

# CARACTERIZAÇÃO IMUNOBIOLOGICA DE ISOLADOS DE LEISHMANIAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA<sup>1</sup>

*Carina Scolari Gosch*

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Na região Centro-Oeste a doença apresenta elevada incidência, sendo prevalente a espécie *L. (V.) braziliensis*. O amplo espectro clínico da LTA é definido pela relação parasito-hospedeiro, por isso é fundamental o estudo dessa relação para a compreensão da doença. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a imunobiologia de isolados de leishmanias de pacientes com LTA, procedentes dos estados de Goiás (GO) e Mato Grosso (MT). Macerados de biópsias de sete pacientes com LTA foram inoculados nas patas de camundongos C57Bl/6 IFN- $\gamma$  KO para isolamento dos parasitos. As espécies foram caracterizadas através de PCR-RFLP e PCR-G6PD. O comportamento biológico foi avaliado *in vitro*, através de culturas axênicas em meio Grace ou RPMI 1640, quanto à morfologia, ao curso temporal do crescimento, à suscetibilidade à temperatura (crescimento e atividade mitocondrial, por meio de contagem diária dos parasitos e do ensaio do MTT, respectivamente) e à interação com macrófagos humanos; tendo sido avaliadas a capacidade de infecção e a suscetibilidade dos parasitos aos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos tratados com IFN- $\gamma$  e LPS. O perfil da infecção foi avaliado *in vivo* pela mensuração das patas de camundongos C57Bl/6 (inóculo de  $1 \times 10^7$  parasitos em fase estacionária do crescimento). Em seis pacientes foi identificada a forma cutânea localizada (LCL); em um, a forma cutânea disseminada (LCD). As espécies de Leishmanias isoladas eram *L. (L.) amazonensis* (2-GO, LCL; 1-MT, LCL) e *L. (V.) braziliensis* (3-GO, LCL; 1-MT, LCD). A morfologia dos isolados de *L. (V.) braziliensis* foi compatível com a que já havia sido descrita por outros autores. O perfil de crescimento *in vitro* (26°C) mostrou-se similar em todos os isolados avaliados. À exceção do isolado M2903 (OMS), os parasitos não mostraram alterações significativas no crescimento *in vitro* com o aumento da temperatura para 35°C. Somente o isolado JM3 (MT, LCD) não mostrou diminuição no crescimento a 37°C, temperatura na qual o metabolismo energético mitocondrial foi elevado nos isolados M2903 e NAP3 (GO, LCL) e reduzido nos isolados JM3 e IMG3 (GO, LCL). O isolado IMG3 foi o único que

1 Resumo de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás, sob a orientação da Profa. Fátima Ribeiro-Dias, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical. Área de concentração: Imunologia. Goiânia, GO, Brasil, 2005.

Endereço para correspondência: Carina Scolari Gosch, Rua NE01, Lt 18, Ed. Palmas I, ap. 203, Quadra 104N. Plano Diretor Norte, CEP: 77.000-000, Palmas-TO. E-mail: goschcarina@yahoo.com.br ou carinagosch@ig.com.br

apresentou diminuição no metabolismo a 35°C. Todos os isolados infectaram macrófagos humanos com elevada variabilidade. A frequência de macrófagos infectados e o número de parasitos por macrófagos revelaram-se dependentes tanto dos isolados quanto das culturas de macrófagos. Foram observadas diferenças na suscetibilidade de diferentes culturas de macrófagos à infecção por um único isolado, assim como na capacidade de infecção de diferentes isolados para uma mesma cultura de macrófagos. Todos os isolados apresentaram variados graus de suscetibilidade aos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  e LPS. A infecção de camundongos isogênicos C57B/6 evidenciou polimorfismo clínico. Após a infecção com o isolado IMG3, o desenvolvimento da lesão na pata dos camundongos foi similar àquele obtido com o isolado M2903. O pico da lesão ocorreu na terceira ou quarta semana de infecção (~1mm), com regressão após oito semanas. O isolado JM3 causou a menor lesão (~0,2mm, na terceira semana), também com resolução após oito semanas, enquanto o isolado NAP3 não apresentou resolução até a nona semana de infecção. Estudos futuros sobre as respostas imunes desses hospedeiros isogênicos a estes isolados devem permitir uma melhor compreensão da infecção por *L. (V.) braziliensis*, pouco conhecida atualmente por falta de modelos murinos.

