

## INVESTIGAÇÃO E ISOLAMENTO DE *Leishmania*: CRIOPRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE BIÓPSIAS DE LESÕES CUTÂNEAS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR EXPERIMENTAL

Maria de Fátima Leren de ARAUJO\*  
Rosângela Borges REINA\*  
Maria Cecília Outeiro GORLA\*  
Almir Venilton MONTEIRO\*  
José Eduardo TOLEZANO\*

RIALA6/752

ARAUJO, M.F.L.; REINA, R.B.; GORLA, M.C.O.; MONTEIRO, A.V. & TOLEZANO, J.E. – Investigação e isolamento de *Leishmania*: criopreservação de amostras de biópsias de lesões cutâneas na Leishmaniose Tegumentar Experimental. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):81-84, 1993.

**RESUMO:** Foi investigada a viabilidade do isolamento de *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* a partir da criopreservação, a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ , de amostras de biópsias de lesões cutâneas de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados. Biópsias de 2mm de diâmetro foram obtidas de lesões de patas de hamsters. Metade das biópsias foi acondicionada em tubos de poliestireno para congelamento, contendo 1,0ml de solução salina estéril e 0,1ml de glicerol. As amostras restantes foram, individualmente, maceradas em solução salina estéril e acondicionadas em alquotas de 1,0ml em tubos de poliestireno para congelamento, com 0,1ml de glicerol. Foram constituídos três grupos de tubos, que foram mantidos, inicialmente, por uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo transferidos sucessivamente para  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ , que foram as temperaturas de manutenção, respectivamente, para os grupos 1, 2 e 3, que assim permaneceram por um período de 60 dias. Após este período as amostras foram descongeladas e examinadas em esfregaços, culturas e inoculações desses materiais. Ambas as espécies de *Leishmania* sobreviveram na condição de manutenção estabelecida para o grupo 1, ou seja  $-20^{\circ}\text{C}$ , tanto em biópsia como em homogenizado de macerado de biópsia. *L. (L.) amazonensis* sobreviveu, também, na condição de manutenção do grupo 3, a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

**DESCRITORES:** *Leishmania*, isolamento; *L. (V.) braziliensis*; *L. (L.) amazonensis*, Leishmaniose Tegumentar experimental; criopreservação, biópsias.

### INTRODUÇÃO

Estudos recentes apontam, em todo o mundo, um total de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de aquisição de Leishmaniose, sendo estimado que 12 milhões estariam infectados por flagelados do gênero *Leishmania*<sup>12</sup>.

No Brasil, são registrados anualmente cerca de 26.000 novos casos de Leishmaniose, consideradas todas as formas clínicas<sup>10</sup>.

No estado de São Paulo, são notificados, a cada ano, cerca de 400 novos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A grande maioria

destes casos é autócone do próprio estado, porém, de diferentes regiões geográficas<sup>11</sup>.

No estudo das leishmanioses grande destaque é dado à padronização dos procedimentos relacionados ao isolamento, à proliferação e à preservação de *Leishmania*.

O isolamento de *Leishmania*, de humanos, de reservatórios naturais ou fontes de infecção e de vetores, com a finalidade de identificação e classificação é sempre uma etapa importante para esclarecimento de aspectos relativos à epidemiologia da parasitose ou, mesmo, para a avaliação e prognós-

\* Do Instituto Adolfo Lutz

tico clínico ou, ainda, para a definição de medidas de controle.

Ainda que vários pesquisadores tenham investigado e relatado diferentes metodologias para o isolamento e proliferação de *Leishmania*<sup>1, 2, 3, 4, 7, 8</sup>, algumas etapas relacionadas a estas atividades permanecem a demandar definição de conduta.

Assim sendo, para a obtenção de crescimento primário de *Leishmania* fazem-se necessários a coleta, o acondicionamento, o transporte e o processamento do material biológico obtido de indivíduo suspeito de estar infectado pelo protozoário.

No estado de São Paulo, a busca pelo conhecimento dos flagelados do gênero *Leishmania* exige superação de um primeiro e grande obstáculo para isolamento desses agentes causais, obstáculo esse relativo às condições de acondicionamento para transporte de material biológico proveniente de pacientes das mais diferentes e distantes regiões, podendo decorrer, algumas vezes, vários dias desde a coleta da biópsia, na região endêmica, até o processamento laboratorial.

No presente trabalho procurou-se investigar, de maneira simples, uma solução para essa questão, estudando as condições mais propícias para o acondicionamento e a temperatura de manutenção, por longos períodos de tempo, de biópsias de lesões de patas de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados por *Leishmania*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação da condição mais adequada para o acondicionamento e a manutenção, por longo período de tempo, de material biológico destinado ao processamento visando o isolamento de *Leishmania*, foi definido um protocolo de pesquisa em que

biópsias, colhidas de lesões cutâneas de hamsters experimentalmente infectados com diferentes espécies do parasita ficaram mantidas em distintas temperaturas.

