

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANA ELIZA REIS DE OLIVEIRA

**Crescimento e infectividade de *Leishmania infantum chagasi* em diferentes meios
de cultivo**

SÃO LUÍS – MA

2019

ANA ELIZA REIS DE OLIVEIRA

Crescimento e infectividade de *Leishmania infantum chagasi* em diferentes meios de cultivo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dr^a Ana Lucia Abreu Silva

Coorientador: Dr. Fernando Almeida de Souza

SÃO LUÍS - MA

2019

Ana Eliza Reis de Oliveira

Crescimento e infectividade de *Leishmania infantum chagasi* em diferentes meios de cultivo

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a Ana Lucia Abreu Silva
Orientadora

Profa. Dr^a Joicy Cortez de Sá Sousa
1º Membro

Profa. Dr^a Alcina Viera de Carvalho Neta
2º Membro

Profa. Dr^a Tatiane Aranha da Penha Silva
Suplente

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo sopro da vida, por todas as promessas em minha vida e por ter me dado forças para chegar até aqui.

Aos meus pais, José Nunes e Terezinha, por acreditarem em mim e me incentivarem em todas as decisões da minha vida. Por não medirem esforços para me educar e me criar.

Aos meus irmãos, José Nunes Neto e João Gabriel, pelo companheirismo e incentivo.

A minha orientadora, professora Dra. Ana Lucia Abreu Silva, por aceitar a orientação, por confiar em mim para execução do projeto e pela amizade. Por ser um exemplo para todos os seus alunos.

Ao meu coorientador Dr. Fernando Almeida de Souza, por me ajudar, por me ensinar, pela amizade e por não deixar eu me desmotivar mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao grupo os Patológicos, ao Laboratório de Anatomopatologia, por toda a amizade e parceria, em especial a Tatiane.

Ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia (FIOCRUZ – RJ) e a Dra. Kátia Calabrese, pela parceria para o desenvolvimento do trabalho e por todo o suporte e estrutura física.

A todos os amigos do LIMP, que foram pessoas que muito me ajudaram e que sou eternamente grata. Flávia Oliveira, Celeste, Tânia, Sandy, Yasmin, Luzilene, João Victor, Mariana, Juan, meu muito obrigada.

Agradeço especialmente a Renata, Taynan e Lucélia. Por dividirem a casa no Rio de Janeiro, a rotina, as alegrias, por me apoiarem e pela maravilhosa amizade que construímos. Vocês foram pessoas importantes demais para execução do trabalho.

Aos meus amigos de turma do mestrado em Ciência Animal, pela parceria e ajuda.

A Fran, por ser uma pessoa sempre disposta a ajudar e a resolver todos os problemas.

Aos amigos e incentivadores: Amanda, Aleska, Thalyta, Ana Clara, Luciana, Lucélia, Ana Beatriz, Elen, Renata, Sany, Milena, Kássia, vocês são especiais.

A Fapema, CAPES e Universidade Estadual do Maranhão, pelo apoio financeiro para execução do projeto.

Sou muito grata.

Não há dor que dure para sempre.

Tudo é vário. Temporário. Efêmero. Nunca somos, sempre estamos.

(Chico Buarque)

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença de grande importância para a Saúde Pública por ser uma zoonose e pela sua ampla distribuição mundial. O cultivo em laboratório de *Leishmania infantum chagasi* é necessário para que se possa entender sua complexidade, levando assim a estudos com a finalidade de desenvolver vacinas e drogas que tenham ação contra o protozoário. O presente estudo tem como objetivo padronizar o cultivo de *L. infantum chagasi* e analisar os parâmetros de infectividade após sucessivas passagens. Formas promastigotas de *L. infantum chagasi* isoladas de um cão foram cultivadas em diferentes meios comerciais e em um deles foi adicionado 2% de urina humana. Durante sete dias foi feita a contagem por hematocitometro resultando assim em uma curva de crescimento. Para análise de infectividade, macrófagos peritoneais de BALB/c foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum chagasi* cultivadas com os meios que tiveram maior crescimento. Os resultados demonstraram que o meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril induziu um maior crescimento das formas promastigotas de *L. infantum chagasi* quando comparada a outros meios comerciais e ao Schneider sem suplementação com urina. Além disso, observou-se que o meio Schneider suplementado com 2% urina apresentou parâmetros de infectividade superior ao meio Schneider sem suplementação. Após a escolha do meio Schneider suplementado com urina, observou-se que a partir da terceira passagem houve uma diminuição dos parâmetros de infectividade em macrófagos peritoneais de BALB/c. O meio adicionado de urina humana foi o único em que foi possível definir as fases logarítmica e estacionária tendo um pico de crescimento no dia 5. As diminuições dos parâmetros de infectividade podem estar relacionadas à necessidade da realização do ciclo completo de *Leishmania*.

Palavras Chaves: Leishmaniose; *Leishmania infantum chagasi*; Cultivo celular; Urina; Infectividade; Schneider's Insect Medium

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a disease of great importance to Public Health because it is a zoonosis and because of its wide distribution worldwide. The laboratory culture of *Leishmania infantum chagasi* is necessary to understand its complexity, leading to studies to develop vaccines and drugs that have an action against the protozoan. The present study aims to standardize the cultivation of *L. infantum chagasi* and to analyze the parameters of infectivity after successive passages. Promastigote forms of *L. infantum chagasi* isolated from a dog were cultured in different commercial media and one of them was added 2% human urine. The counting by hematology was done during seven days, resulting in a growth curve. For infectivity analysis, BALB / c peritoneal macrophages were infected with promastigote forms of *L. infantum chagasi* grown with the highest growth media. The results demonstrated that Schneider's medium supplemented with 2% sterile human urine induced a greater growth of the promastigote forms of *L. infantum chagasi* when compared to other commercial media and to Schneider without supplementation with urine. In addition, it was observed that the Schneider medium supplemented with 2% urine presented parameters of infectivity superior to Schneider's medium without supplementation. After selection of the Schneider medium supplemented with urine, it was observed that from the third passage there was a decrease in the parameters of infectivity in BALB / c peritoneal macrophages. The added medium of human urine was the only one in which it was possible to define the logarithmic and stationary phases having a peak of growth on day 5. The decreases in the infectivity parameters may be related to the need to perform the complete cycle of *Leishmania*.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania infantum chagasi*; Cell culture; Urine; Infectivity; Schneider's Insect Medium

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** - Ciclo Biológico de *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo formas promastigotas são injetadas no hospedeiro vertebrado. Essas formas interagem com os macrófagos via flagelo e são internalizadas. Após a internalização, formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas. Essas formas se multiplicam por divisão binária e rompem a membrana do macrófago e infectam outras células. Durante um segundo repasto sanguíneo, formas amastigotas são ingeridas pelo vetor. Essas formas se diferenciam no intestino do vetor para formas promastigotas e migram para a proboscíde em sua forma infectante. 19
- Figura 02** – Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* durante sete dias de cultivo a 26°C em diferentes meios de cultura. 27
- Figura 03** – Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* durante sete dias de cultivo a 26°C utilizando meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizado em triplicata. **** $p < 0,0001$, quando comparado com os grupos entre colchetes após análise one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. 28
- Figura 04** - Parâmetros de infectividade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* cultivados em diferentes meios de cultura. Número de amastigotas/200 células (A), porcentagem de células infectadas (B) e média do número de amastigotas por célula (C) após 24 horas de infecção com formas promastigotas cultivadas em meio Schneider ou em meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizados ao menos em triplicata. 28
- Figura 05** – Macrófagos peritoneais de BALB/c infectados por *Leishmania infantum chagasi* cultivadas em meio Schneider com adição de 2% de urina 29

(A) e cultivadas em meio Schneider (B).

