



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

JÉSSICA CRISTINA DOS SANTOS

**Avaliação de diferentes lotes de soro bovino fetal no preparo
de meio para cultura de *Leishmania (Viannia) braziliensis***

**Goiânia
2015**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):		Jéssica Cristina dos Santos	
E-mail:		jessicacristina_24@hotmail.com	
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor		Nenhum	
Agência de fomento:		Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla: CAPES
Pais:	Brasil	UF:	GO CNPJ: 00.889.834/0001-8 (Capes)
Título: Avaliação de diferentes lotes de soro bovino fetal no preparo de meio para cultura de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>			
Palavras-chave:		<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> , promastigotas, meio de Grace	
Título em outra língua:		Evaluation of different batches of fetal bovine serum in preparation for <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> culture medium	
Palavras-chave em outra língua:		<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> , promastigotes, Grace's medium	
Área de concentração:			
Data defesa: (dd/mm/aaaa)		27/02/2015	
Programa de Pós-Graduação:		Programa de pós-graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro	
Orientador (a):		Milton Adriano Pelli de Oliveira	
E-mail:		mapoliv@usp.br	
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

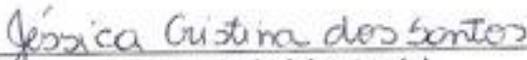
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.



 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 16 / 09 / 2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

JÉSSICA CRISTINA DOS SANTOS

**Avaliação de diferentes lotes de soro bovino fetal no preparo
de meio para cultura de *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro
da Universidade Federal de Goiás para
obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Dr. Milton Adriano P. de
Oliveira

**Goiânia
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

dos Santos, Jéssica Cristina

Avaliação de diferentes lotes de soro bovino fetal no preparo de meio
para cultura de *Leishmania (Viannia) braziliensis* [manuscrito] /
Jéssica Cristina dos Santos. - 2015.
x, 62 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2015.
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras.

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2. promastigotas. 3. meio de
Grace. I. Adriano Pelli de Oliveira, Milton, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Jéssica Cristina dos Santos

Orientador (a): Milton Adriano Pelli de Oliveira

Co-orientador (a):

Membros:

1. Ana Maria de Castro

2. Phileo Pinge Filho

3. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Data: 27/02/2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre me guiando durante a jornada até aqui e por me dar o suporte necessário para vencer e conseguir concluir esta caminhada.

Aos meus pais, irmãos, avós e toda a minha família por todo o orgulho, paciência, dedicação, apoio e amor incondicional ao longo desses anos. Por estarem sempre presentes nos meus momentos de dificuldade e angústia me dando forças para acreditar que fosse capaz de seguir em frente

Ao professor Milton, pela atenção e paciência durante este período em seu laboratório, e principalmente por ter contribuído para que fosse possível concluir mais um degrau na minha vida profissional.

Aos meus colegas do laboratório de citocinas, que com o passar dos anos se tornaram companheiros e verdadeiro amigos. Em especial ao Clayson, por ter me proporcionado a oportunidade de conhecer o laboratório, onde posteriormente tive o privilégio de me tornar membro.

A professora Fátima e toda sua equipe do laboratório de imunidade inata, pela torcida para que no final tudo desse certo.

A toda equipe do IPTSP e ao departamento de imunologia por todo suporte prestado.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vii
FIGURAS E ANEXOS	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana – Aspectos Gerais	14
1.2. O ciclo biológico das leishmânias	15
1.3. A Metaciclogênese	16
1.4. Métodos de purificação de formas metacíclicas de leishmânia	20
1.5. Meios de cultivo para leishmânia	21
1.6. Infecção de camundongos BALB/c	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO	26
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. METODOLOGIA	27
4.1. Parasitos	27
4.2. Curva de Crescimento	28
4.3. Avaliações da atividade metabólica	28
4.4. Quantificações das formas metacíclicas	30
4.5. Camundongos e infecção <i>in vivo</i>	30
4.6. Dosagens bioquímicas.....	31
4.7 Análises estatísticas	31
5. RESULTADOS	33
5.1. Uma passagem em cultura não discrimina lotes ruins de SBF pela técnica de quantificação de parasitos	33
5.3. A cepa PPS6m apresentou diferença na porcentagem de formas promastigotas metacíclicas gerada durante o cultivo nos meios.....	40
5.4. Parasitos em fase estacionária causam lesões semelhantes em camundongos BALB/c independente dos lotes de SBF presentes nas culturas.....	41
5.5. Meio de Grace completo, suplementado com lote de SBF 4, possui maior concentração de hemoglobina, sódio, colesterol, cloro e menor concentração de glicose.....	43

