

Avaliação da infecção de macrófagos caninos DH 82 por promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*

Sophie Ballot¹; Raissa Couto Santana², Natália R. Nadaes³; Lucia Pinto-da-Silva⁴

¹ Bolsista PROIC, discente do curso de Medicina Veterinária, IV/UFRRJ; ² Bolsista FAPERJ, discente do curso de Biologia, IB/UFRRJ; ⁴ Professor do DMIV/IV/UFRRJ

² Departamento de Microbiologia, Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro.

Palavras-chave: *Leishmania*, macrófago canino.

Introdução

A leishmaniose é considerada uma das mais importantes doenças tropicais, que afeta cerca de 1,2 milhões de pessoas no mundo, e por isso constitui um sério problema de saúde pública (<http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-199.pdf>). Esta doença possui quatro formas clínicas em humanos: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral, sendo esta última a pior forma da doença.

Os animais domésticos, como cães, e animais silvestres, como gambás e roedores são susceptíveis a infecção por diversas espécies de *Leishmania*, sendo a espécie *L. chagasi*, causadora da forma visceral da doença a mais estudada (ASHFORD, 1996). Estas espécies de mamíferos são consideradas reservatórios e apresentam um papel central na transmissão da doença para o homem.

A maioria dos dados sobre os mecanismos iniciais da interação de macrófagos com o parasita *Leishmania* e da imunomodulação dessas células durante a infecção tem sido obtidos com o uso de modelos experimentais murinos (Handman & Bullen 2002, Naderer & McConville, 2008). Alguns poucos trabalhos descrevem os mecanismos iniciais da interação da *Leishmania* com macrófagos caninos (Pinelli et al., 1999, Madeira et al., 1999; Bueno et al., 2005; Sampaio et al., 2007), provavelmente pela dificuldade da obtenção de macrófagos desses animais, que são normalmente provenientes da diferenciação de monócitos isolados e purificados de sangue periférico.

Muitos avanços na elucidação de mecanismos patológicos em geral tem sido possíveis pela disponibilidade de linhagens celulares. A linhagem DH82, que é a linhagem de interesse deste projeto, é uma linhagem macrófago-monócito canina, estabelecida a partir de células progenitoras neoplásicas de histiócitos malignos obtidas de um cão da raça "golden retriever" de 10 anos de idade (Wellman et al., 1988). Essas células crescem aderidas em monocamadas, variando de 35 a 55µm de diâmetro. Possuem citoplasma basofílico, vacúolos e emitem pseudópodes. Além disso, possuem receptor Fc (RFc), peroxidase, fosfatase ácida e metaloproteinases. Aproximadamente 75% das células expressam CD14 e 50% expressam CD5 e CD45. Estudo do perfil inflamatório mostra que quando estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), estas células sintetizam IL-6 e TNF-alfa (Barnes et al., 2000).

Objetivo

O objetivo principal foi caracterizar a infecção da linhagem de macrófagos caninos DH82 por duas espécies de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* e *Leishmania braziliensis*).

Material e Métodos:

Parasitas: Promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* foram mantidas em Schneider's Insect Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion) a 26°C. Após 5 dias de cultivo, os parasitas foram lavados em PBS a 4000 RPM/ 10 min a 18°C. As células foram ressuspensas em PBS e contadas em câmara de Neubauer.

Macrófagos: Macrófagos caninos DH82 foram cultivados em meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% de SFB (Cripion) a 37°C /CO₂.

Ensaio de interação e infecção *Leishmania* x Macrófagos: Macrófagos foram plaqueados em lamínulas de vidro em placas de 24 poços, e incubadas por 30 min a 37°C/5% CO₂. Após esse período, as células foram infectadas com promastigotas de *Leishmania* na proporção de 5 p: 1 m. Após 2, 24 e 48 horas de interação, as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas em

metanol e coradas com Giemsa. A determinação do índice fagocítico (% de macrófagos infectados x número de parasitas/macrófago) foi feita após contagem de no mínimo 200 células em microscópio óptico.

Resultados

Primeiramente avaliamos a capacidade fagocítica da linhagem de macrófagos caninos DH82 com as três espécies distintas de *Leishmania*. Macrófagos caninos foram incubados com as formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* por 2 horas. Nossos resultados mostraram que as espécies são capazes de interagir com o macrófago, no entanto, a espécie *L. amazonensis* apresentou um índice de associação 2,49 vezes maior comparado a *L. chagasi* e 4,11 vezes menor em relação a *L. braziliensis*. A espécie *L. braziliensis* mostrou uma interação 10,27 vezes maior em relação a *L. chagasi* em 2 horas.

Visto que as espécies conseguem interagir com a linhagem de macrófagos caninos DH82, nós avaliamos a infectividade de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* em 24 e 48 horas pós-infecção. Nossos resultados mostraram que as espécies de *Leishmania* foram capazes de infectar a linhagem de macrófagos caninos DH82, entretanto em 24 horas a espécie *L. amazonensis* apresentou uma sobrevivência 4 vezes e 2,5 vezes maior comparado a *L. chagasi* e *L. braziliensis*, respectivamente. A infecção da espécie de *L. braziliensis* se mostrou 1,779 vezes maior comparado a *L. chagasi* em 24 horas. Em 48 horas, foi observado uma redução na sobrevivência dos parasitas nos macrófagos DH82 comparada a 24 horas de 1,4, 2,2 e 1,42 vezes em relação a *L. amazonensis*, *L. chagasi*, e *L. braziliensis* respectivamente. Entretanto, em 48 horas foi observado que *L. amazonensis* apresentou um índice de infecção 9 vezes maior que *L. chagasi* e 2,28 vezes maior que a *L. braziliensis*.

Conclusão:

Nossos resultados preliminares mostraram que as espécies de *Leishmania* interagem como a linhagem de macrófago canino DH82. Sendo a *Leishmania amazonensis* mais resistente aos mecanismos de defesa do macrófago canino da linhagem DH82.

Bibliografia

- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol.** 1996 Sep-Oct; 14 (5):523-32.
- BUENO, R.; MELLO, M.N.; MENEZES, C.A.; DUTRA, W.O.; SANTOS, R.L. Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2005. 100(5):521-4.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D.V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.** 2002 18(8):332-4.
- MADEIRA, M.; BARBOSA-SANTOS, E.; MARZOCHI, M. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermatopic *Leishmania* strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1999. 94(5):645-8.
- PINELLI, E.; RUTEN V.P.; BRUYSTERS, M.; et al.. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect Immun.** 1999. 67(1):237-43.
- SAMPAIO, W. M.; MOURA, E.P.; ARRUDA, F.C.; et al. In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **BMC Vet Res.** 2007. 3:11.
- WELLMAN, M. L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R. M.; et al. . A macrophage-monocyte cell line from dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cell Dev Biol.** 1988 ;24(3):223-9.