Figura 6 – Parâmetros de infectividade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* em diferentes passagens. Número de amastigotas/200 células (A), porcentagem de células infectadas (B) e média do número de amastigotas por célula (C) após 24 horas de infecção com formas promastigotas cultivadas em meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizados ao menos em triplicata. * $p=0,02$; ** $p=0,008$ quando comparados com a primeira passagem pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn. 29

Figura 7 – Macrófagos infectados por *Leishmania infantum* cultivadas em meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril. 1) Primeira passagem 2) Segunda Passagem 3) Terceira Passagem 4) Quarta Passagem. Objetiva: 100x. 30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µm – Micrometro

GP63 – Glicoproteína de superfície principal

IFN- γ – Interferon gama

LPG – Lipofosfoglicano

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MTT – brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

PSG – Gel de secreção de promastigota

RPM – Rotações por minuto

SFB – Soro fetal bovino

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 As Leishmanioses	15
2.2 O vetor e o ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	18
2.3 Fatores de Infectividade: LPG e GP63	19
2.4 Cultivo de <i>Leishmania</i>	20
3 OBJETIVOS	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 Obtenção de <i>L. infantum chagasi</i>	23
4.2. Meio de Cultura para <i>L. infantum chagasi</i>	23
4.3 Curva de Crescimento	23
4.5 Animais	24
4.6 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	24
4.7 Ensaio de infecção	24
4.8 Análise estatística	25
5 RESULTADOS	26
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÕES	33
8 REFERÊNCIAS	34

1INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e são consideradas endêmicas em 98 países, com cerca de 58.000 casos de leishmaniose visceral e 220.000 casos de leishmaniose cutânea ao ano (ALVAR et al., 2012). As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania*. A forma visceral é considerada a mais grave podendo levar o indivíduo a morte. No velho mundo, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* são responsáveis pela forma visceral e no Novo mundo o agente causador é *Leishmania infantum chagasi* (ULIANA, 2018).

Leishmania é um protozoário intracelular obrigatório que parasita células do sistema fagocítico mononuclear. Pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e para completar seu ciclo precisa de um hospedeiro invertebrado (vetor) e um hospedeiro vertebrado. Apresentam duas formas principais: promastigotas, que são as formas encontradas no vetor; e formas amastigotas, que são as formas encontradas nos tecidos do hospedeiro vertebrado (SCHLEIN, 1993; CLABORN, 2010).

Quando ocorre a transmissão para o hospedeiro vertebrado, os macrófagos têm a função de impedir o estabelecimento da infecção. Entretanto, *Leishmania* desenvolveu estratégias que garantem a sua adaptação e sobrevivência no meio intracelular. A metaloprotease GP63 age desativando as vias microbidas e adulterando processos fisiológicos e a função dos macrófagos (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015). Outro fator importante de virulência é o lipofosfoglicano (LPG), que é um glicoconjugado presente na superfície das formas promastigotas metacíclicas (LÁZARO-SOUZA et al., 2018).

Para que se possa compreender melhor esses mecanismos e a fisiologia, metabolismo e comportamento do parasito, o cultivo em laboratório é de grande importância. Através dele se pode analisar as moléculas do protozoário e entender sua complexidade. O cultivo também auxilia no diagnóstico laboratorial e isolamento para identificação da espécie e é importante em estudos para o desenvolvimento de vacinas, para detectar resistência a drogas e fazer estudos epidemiológicos. Entretanto, para se obter sucesso no cultivo, algumas particularidades devem ser atendidas, como as exigências nutricionais, temperatura, as condições de incubação e de cultivo (AHMED, 2014).

Nesse contexto, compreende-se a importância das leishmanioses na Saúde Pública e da manutenção de parasitos de *Leishmania* para estudos in vitro e in vivo. O

objetivo desse trabalho foi padronizar o cultivo de *Leishmania infantum chagasi* utilizando quatro meios comerciais já descritos e avaliar os parâmetros de infectividade no decorrer das passagens in vitro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As Leishmanioses

Apesar de ser uma das enfermidades que se encontram presente nos cinco continentes e possuir um elevado número de casos anualmente, as leishmanioses são um complexo de doenças tropicais negligenciadas por parte das políticas públicas e, por não ter um correto gerenciamento do número de casos e da sua incidência, acabam resultando em uma falha no reconhecimento da sua importância. Os dados epidemiológicos indicam que 90% dos casos mundiais de leishmaniose visceral se concentram em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. Já a leishmaniose cutânea concentra 70% dos casos no Afeganistão, na Argélia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Costa Rica, Sudão, Irã e República Árabe Síria (ALVAR et al., 2012; TORRES-GUERRERO, 2017).

O gênero *Leishmania* compreende os subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*. No subgênero *Leishmania*, a forma cutânea no Velho Mundo é causada por *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica*. No Novo Mundo é causada por *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis* (BATES, 2007; ULIANA et al., 2018).

Na leishmaniose tegumentar, o hospedeiro desenvolve lesões ulcerativas na pele e na maioria dos casos essas lesões cicatrizam espontaneamente. A forma mucocutânea é uma variação da cutânea e se caracteriza pela destruição dos tecidos oronaso-faríngeos. A leishmaniose visceral afeta órgãos internos, como o fígado, medula óssea e o baço. Tem um caráter crônico e se não for tratada torna-se fatal (PODINOVSKAIA; DESCONTEAUX, 2015).

De acordo com a região do mundo em que ocorre, pode ser classificada como sendo Leishmaniose do Velho Mundo e Leishmaniose do Novo Mundo. Na Austrália, Ilhas do Pacífico e Antártida não há registro da doença (KEVRIC et al., 2015). As leishmanioses podem ser classificadas também quanto ao seu reservatório natural em zoonose ou antropozoonose (MONDIALE DE LA SANTÉ et al., 2017).

A apresentação clínica depende da espécie de *Leishmania* e da interação com o hospedeiro e de sua resposta imune mediada pelas células de defesa. Atualmente, quatro classificações são aceitas para as manifestações clínicas da doença: leishmaniose cutânea, leishmaniose difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral (KEVRIC et al., 2015). Existem também hospedeiros assintomáticos que acabam

contribuindo na transmissão da doença nas áreas endêmicas. Um diagnóstico preciso é de grande importância para que se possa controlar a transmissão da doença e que se escolha a opção terapêutica (AKHOUNDI et al., 2017).

A realização do diagnóstico da leishmaniose ainda é um grande desafio. Para que se enquadre na perspectiva de um diagnóstico ideal, deve apresentar facilidade na sua execução, ter um baixo custo e apresentar especificidade e sensibilidade elevada (FARIA; ANDRADE, 2012).

O melhor método de diagnóstico para a leishmaniose visceral, considerado o padrão ouro, é a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* no tecido. Os tecidos mais sensíveis para a detecção das formas amastigotas são o baço, medula óssea e os gânglios linfáticos. Entretanto esse método parasitológico é invasivo e pode acarretar riscos para os pacientes. Atualmente, os testes mais utilizados para a confirmação da doença são os testes baseados em anticorpos. O teste de aglutinação direta e o teste de tira imunocromatográfica baseado em rK39 são os mais utilizados para o diagnóstico. (SUNDAR et al., 2012)

Na leishmaniose visceral temos como característica uma estimulação policlonal de linfócitos B que leva a uma produção exacerbada de anticorpos e resulta em uma hipergamaglobulinemia. Essa característica facilita o diagnóstico sorológico, entretanto esses testes apresentam limitações e podem ocorrer reações cruzadas, levando a resultados falso positivos (GONTIJO; MELO, 2004).

