

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise do comportamento *in vitro* entre uma cepa viscerotrópica e outra dermatrópica de
Leishmania amazonensis

Marco Miguel de Oliveira

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG

Dezembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise do comportamento *in vitro* entre uma cepa viscerotrópica e outra dermatrópica de
Leishmania amazonensis

Marco Miguel de Oliveira

Orientador: Sydnei Magno da Silva

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG

Dezembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise do comportamento *in vitro* entre uma cepa viscerotrópica e outra dermatrópica de
Leishmania amazonensis

Marco Miguel de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva

Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em __/__/__

Profª. Dra. Celine de Melo

Uberlândia – MG

Dezembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise do comportamento *in vitro* entre uma cepa viscerotrópica e outra dermatrópica de
Leishmania amazonensis

Marco Miguel de Oliveira

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva (Presidente da Banca Examinadora)

Uberlândia, _____ de _____ de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivone Anselmo de Oliveira e José Miguel de Oliveira, pelo amor, compreensão e apoio incondicionais. Por muitas vezes abdicarem dos seus sonhos para viverem os meus.

A minha família, principalmente a minhas avós e avô, que sempre me incentivaram desde pequeno a fazer o curso de Ciências Biológicas. Vó Maria, sei que mesmo estando no céu a senhora continua cuidando de mim e torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus amigos(as) Noéli, Janaína, Nicole, Bárbara, Hellen e Paulo Cuevas pela amizade. Em particular, ao meu companheiro Paulo Vitor Alves Ribeiro por sempre me ouvir, transmitir alegria, paciência e determinação.

Aos meus colegas do laboratório pelo companheirismo, auxílio e por compartilharem as dificuldades. À técnica do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia de Parasitos, Juliana Miranda, pela paciência e auxílio na rotina do laboratório.

Ao professor Dr. Sydnei Magno da Silva, pelo apoio, paciência, confiança, dedicação e, principalmente, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua orientação.

Aos órgãos de fomento à pesquisa por subsidiarem diversos projetos do grupo de pesquisas do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* e fornecerem a possibilidade para que este trabalho fosse desenvolvido.

Não é sobre chegar

No topo do mundo e saber que venceu

É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu

Ana Vilela – Trem bala

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças graves e negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. As duas formas clínicas principais desta enfermidade são: leishmaniose cutânea (LC) e visceral (LV). Embora não seja frequente, algumas espécies causadoras de LC podem ser encontradas em células do sistema fagocitário mononuclear presentes em órgãos viscerais – como fígado e baço –, levando a um quadro clínico sugestivo de LV. O objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento *in vitro* de uma cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis* isolada do baço de um cão com sinais clínicos de LV e de outra cepa da mesma espécie (MHOM/BR/1989/Ba199). O desenvolvimento e a multiplicação das formas promastigotas foi avaliado por meio da curva de crescimento gerada com base no número de parasitos/mL. Resumidamente, os parasitos foram cultivados em meio quimicamente definido α -MEM e incubados a $24\pm 1^\circ\text{C}$, sendo as culturas acompanhadas durante 7 dias. Com o intuito de verificar as porcentagens de promastigotas metacíclicas *in vitro*, as cepas foram incubadas (37°C por 1h) com 10% (cepa viscerotrópica) e 8% (Ba199) de soro humano, sendo a viabilidade das formas resistentes a lise medida pelo ensaio de redução da resazurina. Para a infecção de macrófagos, 5×10^5 BMDMs foram cultivados em placas de 24 poços (5% de CO_2 e 95% de umidade) contendo lamínulas (13mm). Em seguida, promastigotas de fase estacionária foram adicionadas aos poços, sendo a placa incubada a 26°C por 18h. Após a lavagem, as células infectadas foram novamente incubadas a 37°C por 12h. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas dos poços, coradas com Panótico rápido, montadas em lâminas e analisadas por microscopia óptica. No segundo dia de crescimento, ambas as cepas iniciaram a fase exponencial, sendo o pico de promastigotas/mL registrado no quarto dia. A partir desse dia, a proliferação diminuiu dando início a fase estacionária e, posteriormente, a fase de declínio. O perfil das curvas foi semelhante, entretanto o número de promastigotas/mL variou entre as cepas do segundo ao sétimo dia ($p<0,05$). As porcentagens de promastigotas resistentes à proteínas séricas do Complemento foram próximas para ambas as cepas. Entretanto, constatou-se um aumento médio de aproximadamente $1,3\times$ na quantidade de parasitos viáveis (resistentes) entre as fases de crescimento testadas (exponencial e estacionária), embora não existam diferenças estatísticas ($p>0,9$). A porcentagem de macrófagos infectados foi aproximadamente $2\times$ maior para a cepa viscerotrópica do que para Ba199 ($p=0,1$). O índice de infecção encontrado para a cepa viscerotrópica também foi $3\times$ maior do que o de Ba199 ($p=0,1$). A cepa viscerotrópica de

aparentemente apresenta um comportamento *in vitro* similar ao de Ba199, embora ela possua uma maior capacidade de infectar a linhagem de macrófagos utilizados, o que pode ser um indicativo da expressão de determinados fatores de virulência por parte deste parasito.

Palavras-chave: visceralização, curva de crescimento, metaciclogênese e infectividade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Leishmania</i> e as leishmanioses	1
1.2. Ciclo biológico e processo de metaciclogênese	4
1.3. Relação parasito-hospedeiro	9
1.4. Manifestações clínicas	11
1.5. Epidemiologia	16
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Cultivo e manutenção de parasitos.....	22
3.2. Curva de crescimento	22
3.3. Avaliação da metaciclogênese <i>in vitro</i>	23
3.4. Cultivo e manutenção de células.....	24
3.5. Infecção de macrófagos	24
3.6. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS	27
4.1. Curva de crescimento	27
4.2. Avaliação da metaciclogênese <i>in vitro</i>	30
4.3. Avaliação da infecção de macrófagos pelas duas cepas de <i>Leishmania</i> <i>amazonensis</i>	32
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferenças morfológicas entre as formas promastigota e amastigota (A) no ciclo biológico de *Leishmania* (B). Brevemente, ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (1) o inseto vetor ingere células do SFM contendo amastigotas. No trato digestivo do flebotomíneo, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas (2). Em seguida, as promastigotas procíclicas se diferenciam em promastigotas nectomonadas (3), que se ligam nas microvilosidades do intestino médio. Após migrarem para o intestino médio torácico e válvula estomodeal (4-5), as promastigotas nectomonadas dão origem às promastigotas leptomonadas, que podem se dividir e/ou aderir ao epitélio do trato digestivo e se tornarem promastigotas haptomonadas ou se diferenciarem em promastigota metacíclicas (forma infectante - 6). As promastigotas metacíclicas são inoculadas e regurgitadas na solução de continuidade gerada pelo repasto sanguíneo do flebotomíneo e ao encontrarem as células do SFM, são reconhecidas e fagocitadas (8). No vacúolo parasitóforo, as promastigotas metacíclicas se diferenciam novamente em amastigotas, as quais proliferam e ao romperem a célula hospedeira podem infectar novas células (9). As formas proliferativas são indicadas setas circulares (Adaptado de SUNTER; GULL, 2017).

..... 8

Figura 2 – Curva de crescimento *in vitro* da cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis* e de Ba199. Os parasitos foram cultivados em meio quimicamente definido α -MEM e mantidos à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada ponto representa a média $\pm$ DP de três contagens realizadas em paralelo no mesmo dia e horário. As setas ($\downarrow$) indicam o início das fases de crescimento exponencial, estacionária e declínio, respectivamente. O gráfico de inserção mostra a área abaixo da curva (AUC – *area under curve*), evidenciando que ambas as cepas apresentam o mesmo perfil de crescimento. * $p < 0,05$ (número de promastigotas/mL de Ba199 vs. cepa viscerotrópica), obtido pelo teste *t* de Student. 28

Figura 3 – Diversidade morfológica das culturas de Ba199 (A e B) e da cepa viscerotrópica (C e D) de *Leishmania amazonensis*. Os aspectos morfológicos foram analisados por microscopia óptica durante as fases logarítmica (terceiro dia de cultivo, A e C) e estacionária (quinto dia de cultivo, B e D) de crescimento *in vitro*. As setas ($\rightarrow$) indicam as rosáceas íntegras e mortas. Aumento de $500\times$ 29

Figura 4 – Porcentagem de parasitos viáveis após exposição a diferentes concentrações de soro humano. Basicamente, as promastigotas em fase estacionária de ambas as cepas foram incubadas com 5%, 10%, 20% e 40% de soro por 1h a 37°C e a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução da resazurina. Os dados representam as medianas, os valores mínimos e máximos de dois experimento realizado em triplicata. A linha pontilhada representa a porcentagem de 50% de viabilidade. 30

Figura 5 – Viabilidade das promastigotas da cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis* e de Ba199 em fase exponencial (terceiro dia de cultivo) e estacionária (quinto dia de cultivo) de crescimento *in vitro* após exposição a 10% (cepa viscerotrópica) e 8% (Ba199) de soro humano. Os dados representam as medianas, os valores mínimos e máximos de um experimento realizado em triplicata. 31

Figura 6 - Porcentagem de macrófagos infectados (A), proporção de parasitos por célula infectada (B) e índice de infecção (C) de Ba199 e da cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis*. Brevemente, BMDMs foram incubados na presença das formas promastigotas de fase estacionária das duas cepas (proporção de 10:1) durante 18h a 26°C. Após a remoção dos protozoários não internalizados, as células infectadas permaneceram incubadas por mais 12h a 37°C (5% de CO₂ e 95% de umidade). Os dados representam as medianas, os valores mínimos e máximos da contagem de 200 BMDMs em triplicata/cepa. 32

Figura 7 – BMDMs infectados com a cepa viscerotrópica (A), Ba199 (B) e controle não infectado (C). As cabeças de seta (Δ) indicam as amastigotas intracelulares. Aumento 1.000x. 33

LISTA DE ABREVIATURAS

B.O.D.: Demanda Biológica de Oxigênio;

BMDMs: *Bone marrow-derived macrophage* (Macrófagos derivados de medula óssea);

BPL: *Bauhinia purpurea lectin*

CI₅₀: Concentração inibitória em 50%;

DALYs: *Disability-adjusted life years* (Anos de vida ajustados por incapacidade);

DCs: *Dendritic cells* (Células dendríticas);

DMSO: Dimetilsulfóxido;

IDRM: Intradermoreação de Montenegro;

IFN- γ : Interferon-gama;

IL: Interleucina;

LC: Leishmaniose Cutânea;

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa;

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada;

LDPK: Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar;

LMC: Leishmaniose Mucocutânea;

LPG: Lipofosfoglicano;

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana;

LV: Leishmaniose Visceral;

LVC: Leishmaniose Visceral Canina;

MAC: *Membrane Attack Complex* (Complexo de Ataque à Membrana);

MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe II;

NETs: *Neutrophil Extracellular Traps* (Armadilha extracelular de neutrófilos);

NK: *Natural killer*;

NO: Óxido nítrico;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase);

PNA: *Peanut lectin of Arachis hypogaea*

PSG: *Parasite secretory gel*;

qPCR: *Quantitative real-time PCR* (PCR em tempo real)

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism*;

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas de oxigênio);

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*;

SFB: Soro Fetal Bovino;

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação;

SMF: Sistema Fagocitário Mononuclear;

SNP: *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismos de nucleotídeos simples);

TGF- β : Fator transformador do crescimento-beta;

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa;

VP: Vacúolo Parasitóforo;

WHO: *World Health Organization*;

α -MEM: *Minimum Essential Medium Alpha modification*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leishmania* e as leishmanioses

Os registros mais antigos sobre as leishmanioses consistem em textos que remontam a 1500-2500 antes de Cristo (a.C.) e achados paleoparasitológicos de 2050-1650 a.C. (ZINK et al., 2006; STEVERDING, 2017). Durante a Idade Média, diversos povos do Oriente foram acometidos pelas formas cutâneas da doença, sendo que nos relatos a enfermidade recebia nomes locais, como: botão do Oriente, furúnculo de Aleppo, erupção de Bagdá e dor de Balkh (KUMAR, 2013). Em 1571, os colonizadores espanhóis foram os primeiros a reportar sobre as condições da face de trabalhadores nos Andes peruanos, os quais apresentavam nariz e lábios desfigurados (LAINSON, 2010; STEVERDING, 2017). Embora esta tenha sido uma das primeiras descrições da leishmaniose nas Américas, representações em cerâmica das deformidades faciais foram encontradas em sítios arqueológicos remanescentes do século V (TUON; NETO; AMATO, 2008).