#### IMMUNOBIOLOGIC CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF LEISHMANIA OF PATIENTS WITH AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a zoonosis caused by the protozoa from the genus *Leishmania*. In Brazilian Middle West area there is a high incidence of the disease and the species *L. (V.) braziliensis* is the most prevalent. The clinical spectrum of ATL is dependent on the parasite-host interactions and it is crucial to study this relationship in order to understand the disease outcome. Thus, the objective of this work was to evaluate the immunobiology of leishmania isolates of ATL patients from the states of Goiás (GO) and Mato Grosso (MT). Biopsies of seven ATL patients were macerated and inoculated in C57Bl/6 IFN $\gamma$ KO mice to isolate the parasites; the species were identified through PCR-RFLP and PCR-G6PD. The biological behavior in axenic cultures in Grace's or RPMI 1640 medium was evaluated considering the morphology, course of growth, and susceptibility to temperature (growth and mitochondrial activity, by daily determination of the number of parasites and MTT assay, respectively). Interaction with human macrophages was evaluated by the infection capacity and the susceptibility of the parasites to the killing mechanisms of IFN $\gamma$ - and LPS-treated macrophages; the profile of the infection was evaluated in C57Bl/6 mice (inoculated in the paws with  $1 \times 10^7$  parasites in stationary phase). The localized cutaneous leishmaniasis form (LCL) was identified in six patients and the disseminated cutaneous form (DCL) was detected in only one patient. The species of *Leishmania* isolated were *L. (L.)*

*amazonensis* (2-GO, LCL; 1-MT, LCL) and *L. (V.) braziliensis* (3-GO, LCL; 1-MT, DCL). The morphology of the isolates of *L. (V.) braziliensis* was compatible with previous descriptions. The profile of *in vitro* growth (26°C) was similar among all the isolates. Except the M2903 (OMS) isolate, all parasites did not show significant alterations in *in vitro* growth with increase of temperature to 35°C. The JM3 isolate (MT, DCL) was the unique that did not show decrease in growth at 37°C. At this temperature, the mitochondrial metabolism was elevated in M2903 and NAP3 (GO, LCL), while in JM3 and IMG3 (GO, LCL) isolates the activity was reduced. The IMG3 isolate was the only that presented decrease in the metabolism at 35°C. All the isolates infected human macrophages with high variability. The frequency of infected macrophages and the number of parasites in macrophages were dependent on both isolates as well as macrophage cultures. There were differences in the susceptibility of different macrophage cultures to the infection by each isolate, as well as in the infection capacity of different isolates for the same macrophage culture. All isolates presented different susceptibility degrees to the killing mechanisms of the IFN $\gamma$  and LPS-treated macrophages. The infection of isogenic mice C57B/6 showed clinical polymorphism. After infection with the IMG3 isolate the development of the lesion in the mice paw was similar to that obtained with M2903 isolate, with a peak of the lesion in the 3<sup>rd</sup> or 4<sup>th</sup> week of infection (~1mm) and resolution after eight weeks. The JM3 isolate caused the smallest lesion (~0,2mm, in the 3<sup>rd</sup> week) and also presented resolution after eight weeks. The NAP3 isolate did not show resolution of the lesion even after nine weeks of infection. Future studies concerning immune responses of these isogenic hosts to these isolates should provide a better understanding of the infection caused by *L. (V.) braziliensis*, poorly known due to the lack of murine models.