Poucos são os medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses. As drogas sintetizadas usadas atualmente apresentam algumas desvantagens por apresentarem resistência e por serem tóxicas e isso leva a uma dificuldade no tratamento (BEKHIT et al., 2018). Outro ponto é que a abordagem para o tratamento é muito ampla, não sendo espécie específica. Isso acontece porque em uma mesma área tem-se a coexistência de várias espécies e os exames para se determinar a espécie causadora não são acessíveis (ULIANA, 2018).

É de grande necessidade o estudo de novas drogas com efeito antileishmânia devido aos diversos efeitos e resistência apresentados pelos medicamentos utilizados nos tratamentos atuais (BEKHIT et al., 2018).

Segundo o Ministério da Saúde, as drogas utilizadas para o tratamento da leishmaniose visceral no homem são: antimoniato de N-metil glucamina (medicamento de primeira escolha) e anfotericina B na sua forma lipossomal ou desoxicolato de anfotericina B (utilizada para o tratamento de gestantes e de pacientes que são sensíveis

ao uso dos antimoniais pentavalentes). Entretanto, os antimoniais apresentam fortes efeitos colaterais, principalmente sobre o aparelho cardiovascular (BRASIL, 2014; PONTE-SUCRE et al., 2017).

Em relação ao tratamento da leishmaniose visceral canina, uma Portaria Interministerial Nº 1.426 de 11 de julho de 2008, proibia o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Entretanto, o MAPA autorizou a comercialização da miltefosina (Milteforan[®]), por meio da nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS.

A miltefosina (Hexadecilfosfocolina) é um derivado fosfolipídico que originalmente foi desenvolvida para ser utilizada no tratamento do câncer. Estudos comprovaram que a miltefosina tem eficácia quando utilizada para o tratamento da leishmaniose visceral (KUHLENCORD et al., 1992). A atividade antileishmânica da miltefosina ocorre devido a inibição da penetração do parasito nos macrófagos através de alguns mecanismos relacionados a interação com os glicossomas e com âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol, e também por meio da inibição da fosfolipase C (LUX et al., 2000). Alguns estudos comprovam que a miltefosina possui ação na ativação da resposta imunológica por meio da indução da produção de IFN- γ e por levar o organismo a ter uma resposta do tipo Th1. A miltefosina induziu também a fosforilação da MAP quinase p38 (WADHONE et al., 2009).

Em relação às medidas de controle e profilaxia das leishmanioses devem ser levados em consideração alguns aspectos. São eles: vigilância epidemiológica, medidas que vão atuar na cadeia de transmissão, medidas educativas para a sociedade, medidas administrativas e uso de vacinas. Em áreas que se tem maior incidência da doença, os Programas de Saúde da Família têm um importante papel na busca de casos e na adoção de medidas educativas junto à sociedade. Em áreas de perfil periurbano deve-se tentar reduzir o contato com o vetor, com o uso de inseticidas e proteção individual como mosquiteiros, telas, repelentes, entre outras. Outra forma de controle e profilaxia é a melhora das condições de saneamento para evitar roedores e mamíferos, somada também à melhoria das condições habitacionais (BASANO, 2004).

2.2 O vetor e o ciclo biológico de *Leishmania*

Leishmania apresenta dois estágios primários de desenvolvimento: forma amastigota e forma promastigota. A forma amastigota é caracterizada por infectar células fagocíticas do hospedeiro vertebrado. A forma promastigota encontra-se nas microvilosidades do intestino médio do vetor. O parasito durante o ciclo biológico alterna entre um hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e hospedeiro vertebrado que pode ser o homem, o cão, roedores, entre outros (CLABORN, 2010).

O vetor natural das espécies de *Leishmania* pertence a subfamília Phlebotominae (flebotomíneo) e família Psychodidae, ordem Diptera. Na América do Sul encontra-se a maior diversidade de espécies de flebotomíneos (SACKS; KAMHAWI, 2001). No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* tem grande importância na transmissão da leishmaniose visceral (LANA et al., 2018). Durante seu ciclo de vida, passa por 4 fases: ovo, larva, pupa e adulto. Para seu desenvolvimento, necessita de ambiente quente e úmido e é frequentemente encontrado perto de locais que habitam roedores. Para realização da ovopostura, a fêmea procura local que seja rico em matérias orgânicas para que ao eclodirem, as larvas possam se nutrir (CLABORN, 2010).

As formas promastigotas de *Leishmania* são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea. Estas formas estão envolvidas em um gel de secreção (PSG) junto com a saliva que é rica em moléculas que possuem diversas propriedades farmacológicas e que modulam o sistema imunológico. O sucesso na infecção por *Leishmania*, está ligado a capacidade que o parasito tem de manipular a resposta imune do hospedeiro em seu favor. Essa manipulação da resposta imune ocorre por meio de moléculas produzidas pelo parasito e também através da saliva do vetor (LESTINOVA, 2017).

A interação da forma promastigota com o macrófago ocorre via flagelo e de vários receptores encontrados na superfície do macrófago. Essa interação desencadeia um processo de fagocitose e assim o parasito libera fatores que modificam a formação dos fagossomos e inibem a indução das vias pró-inflamatórias, permitindo a sobrevivência no interior do macrófago. Além disso, outros fatores como o baixo pH, o aumento da temperatura e o aumento da absorção de ferro ferroso, ajudam na diferenciação da forma promastigota para a forma amastigota e também auxilia na acidificação do vacúolo parasitóforo. Dentro do vacúolo, a amastigota adquire

nutrientes que vão permitir a sua replicação (PODINOVSKAIA; DESCONTEAUX, 2015).

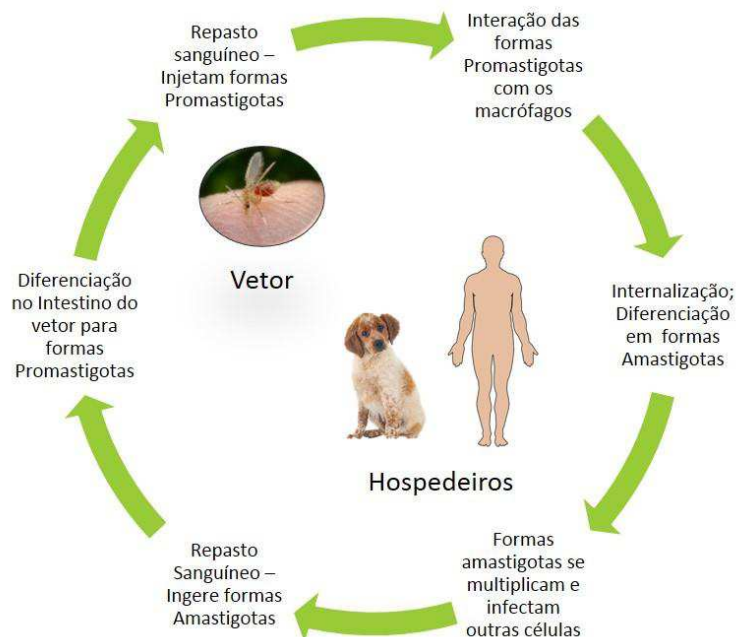


Figura 1 – Ciclo Biológico de *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo formas promastigotas são injetadas no hospedeiro vertebrado. Essas formas interagem com os macrófagos via flagelo e são internalizadas. Após a internalização, formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas. Essas formas se multiplicam por divisão binária e rompem a membrana do macrófago e infectam outras células. Durante um segundo repasto sanguíneo, formas amastigotas são ingeridas pelo vetor. Essas formas se diferenciam no intestino do vetor para formas promastigotas e migram para a proboscíde em sua forma infectante.