O primeiro relato da leishmaniose visceral (LV) data de um artigo publicado em 1827 pelo cirurgião William Twining, o qual descreve o aumento do baço, anemia aguda e febre intermitente de um paciente indiano (KUMAR, 2013; STEVERDING, 2017). Em 1885, o médico David D. Cunningham foi o primeiro a observar o agente causador da LV e das lesões cutâneas (STEVERDING, 2017). O agente etiológico, entretanto, só foi formalmente descrito e classificado em 1903 pelo médico Ronald Ross, com auxílio dos dados publicados pelo patologista William B. Leishman e o médico Charles Donovan (ROSS, 1903; LAINSON, 2010; STEVERDING, 2017).

Atualmente, sabe-se que as leishmanioses consistem em um complexo de doenças graves e negligenciadas, que afetam milhões de pessoas por toda a região tropical e subtropical, abrangendo desde as áreas de florestas úmidas das Américas aos desertos no

oeste da Ásia e o sul da Europa, variando entre ambientes naturais, periurbanos à urbanos (HERWALDT, 1999; WHO, 2010). Essa moléstia infecciosa é causada por protozoários digenéticos (heteroxenos) pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903), família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida (LAINSON; SHAW, 2005; SUNTER; GULL, 2017). Essa divisão em subgêneros *Leishmania* e *Viannia* se dá de acordo com os sítios anatômicos de desenvolvimento do parasito no tubo digestivo do inseto vetor, sendo que o primeiro se desenvolve no intestino médio e anterior (conforme descrito no tópico 1.2) e o segundo no intestino posterior de onde migra para as regiões antecedentes, respectivamente (LAINSON; SHAW 1987; ASSIS et al., 2012). O subgênero *Viannia* é restrito ao Novo Mundo, enquanto *Leishmania* (*Leishmania*) circula na América Latina e no Velho Mundo (KERR, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2010).

Os parasitos do gênero *Leishmania* exibem uma grande variedade de morfologias celulares, que são adaptadas ao hospedeiro vertebrado e ao vetor, sendo as duas principais formas: promastigota e amastigota. As promastigotas flageladas são encontradas no tubo digestivo do inseto vetor, enquanto que as amastigotas sem flagelo aparente são intracelulares obrigatórias, podendo ser identificadas nas células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) do mamífero infectado (BATES, 2007). Embora a morfologia dessas duas formas varie, a arquitetura celular básica é conservada entre elas, sendo que alojado dentro da célula há um núcleo oval e uma mitocôndria única que ocupa grande parte do citoplasma, esta possui ainda uma região em formato de bastão conhecida como cinetoplasto (característica diagnóstica dos tripanossomatídeos) (ALEMAN, 1969; SUNTER; GULL, 2017). O flagelo (aparente e altamente móvel das promastigotas e não aparente das amastigotas) é conectado ao corpo celular através do corpo basal, o qual está situado dentro da bolsa flagelar (LACOMBLE et al., 2009; GLUENZ et al., 2015) (Figura 1A).

A transmissão do parasito dá-se através do repasto sanguíneo das fêmeas do inseto vetor, os quais pertencem aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e ordem Diptera (BATES; ROGERS, 2004). Sendo o primeiro prevalente na região Paleártica, incluindo os ecossistemas desérticos e semiáridos da Europa, Ásia, o norte da África e a península Arábica, enquanto o segundo ocorre na América Latina (ORYAN; AKBARI, 2016). Atualmente, são conhecidas cerca de 800 espécies de flebotomíneos, sendo que 98 delas são consideradas vetores comprovados das leishmanioses (AKHOUNDI et al., 2016). Esses dípteros são conhecidos por seu tamanho diminuto (1,5 – 2mm de comprimento), pelo corpo piloso, o comportamento de manter as asas eretas durante o pouso, voo saltitante, hábito crepuscular e pós-crepuscular, bem como o fato das formas imaturas se desenvolvem sob resíduos orgânicos dispostos em ambientes úmidos (KILLICH-KENDRICK, 1999; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão das leishmanioses são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei*, *L. migonei* (para os casos de leishmaniose cutânea), *L. longipalpis* e *L. cruzi* (para os casos de LV) (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

Atualmente são conhecidas cerca de 33 espécies de *Leishmania*, das quais aproximadamente 20 são capazes de causar patologias (WHO, 2010). Além dos seres humanos, as leishmanioses podem acometer um amplo espectro de mamíferos sendo as principais ordens: Carnivora (canídeos e felídeos), Rodentia (ratos e outros roedores), Primata (macacos e demais símios), Marsupialia (gambás e cuícas), Cingulata (tatus), Pilosa (preguiças e tamanduás), Chiroptera (morcegos), Perissodactyla (antas, equinos e asininos), Artiodactyla (porcos, catetos, cervídeos, bovinos e ovinos) e Lagomorpha (coelhos e lebres), que são tomados como reservatórios do protozoário e que podem ou não desenvolver sinais clínicos decorrentes da infecção (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; MOLINA et al., 2012;

ROQUE; JANSEN, 2014; BRASIL, 2017). Conforme o envolvimento destes hospedeiros, a doença assume dois perfis de transmissão principais: zoonótico – quando envolve o reservatório animal – e antroponótico – quando o parasito circula somente entre seres humanos –, sendo que em ambos os casos o agente etiológico precisa do inseto vetor para completar seu ciclo biológico (DESJEUX, 2004; WHO, 2010; BRASIL, 2017).

Em áreas urbanas onde existe a transmissão da LV, o principal reservatório do parasito são os cães (*Canis familiaris*) domiciliados e de rua, sendo o sacrifício dos indivíduos soropositivos ou positivos no teste parasitológico direto a principal medida de controle da endemia, já que esses casos precedem o aparecimento da doença em humanos (DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2014; BRASIL, 2016). Nos focos de leishmaniose cutânea (LC), entretanto, esses animais são tomados como hospedeiros acidentais e, desde que a forma clínica e a espécie de *Leishmania* causadora sejam identificadas, a eutanásia não é preconizada (DANTAS-TORRES, 2007; SANCHES et al., 2016; BRASIL, 2017). A LV e LC também já foram relatadas em gatos (*Felis catus*), bem como, em animais silvestres e sinantrópicos que habitam o ambiente rural e periurbano, como: raposas (*Lycalopex vetulus*), cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), gambás (*Didelphis albiventris*), ratos (*Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) (DUARTE et al., 2010; LARA-SILVA et al., 2014; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; CALDART et al., 2017).

1.2. Ciclo biológico e processo de metaciclogênese

Como algumas espécies de dípteros, a hematofagia é realizada somente pelas fêmeas de flebotomíneo e faz-se necessária para o desenvolvimento dos ovos (READY, 1979). Assim, o parasito é adquirido quando o vetor se alimenta de sangue infectado, mais especificamente, após a ingestão de células do SMF que contenham amastigotas (BATES, 2007; SUNTER;

GULL, 2017). Durante a digestão, as amastigotas que sobrevivem às enzimas digestivas iniciam sua diferenciação em promastigotas procíclicas, formas pequenas e móveis que exibem alta taxa de multiplicação por divisão binária no bolo alimentar (SUNTER; GULL, 2017). Estas sofrem uma série de modificações, tornando-se promastigotas nectomonadas que rompem a matriz peritrófica (membrana que separa o alimento do epitélio intestinal do inseto), atacam e prendem-se às microvilosidades do intestino médio na porção abdominal (LEHANE, 1997; COUTINHO-ABREU et al., 2010; SUNTER; GULL, 2017). A adesão à parede intestinal é um evento crucial na infecção do hospedeiro invertebrado, pois através dela as leishmanias não são eliminadas com a excreção do conteúdo já digerido. Nessa perspectiva, o flagelo assume a importante função de garantir a fixação através dos hemidesmossomos presentes em sua ponta, bem como das interações glicoproteína-lectina mediadas pelo lipofosfoglicano (LPG) presente na membrana plasmática do protozoário (KILLICK-KENDRICK; MOLYNEUX; ASHFORD, 1974; SACKS et al., 2000).

As promastigotas nectomonadas migram para a porção torácica do intestino médio, onde se transformam em promastigotas haptomonadas, que permanecem fixadas ao epitélio intestinal ou passam pelo processo de metaciclogênese e transformam-se em promastigotas metacíclicas (forma infectante para o hospedeiro vertebrado) (SACKS; PERKINS, 1984; LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). Durante a metaciclogênese ocorrem mudanças estruturais nas moléculas de LPG, a qual é alongada devido a adição de resíduos de glicose e sofre um aumento nas unidades de galactose-manose, bem como há uma superexpressão da glicoproteína gp63 no glicocálix do parasito (BRITTINGHAM et al., 1995; YAO; DONELSON; WILSON, 2003; ASSIS et al., 2012). As promastigotas metacíclicas, por sua vez, estabelecem uma intensa infecção na válvula estomodeal do inseto, o que impede a correta alimentação e estimula a regurgitação dos protozoários presentes nas porções anteriores do intestino, cibário e proboscíde (SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992;

BATES, 2007). Além disso, as leishmanias são capazes de secretar uma matriz gelatinosa, o PSG (*Parasite secretory gel*), que desencadeia a obstrução da parte anterior do tubo digestivo, levando ao comprometimento deste sistema e o refluxo de saliva juntamente com os parasitos (ROGERS; CHANGE; BATES, 2002; BATES, 2007).

Durante o repasto sanguíneo a integridade da pele e dos capilares é danificada, sendo que no local da laceração é formado um “*pool*” com sangue, diferentes tipos de células e componentes da matriz extracelular (RIBEIRO, 1987; MENEZES; SARAIVA; ROCHA-AZEVEDO, 2016). Com a inoculação e regurgitação das promastigotas metacíclicas na solução de continuidade provocada pela picada, os parasitos ficam expostos à um novo microambiente (constituído principalmente por componentes extravasados do sangue) e, aqueles que sobrevivem entram em contato com as células do SFM (ROGERS; CHANGE; BATES, 2002). Um grande conjunto de substâncias presentes na saliva do vetor potencializam o encontro do protozoário com os fagócitos, estas possuem ações vasodilatadoras, anti-coagulantes, quimioáticas para monócitos e imunoreguladoras para determinadas células do sistema imunológico (KAMHAWI, 2000; ROGERS et al., 2004). Além disso, gp63 e LPG desempenham papéis de grande importância para que tal processo ocorra. Basicamente, o alongamento das cadeias de LPG nas leishmanias garante resistência a lise celular mediada pelas proteínas séricas do Sistema Complemento, por atuarem como uma barreira física e impedirem a inserção do Complexo de Ataque à Membrana (MAC - *Membrane attack complex*) (FRANKE et al., 1985; SACKS; SILVA, 1987; PUENTES et al., 1988). A Gp63, por sua vez, é capaz de clivar o componente C3b do Complemento em uma forma inativa (C3bi), impedindo a continuidade da cascata de formação do MAC (BRITTINGHAM et al., 1995; MOSSER; BRITTINGHAM, 1997). Ademais, essas moléculas também atuam no reconhecimento das promastigotas por monócitos, macrófagos e

células dendríticas (DCs - *Dendritic Cells*), consequentemente, são cruciais para sua internalização.

O reconhecimento das promastigotas metacíclicas pelas células do SMF ocorre através de uma gama de receptores presentes nesse fagócitos, são exemplos: receptores do Complemento (CR3 e CR1, que reconhecem as leishmanias opsonizadas com C3bi e C1), receptores para proteína C reativa, receptores de fucose-manose, receptores de fibronectina e receptores para a porção Fc de anticorpos inespecíficos ou específicos (FcR) (SACKS; SHER, 2002; AKILOV et al., 2007; UENO; WILSON, 2012). Uma vez reconhecidas, inicia-se o processo de fagocitose e formação do fagolisossomo, no interior do qual as promastigotas iniciam sua transformação em amastigotas (SPÄTH; DRINI; RACHIDI, 2015). As amastigotas induzem modificações do ambiente fagolisossomal que passa a se chamar vacúolo parasitóforo (VP), de forma a possibilitar sua sobrevivência e proliferação, sendo que após determinado período elas podem romper a célula hospedeira e infectam novos fagócitos (NADERER; MCCONVILLE, 2011).

A metaciclologênese também ocorre nas culturas axênicas de *Leishmania* spp. *in vitro*, podendo ser observadas promastigotas metacíclicas na fase estacionária de crescimento (SACKS; PERKINS, 1984; SACKS, 1989). Embora os mecanismos que regem tal processo ainda não tenham sido bem esclarecidos, sabe-se que é possível induzi-lo expondo os parasitos a pHs baixos e/ou condições anaeróbicas de cultivo (LOUASSINI et al., 1998; ZAKAI; CHANGE; BATES, 1998; BATES, 2008). Atualmente, existem algumas metodologias que permitem a identificação, separação e estudo desses formas, as principais baseiam-se na morfologia do protozoário e nas propriedades das moléculas presentes na membrana plasmática. Baseado nas funcionalidades do LPG e da gp63, é possível segregar as promastigotas metacíclicas com base na lise mediada pelo Complemento ao colocá-las em contato com soro (SACKS; MELBY, 2001; SILVA et al., 2016). Neste caso, as formas

resistentes (promastigotas metacíclicas) permanecem íntegras e as susceptíveis (promastigotas procíclicas) sofrem lise.