6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS	51

FIGURAS E ANEXOS

Figura 1 Formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	12
Figura 2 Ciclo de vida da leishmânia.....	13
Figura 3 Diferenciação morfológica das formas promastigotas no intestino do inseto vetor.....	14
Figura 4 Estrutura bioquímica do LPG de promastigotas pró-cíclicas e metacíclicas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	16
Figura 5 Esquema respresentativo das curvas de crescimento.....	25
Figura 6 Esquema respresentativo dos testes de MTT.....	27
Figura 7 Adaptação dos parasitos após primeira passagem para meio Grace com diferentes lotes de SBF.....	31
Figura 8 Adaptação dos parasitos após segunda passagem para meio Grace com diferentes lotes de SBF.....	33
Figura 9 Avaliação da atividade metabólica dos parasitos em meios de Grace contendo diferentes lotes de SBF.....	35
Figura 10 Avaliação da atividade metabólica dos parasitos após a segunda passagem em meios contendo diferentes lotes de SBF.....	36
Figura 11 Avaliação da atividade metabólica dos parasitos após a terceira passagem em meios de Grace contendo diferentes lotes de SBF.....	37

Figura 12 Recuperação de formas promastigotas metacíclicas cultivadas em meio de Grace contendo diferentes lotes de SBF.....38

Figura 13 Infecção de camundongos BALB/c com parasitos cultivados em meio Grace contendo diferentes lotes de SBF.....39

Figura 14 Infecção de camundongos BALB/c com parasitos cultivados em meio de Grace contendo diferentes lotes de SBF.....39

ANEXOS

Anexo 1 Parecer do Comitê de ética.....60

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BPL	Lectina Bauhinia Purpúrea
DMF	Dimetilformamida
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetil galactosamina
Glc	Glicose
GIPL	Glicosilinositol fosfolipídios
GPI	Glicofosfatidilinositol
GP63	Glicoproteína 63
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon - gama
LL	Lectina de lentilha
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
Man	Manose
MTT	(3-(4,5-dimetilazol-2i)-2,5-difenil brometo de tetrazólio)
NNN	Novy – MacNeal – Nicolle
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina fosfato
PNA	Lectina de amendoim
PO	Fosfato
SBF	Soro Fetal Bovino
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2

RESUMO

Formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* podem ser mantidas *in vitro* para utilização em diversos estudos. O soro bovino fetal (SBF) é um componente importante em vários meios de cultura, no entanto, a sua constituição varia em diferentes lotes. Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de diferentes lotes de SBF no preparo de meio para cultura de *Leishmania (V.) braziliensis*, comparando as informações fornecidas por diferentes técnicas conhecidas. Foram utilizadas as cepas PPS6m e CSA7c de leishmânias obtidas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana e foram testados cinco diferentes lotes de SBF em meio de Grace. A curva de crescimento dos parasitos no meio foi avaliada por contagem diária em hematocítômetro, o metabolismo avaliado pela capacidade do parasito em metabolizar o 3-(4,5-dimetilazol-2i)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), a porcentagem de formas promastigotas metacíclicas quantificada pelo ensaio de aglutinação com lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL) e a capacidade de produzir lesão em camundongos avaliada pelo acompanhamento semanal das lesões. Foi também realizada a dosagem dos constituintes bioquímicos dos diferentes lotes de SBF. Observou-se que são necessárias duas ou mais passagens dos parasitos em cultura para que sejam discriminados lotes de SBF ruins pelo acompanhamento da curva de crescimento enquanto a análise do metabolismo mostrou que um lote de SBF inadequado para cultura proporcionou um metabolismo maior ou igual que o melhor lote de SBF. Observou-se uma menor porcentagem de formas promastigotas metacíclicas geradas durante o cultivo da cepa PPS6m em um dos meios, porém, a porcentagem de metacíclicas foi semelhante para todos os meios de cultura de CSA7c, independente do número de parasitos obtido ao final da cultura. Além disto, a capacidade de parasitos em fase estacionária de cultura causarem lesões em camundongos BALB/c não dependeu do lote de soro presentes nas culturas. Os dados revelam que o melhor método para selecionar um bom soro para cultura é o acompanhamento da curva de crescimento por dois ou mais repiques, além disto, lotes ruins para a manutenção de leishmânia são capazes de gerar parasitos com a mesma capacidade de infectar camundongos.