2.3 Fatores de Infectividade: LPG e GP63

Para que ocorra a infecção no hospedeiro vertebrado, a sobrevivência do protozoário dentro do macrófago é crucial (STREIT ET AL., 1996). A leishmânia altera as vias de sinalização que são utilizadas pelos macrófagos para eliminar os patógenos ou a resposta do sistema imunológico adaptativo, e com isso garantem a sua sobrevivência e sua multiplicação dentro do hospedeiro. Logo após o contato da leishmânia com o macrófago, algumas funções são inibidas, dentre elas a de apresentação ao antígeno e de regulação da resposta adaptativa, e outras induzidas, como a produção de quimiocinas e receptores de quimiocinas (SHIO, 2012).

Os mecanismos de evasão da resposta imune utilizados pelo parasito foram identificados experimentalmente e diferentes fatores vão determinar a virulência do

parasito. Dentre esses fatores, podemos citar os determinantes invasivos e evasivos, como liposfoglucanos (LPG) (TORRES-GUERREIRO et al., 2018).

Muitos microrganismos patogênicos apresentam um glicocálice denso em sua superfície. Esse glicocálice é composto de glicoproteínas ancoradas em lipídeos e polissacarídeos não ligados a proteínas. O LPG é um glicoconjugado de alta complexidade e está presente na superfície de todas as espécies de *Leishmania*. (FORESTIER; GAO; BOONS, 2015). É um dos mais importantes fatores de virulência, permitindo a sobrevivência do parasito no meio intracelular. (DE BARROS et al., 2012)

No intestino do vetor, o LPG protege o protozoário contra as enzimas digestivas e também é responsável pela fixação das formas promastigotas na parede intestinal do vetor. No hospedeiro vertebrado, o LPG tem a função de proteger as formas promastigotas contra a degradação por enzimas lisossomais. Atua também modulando a ativação do macrófago por comprometer a síntese de espécies de nitrogênio e de citocinas que estão relacionadas ao controle da infecção. Outra função é proteger o parasito contra as espécies reativas de oxigênio (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012)

GP63 é a glicoproteína mais abundante da membrana plasmática de formas promastigotas de *Leishmania*. Essa protease tem diversas funções na patogênese da leishmaniose. É responsável pela evasão da lise mediada pelo complemento, auxilia a fagocitose pelo macrófago de formas promastigotas, interage com a matriz extracelular da célula hospedeira e inibe as funções celulares que são destinadas a destruir o protozoário (YAO, 2010)

Outra função é a modulação dos mecanismos de sinalização das células hospedeira e das funções celulares. GP63 está envolvida na clivagem e degradação de várias quinases e fatores de transcrição e também é a principal molécula que modula os mecanismos reguladores negativos do hospedeiro, envolvendo proteínas tirosina fosfatases (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012).

2.4 Cultivo de *Leishmania*

Os estudos com isolados de *Leishmania* necessitam de meios de cultura em que se possa obter um alto número de formas promastigotas em um curto espaço de tempo. Alguns meios comerciais são utilizados com essa finalidade, entres eles podemos citar o meio RPMI 1640, M199 e o meio Drosophila Schneider (LIMONCU et al., 1997).

As culturas axênicas de *Leishmania* necessitam de meios ricos em aminoácidos e vitaminas, suplementado com soro, para que se tenha um bom crescimento e que se consiga manter a cultura por sucessivas passagens. Estudos comprovaram que alguns aminoácidos como a arginina, leucina, triptofano, lisina e vanila são essenciais para o crescimento de *Leishmania* (NAYAK et al, 2018).

Para se isolar *Leishmania* spp. provenientes de amostras biológicas de cães infectados, o meio de escolha é o meio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), preparado com sangue de coelho. Entretanto, estudos mostraram que a utilização do sangue de outras espécies animais é viável para utilizar na cultura (DOS SANTOS et al., 2018). Ao se adicionar um meio líquido sobre o NNN aumentamos a positividade da cultura. As culturas devem ser mantidas em estufas a 24-26°C (BRASIL, 2014).

Outro componente importante para o cultivo de *Leishmania* é a adição de soro fetal bovino (SFB), que é comumente utilizado como suplemento ao meio de cultura. Ele fornece nutrientes, hormônios e fatores de crescimento necessários para o crescimento celular. O SFB é o mais utilizado, entretanto é considerado um meio indefinido e a forma de obtenção do soro é levantada pelos comitês de ética. Devido a isso alternativas de substituição do SFB tem sido estudada com a finalidade de encontrar métodos alternativos (GSTRAUNTHALER, 2003). Outro fator é que apesar da eficiência da adição do SFB ao meio de cultura no crescimento do número de formas promastigotas, o SFB tem um elevado custo (ALLAHVERDIYEV et al., 2011).

A urina humana estéril é utilizada como forma suplementar para cultivar *Leishmania*, estimulando a metaciclogênese aumentando assim o número de parasitos na cultura. Alguns estudos apontam que ela pode ser utilizada para substituir o soro fetal bovino (SFB), o que reduz o custo se tornando uma alternativa econômica e que apresenta a mesma eficácia de meios suplementado com o SFB (ARMSTRONG & PATTERSON, 1994; HOWARD et al., 1991).

O cultivo de formas amastigotas axênicas exige temperaturas mais altas que as utilizadas para cultivar formas promastigotas. Cysne-Finkelsteins et al., comprovaram que a mudança de temperatura para 32°C e pH para 5,5 induz a diferenciação de promastigota para amastigota in vitro.

3 OBJETIVOS

- **Geral** – Padronizar o cultivo de *L. infantum chagasi* e analisar os parâmetros de infectividade após sucessivas passagens *in vitro*

- **Específicos**
 1. Comparar os perfis das curvas de crescimento *in vitro* de diferentes meios utilizados para cultura de *L. infantum chagasi*, definindo as fases logarítmica e estacionária;
 2. Avaliar a infectividade de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* cultivadas com diferentes meios de cultura em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;
 3. Avaliar a infectividade de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* após sucessivas passagens em meios de cultura em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção de *L. infantum chagasi*

Foram utilizadas formas promastigota de *L. infantum chagasi* (MCAN/BR/2014/21BAÇO) isoladas de um cão naturalmente infectado no município de São Luís, Maranhão. Os parasitos foram caracterizados previamente pelo Laboratório de Referência Nacional para tipagem de *Leishmania* (CLIOC) do Instituto Oswaldo Cruz e criopreservados no Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia. As formas promastigotas foram mantidas em meio ágar-sangue de Neal-Novy modificado por Nicolle (1908) NNN e acrescidos de meio líquido Schneider's Insect Medium (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina.