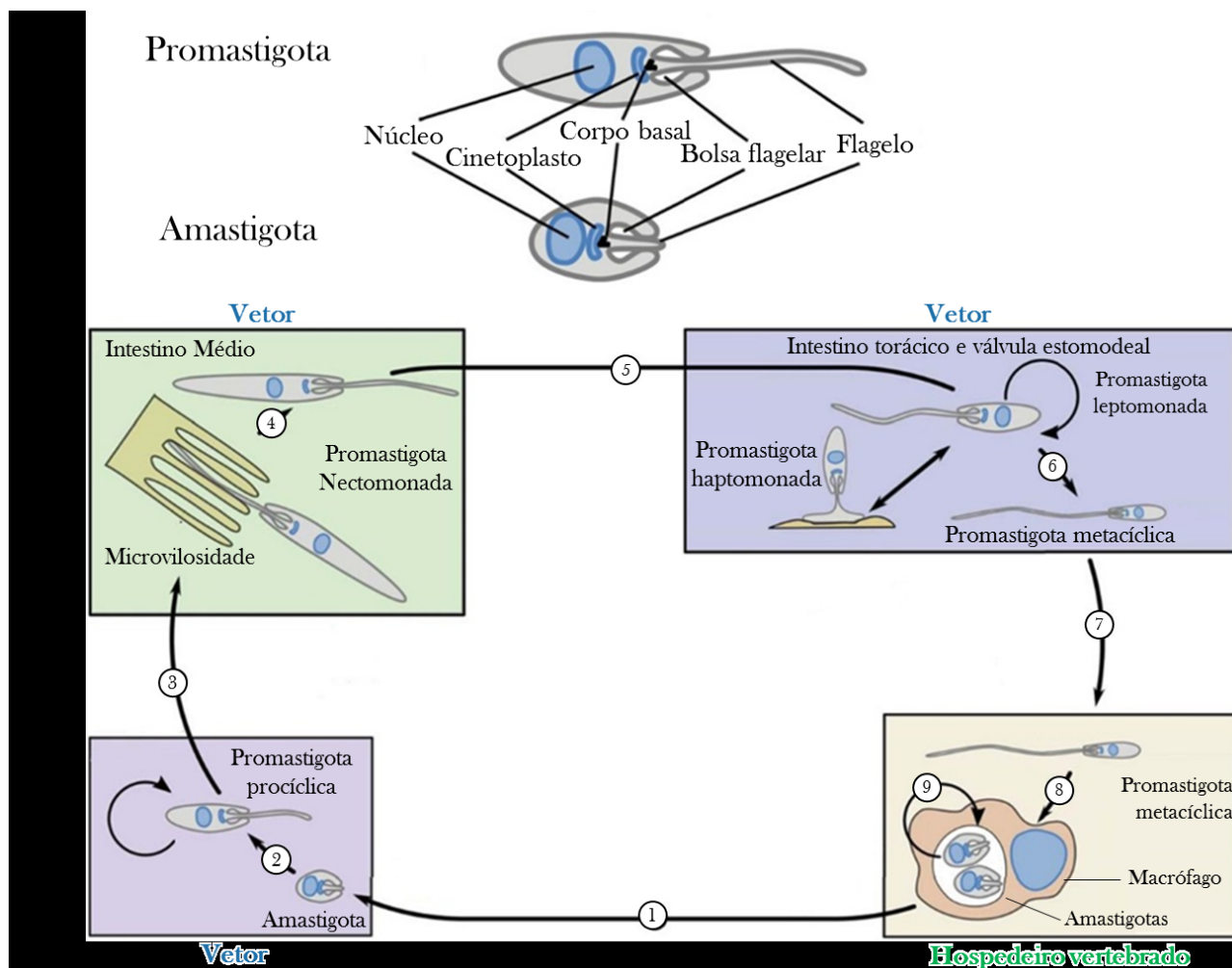


Figura 1 – Diferenças morfológicas entre as formas promastigota e amastigota (A) no ciclo biológico de *Leishmania* (B). Brevemente, ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (1) o inseto vetor ingere células do SFM contendo amastigotas. No trato digestivo do flebotomíneo, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas (2). Em seguida, as promastigotas procíclicas se diferenciam em promastigotas nectomonadas (3), que se ligam nas microvilosidades do intestino médio. Após migrarem para o intestino médio torácico e válvula estomodeal (4-5), as promastigotas nectomonadas dão origem às promastigotas leptomonadas, que podem se dividir e/ou aderir ao epitélio do trato digestivo e se tornarem promastigotas haptomonadas ou se diferenciarem em promastigota metacíclicas (forma infectante - 6). As promastigotas metacíclicas são inoculadas e regurgitadas na solução de continuidade gerada pelo repasto sanguíneo do flebotomíneo e ao encontrarem as células do SFM, são reconhecidas e fagocitadas (8). No vacúolo parasitóforo, as promastigotas metacíclicas se diferenciam novamente em amastigotas, as quais proliferam e ao romperem a célula hospedeira podem infectar novas células (9). As formas proliferativas são indicadas setas circulares (Adaptado de SUNTER; GULL, 2017).

Outras técnicas que podem ser empregadas para obtenção de populações homogêneas de promastigotas metacíclicas, são: aglutinação com lectina do amendoim (*Peanut lectin of Arachis hypogaea* – PNA), com lectina de *Bauhinia purpurea* (*Bauhinia purpurea lectin* - BPL), com anticorpos específicos para LPG, centrifugação em gradiente de densidade e pela análise do tamanho/granulosidade por citometria de fluxo (MCCONVILLE et al., 1992; SPÄTH; BEVERLEY, 2001; PINTO-DA-SILVA et al., 2002; GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; PINTO-DA-SILVA, 2005; SARAIVA et al., 2005).

1.3. Relação parasito-hospedeiro

A partir da inoculação das formas metacíclicas na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro, a qual determinará a expressão clínica e a evolução da doença. Os neutrófilos são as primeiras células que migram para o local da infecção, onde liberam mediadores tóxicos, como as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs - *Neutrophil Extracellular Traps*), que capturam e promovem a morte das leishmanias (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009). O LPG é uma das principais moléculas que induzem a NETosis (processo de formação das NETs), embora algumas espécies de *Leishmania* sejam mais ou menos capazes de desencadeá-la (MENEZES; SARAIVA; ROCHA-AZEVEDO, 2016). Além desse papel, os neutrófilos também são capazes de fagocitar as promastigotas metacíclicas, entretanto, a principal célula onde as amastigotas se estabelecem são os macrófagos.

Uma vez que o parasitos são reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos, ocorre a fusão do fagossomos com lisossomos (organelas que contém enzimas proteolíticas e moléculas microbidas), formando o fagolisossomo. Com vista ao fato de que é criado um microambiente inóspito, as promastigotas metacíclicas recém internalizadas são capazes de

degradar algumas enzimas através da gp63 e modificar o ambiente intracelular, tornando-o apropriado para sua diferenciação em amastigotas e replicação (BURCHMORE; BARRETT, 2001; LODGE; DESCOTEAUX, 2005; SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016). Ainda nessa perspectiva, algumas espécies de *Leishmania*, como *L. amazonensis*, são capazes de alterar o tráfego intracelular de membranas e promover a fusão de endossomos primários com o VP (COURRET et al., 2002). Essa é uma estratégia para diluir o efeito do óxido nítrico (NO) e das espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*), que constituem as principais moléculas com ação leishmanicida (WILSON et al., 2008; HORTA et al., 2012). Assim, assume-se a existência de dois tipos de VPs: os grandes e com múltiplos protozoários – comuns nas infecções ocasionadas por alguns parasitos do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) – e os pequenos com uma única amastigota por vacúolo – comuns para o subgênero *Viannia* (ANTOINE et al., 1998; REAL; MORTARA; RABINOVITCH, 2010).

Com a descoberta das subpopulações de células T CD4⁺, a natureza da resposta imunológica celular tornou-se a “chave” para definição do quadro clínico e progressão da doença, sendo proposta um paralelo entre resistência/susceptibilidade conhecido como dicotomia Th1/Th2. Brevemente, a resistência à *Leishmania* spp. está associada à capacidade das células T CD4⁺ auxiliares (subpopulação Th1) em reconhecer antígenos específicos e estimular a produção de interferon-gama (IFN- γ) (KIMA; SOONG, 2013; FILIPE-SANTOS et al., 2009). O IFN- γ , juntamente com o fator de necrose tumoral (TNF- α) induzem a expressão de NO e de ROS em macrófagos infectados (OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015). Além disso, a eliminação do parasito também está ligada à produção de interleucina-12 (IL-12), IL-17, IL-1 β e do desenvolvimento de células T CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos) e *Natural killer* (NK), que promovem a morte das amastigotas intracelulares através da ativação dos fagócitos ou por eliminação das células infectadas (SERBINA et al., 2008; BELKAID et al., 2002; SCOTT; NOVAIS, 2016). Por outro lado, a susceptibilidade está relacionada à ativação

de células da subpopulação Th2, as quais são responsáveis por suprimir a resposta imunológica por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como: IL-4, IL-5 e IL-13 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). A supressão da resposta imunológica também está ligada ao desenvolvimento de células T regulatórias, a produção de IL-10 e do fator transformador do crescimento-beta (TGF- β) (BELKAID et al. 2002; BELKAID et al., 2001; HORTA et al., 2012).

Embora muitos autores ainda defendam a importância da dicotomia Th1/Th2 no curso da doença, pesquisas recentes apontam que a resistência ao parasito não é exclusivamente explicada com base em respostas celulares, mas sim em um conjunto de mecanismos ainda não elucidados (ALEXANDER; BRYSON, 2005). Fatores como a constituição genética, status sanitário e nutricional também devem ser considerados como determinantes no processo de infecção e evolução da enfermidade, pois eles condicionam a fisiologia e a capacidade do organismo de reagir ao agente agressor. Além disso, o quadro clínico e sua gravidade podem variar conforme a espécie de *Leishmania* envolvida (WHO, 2010).

1.4. Manifestações clínicas

Em seres humanos, as manifestações da leishmaniose são diversas, porém, na maioria dos casos resultam em quatro formas clínicas principais: LC, LV, leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose dérmica pós-kalazar (LDPK) (DESJEUX, 2004; WHO, 2010). A LC, em particular, apresenta-se de duas formas distintas conforme a distribuição das lesões, sendo elas: leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (DESJEUX, 2004; HARTLEY et al., 2014; AZEVEDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014).

A LCL é causada principalmente por: *L. (Leishmania) tropica* e *L. (L.) major* no Velho Mundo, *L. (L.) mexicana*, *L. (Viannia) panamanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L.*

(*L.*) *amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* no Novo Mundo (WHO, 2010; BRASIL, 2017). A LCD têm como agentes etiológicos: *L. (L.) aethiopica* (Velho Mundo) e *L. amazonensis* (Novo Mundo) (WHO, 2010; BRASIL, 2017). Já a LMC, ocorre devido infecção por *L. braziliensis* e ocasionalmente por *L. panamanensis* ou *L. guyanensis* (AMATO et al., 2008; VAN ASSCHE et al., 2011; BRASIL, 2017). A forma mucocutânea, dá-se devido a disseminação linfática ou hematogênica dos parasitos após um intervalo variável da doença cutânea e sem o correto tratamento pode vir a comprometer as mucosas nasais, orofaríngeas, o trato respiratório superior e ocasionar a completa destruição da pirâmide nasal (AZEVEDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014).

O primeiro sinal clínico da LCL, tipicamente é um pequeno eritema no local onde o flebotomíneo realizou o repasto sanguíneo, que se desenvolve após um período pré-patente variável (BRASIL, 2017; AMEEN, 2010). O eritema dá origem a uma pápula, a qual em seguida torna-se um nódulo ulcerativo, que progride ao longo de um período de duas semanas a seis meses (AMEEN, 2010). As úlceras típicas da LC geralmente são indolores e apresentam um aspecto arredondado, tamanho variável (de poucos milímetros até 20 centímetros ou mais), bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, fundo granuloso grosseiro, avermelhado e com pouca secreção (AZEVEDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014; BRASIL, 2017). A infecção crônica pode persistir por meses ou anos e geralmente progride para a cura, exceto em casos onde há reativação, na maioria das vezes ocasionada por imunossupressão (REITHINGER et al., 2007).

A LCD, por sua vez, é caracterizada pela presença de múltiplas lesões crônicas nodulares que não curam tão facilmente (CARVALHO et al., 1994). A apresentação inicial é uma única úlcera como na LCL, sendo que após um período variável desenvolvem-se numerosas pápulas foliculares ou acneiformes, pústulas e placas que podem ou não sofrem um processo de necrose central (AZEVEDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014; BRASIL,

2017). Essa forma clínica está relacionada à ausência de uma resposta imunológica celular sustentada, uma vez que os pacientes não respondem tão bem à estimulação com antígenos do parasito (SILVEIRA, 2009; MURRAY et al., 2005). Em oposição à LCL, somente com a terapia adequada há a evolução para a cura clínica, mesmo que os danos teciduais sejam permanentes e possam atuar como estigma estético (YANIK et al., 2004).