Biópsias de 2mm foram colhidas de lesões cutâneas de patas de hamsters (*M. auratus*), experimentalmente infectados com flagelados do gênero *Leishmania*, sendo *L. amazonensis* representante do subgênero *Leishmania*, e *L. braziliensis* pertencente ao subgênero *Viannia*.

Metade das biópsias colhidas foi acondicionada, separadamente, em flaconetes de poliestireno contendo 1,0ml de solução 0,85% NaCl estéril e 0,1ml de glicerol. O restante das biópsias foi macerado, individualmente, em solução 0,85% NaCl estéril e o homogeneizado foi acondicionado em alíquotas de 1,0ml em flaconetes contendo 0,1ml de glicerol.

Foram constituídos, então, três grupos com quatro flaconetes cada um, de forma que cada grupo conteve uma amostra de biópsia e uma amostra do homogeneizado de macerado de lesão cutânea para cada uma das espécies de *Leishmania* utilizadas no estudo.

Todos os grupos de flaconetes foram resfriados a 4°C por uma noite, sendo após transferidos para -20°C. O grupo 1 permaneceu por 60 dias nesta temperatura, enquanto que os grupos 2 e 3, após 24 horas, foram transferidos para -70°C.

O grupo 2 permaneceu por 60 dias nesta temperatura e o grupo 3, após 24 horas foi transferido para -196°C onde, também, permaneceu por 60 dias.

Após esse período, todas as amostras foram degeladas em banho-maria a 37°C e examinadas pela confecção de esfregaços, por semeadura em meio de NNN e por inoculações de parte destas amostras em hamsters.

TABELA 1

Viabilidade, cultivabilidade e infectividade de amostras de *leishmania* mantidas, por 60 dias, em diferentes temperaturas de congelamento, em biópsias ou em homogeneizados de macerado de lesões cutâneas de hamsters experimentalmente infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*.

Grupo experimental	<i>Leishmania</i> : L. (L.)	<i>amazonensis</i>	L. (V.)	<i>braziliensis</i>
	Biópsia	Homogeneizado de macerado	Biópsia	Homogeneizado de macerado
1 (-20° C)	E/C	E/C	C/I	C
2 (-70° C)	E	E	-	-
3 (-196° C)	E/C/I	E/C	-	-

E – Presença de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços realizados de amostras descongeladas.

C – Desenvolvimento e proliferação de formas promastigota de *Leishmania* em cultivos realizados a partir da semeadura de amostras descongeladas.

I – Inoculação positiva para *Leishmania* em hamsters, a partir de amostras descongeladas.

-- Ausência de *Leishmania* para qualquer um dos critérios utilizados.

## RESULTADOS E COMENTÁRIOS

O crescimento primário de *Leishmania*, "in vivo" ou "in vitro", a partir de material biológico colhido de pacientes com LTA, se constitui em importante etapa para o conhecimento de aspectos relacionados à epidemiologia da parasitose ou mesmo à avaliação clínica, entre outros<sup>2,3</sup>.

No estado de São Paulo, onde anualmente são notificados cerca de 400 casos de LTA, o perfil epidemiológico é representado por focos restritos e casos esporádicos, porém, espalhados por todas as regiões geográficas<sup>6</sup>.

A tentativa de isolamento de *Leishmania* dos casos autóctones pelo Laboratório de Saúde Pública, situado na capital do Estado, esbarra em dificuldades relacionadas às distâncias e à pulverização das áreas endêmicas.

A execução de procedimentos para o isolamento de *Leishmania* em condições de campo, em áreas endêmicas, sofre limitações decisivas que determinam muitas vezes seu insucesso. No caso de culturas de material de biópsia de lesão cutânea esta limitação é devida a altas taxas de contaminação bacteriana e/ou fúngica; no que se refere às inoculações em animais de laboratório, o custo e à necessidade de uma estrutura mínima impossibilitam a descentralização deste procedimento<sup>7</sup>.

De outra parte, a criopreservação é, hoje, uma metodologia indispensável no estudo de protozoários parasitas. No presente estudo procurou-se aproveitar as vantagens da criopreservação na tentativa de otimizar recuperação, o isolamento e a proliferação de *Leishmania* de materiais biológicos colhidos de animais infectados com o flagelado.

Os resultados obtidos indicaram a viabilidade de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, em biópsias ou homogeneizados de macerado de lesão cutânea de hamsters experimentalmente infectados, mesmo após um período de 60 dias, mantidos em condições de congelamento. (tabela).

No estado de São Paulo, assim como no restante da região sudeste do Brasil, acredita-se que a grande maioria dos casos de LTA é devida a *L. (V.) braziliensis*.

Neste trabalho, verificou-se, claramente, a possibilidade de isolamento deste parasita a partir do congelamento de biópsias de lesões cutâneas, ao menos à temperatura de -20°C; o que significa dizer, a utilização de um freezer doméstico para a manutenção de amostras de material biológico para posterior encaminhamento ao laboratório que procederá o isolamento de *Leishmania*.