4.2. Meio de Cultura para *L. infantum chagasi*

Para a escolha do melhor meio a ser utilizado para o crescimento *L. infantum chagasi* foram avaliados 4 meios diferentes: M199 (Sigma), Grace's (ThermoFisher), RPMI-1640 (Sigma) e Schneider's (Sigma). Os meios foram suplementados com 20% de SFB inativado a 56° por 40 minutos. Foi adicionado também 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina em cada meio. Ao meio Schneider foi adicionado 2% de urina humana masculina filtrada através de uma membrana de 0,22µm e outro meio ficou sem a adição de urina totalizando 5 meios avaliados para o crescimento. A quantidade inicial do inóculo foi de 10⁶ parasitos/mL. Os parasitos foram cultivados em garrafas estéreis paracultura de células.

4.3 Curva de Crescimento

Para realização da curva de crescimento, os parasitos foram quantificados diariamente durante 7 dias e a quantificação foi feita por meio de contagem em hematocítmetro. Os resultados foram expressos como número de parasitos/mL. Foram realizadas 4 passagens, no sétimo dia de passagem, dos meios que apresentaram maior crescimento de parasitos.

4.5 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas, com 4-6 semanas de idade, foram adquiridos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, e mantidos em micro isoladores, com água e alimentação *ad libitum*, conforme o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC) aprovou todas os procedimentos envolvendo os animais (CEUA/IOC – L053/2016).

4.6 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Para obtenção de macrófagos peritoneais foi inoculado tioglicolato 3% por via intraperitoneal e após 72 horas foi realizada a eutanásia utilizando xilazina (20mg/mL) e cetamina (100mg/mL) em camundongos. O lavado peritoneal foi feito com PBS 1x, as células foram centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos a 4° C e ressuspensas em meio RPMI-1640 (Sigma). Foi realizado o ajuste celular para 5×10^5 células/mL e adicionado 1mL de células em cada poço de uma placa de 24 poços. A placa foi levada para estufa 37° C, 5% CO₂ por 1 hora para aderência dos macrófagos nas lamínulas que foram colocadas no fundo de cada poço.

4.7 Ensaio de infecção

Para o ensaio de infecção, macrófagos peritoneais aderidos em lamínulas de 24 poços por 1 hora foram infectados com a quantidade de 10^6 parasitos/mL em cada poço e a placa foi deixada por 24 horas em estufa a 34° C, 5% CO₂. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com Bouin por 5 minutos, e coradas com Giemsa. As lamínulas foram analisadas em microscópio ótico, na objetiva de 100x, para a contagem de amastigotas intracelulares e determinação dos parâmetros de infectividade: número de amastigotas por 200 células; porcentagem de células infectadas; e média de amastigotas por célula. A porcentagem de células infectadas foi obtida a partir do número de células infectadas em 200 células dividido por dois. O número médio de amastigotas por célula foi obtido do número de amastigotas intracelulares em 200 células dividido pelo número de células infectadas.

4.8 Análise estatística

Os dados não-paramétricos foram analisados com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunns ($p \leq 0,05$) ou one-way ANOVA com pós-teste de Tukey, empregando-se o software GraphPadPrism 7.00.

5 RESULTADOS

Após os sete dias de contagem do número de promastigotas por mL nos meios de cultura, observou-se que não foi possível determinar as fases logarítmicas ou estacionárias dos meios M199, RPMI, Grace e Schneider (Figura 2).

Após o inoculo inicial de 10^6 parasitos/mL, não houve diferença estatística significativa entre os sete dias de contagem, tendo o meio Grace um pico máximo de 6.0×10^6 parasitos/mL no dia 4.

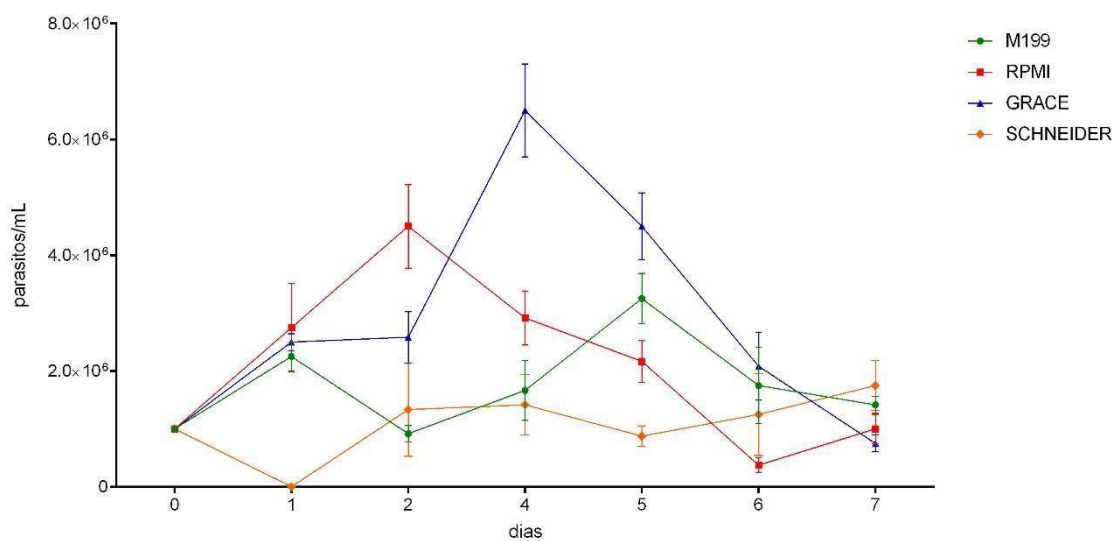


Figura 2 – Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* durante sete dias de cultivo a 26°C em diferentes meios de cultura.

O meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril permitiu a caracterização da fase logarítmica e estacionária da cultura. Do dia 1 ao dia 5 houve crescimento progressivo do número de parasitos/mL, caracterizando a fase logarítmica do crescimento. O dia 5 teve um crescimento máximo com 2.0×10^8 parasitos/mL. O sexto dia da contagem não teve diferença estatisticamente significativa do quinto dia. O número de parasitos começa a cair no dia 7 (Figura 3).

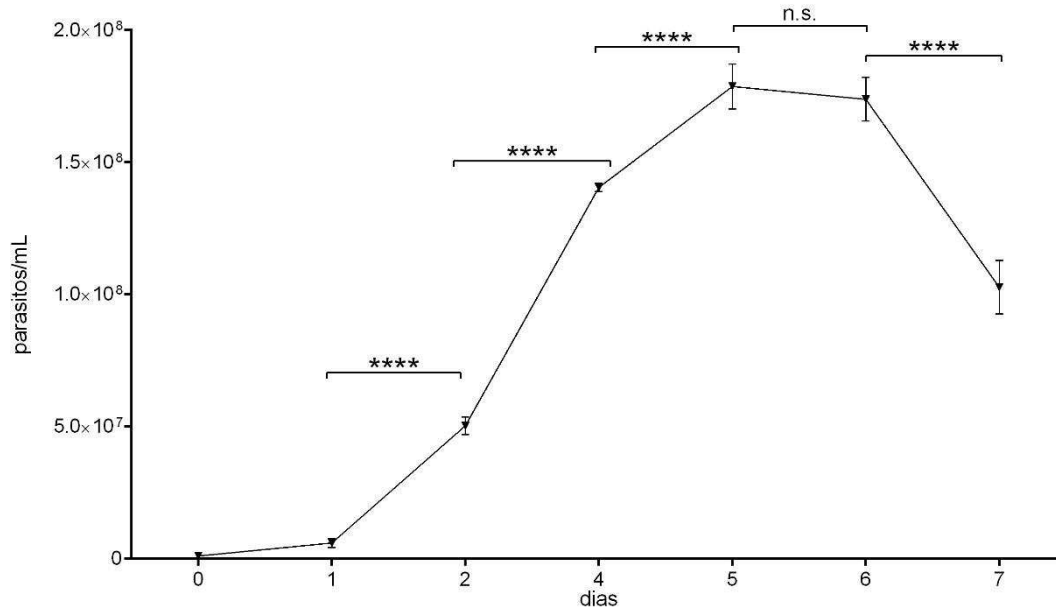


Figura 3 – Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* durante sete dias de cultivo a 26°C utilizando meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizado em triplicata. **** $p < 0,0001$, quando comparado com os grupos entre colchetes após análise one-way ANOVA e pós-teste de Tukey.