A LV é causada por *L. (L.) donovani* no Velho Mundo e *L. (L.) infantum* no Sudeste da Europa, na região do Mediterrâneo e no Novo Mundo (WHO, 2010). As manifestações variam desde infecções assintomáticas ou oligossintomáticas, até um quadro progressivo e potencialmente fatal (BRASIL, 2014). Os achados clínicos caracterizam-se por perda de peso, palidez, fraqueza, febre recorrente, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia, com intenso e difundido parasitismo em órgãos como fígado, baço e medula óssea (WHO, 2010; PEDROSA, 2017). Essa forma é considerada grave principalmente para crianças, idosos e pessoas portadoras de imunodeficiências, sendo a letalidade determinada devido às complicações associadas ao quadro visceral-debilitante, como: infecções secundárias e distúrbios de coagulação sanguínea (BRASIL, 2014; LINDOSO et al., 2016). A LDPK, normalmente é observada nas infecções com *L. donovani*, que após um quadro de LV leva o desenvolvimento de nódulos cutâneos (MURRAY et al., 2005).

No cão, a infecção por *L. infantum* pode variar de um quadro de assintomático à uma forma aguda que leva rapidamente ao óbito. As principais apresentações clínicas da leishmaniose visceral canina (LVC) são: sinais oculares (conjuntivite, ceratoconjuntivite e uveíte), linfadenopatia local ou generalizada, anemia, febre, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, vômito, hiperqueratose, hepatoesplenomegalia, paresia dos membros, caquexia, inanição e morte (ALVAR et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2014). Pode ocorrer ainda, ulcerações na pele e demais acometimentos do tegumento, como:

dermatites, descamação, onicogribose, eczema e alopecia (MADEIRA, 2009; BRASIL, 2014). O parasito pode ser encontrado no baço, fígado, linfonodos, lesões, pele íntegra e medula óssea (ALVAR et al., 2004; FIGUEIREDO; MADEIRA, 2014). Quando infectados com outras espécies de *Leishmania* spp., há o desenvolvimento de uma doença crônica com manifestações semelhantes a LC humana, sendo que o parasitismo se estabelece preferencialmente nas mucosas das vias aerodigestivas superiores (BRASIL, 2017)

Embora seja raro, algumas espécies de *Leishmania* causadoras de LC podem manifestar um amplo espectro de formas clínicas da doença, podendo ser encontradas nas vísceras em um quadro clínico sugestivo de LV. A infecção por *L. amazonensis*, por exemplo, pode variar de assintomática sem lesões aparentes à formas desfigurantes e até mesmo viscerais (BARRAL et al., 1991; FERNANDES et al., 2014). No estudo de Barral e colaboradores (1991), *L. amazonensis* e *L. infantum* foram isoladas de pacientes com LV na mesma localidade no interior da Bahia, nesse caso especula-se que a visceralização possa ter se dado em decorrência da infecção mista entre as duas espécies ou estar relacionada com uma cepa de *L. amazonensis* em particular. Infecções experimentais em hamsters (*Mesocricetus auratus*) comprovaram que a co-infecção entre ambas as espécies agrava o quadro clínico, com *L. amazonensis* invadindo precocemente o baço e o fígado, causando esplenomegalia e lesões locais ou disseminadas (CELESTE et al., 2017). Entretanto, passado determinado tempo, *L. infantum* prevalece no baço e fígado. Outros trabalhos também têm sugerido o desenvolvimento de LVC em animais naturalmente infectados com *L. amazonensis* em áreas urbanas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (TOLEZANO et al., 2007; DIAS et al., 2011; HOFFMANN et al., 2012; SANCHES et al., 2016; VALDIVIA et al., 2017).

Embora fatores do hospedeiro sejam determinantes, variações genéticas e a expressão de determinados fatores de virulência no parasito podem ser a razão da tendência à visceralização de determinadas cepas (SOLIMAN, 2006). Dentre as espécies de *Leishmania*,

a infecção por *L. amazonensis* geralmente se destaca por gerar um cenário onde há a ausência de uma resposta imune celular, o que se dá em função das falhas na apresentação de antígenos e na ativação de linfócitos T (XIN; LI; SOONG, 2008; JI; SUN; SOONG, 2003; WANDERLEY et al., 2012). Recentemente também foi descrito que esse parasito é capaz de expor resíduos de fosfatidilserina em sua superfície, um estratégia rara conhecida como “mimetismo apoptótico” e que conduz a um estado de anergia por meio da produção de IL-10 e TGF- β (WANDERLEY et al., 2012). França-Costa e colaboradores (2012) mostraram experimentalmente que a exposição dessa molécula está correlacionada aos casos onde ocorre a disseminação do parasito. Variações de ordem genética também podem ser a razão da tendência à visceralização, como exemplos destacam-se: o número de cópias de um mesmo gene, polimorfismos de nucleotídeos simples (SNP, *Single nucleotide polymorphism*), a expressão diferencial de proteínas, populações com perfis genéticos distintos e a presença de psdeudogenes (SOLIMAN, 2006; ROGERS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; HARTLEY et al., 2014). No que se refere à última, muito têm-se discutido sobre o papel dos genes codificadores da proteína A2, já que ela está relacionada com uma sobrevivência do parasito no fígado, baço e medula óssea (FERNANDES et al., 2014).

Embora o mecanismo de visceralização de cepas cutâneas de *Leishmania* spp. ainda não esteja claro, o fundo genético e status imunológico do hospedeiro são essenciais para definição da forma clínica causada por esses parasitos. Por exemplo, certos polimorfismos no genes *Slc11a1* (NRAMP1) e do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) promovem um aumento de risco de infecção e a susceptibilidade de determinadas raças de cães a LVC (ALTET et al., 2002; QUINNELL et al., 2003). Co-infecções também podem afetar e alterar o resultado da doença e corroborar para um quadro de disseminação sistêmica, como mostrado por Morgado e colaboradores (2016) ao descreverem a co-infecção entre *Hepatozoon canis* e *L. braziliensis* em dois casos de LVC. Ainda quanto esse estudo, os

autores sugerem que a visceralização se deva ao comprometimento do sistema imunológico desses cães ocasionado pela hepatozoonose ou aumento da virulência por co-infecção.

Sob condições experimentais, a visceralização de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. major*, principais responsáveis pelo desenvolvimento da LCD e LCL, também já foi relatada em camundongos (*Mus musculus*) e hamsters, mostrando que algumas cepas e isolados podem se disseminar para vários órgãos, causando uma patologia similar à LV e LVC (ALMEIDA et al., 1996; ABREU-SILVA et al., 2003; ABREU-SILVA et al., 2004; SOLIMAN, 2006; MAHMOUDZADEH-NIKNAM; KIAEI; IRAVANI, 2007; KOBETS et al., 2012; GOMES-SILVA et al., 2013; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014; SPOTIN; PARVIZI, 2016).

1.5. Epidemiologia

A LV constitui o segundo grupo de afecções parasitárias que mais mata no mundo, ficando atrás somente da malária (WHO, 2010; DESJEUX, 2004). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 350 a 400 milhões de indivíduos encontram-se em áreas de risco de infecção (ALVAR et al., 2012; WHO, 2010). Ainda segundo esses dados, a incidência anual das leishmanioses como um todo é estimada entre 1,3 milhões de novas infecções, sendo 1,0 milhão para a LC e 300.000 para a LV. Quanto à forma visceral, cerca de 20.000-30.000 dos casos evoluem para o óbito do portador (CHAPPUIS et al., 2007; WHO, 2010).

Dos casos de LC, mais de 70% são registrados em países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Iran, Peru, Sudão e Síria (WHO, 2010). Nestes locais, entretanto, têm-se observado um aumento global no número de casos. Isso devido às melhorias no diagnóstico e notificação, bem como resulta do controle falho do vetor e dos

reservatórios (REITHINGER et al., 2007). Ademais, o aumento na susceptibilidade do hospedeiro humano à infecção, seja por imunossupressão, desnutrição, migrações e conflitos étnicos-territoriais, também tem profundos impactos na epidemiologia da doença (DESJEUX, 2001; DU et al., 2016). Essa forma clínica é considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas, principalmente devido a sua capacidade de produzir deformidades que comprometem a vida do indivíduo acometido, com reflexos no campo psicológico, social e econômico (WHO, 2010; DU et al., 2016; BRASIL, 2017). Considerando que a LC é uma doença ocupacional, são perdidos cerca de 42 mil anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs, *Disability-adjusted life years*) (MURRAY et al., 2015).

No continente americano, a LC também é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e distribui-se amplamente do sul dos Estados Unidos até norte da Argentina, exceto no Chile e Uruguai (COSTA, 2008; WHO, 2010). No Brasil, a LTA é causada principalmente por *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, que apresentam ampla distribuição por todas as regiões geográficas, porém, com forte concentração em algumas áreas (COSTA, 2008; COELHO et al., 2011; BRASIL, 2017). Estima-se que no período de 1995 a 2014, a forma cutânea apresentou uma média anual de 25.763 novos casos, com um coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2017). O mesmo estudo ainda aponta que casos autóctones já foram registrados em todas as regiões. Entanto, a real prevalência da LTA em território brasileiro não se encontra plenamente estabelecida, principalmente em virtude da mudança no perfil epidemiológico, subnotificações, diagnósticos incorretos, infecções inaparentes e variações de resposta do hospedeiro (COSTA, 2008). Em 2015, foram notificados 20.817 novos casos, dos quais 1.331 correspondem ao estado de Minas Gerais e dez na região de Uberlândia (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN, 2017).

Como dito, nas últimas décadas algumas análises epidemiológicas da LTA têm sugerido uma inversão no padrão de transmissão da doença. Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres, a LTA acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, seja por exposição ocupacional ou lazer (BRASIL, 2017). Ainda segundo esses dados, observa-se que o perfil epidemiológico alterou-se de silvestre para peridomiciliar, o que acaba por colocar em risco populações rurais e assentadas. Tal mudança é promovida principalmente pelas modificações ambientais feitas pelo homem, por exemplo, o desmatamento e a urbanização mal planejada, que levam os vetores e os reservatórios a entrar em maior contato com os seres humanos (DESJEUX, 2001; ASHFORD, 2000).

A LV apresenta ampla distribuição na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas, sendo que dos 88 países onde a doença é endêmica, 90% dos casos ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil (PIGOTT et al., 2014). O Brasil, em particular, possui o maior número de notificações entre os países da América Latina, sendo responsável por 90% dos registros no continente (WHO, 2010). Em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos somaram 48.455, sendo 66% na região Nordeste (BRASIL, 2014). Os dados ainda apontam que de 2004 a 2014, a média anual no país foi de 3.156 casos, com incidência de dois casos/100 mil habitantes. Em 2015, entretanto, foram registrados 3.319 novas infecções (dos quais 443 correspondentes ao estado de Minas Gerais e dois na região de Uberlândia) (SINAN, 2017).

Em 25 anos de notificação (1990-2015), torna-se evidente o aumento no número de casos, a mudança no perfil de transmissão de rural para urbana e sua expansão no país (BRASIL, 2014; SINAN, 2017). Historicamente, as migrações representaram o principal fator que contribuiu para essa alteração (HARHAY et al., 2011; WHO, 2010). Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos de LV eram notificados no Nordeste, entretanto, com o passar dos anos a doença se expandiu para outras regiões, como Norte, Centro-Oeste, Sudeste

e, recentemente cinco casos autóctones foram registrados no Sul (onde anteriormente não haviam casos de LV) (HARHAY et al., 2011; BRASIL, 2014; SINAN, 2017).

O exame parasitológico é o padrão ouro para o diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Para tal, o material coletado por biópsia é corado e analisado em microscópio óptico para se verificar a presença do parasito (REITHINGER et al., 2007). Outras técnicas, como as de biologia molecular e a intradermoreação de Montenegro (IDRM) também podem ser utilizadas para confirmação dos casos em humanos. O IDRM, no entanto, indica a exposição do indivíduo ao parasito e não a presença do mesmo, sendo recomendado apenas como teste complementar (BRASIL, 2017). A reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase chain reaction*) e a PCR em tempo real (qPCR - *Quantitative real-time PCR*), apesar serem caras e necessitarem de certa infraestrutura, são eficientes mesmo em baixas cargas parasitárias e permitem a caracterização ao nível de espécie através da restrição de fragmentos (PCR-RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*), sequenciamento genômico ou da utilização de iniciadores específicos (GOTO; LINDOSO, 2010; NEITZKE-ABREU et al., 2013). O diagnóstico sorológico é mais usado para confirmação dos casos de LVC, entretanto sua sensibilidade é variável devido a ocorrência de reações cruzadas entre as espécies de *Leishmania*, outros tripanossomatídeos e/ou hemoparasitos (BRASIL, 2017).