Esses resultados remetem, também, à necessidade de novos estudos, para outras avaliações sobre condições de acondicionamento prolongado e transporte de material biológico destinado ao isolamento de *Leishmania*. Sobre as condições de coleta e transporte, Marzochi *et alii*<sup>2</sup>, desenvolveram um sistema por punção aspirativa a vácuo para isolamento e cultivo *Leishmania*, que parece ser uma outra alternativa adequada para condições de trabalho de campo em áreas endêmicas.

Os autores acreditam, finalmente, ser importante a avaliação dos procedimentos aqui descritos em situações de manutenção e transporte de material biológico colhido de pacientes com LTA, em áreas endêmicas, para o isolamento de *Leishmania*.

RIALA6/752

ARAUJO, M.F.L.; REINA, R.B.; GORLA, M.C.O.; MONTEIRO, A.V. & TOLEZANO, J.E. – Investigation and isolation of *Leishmania*: cryopreservation of samples of biopsies from skin lesions in experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 53(1/2):81-84, 1993.

**ABSTRACT:** We investigated the viability of isolation of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* from cryopreserved, at -20°C, -70°C and -196°C, samples of biopsies of hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected. Biopsies with 2mm of diameter were obtained from feet lesions of hamsters. Half of the biopsies was conditioned in plastic freezing tubes containing 1.0ml of sterile salt solution and 0.1ml of glycerol. The rest was macerated in sterile salt solution and conditioned in aliquot of 1.0ml into plastic freezing tubes containing 0.1ml of glycerol. It was constituted, then, 3 groups, so that each group contained a biopsy or macerated sample belonging to the different *Leishmania* at the temperatures above mentioned. Every group were cooled at 4°C for overnight, then placed at -20°C for 24 hours, where stayed the group 1 for 60 days. The other plastic freezing groups were placed at -70°C for 24 hours where stayed the group 2 for 60 days, being the group 3 placed at -196°C where continued for 60 days too. After this period, the samples were thawed and examined from the smears, cultures and inoculation of these materials. The results obtained up to the present indicated the surviving and the cultivability of *L. (L.) amazonensis* at -20°C and -196°C and *L. (V.) braziliensis* at -20°C, both strains in macerated and fragment.

**DESCRIPTORS:** *Leishmania*, isolation, *L. (V.) braziliensis*; *L. (L.) amazonensis*; Experimental Cutaneous leishmaniasis; Cryopreservation, biopsies.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGR FICAS

1. ALVES, C.R. & MARZOCHI, M.C. de A. – Axenic culture's comparative study of six subspecies of *Leishmania* from the New and Old World in coconut water. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:81, 1987.
2. BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; JESUS, A.R.; MEDEIROS NETO, E.; SANTOS, J.A. & JOHNSON Jr., W. – The relevance of characterizing *Leishmania* from cutaneous lesions. A simple approach for isolation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:579, 1987.
3. CUBA-CUBA, C.A.; NETTO, E.M.; COSTA, E.M.; COSTA, J.L.M.; BARRETO, A.C. & MARSDEN, P.D. – El cultivo "in vitro" como instrumento práctico para el diagnóstico y aislamiento primario de *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2. Estudios en pacientes de áreas endêmicas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 28:317-324, 1986.
4. CUBA-CUBA, C.A.; NETTO, E.M.; MARSDEN, P.D.; ROSA, A.C.; CUENTAS, E.A.L. & COSTA, J.L.M. – Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80:456-457, 1986.
5. EVANS, D., ed. – *Handbook on isolation characterization and cryopreservation of Leishmania*.
6. GOMES, A.C. – Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. *An. bras. dermatol.*, 67:55-60, 1992.
7. HENDRICKS, L.D. & WRIGHT, N. – Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by "in vitro" cultivation of saline aspirate in Schneider's *Drosophila* medium. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 28:962-964, 1979.
8. JAFFE, C.L.; GRIMALDI, G. & McMAHON – PRATT, D. – The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: MOREL, C.M., (ed.) *Genes and Antigens of Parasites: A Laboratory Manual*. UNDP/WORD BANK WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Funda o Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Brasil. p. 47-91, 1984.
9. JAMES, E.R. – Maintenance of Parasitic Protozoa by cryopreservation. In KIRSOP, B.E. & SNELL, J.J.S., (ed.) – *Maintenance of microorganisms*. A Manual of Laboratory Methods. Academic Press, London, 1984. p. 161-177.
10. MARZOCHI, M.C. de A.; TELXEIRA, P.C.; MARZOCHI, K.B.F.; CONCEI O, N.F.; COUTINHO, W. & BRITO, D.B. – Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 35:301-303, 1993.
11. WANDERLEY, D.M.V.; GONZAGA, E.Z.S.; GALIMBERTI, M.Z.; TOLEZANO, J.E. & CORRÊA, F.M.A. – Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana. *Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Natal-RN, 1990.
12. WHO. Technical Report Series Control of leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee. *Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.* 793:1-158.

Recebido para publica o em 10 de outubro de 1993.