De todos os meios testados, o meio Schneider's suplementado com 2% de urina humana estéril foi o que melhor apresentou crescimento no número de parasitos, sendo indicado para o cultivo de *L. infantum chagasi*.

Ao compararmos a infectividade de *Leishmania* cultivada em meio Schneider e meio Schneider suplementado com 2% de urina, podemos observar que o ultimo meio foi superior tanto no número de amastigotas intracelulares, quanto no percentual de células infectadas e na média de amastigotas por célula (Figura 4 e 5).

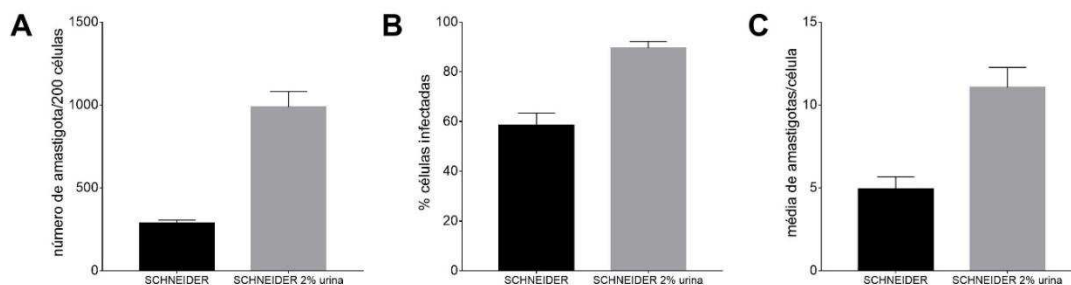


Figura 4 – Parâmetros de infectividade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* cultivados em diferentes meios de cultura. Número de amastigotas/200 células (A), porcentagem de células infectadas (B) e média do número de amastigotas por célula (C) após 24 horas de infecção com formas promastigotas cultivadas em meio Schneider ou em meio Schneider suplementado com

2% de urina humana estéril. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizados ao menos em triplicata.

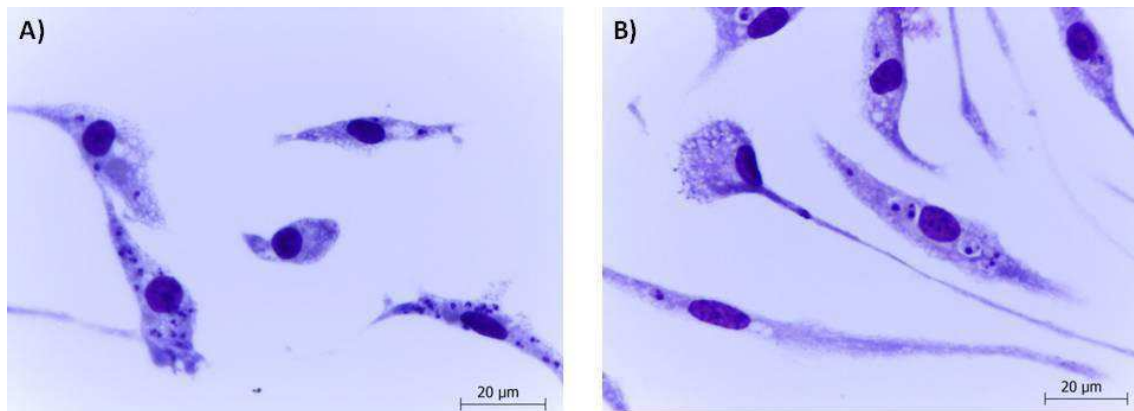


Figura 5 – Macrófagos peritoneais de BALB/c infectados por *Leishmania infantum chagasi* cultivadas em meio Schneider com adição de 2% de urina (A) e cultivadas em meio Schneider (B).

A partir dos resultados que comprovaram que o meio Schneider suplementado com urina apresentou os parâmetros de infectividade superior aos outros meios testados, o meio Schneider suplementado foi o meio de escolha para o cultivo de *L. infantum chagasi* e realização das análises posteriores.

Após sucessivas passagens in vitro houve redução dos parâmetros de infectividade. O número de amastigotas por 200 células e a média de amastigotas por célula apresentou valor significativamente menor na terceira passagem, quando comparado com a primeira passagem. Da mesma forma, foi observada uma menor porcentagem de células infectadas na quarta passagem, quando comparada com a primeira passagem (Figura 6 e 7).

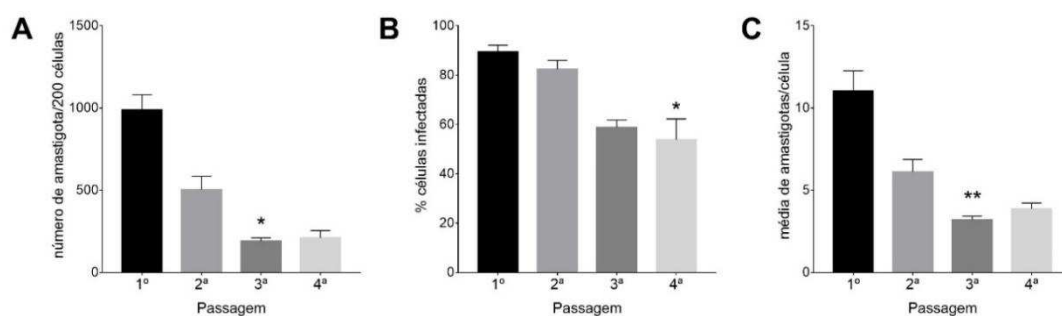


Figura 6 – Parâmetros de infectividade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum chagasi* em diferentes passagens. Número de amastigotas/200 células (A), porcentagem de células infectadas (B) e média do número

de amastigotas por célula (C) após 24 horas de infecção com formas promastigotas cultivadas em meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizados ao menos em triplicata. * $p=0,02$; ** $p=0,008$ quando comparados com a primeira passagem pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.