O isolamento e manutenção de parasitos em culturas axênicas a partir das lesões de LC, de aspirados de medula em casos de LV ou LVC, também constitui uma metodologia para o diagnóstico das leishmanioses (NEITZKE-ABREU et al., 2013) que, apesar de suas limitações permite o estudo do comportamento biológico de cepas selvagens de *Leishmania* em laboratório. A análise de fatores intrínsecos dos parasitos, como morfologia, genética, perfil bioquímico e dos fatores extrínsecos, que incluem o comportamento nos hospedeiros e em cultura *in vitro*, a resposta imunológica do organismo infectado, as características clínicas

e a distribuição geográfica constituem informações importantíssimas para caracterização dos parasitos (LAINSON; SHAW, 1987).

No que diz respeito às espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, ainda há lacunas no conhecimento de sua biologia. Assim, com vista à importância clínico-epidemiológica da *Leishmania amazonensis* no Brasil, neste trabalho caracterizamos o comportamento *in vitro* de uma cepa selvagem que apresentou um amplo espectro clínico da doença com o intuito de fornecer subsídios para futuros estudos sobre os mecanismos de visceralização. Para tal, foi utilizada como parâmetro de comparação uma cepa dermatrópica de referência da OMS (MHOM/BR/1989/Ba199) para a espécie supracitada. Essa cepa selvagem (referida como cepa viscerotrópica), foi isolada através de uma amostra de aspirado do baço de um cão doméstico atendido no Hospital Veterinário da UFU em 2015, o qual apresentava sinais clínicos compatíveis com a LVC. O parasito foi caracterizada como *Leishmania amazonensis* por meio de PCR-RFLP e a confirmação do quadro visceral se deu por meio da infecção experimental de hamsters com o isolado (dados não mostrados).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o comportamento *in vitro* da cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis* e da cepa referência da OMS (MHOM/BR/1989/Ba199).

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o comportamento de ambas as cepas *in vitro* através da curva de crescimento;
- ✓ Avaliar o processo de metaciclogênese de ambas as cepas através da resistência às proteínas séricas do Complemento por meio do ensaio de redução da resazurina;
- ✓ Avaliar a infectividade/virulência de ambas as cepas à macrófagos murinos através da porcentagem de células infectadas, da quantidade de parasitos/célula e do índice de infecção;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo e manutenção de parasitos

A cepa viscerotrópica e MHOM/BR/1989/Ba199 (referida como Ba199) foram cultivadas separadamente em meio α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle* - Sigma Aldrich Inc., Estados Unidos da América - EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB - Life Technologies, EUA), 2mM de L-glutamina (Sigma Aldrich Inc., EUA), 100U/mL de penicilina (Sigma Aldrich Inc., EUA), 100 μ g/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich Inc., EUA), 400 μ g/mL de gentamicina (Vetec, Brasil) e 20mM de HEPES (Sigma Aldrich Inc., EUA) em garrafas de 25cm² (Sarsted AG & Co., Alemanha), sendo incubadas em estufa B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio – Lucadema, Brasil) a 24 $\pm$ 1°C.

Sempre que necessário, os parasitos foram repicados entre o 3-5º dias de cultivo, sendo as novas culturas iniciadas com 10⁵ promastigotas/mL. Congelamentos foram realizados utilizando 10% de glicerol (Sigma Aldrich Inc., EUA), sendo os *vials* criopreservados em nitrogênio líquido.

3.2. Curva de crescimento

A avaliação do desenvolvimento e multiplicação das formas promastigotas foi realizada através da curva de crescimento. Para tal, culturas iniciadas com 10⁵ promastigotas/mL foram acompanhadas por sete dias consecutivos, no mesmo horário. Basicamente, uma alíquota das culturas foi diluída em solução de ISOTON (ácido cítrico 0,05M, cloreto de sódio 0,12M, formaldeído 0,5% v/v, pH 7,2). Em seguida, a solução foi diluída novamente em igual volume (1:1) de Azul de Tripan (0,4% p/v – corante vital), aplicada em câmara hemocitométrica (Kasvi, Brasil) e analisada em microscópio óptico (aumento de 40x) (GORJÃO, 2005;

STODDART, 2011). O número de parasitos por mililitro de cultura foi determinado pela média aritmética dos quatro quadrantes multiplicada pelo inverso da diluição e, novamente, por 10000 (fator de correção da câmara) (MINEO et al., 2016).

Em paralelo, as culturas foram fotografadas nas fases exponencial (terceiro dia de cultivo) e estacionárias (quinto dia de cultivo) de crescimento *in vitro* para avaliação da diversidade morfológica dos parasitos, em particular das formas proliferativas. Para tal, foi utilizado o microscópio EVOS® XL *Core Cell Imaging System* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.3. Avaliação da metaciclogênese *in vitro*

Para este ensaio foi utilizada a metodologia de resistência às proteínas séricas do Sistema Complemento, descrita por Silva e colaboradores (2015) com modificações. Brevemente, alíquotas de aproximadamente 2mL das culturas foram coletadas em fase estacionária de cultivo, centrifugados a 3500rpm por 10min e lavados tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2). Após isso, o número de parasitos foi ajustado para 1×10^6 promastigotas/100 μ L de meio incompleto/poço de uma placa com 96 poços, sendo a mesma incubada por 1h a 37°C em estufa com 5% de CO₂ (CO₂ Incubator MCO-19IAUV-PA, Panasonic Corp., Japão) na ausência e presença de diferentes concentrações de soro humano (5%, 10%, 20% e 40%) para definição da concentração inibitória de 50% (CI₅₀). Passado este tempo, o número de parasitos vivos foi determinado pelo ensaio de redução da resazurina, como descrito por Corral e colaboradores (2013). Basicamente, foi adicionado aos poços 10% v/v de uma solução de resazurina (0,15mg/mL - Sigma-Aldrich Inc., EUA), sendo a placa incubada novamente a 24 $\pm$ 1°C *overnight* e lida em fluorímetro Spectramax M2 (Molecular Devices LLC, EUA) com 550nm de excitação e 590nm de emissão. Formas promastigotas incubadas

com 10% de SFB foram utilizadas como controle, sendo a porcentagem de viabilidade estabelecida com base nos dados de leitura dos parasitos tratados com soro humano $\times 100$, dividido pelos respectivos controles.

Após o estabelecimento da CI_{50} , os parasitos foram expostos a 10% (cepa viscerotrópica) e 8% (Ba199) de soro humano seguindo os mesmos passos descritos acima.

3.4. Cultivo e manutenção de células

Macrófagos murinos derivados de medula óssea imortalizados (BMDMs) foram cultivados em garrafas de 25cm² com meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium* - Sigma Aldrich Inc., EUA) suplementado com 2,0g/L de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich Inc., EUA), 20% de SFB, 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 400µg/mL de gentamicina e 20mM de HEPES. A incubação foi realizada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e 95% de umidade.

Subculturas (repiques) foram realizados a cada três dias ou quando a monocamada atingiu uma confluência próxima a 100%. Quando necessário, as células foram congeladas com 50% de meio de congelamento (DMSO – dimetilsulfóxido – diluído 1:9 em SFB).

3.5. Infecção de macrófagos

Para a infecção *in vitro*, BMDMs cultivados até a confluência aproximada de 100% foram raspados do fundo da garrafa com auxílio do *cell-scraper* e uma alíquota da suspensão celular foi reservada para contagem de células em câmara hemocitométrica, como descrito no tópico 3.2.

Após tal procedimento, a concentração de BMDMs por poço foi ajustada para 5×10^5 macrófagos/mL e as células foram alocados em placas de 24 poços (TPP, EUA) contendo lamínulas (13 mm). A placa foi incubada *overnight* (37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade) até a completa adesão dos macrófagos. Em paralelo, os parasitos foram contados e a proporção de promastigotas/célula foi ajustada para 10:1 em um volume final de 500µL de meio RPMI 1640 completo acrescido de 30mM de glicose (Sigma Aldrich Inc., EUA).

Os parasitos foram incubados juntamente com os macrófagos por 18h a 26°C em estufa B.O.D. Após isso, os poços foram lavados três vezes com meio RPMI 1640 incompleto e as células infectadas foram incubados a 37°C (5% de CO₂ e 95% de umidade) por mais 12h. Após este tempo, os poços foram lavados novamente e as lamínulas foram retiradas cuidadosamente, coradas com Panótico rápido (Laborclin LTDA, Brasil), montadas em lâminas com o auxílio de Bálsamo do Canadá (Sigma-Aldrich Inc., EUA) e analisadas em microscópio ótico (aumento de 100x).

A porcentagem de macrófagos infectados (número de BMDMs infectados $\times$ 100/número de BMDMs contados), o número médio de amastigotas/célula infectada e o índice de infectividade (porcentagem de BMDMs infectados $\times$ [número de amastigotas/macrófago infectado]) foram determinadas após a contagem de 200 macrófagos por lamínula, preparadas em triplicata.

3.6. Análise estatística

As médias do número de promastigotas/mL e desvios padrões (DP) de três contagens foram calculados, expressos em um gráfico gerado no GraphPad® InStat 5 (GraphPad Software Inc, EUA) e analisados pelo teste *t* de Student (amostras paramétricas). Para as porcentagens de promastigotas resistentes às proteínas do Complemento, bem como para a

taxa de infecção, número de amastigotas/célula e o índice de infectividade os dados são apresentados como medianas e valores mínimos e máximos, sendo estes resultados submetidos ao teste de Mann Whitney (amostras não paramétricas). Em todas as análises foi considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Os valores de CI_{50} foram calculados através da regressão não linear das médias dos valores encontrados para cada concentração utilizando o programa Origin Pro 8.5 (OriginLab Corp., EUA).

4. RESULTADOS

3.1. Curva de crescimento

Ambas as cepas foram cultivadas a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante sete dias e o número de promastigotas/mL foi acompanhado diariamente por contagem em câmara hemocitométrica. A Figura 2 mostra uma maior proliferação dos parasitos após o segundo dia de cultivo, caracterizando a fase exponencial de crescimento. As culturas atingiram o pico no quarto dia, sendo o número máximo de parasitos de aproximadamente $5,12 \times 10^7/\text{mL}$ para Ba199 e $5,90 \times 10^7/\text{mL}$ para a cepa viscerotrópica. A partir desse dia, a proliferação diminuiu dando início a fase estacionária, a qual não é perceptível na curva da cepa viscerotrópica devido a morte de uma grande quantidade de parasitos. Após o sexto dia, iniciou-se a fase de declínio, marcada pela queda brusca no número de promastigotas/mL.

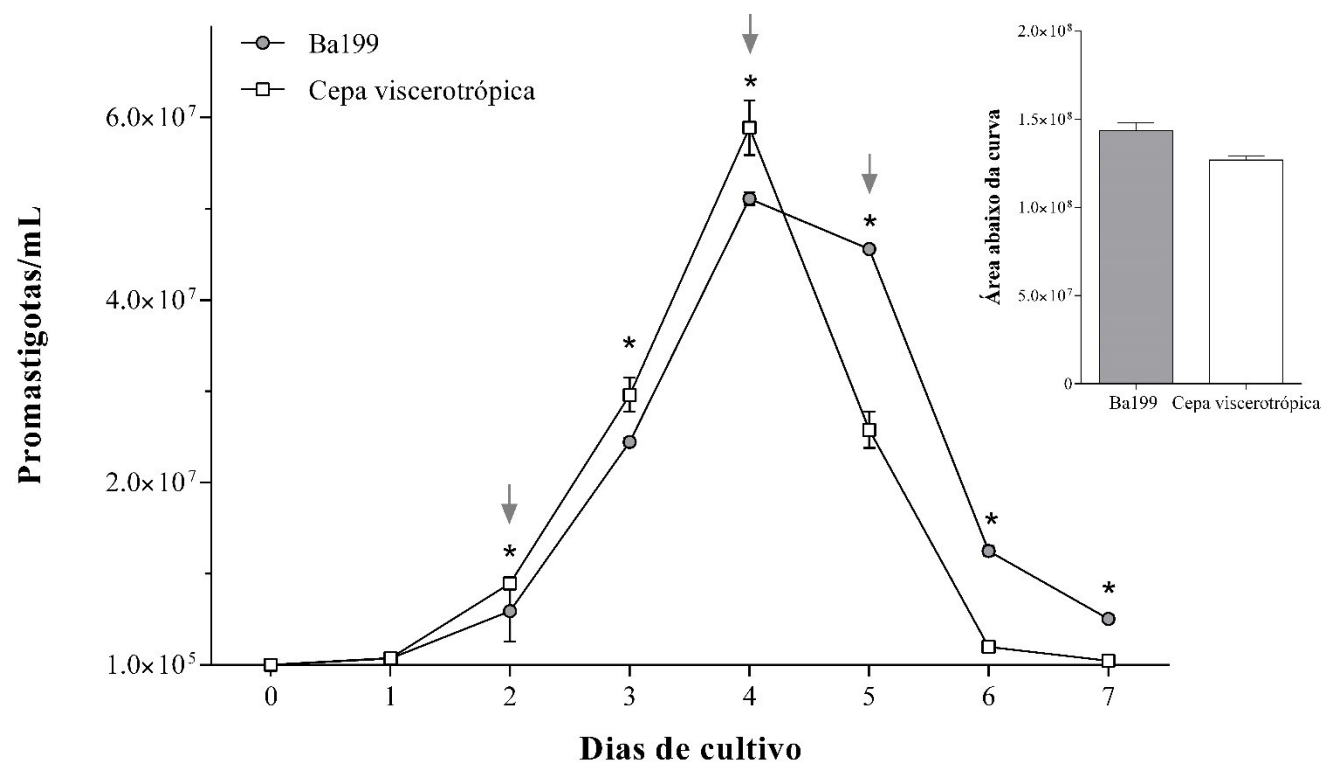


Figura 2 – Curva de crescimento *in vitro* da cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis* e de Ba199. Os parasitos foram cultivados em meio quimicamente definido α -MEM e mantidos à temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada ponto representa a média $\pm$ DP de três contagens realizadas em paralelo no mesmo dia e horário. As setas ($\downarrow$) indicam o início das fases de crescimento exponencial, estacionária e declínio, respectivamente. O gráfico de inserção mostra a área abaixo da curva (AUC – *area under curve*), evidenciando que ambas as cepas apresentam o mesmo perfil de crescimento. * $p < 0,05$ (número de promastigotas/mL de Ba199 em comparação com a cepa viscerotrópica), obtido pelo teste *t* de Student.