ABSTRACT

Promastigote forms of *Leishmania (V.) braziliensis* can be maintained *in vitro* for use in research. The bovine fetal serum (BFS) is an important component in several culture medium, however, its composition varies from batch to batch. This work aims to evaluate the performance of different BFS batches for preparation of *Leishmania (V.) braziliensis* culture media, comparing information supplied by different known techniques. PPS6m and CSA7c leishmanias strains were from samples obtained from American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) patients and five different batches of BFS were tested in Grace's medium. The parasite growth curve was evaluated by a daily hemocytometer counting, the metabolism was evaluated by the parasite's ability to metabolize 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), the percentage of promastigote metacyclic forms was quantified by an agglutination test using *Bauhinia purpuera* (BPL) lectin and the ability to promote mice lesions evaluated by a weekly measurement of lesions. The biochemical components of the BFS batches was also performed. It was observed that two or more passages in culture were necessary to identify bad batches of BFS by the growth curve analysis, while the metabolic analysis showed that an inadequate BFS batch of provided a metabolic rate higher or equal to the best BFS batch. A lower percentage of metacyclic forms of PPS6m strain was observed in one of the media, however, the percentage of metacyclic promastigotes was similar among all the CSA7c culture media, independently of the parasite number. Besides, the stationary phase parasite's ability to cause lesions in BALB/c mice did not depend on the SBF batch present in the cultures. Data reveals that the best method to select good culture serum is to observe the growth curve for two or more passages, besides this, bad SBF batches are able to produce parasites with the same ability to infect mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana – Aspectos Gerais

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecto-parasitária, que possui transmissão endêmica em 98 países. A estimativa global de incidência da leishmaniose cutânea é de 700 mil a 1,2 milhão de casos por ano, sendo o Brasil um dos 10 países responsáveis por 70 a 75% dos casos de leishmaniose cutânea em todo o mundo (WHO 2011).

A LT é uma antropozoonose causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* (Gontijo & de Carvalho Mde 2003). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é caracterizada por causar lesões cutâneas localizadas (LCL) e/ou mucosas (LM) e lesões cutâneas difusas (LCD). As espécies que causam a doença podem ser classificadas em dois subgêneros, sendo: seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. No Brasil, as principais espécies causadoras de LTA são: *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Silveira et al. 2004; Murray et al. 2005; Murback et al. 2011). Em regiões endêmicas para LTA, a espécie *braziliensis* é predominante (Jones et al. 1987), e estas são as responsáveis por causar LCL, onde o paciente apresenta uma ou várias úlceras/nódulos na pele, que podem curar espontaneamente, embora de maneira lenta. Já na forma mucosa, o paciente apresenta ulcerações progressivas e destrutivas nas mucosas nasal e oral, principalmente. Estas lesões não apresentam cura espontânea e, geralmente, são detectadas meses ou anos após episódios da LTA cutânea (Chappuis et al. 2007).

