da infecção ocorreu a eutanásia dos animais, sendo coletado o baço de forma asséptica para posteriormente se realizar de extração de DNA. Para a extração do DNA utilizou-se o kit Comercial QUIAGEN®, seguindo as recomendações do fabricante. Para a determinação da quantidade e pureza do DNA utilizou-se espectrofotômetro Nanodrop® e os DNAs analisados nos comprimentos de onda 260 e 280. As amostras cujos DNAs não apresentaram um grau de pureza adequado foram submetidas a nova extração.

Os DNAs das amostras foram submetidos à técnica de PCR convencional, com a utilização dos iniciadores Lin R-4 e Lin 19, para pesquisa do gênero *Leishmania*, que apresenta tamanho aproximado de 720pb. Para tanto foi utilizado reagentes PCR Master Mix (Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram levadas ao termociclador para que ocorra a amplificação do DNA. Os produtos amplificados foram submetidos a corrida eletroforética e visualizados e registrados por sistema de fotodocumentação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise clínica mostrou que apenas 3 animais mostraram sintomatologia, características de leishmaniose. Estes foram os animais inoculados com cepas de perfil grave da doença, apresentando sinais como alopecia na cabeça e parte do dorso. O polimorfismo clínico pode refletir a variabilidade da virulência do parasita ou do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo o desenvolvimento de diferentes padrões de doença (BAPTISTA-FERNANDES, 2007).

Quanto ao resultado da PCR os animais infectados com as cepas de perfil Cura-Espontânea não apresentaram resultados positivos, o que sugere que pode ter havido uma cura espontânea também neste modelo experimental, provavelmente devido a baixa virulência da cepa. Já nos casos dos animais infectados com cepas de perfil Calazar Grave e Calazar Normal, a PCR detectou amostras positivas. Entretanto, em algumas amostras não foi possível a amplificação. Com estes resultados inesperados, submeteu-se todas as amostras a análise do DNA extraído por espectrofotometria e pudemos perceber que nestas amostras não havia DNA de boa qualidade por as mesmas estarem contendo contaminantes, tais como proteínas ou etanol, o que prejudica a amplificação do produto.

O ensaio demonstra confiabilidade tendo em vista que o PCR é um método diagnóstico que analisa as informações genéticas desejadas com eficiência e rapidez a partir de fragmentos do DNA

do parasita (DISCH ., 2006). Os métodos de PCR utilizados para Leishmania são confiáveis para determinar a presença de identificar o parasita, não somente em casos ativos da doença, mas também para monitorar ao pacientes após a infecção (MAIA E CAMPINO,2008). Além da possibilidade de utilizar várias amostras biológicas apresenta dentre outras vantagens a habilidade de se trabalhar com pequenas quantidades de material a ser analisado e ser capaz de detectar baixos níveis de parasitas nas amostras(TAVARES,2003)

CONCLUSÃO

Animais infectados com cepas de perfil grave foram capazes de induzir sintomatologia clínica nos animais, enquanto os demais animais infectados com as outras cepas com perfil clínico de cura espontânea e calazar normal não induziram o aparecimento de sintomatologia clínica nos animais estudados, permanecendo assintomáticos.

A PCR demonstrou ser capaz de detectar a presença de DNA do parasita em amostras de baço dos animais infectados, especialmente nos que foram infectados com cepas do perfil grave.

Os animais infectados com cepas com perfil de cura espontânea não tinham a presença de parasitas no seu organismo, sendo negativos para a doença.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BATES P.A. and ROGERS M.E., New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*, **Current Molecular Medicina**. v.4 , pp. 601–609. 2004.

BAPTISTA-FERNANDES T., MARQUES C., ROOS-RODRIGUES O., SANTOS-GOMES G. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. **Comparative Immunology Microbiology e Infectious Diseases**., v. 30, p. 41–53, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Epidemiologia. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, p.14 .2006.

CUPOLILLO E. *et al.*, Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil, **Journal of Clinical Microbiology**!. v. 41, p. 3126–3132. 2003

DISCH, J *et al.* **Diaginostic Microbiology and Infectious Diseases**. v.56, p.395-400, 2006.

DUJARDIN J.C. *et al.*, Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.96 , p. 81–86. 2002

MAIA ,C E CAMPINO ,L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**.v.158: p.274-287.2008.

REY L. **Bases da Parasitologia Médica**, 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, P.349. 2001.

TAVARES ,C A. Molecular diagnosis of leishmania. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. v.3 : p.657-667.2003.