Apesar de ter sido observada diferença estatística entre o número de promastigotas/mL de ambas as cepas do segundo ao sétimo dia de cultivo ($p < 0,05$), os perfis de curvas são semelhantes, conforme evidenciado pela análise das áreas (AUC - *Area under curve*) (Figura 2). Quanto aos aspectos morfológicos, ambas as culturas exibiram durante a fase exponencial pequenos grumos (rosáceas) de parasitos presos pelo flagelo (Figura 3). Essas formas, permaneceram viáveis até o quarto dia, após o qual muitas promastigotas apresentavam-se imóveis e/ou não estavam íntegras.

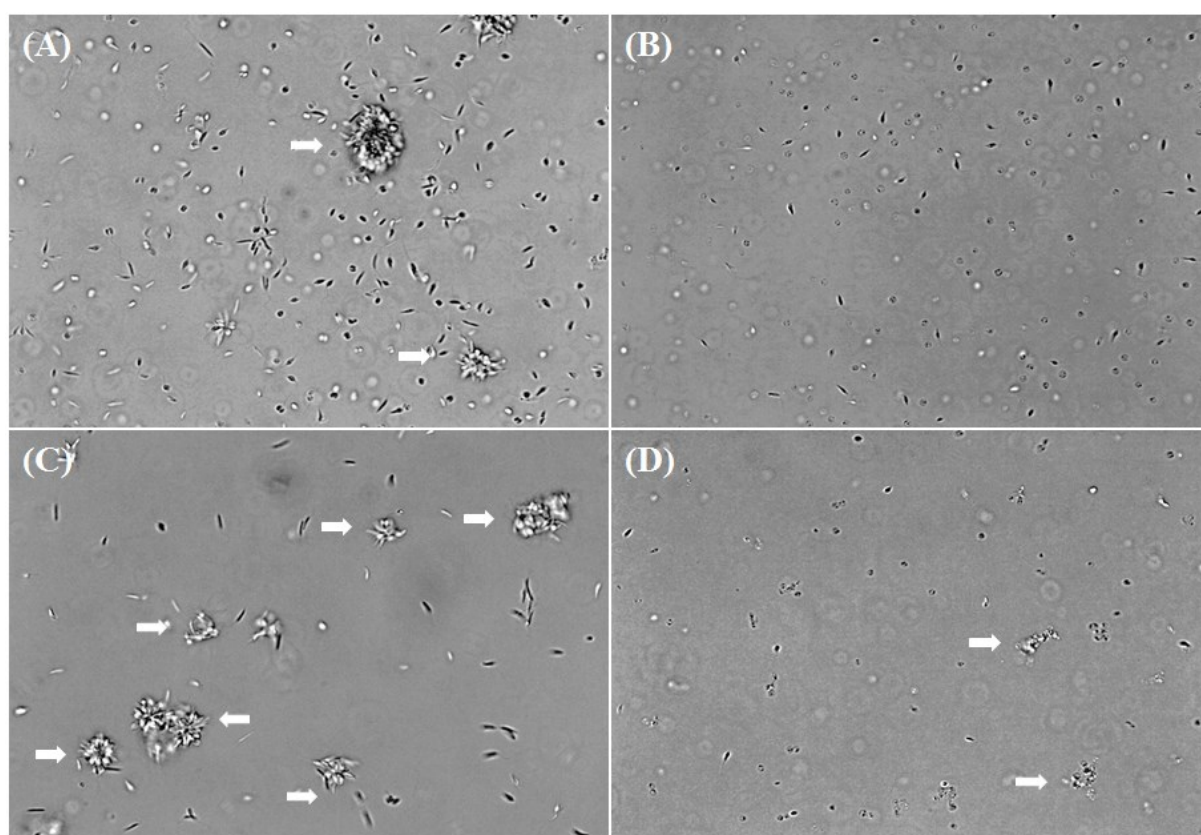


Figura 3 – Diversidade morfológica das culturas de Ba199 (A e B) e da cepa viscerotrópica (C e D) de *Leishmania amazonensis*. Os aspectos morfológicos foram analisados por microscopia óptica durante as fases logarítmica (terceiro dia de cultivo, A e C) e estacionária (quinto dia de cultivo, B e D) de crescimento *in vitro*. As setas (→) indicam as rosáceas íntegras e mortas. Aumento de 500×.

3.2. Avaliação da metaciclogênese *in vitro*

Como dito anteriormente, o processo de metaciclogênese é acompanhado por um aumento na resistência a lise mediada pelas proteínas séricas do Sistema Complemento, sendo assim, é possível comparar as porcentagens de promastigotas metacíclicas em culturas *in vitro*. Entretanto, para tal faz-se necessário estabelecer a concentração ideal de soro que promova a lise da mesma proporção de parasitos. A Figura 4 mostra que ambas as cepas em fase estacionária exibiram morte dependente da concentração de soro humano, sendo que a partir das porcentagens de viabilidade foi possível estabelecer uma CI_{50} de aproximadamente 10% para cepa viscerotrópica e 8% para Ba199.

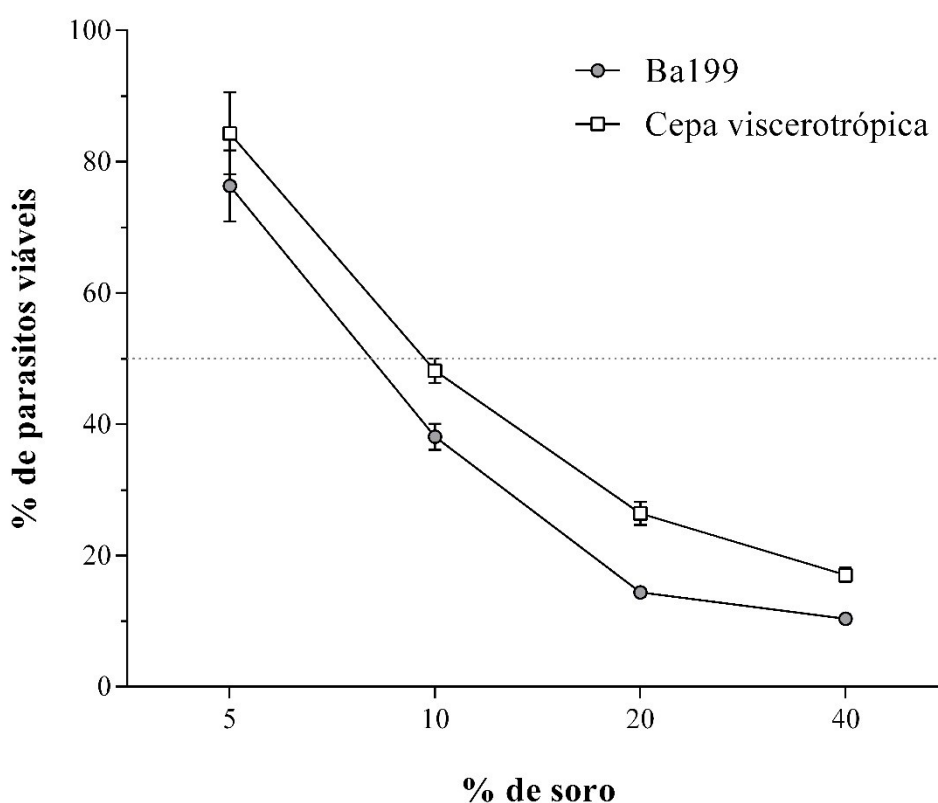


Figura 4 – Porcentagem de parasitos viáveis após exposição a diferentes concentrações de soro humano. Basicamente, as promastigotas em fase estacionária de ambas as cepas foram incubadas com 5%, 10%, 20% e 40% de soro por 1h a 37°C e a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução da resazurina. Os dados representam as medianas, os valores mínimos e máximos de dois experimento realizado em triplicata. A linha pontilhada representa a porcentagem de 50% de viabilidade.

Com o intuito de avaliar a porcentagem de promastigotas metacíclicas nas culturas *in vitro*, ambas as cepas em fase exponencial (terceiro dia de cultivo) e estacionária (quinto dia de cultivo) foram expostas a 10% (cepa viscerotrópica) e 8% (Ba199) de soro humano. Na Figura 5 é possível observar que $66\pm 2,6\%$ das promastigotas de Ba199 e $68\pm 3,2\%$ da cepa viscerotrópica em fase exponencial apresentavam-se viáveis após exposição ao soro. Já na fase estacionária, $92\pm 5,3\%$ das promastigotas de Ba199 e $85\pm 0,4\%$ da cepa viscerotrópica permaneceram viáveis. Foi observado um aumento médio de aproximadamente $1,3\times$ na quantidade de parasitos resistentes entre os dias testados para ambas as cepas, embora não existam diferenças estatísticas ($p>0,9$).

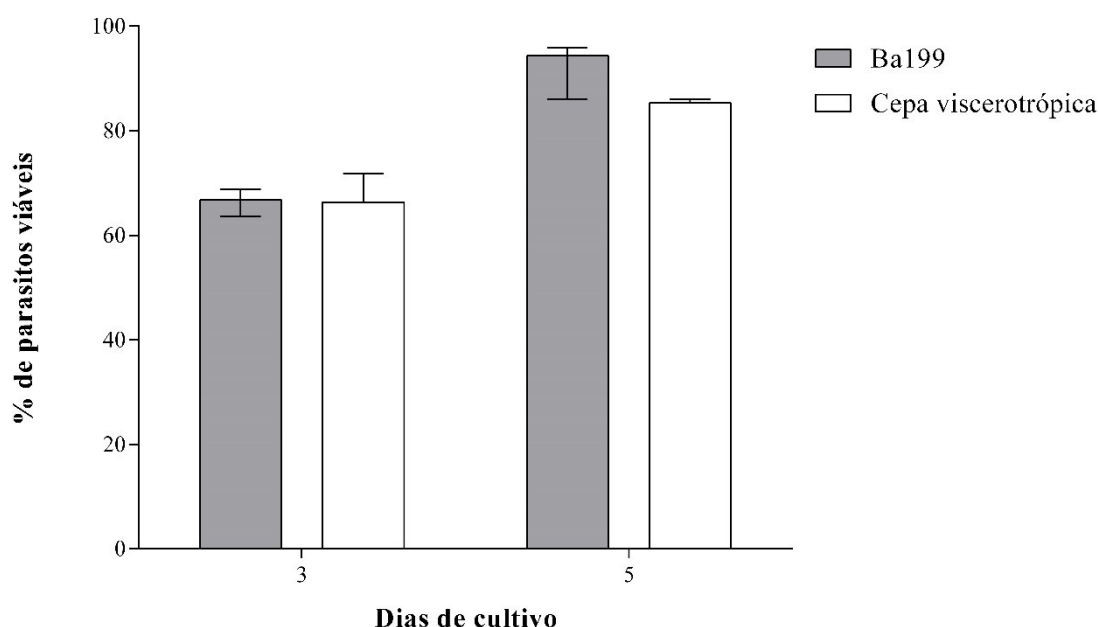


Figura 5 – Viabilidade das promastigotas da cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis* e de Ba199 em fase exponencial (terceiro dia de cultivo) e estacionária (quinto dia de cultivo) de crescimento *in vitro* após exposição a 10% (cepa viscerotrópica) e 8% (Ba199) de soro humano. Os dados representam as medianas, os valores mínimos e máximos de um experimento realizado em triplicata.