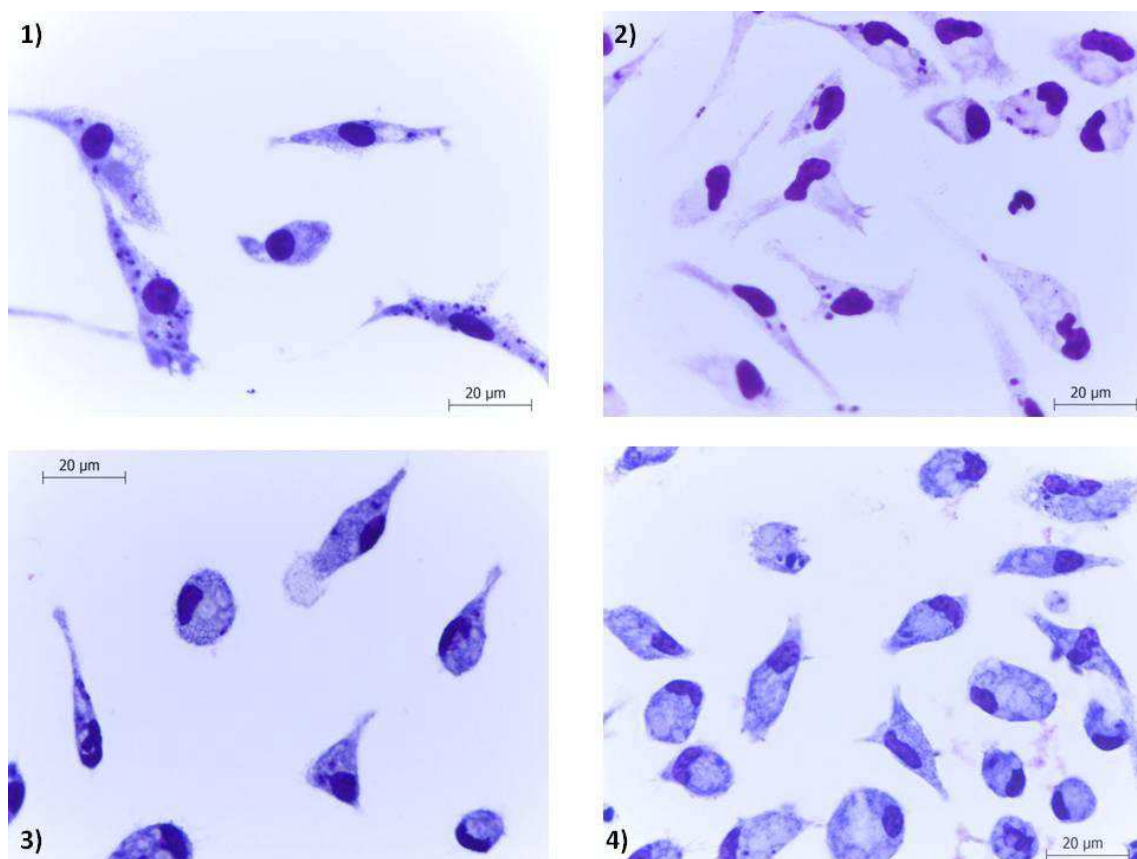


Figura 7 – Macrófagos infectados por *Leishmania infantum* cultivadas em meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril. 1) Primeira passagem 2) Segunda Passagem 3) Terceira Passagem 4) Quarta Passagem. Objetiva: 100x.

6 DISCUSSÃO

A contagem do número de parasitos por mL foi feita diariamente resultando nas curvas de crescimento. O meio Schneider adicionado de 2% de urina demonstrou um crescimento progressivo do dia 1 até o dia 5, definindo a fase exponencial. No dia 5 houve um maior crescimento quando comparado aos outros dias. Os dias 5 e 6 não tiveram diferença estatística significativa ($p < 0,0001$), definindo assim a fase estacionária. A fase estacionária e a fase exponencial estão relacionadas ao ciclo celular. A metaciclogênese torna os parasitos aptos a sobreviver no hospedeiro vertebrado. É nessa fase que se inicia a expressão de moléculas que permitem a sobrevivência no ambiente intracelular. Em culturas *in vitro*, as formas promastigotas procíclicas encontram-se em maior quantidade na fase logarítmica e a fase estacionária é caracterizada por um número maior de promastigotas metacíclicas. O estágio metacíclico ativa as vias de complemento e auxilia no estabelecimento da infecção (SACKS, 1989).

Ao comparar-se os meios RPMI, M199, Grace e Schneider não foi possível identificar as fases estacionária exponencial ao contrário do meio Schneider suplementado com urina. A urina possui constituintes que estimulam a divisão binária do parasito resultando em um maior número de formas promastigotas na cultura. Ainda não se sabe ao certo qual o componente da urina que estimula o crescimento. Para Warburget al. (2008) isso pode estar relacionado com a presença de xantina na urina. Esses autores observaram que a xantina comercial adicionada a em meio de cultura RPMI-1640, estimulou a multiplicação de *Leishmania*.

Outro componente importante encontrado na urina é a uréia, que além de ser a segunda substância mais abundante, serve de substrato para produção de poliaminas. A produção de ornitina é precursora da via das poliaminas (DA SILVA, 2014). *Leishmania* utiliza a L-arginina como substrato para a arginase. A arginase é uma enzima que produz ureia e ornitina. A ornitina tem grande importância na replicação e estabelecimento da infecção no ambiente intracelular (AOKI et al., 2017). A proliferação de parasitos depende da disponibilidade de poliaminas que é gerada pelo catabolismo da L-arginina e pela atividade enzimática da arginase (BADIRZADEH et al., 2017)

A arginase e a ornitina são enzimas que estão envolvidas no ciclo da ureia e estão envolvidas também na síntese de óxido nítrico (MORRIS JR, 2002). Estudos demonstraram que a arginase foi detectada em *Leishmania* e o protozoário utiliza desta metaloenzima para favorecer a sua replicação no ambiente intracelular. A atividade da arginase é importante também no estabelecimento e manutenção da infecção por *Leishmania* (DA SILVA, 2014). Por essa razão, levantamos a hipótese de que devido ao fato de *Leishmania* necessitar de arginase e ornitina e dessas enzimas fazerem parte do ciclo da ureia que faz parte da formação da urina, de alguma forma isso influencia diretamente no crescimento e infectividade do protozoário. Isso poderia explicar o motivo dos parâmetros de infectividade de *L. infantum chagasi* cultivadas com meio Schneider adicionado de urina ser superiores aos que foram cultivados em meio Schneider sem urina. Observamos também que parasitos cultivados em meio adicionado de urina tiveram uma infectividade superior ao meio em que não se adicionou urina. A capacidade das formas promastigotas metacíclicas de infectar macrófagos está relacionada a fatores de infectividade que estão presentes em sua superfície. De alguma forma, a urina também induziu uma maior entrada nos macrófagos das formas promastigotas cultivadas em meio Schneider quando comparada ao meio Schneider sem a adição da urina. Em estudos feitos por Allahverdiyev et al. (2011), demonstraram que as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. donovani* cultivadas em meio de cultura com a adição de urina humana tiveram uma diferença significativa nos índices de infecção em relação ao meio sem adição de urina.

Os meios RPMI, M199, Grace e Schneider já são utilizados para o cultivo de *Leishmania* spp. Esses meios são ricos em nutrientes e são adicionados de SFB com a finalidade de sustentar o crescimento do número de parasitos e manter a cultura ao longo de várias passagens (NAYAK et al., 2018). Entretanto, a cepa de *Leishmania infantum chagasi* (MCAN/BR/2014/21BAÇO) utilizada em nosso trabalho não apresentou um bom crescimento quando comparado com o meio Schneider suplementado com urina. Os meios utilizados conseguiram manter a quantidade de parasitos do inoculo inicial, mas não foi capaz de manter a cultura ao longo das passagens.