3.3. Avaliação da infecção de macrófagos pelas duas cepas de *Leishmania amazonensis*

Para avaliar a infectividade das duas cepas, BMDMs foram colocados em contato com promastigotas de fase estacionária durante 18h a 26°C, sendo as células infectadas incubadas por mais 12h a 37°C. Como mostrado na Figura 6, a porcentagem de células infectadas foi de $19 \pm 2,8\%$ para Ba199 e $42,8 \pm 6,6\%$ para a cepa viscerotrópica ($p=0,1$). Quanto a proporção de amastigotas/macrófago infectado, para Ba199 foi encontrado um número médio de $1,68 \pm 0,22$ parasitos, enquanto para a cepa viscerotrópica $2,73 \pm 0,05$ ($p=0,1$). O índice de infecção para Ba199 foi de $31,8 \pm 5$ e para a cepa viscerotrópica de $116,8 \pm 18,8$, aproximadamente $3 \times$ maior do que o de Ba199 ($p=0,1$). Analisando os perfis de infecção, é possível detectar que o índice de infecção para a cepa viscerotrópica foi maior devido ao elevado número de células infectadas, cerca de $2 \times$ maior em comparação a Ba199.

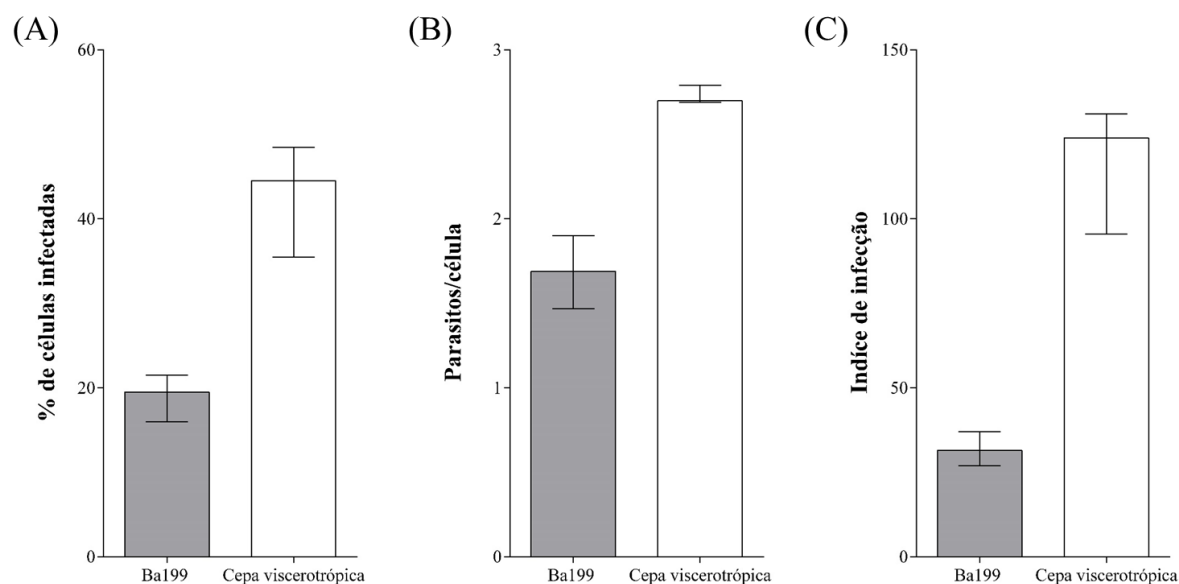


Figura 6 - Porcentagem de macrófagos infectados (A), proporção de parasitos por célula infectada (B) e índice de infecção (C) de Ba199 e da cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis*. Brevemente, BMDMs foram incubados na presença das formas promastigotas de fase estacionária das duas cepas (proporção de 10:1) durante 18h a 26°C. Após a remoção dos protozoários não internalizados, as células infectadas permaneceram incubadas por mais 12h a 37°C (5% de CO₂ e 95% de umidade). Os dados representam as medianas, os valores mínimos e máximos de um único experimento realizado em triplicata, sendo contados 200 BMDMs/cepa.

Para visualização da infecção dos macrófagos com Ba199 e a cepa viscerotrópica, na Figura 7 são mostradas fotomicrografias das células infectadas e controle não infectado.

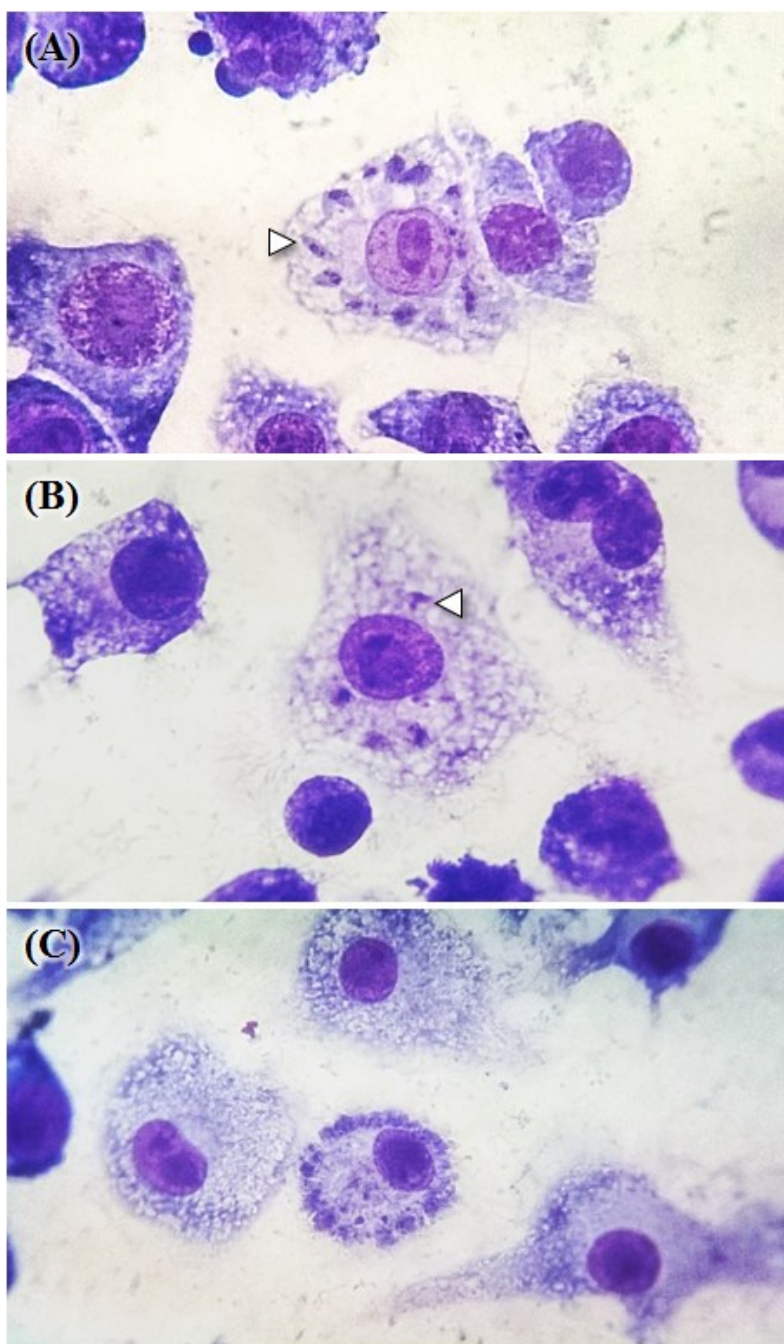


Figura 7 – BMDMs infectados com a cepa viscerotrópica (A), Ba199 (B) e controle não infectado (C). As cabeças de seta (Δ) indicam as amastigotas intracelulares. Aumento 1.000x.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado o comportamento *in vitro* de duas cepas de *Leishmania amazonensis* com diferentes tropismos. A cepa viscerotrópica foi isolada de aspirado de baço de um cão com um quadro clínico similar a LVC, atendido no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no ano de 2015. Desde o isolamento e caracterização por PCR-RFLP, o parasito foi mantido no criobanco do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* da UFU. Como critério de comparação, também foi estudada a cepa MHOM/BR/1989/Ba199, referência da OMS para a espécie supracitada. Basicamente, foram estudados o padrão de crescimento e metaciclogênese *in vitro*, bem como a infectividade dos parasitos à macrófagos imortalizados.

Quanto a curva de crescimento *in vitro*, observa-se certa similaridade nos perfis apresentados por ambas as cepas, mesmo que o número de promastigotas/mL tenha variado do segundo ao sétimo dia de cultivo. Com base na curva foi estabelecido que a fase exponencial, marcada pela acentuada proliferação e aparecimento das rosáceas, ocorreu do segundo ao quarto dia. Após esse período, iniciou-se a fase estacionária (marcada pela diminuição na taxa de divisão binária e manutenção do número de parasitos) que durou do quarto ao quinto dia. Esta, por sua vez, não é perceptível na curva da cepa viscerotrópica, provavelmente devido à morte de uma grande quantidade de protozoários ocasionada pela baixa quantidade de nutrientes. Embora isso ocorra, o perfil de crescimento obtido foi parecido com os descritos anteriormente para *Leishmania amazonensis* por outros autores, mesmo que para cepas e meios de cultura diferentes (HODGKINSON et al., 1996; SANTOS et al., 2011; SILVA et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2016). O cultivo *in vitro* de *Leishmania* spp. ainda é um assunto em debate entre os laboratórios de pesquisa, sendo que a comparação de experimentos pode se tornar ambígua devido à variações nos meios de cultura, na duração

do cultivo e do número de passagens axênicas dos protozoários, o que reflete diretamente no número de formas metacíclicas e condiciona o sucesso da infecção (CYSNE-FINKELSTEIN, 1998; DEY et al., 2002; MOREIRA et al., 2012; CUNHA et al., 2013).

Ao contrário de como ocorre no vetor, não há uma sincronização das diversas formas de promastigotas nas culturas *in vitro*. Os parasitos, portanto, são classificados somente como promastigotas procíclicas (comumente obtidas na fase exponencial) e metacíclicas (geralmente observadas nas culturas em fase estacionária) (PINTO-DA-SILVA et al., 2002; SUNTER; GULL, 2017). No presente estudo, após a análise da resistência às proteínas do Complemento das duas cepas à diferentes porcentagens de soro humano, foi estabelecido que 10% para a cepa viscerotrópica e 8% para Ba199 eram concentrações que poderiam ocasionar a lise de aproximadamente 50% dos parasitos (CI₅₀) em fase estacionária. Quanto às porcentagens de resistência das duas cepas em diferentes estágios de crescimento, as promastigotas de fase estacionária foram cerca de 1,3× mais resistentes à lise do os parasitos em fase exponencial. A constatação de que as leishmanias em fase estacionária são mais resistentes às proteínas do Complemento, também foi feita por Silva e colaboradores (2015) ao trabalhar com outra cepa de referência da OMS (IFLA/BR/67/PH8 – *Leishmania amazonensis*) e um isolado de *Leishmania amazonensis*. Neste trabalho, em particular, as porcentagem de parasitos resistentes a 10% de soro de coelho foram de ~30% no segundo dia e ~70% no décimo dia de cultivo, valores próximos aos encontrados no ensaio aqui apresentado. Resultados semelhantes também são descritos por Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998) e Pinto-da-Silva e colaboradores (2005).

Com base no fato de que os macrófagos são as principais células hospedeiras para as formas intracelulares de *Leishmania* spp. e buscando entender a interação da cepa viscerotrópica com esses fagócitos, BMDMs foram infectados com este parasito e com Ba199. Considerando que as metacíclicas são as formas infectantes para o hospedeiro

vertebrado, nos ensaios de infecção *in vitro* foram utilizadas promastigotas de fase estacionária. Apesar de não serem observadas diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros estudados, a cepa viscerotrópica foi capaz de infectar um maior número de macrófagos e apresentar mais parasitos por célula infectada do que Ba199, o que reflete em um maior índice de infecção. Segundo Chang e McGwire (2002), as espécies causadoras dos quadros viscerais são mais virulentas do que às que levam ao desenvolvimento de lesões cutâneas autocuráveis. Embora os resultados apresentados sejam insuficientes para prever se a cepa viscerotrópica realmente é mais virulenta, ela foi 3 vezes mais capaz de infectar as células do que Ba199. Padrões similares aos observados para Ba199 foram obtidos por França-Costa e colaboradores (2012), embora tenham sido usados macrófagos peritoneais de camundongo.

Este trabalho foi o primeiro a utilizar a metodologia de redução da resazurina para estabelecer as porcentagens de promastigotas metacíclicas *in vitro* por meio do ensaio de resistência às proteínas séricas do Complemento. Além disso, ele fornece subsídios para futuros estudos sobre os mecanismos de disseminação e viseralização de *Leishmania amazonensis*, bem como da relação parasito-hospedeiro.

6. CONCLUSÃO

A cepa viscerotrópica de *Leishmania amazonensis* apresenta um comportamento *in vitro* similar ao da cepa de referência da OMS, o que é perceptível através dos perfis de curva de crescimento e das porcentagens de formas promastigotas resistentes às proteínas do Complemento. Entretanto, a cepa viscerotrópica apresenta uma maior capacidade de infectar macrófagos murinos, o que pode ser um indicativo da expressão de determinados fatores de virulência por parte deste parasito.

7. REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A. L. et al. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 6, 2003. p. 661-665.
- ABREU-SILVA, A. L. et al. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3, 2004. p. 179-187.
- AKHOUNDI, M. al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 2016. p. e0004349.
- AKILOV, O. E. et al. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 5, 2007. p. 1188-1196.
- ALEMAN, C. Finestructure of cultured *Leishmania brasiliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 24, n. 2, 1969. p. 259-264.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h) 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, n. 1, Jun. 2005. p. 17-23.
- ALMEIDA, M. A. O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3, 2005. p. 227-232.
- ALMEIDA, M. C. et al. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 115, n. 3, 1996. p. 311-316.
- ALTET, L. et al. Mapping and sequencing of the canine NRAMPI gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, 2002. p. 2763-2771.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, 2004. p. 1-88.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS ONE**, v. 7, n. 5, 2012. p. e35671.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, 2008. p. 1-9.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical And Experimental Dermatology**, v. 35, n. 7, 2010. p. 699-705.
- ANTOINE, J. C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, 1998. p. 392-401.
- FUCHS, A. M. S.; FRANÇA, M. N.; PINHEIRO, M. S. F. **Guia para Normalização de Publicações Técnico-Científicas**. Uberlândia: EDUFU, 2013, p. 209.

- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12, 2000. p. 1269-1281.
- ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 9, 2012. p. 1354-1365.
- AZEVEDO-COUTINHO, R. B.; MENDONÇA, S. C. Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1 ed., 2014. p. 311-326.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, 1991. p. 536-546.
- BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, 2008. p. 340-344.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, 2007. p. 1097-1106
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, 2004. p. 601-609.
- BELKAID, Y. et al. CD8⁺ T Cells Are Required for Primary Immunity in C57BL/6 Mice Following Low-Dose, Intradermal Challenge with *Leishmania major*. **Journal of immunology**, v. 168, n. 8, 2002. p. 3992-4000.
- BELKAID, Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 10, 2001. p. 1497-1506.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, ed. 1, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, ed. 1, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, ed. 1, 2016.
- BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, 1995. p. 3102-3111.

- BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles–nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 12, 2001. p. 1311-1320.
- CALDART, E. T. et al. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, 2017. p. 17-27.
- CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, 1994. p. 315-325.
- CELESTE, J. L. L. et al. Experimental mixed infection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*L.*) *infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Parasitology**, v. 144, n. 9, 2017. p. 1191-1202.
- CHANG, K. P.; MCGWIRE, B. S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, n. 1, 2002. p. 1.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews in Microbiology**, v. 5, n. 11, 2007. p. 873-882.
- COELHO, L. I. C. et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, 2011. p. 671-677.
- CORRAL, M. J. et al. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 2, 2013. p. 111-116.
- COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.
- COURRET, N. et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 11, 2002. p. 2303-2316.
- COUTINHO-ABREU, I. V. et al. Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania major* development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, 2010. p. e901.
- CUNHA, J. et al. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV-patients in the murine model of visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, 2013. p. 122.
- CYSNE-FINKELSTEIN, L. et al. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 89, n. 1, 1998. p. 58-62.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3, 2007. p. 139-146.

- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, 2004. p. 305-318.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, 2001. p. 239-243.
- DEY, T. et al. Infectivity and Virulence of *Leishmania donovani* Promastigotes+ a Role for Media, Source, and Strain of Parasite. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n. 4, 2002. p. 270-274.
- DIAS, E. S. et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2, 2011. p. 101-111.
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, 2012. p. 5-276.
- DU, R. et al. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, 2016.
- DUARTE, I. R. M. et al. Comportamento biológico de *Leishmania (L.) amazonensis* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, 2010. p. 33-40.
- FERNANDES, A. P. et al. A2 and other Visceralizing proteins of *Leishmania*: role in pathogenesis and application for vaccine development. In: SANTOS, A. L. S. et al. **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma**. Springer Netherlands, 2014. p. 77-101.
- FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Os Parasitos e a Questão da Infecção em Animais Domésticos e Domiciliados. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1 ed., 2014. p. 259-273.
- FILIPPE-SANTOS, O. et al. A dynamic map of antigen recognition by CD4 T cells at the site of *Leishmania major* infection. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 1, 2009. p. 23-33.
- FRANÇA-COSTA, J. et al. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PloS one**, v. 7, n. 5, 2012. p. e36595.
- FRANKE, E. D. et al. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. **The Journal of Immunology**, v. 134, n. 4, 1985. p. 2713-2718.
- GLUENZ, E. et al. Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* flagella. **Methods in Cell Biology**, v. 127, 2015. p. 509-542.
- GOMES-SILVA, A. et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Parasitology**, v. 140, n. 06, 2013. p. 771-779.
- GORJÃO, R. Contagem de células. In: PERES, C. M., CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2005. p. 22-24.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, 2003. p. 1027-1034.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, 2010. p. 419-433.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11, 2005. p. 1169-1180.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, 2009. p. 6748-6753.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, 2011. p. 403-409.

HARTLEY, M. et al. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 8, 2014. p. 412-422.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, 1999. p. 1191-1199.

HODGKINSON, V. H. et al. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. **Experimental Parasitology**, v. 83, n. 1, 1996. p. 94-105.

HOFFMANN, A. R. et al. *Leishmania amazonensis* in dog with clinical diagnosis of visceral leishmaniasis in Paraná State, Brazil – a case report. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, Supl. 2, 2013. p. 3265-3270.

HORTA, M. F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, 2003. p. 4278-4288.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 14, 2000. p. 1765-1773.

KERR, S. F. Palaearctic origin of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, 2000. p. 75-80.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sandflies. **Clinics in Dermatology**, v.17, 1999. p. 279-289.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the

mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, v. 187, n. 1089, 1974. p. 409-419

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. 156, 2013.

KOBETS, T. et al. Genetics of host response to *Leishmania tropica* in mice—different control of skin pathology, chemokine reaction, and invasion into spleen and liver. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

KUMAR, A. Introduction. In: KUMAR, A. **Leishmania and leishmaniasis**. New York: Springer, 1 ed., 2013. p. 1-11.

LACOMBLE, S. et al. Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 8, 2009. p. 1081-1090.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, 2010. p. 13-32.

LAINSON, R.; SHAW J. J. New World Leishmaniasis. In: COX, F. E. G. et al. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, London: ASM Press, 10 ed., 2005. p. 313-349.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniases in Biology and Medicine**, London: Academic Press, v. 1, 1987. p. 1–120.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, 1987. p. 421-424.

LARA-SILVA, F. O. et al. *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *Le. chagasi*) in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, 1997. p. 525-550.

LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **HIV/AIDS (Auckland, NZ)**, v. 8, 2016. p. 147.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clinical Immunology**, v. 114, n. 3, 2005. p. 256-265.

LOUASSINI, M. et al. Investigations on the *in vitro* metacyclogenesis of a visceral and a cutaneous human strain of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 70, n. 3, 1998. p. 355-368.

MADEIRA, M. F. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target?. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 2, 2009. p. 260-262.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; KIAEI, S. S.; IRAVANI, D. Viscerotropic growth pattern of *Leishmania tropica* in BALB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic leishmaniasis. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 45, n. 4, 2007. p. 247-253.

MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO journal**, v. 11, n. 10, 1992. p. 3593.

MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 2016. p. 264.

MINEO, J. R. et al. **Manual Ilustrado de Práticas Laboratoriais em Imunologia**. Uberlândia: EDUFU, 2016. p. 105-108.

MOLINA, R. et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1, 2012. p. 268-271.

MOREIRA, D. et al. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, 2012. p. e1469.

MORGADO, F. N. et al. *Hepatozoon canis* and *Leishmania* spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, 2016. p. 450-458.

MOSSER, D. M.; BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. **Parasitology**, v. 115, n. 7, 1997. p. 9-23.

MURRAY, C. J. L. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. **The Lancet**, v. 386, n. 10009, 2015. p. 2145-2191.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, 2005. p. 1561-1577.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. **Essays in Biochemistry**, v. 51, 2011. p. 81-95.

NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **PloS One**, v. 8, n. 7, 2013.

NOGUEIRA, Paula M. et al. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, 2016. p. e0004848.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, 2015. p. 653-664.

OLIVEIRA, G. M. et al. Canine cutaneous leishmaniasis: dissemination and tissue tropism of genetically distinct *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* populations. **Veterinary medicine international**, v. 2013, 2013.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, 2016. p. 925-932.

PEDROSA, C. M. S. Clinical Manifestations of Visceral Leishmaniasis (American Visceral Leishmaniasis). In: CLABORN, D. **The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**. InTech, 2017.

PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **Elife**, v. 3, 2014. p. e02851.

PINTO-DA-SILVA, L. H. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters *in vivo*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 11, 2002. p. 1371-1377.

PINTO-DA-SILVA, L. H. et al. The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of *Leishmania* (*L*) *amazonensis* metacyclic promastigotes and inhibits procyclic attachment to the sand fly midgut. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 7, 2005. p. 757-764.

PUENTES, S. M. et al. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 3, 1988. p. 887-902.

QUINNELL, R. J. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, n. 1, 2003. p. 23-28.

READY, P. D. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 16, n. 5, 1979. p. 413-423.

REAL, F.; MORTARA, R. A.; RABINOVITCH, M. Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* parasitophorous vacuoles: live imaging of coinfecting macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, 2010. p. e905.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, 2007. p. 581-596.

RIBEIRO, J. Vector salivation and parasite transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, 1987. p. 1-3.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* concentrations. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 12, 2014. p. 5203-5213.

- ROGERS, M. B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21, n. 12, 2011. p. 2129-2142.
- ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, 2004. p. 463-467.
- ROGERS, M. E.; CHANGE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. 5, p. 295-507, 2002.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. International journal for parasitology. **Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, 2014. p. 251-262.
- ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261, 1903.
- SACKS, D. L. et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*–sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, 2000. p. 406-411.
- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, 1989. p. 100-103.
- SACKS, D. L.; MELBY, P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Current Protocols in Immunology**, c. 19, 2001. p. 19-2.
- SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective state of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, 1984. p. 1417-1420.
- SACKS, D. L.; SILVA, R. P. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 9, 1987. p. 3099-3106.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, 2002. p. 845-858.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, 2002. p. 1041-1047.
- SANCHES, L. C. et al. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, 2016. p. 465-469.
- SANTOS, M. G. et al. Correlation of meta 1 expression with culture stage, cell morphology and infectivity in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, 2011. p. 190-193.

- SARAIWA, E. M. et al. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, 2005. p. 39-47.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 20, 1992. p. 9944-9948.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews in Immunology**, v. 16, n. 9, 2016. p. 581-592.
- SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cellular Immunology**, v. 309, 2016. p. 1-6.
- SERBINA, N. et al. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial **Pathogens. Annual Review of Immunology**, v. 26, 2008. p. 421-452.
- SILVA, I. A. et al. *In Vitro* Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, 2009. p. 423-431.
- SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>>. Acesso em 29/11/2017.
- SOLIMAN, M. F. M. The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. **Acta Tropica**, v. 97, n. 2, 2006. p. 146-150.
- SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, 2001. p. 97-103.
- SPÄTH, G.F.; DRINI, S.; RACHIDI, N. A touch of Zen: post-translational regulation of the *Leishmania* stress response. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 5, 2015. p. 632-638.
- SPOTIN, A.; PARVIZI, P. Comparative study of viscerotropic pathogenicity of *Leishmania major* amastigotes and promastigotes based on identification of mitochondrial and nucleus sequences. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, 2016. p. 1221-1228.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017. p. 82.
- STODDART, M. J. Cell viability assays: Introduction. In: STODDART, M. J. **Mammalian cell viability: methods and protocols**, 2011. p. 1-6.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, 2017. p. 170165.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3, 2007. p. 280-284.

TUON, F. F.; NETO, V. A.; AMATO, V. S. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. **Pathogens and Disease**, v. 54, n. 2, 2008. p. 158-166.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends In Parasitology**, v. 28, n. 8, 2012. p. 335-344.

VALDIVIA, H. O. et al. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. p. 40804.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

WANDERLEY, J. L. M. et al. Subversion of Immunity by *Leishmania amazonensis* Parasites: Possible role of phosphatidylserine as a main regulator. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

WILSON, J. et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 10, 2008. p. e1000179.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis**: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. Geneva: WHO Press, 2010, v. 949. (WHO technical report series).

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, 2008. p. 3371-3382.

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 29, n. 5, 2004. p. 464-467.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, n. 1, 2003. p. 1-16.

ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. *In vitro* stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. **Parasitology**, v. 116, n. 4, 1998. p. 305-309.

ZINK, A. R. et al. Leishmaniasis in ancient Egypt and upper Nubia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1616, 2006.