Após as passagens de *Leishmania*, observou-se uma diminuição nos parâmetros de infectividade e diferença estatisticamente significativa em relação à primeira passagem. Esse fato ocorre devido às condições de cultivo in vitro. O ciclo de *Leishmania* envolve um hospedeiro invertebrado, o vetor, e o hospedeiro vertebrado. A

transmissão vetorial tem grande influência na infecção por *Leishmania*. Essa interação vetor-hospedeiro é importante para favorecer o estabelecimento da infecção. Características vetoriais interagem especificamente com o parasito. O PSG é um gel rico em proteofosfoglicanos que se acumula no intestino do vetor e nas peças bucais. Esse gel tem papel fundamental na regurgitação das formas promastigotas no local da picada. O PSG também auxilia na infecção promovendo a cronicidade e exacerbando as manifestações da doença (ROGERS, 2012). Estudos realizados por Moreira et al. (2012) demonstraram que a perda de virulência de *L. infantum* está relacionada a uma diminuição na capacidade de diferenciação das formas promastigotas em formas amastigotas. Esses fatos nos mostram que a diminuição da infectividade pode estar relacionada às condições de infecção experimental in vitro. Embora, a infecção experimental por *Leishmania* seja bem aceita, ela não reproduz com fidedignidade a infecção natural, visto que, o ciclo de vida do protozoário depende de interações específicas no trato digestório do vetor.

7 CONCLUSÕES

- O meio Schneider suplementado com 2% de urina humana estéril foi o único meio em que foi possível definir a fase logarítmica e estacionária e que teve um maior crescimento do número de formas promastigotas de *L. infantum chagasi*.
- As formas promastigotas cultivadas com meio Schneider suplementado com 2% de urina apresentou parâmetros de infectividade superior aquelas cultivadas em meio Schneider;
- A partir da terceira passagem observou-se diminuição dos parâmetros de infectividade em macrófagos peritoneais de BALB/c;

8 REFERÊNCIAS

- AHMED, Nishat Hussain. Cultivation of parasites. **Tropical parasitology**, v. 4, n. 2, p. 80, 2014.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. Leishmania infections: molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1-29, 2017.
- ALLAHVERDIYEV, Adil M. et al. Effect of human urine on cell cycle and infectivity of Leishmania species promastigotes in vitro. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 4, p. 639-643, 2011.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis world wide and global estimates of its incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AOKI, Juliana Ide et al. L-arginine availability and arginase activity: Characterization of amino acid permease 3 in Leishmania amazonensis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 10, p. e0006025, 2017.
- ARMSTRONG, Timothy C.; PATTERSON, Jean L. Cultivation of Leishmanibraziliensis in an economical serum-free medium containing human urine. **The Journal of parasitology**, p. 1030-1032, 1994.
- BADIRZADEH, Alireza et al. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of Leishmania parasites. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005774, 2017.
- BASANO, Sergio de Almeida; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328-337, 2004.
- BATES, Paul A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BEKHIT, Adnan A. et al. Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 120 p. 2014
- CLABORN, David M. The biology and control of leishmaniasis vectors. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 127, 2010.
- CYSNE-FINKELSTEIN, Léa et al. Leishmania amazonensis: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 89, n. 1, p. 58-62, 1998.

DA SILVA, Maria Fernanda Laranjeira; FLOETER-WINTER, Lucile Maria. Arginase in leishmania. In: **Proteins and proteomics of Leishmania and Trypanosoma**. Springer, Dordrecht, 2014. p. 103-117.

DE BARROS, Muriel Primonet al. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: Trypanosoma cruzi, Leishmania spp., Toxoplasma gondii e Plasmodium spp. **Revista Liberato**, v. 13, n. 20, 2012.

DOS SANTOS, Roseclea Chagas et al. Isolation of naturally infecting Leishmaniainfantum from canine samples in Novy-MacNeal-Nicolle medium prepared with defibrinated blood from different animal species. **Veterinary parasitology**, v. 257, p. 10-14, 2018.

DUQUE, Guillermo Arango; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current opinion in microbiology**, v. 26, p. 32-40, 2015.

FARIA, Angélica Rosa; ANDRADE, Héli da Monteiro de. Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina: grandes avances tecnológicos y baja aplicación práctica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FORESTIER, Claire-Lise; GAO, Qi; BOONS, Geert-Jan. Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 193, 2015.

FRANCO, Luis H.; BEVERLEY, Stephen M.; ZAMBONI, Dario S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan. **Journal of parasitology research**, v. 2012, 2012.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GSTRAUNTHALER, Gerhard. Alternative to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 20, n. 4, p. 275-281, 2003.

HOWARD, M. Keith et al. Human urine stimulates growth of Leishmania in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 4, p. 477-479, 1991

ISNARD, Amandine; SHIO, Marina Tiemi; OLIVIER, Martin. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 72, 2012.

KEVRIC, Ines; CAPPEL, Mark A.; KEELING, James H. New world and old world Leishmania infections: a practical review. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

- KUHLENCORD, A. et al. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 8, p. 1630-1634, 1992.
- LADOPOULOS, Theodoros et al. The proliferation potential of promastigotes of the main Leishmania species of the old world in NNN culture medium prepared using blood of four different mammals. **Experimental parasitology**, v. 157, p. 124-127, 2015.
- LANA, Rosana S. et al. Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. **PloSone**, v. 13, n. 10, p. e0206452, 2018.
- LÁZARO-SOUZA, Milena et al. LeishmaniainfantumLipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 626, 2018.
- LESTINOVA, Tereza et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005600, 2017.
- LIMONCU, M. Emin et al. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of Leishmania species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2430-2431, 1997.
- LUX, Henning et al. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in Leishmania. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 111, n. 1, p. 1-14, 2000.
- MONDIALE DE LA SANTÉ, Organisation et al. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance—Le point sur la situation mondiale de la leishmaniose, 2006-2015: un tournant dans la surveillance de la maladie. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 92, n. 38, p. 557-565, 2017.
- MOREIRA, Diana et al. Impact of continuous axenic cultivation in Leishmania infantum virulence. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. e1469, 2012.
- NAYAK, Archana et al. A defined medium for Leishmania culture allows definition of essential amino acids. **Experimental parasitology**, v. 185, p. 39-52, 2018.
- PODINOVSKAIA, Maria; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2015.
- PONTE-SUCRE, Alicia et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017
- ROGERS, Matthew Edward. O papel de Leishmaniaproteofosfoglicanos na transmissão de flebotomíneos e na infecção do hospedeiro mamífero. **Fronteiras em microbiologia**, v. 3, p. 223, 2012.
- SACKS, David L. Metacyclogenesis in Leishmaniapromastigotes. **Experimental parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989.

SACKS, David; KAMHAWI, Shaden. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual reviews in microbiology**, v. 55, n. 1, p. 453-483, 2001.

SUNDAR, Shyam et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012.

SCHLEIN, Y. Leishmania and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, n. 7, p. 255-258, 1993.

SHIO, Marina Tiemi et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, 2012.

TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 2017.

ULIANA, Silvia RB; TRINCONI, Cristiana T.; COELHO, Adriano C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2018.

WADHONE, Pallavi et al. Miltefosine promotes IFN- γ -dominated anti-leishmanial immune response. **The journal of immunology**, v. 182, n. 11, p. 7146-7154, 2009.

WARBURG, Alon; GELMAN, Shoshana; DEUTSCH, Joseph. Xanthine in urine stimulates growth of Leishmaniapromastigotes in vitro. **Journal of medical microbiology**, v. 57, n. 1, p. 136-138, 2008.

YAO, Chaoqun. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all?. **Infection and immunity**, v. 78, n. 1, p. 22-31, 2010.