A transmissão do parasito ao hospedeiro é feita por insetos vetores denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem *Díptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia* (Maroli et al. 2013; Ready 2013). No Brasil, os principais vetores de LTA são: *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia wellcomei* (Rebelo et al. 2010; de Castro Cortes et al. 2012).

1.2. O ciclo biológico das leishmânias

Leishmânias apresentam-se sob duas formas principais em seu ciclo de vida: as formas promastigotas que são flageladas e encontradas no inseto vetor, enquanto as formas intracelulares, denominadas amastigotas, são encontradas no hospedeiro vertebrado (McGwire & Satoskar 2014).

As formas promastigotas, desenvolvidas no inseto vetor recebem nomes diferentes de acordo com as suas características morfológicas e bioquímicas. Em geral as formas promastigotas procíclicas de *L. (V.) braziliensis* apresentam o corpo relativamente grande e o flagelo curto (Figura 1A). As formas promastigotas metacíclicas se diferem das procíclicas pelo tamanho, morfologia e motilidade, pois apresentam corpo pequeno, com flagelo longo, geralmente o dobro do comprimento do corpo da célula, e são altamente ativas e móveis (Figura 1B) (Zakai et al. 1998; Pinto-da-Silva et al. 2002).

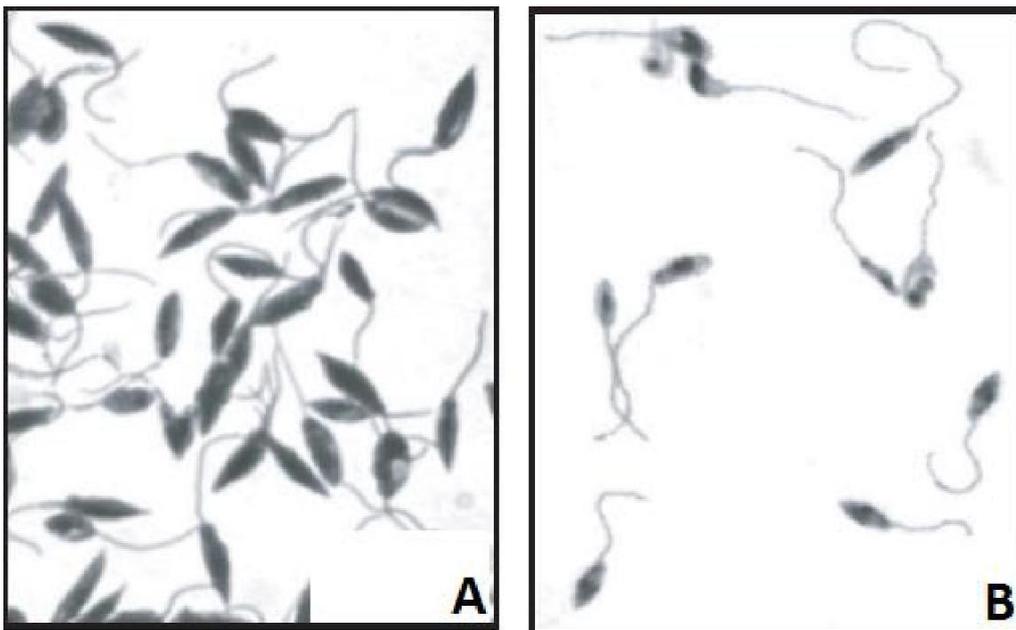


Figura 1: Microscopia Óptica (1000x) de formas promastigotas procíclicas (A) e formas promastigotas metacíclicas (B) de *L. (V.) braziliensis*.

Fonte adaptada: da Silva Jr et al. (2014)

O ciclo de transmissão se inicia quando flebotomíneos fêmeas se infectam durante o repasto sanguíneo com formas amastigotas do parasito. Estas formas podem ser obtidas em reservatórios infectados, os quais geralmente são animais selvagens, como roedores. Como esta doença é uma

zoonose, o homem também pode ser infectado, porém, no caso da leishmaniose, este é considerado um hospedeiro acidental (Killick-Kendrick et al. 1974; Gontijo & de Carvalho Mde 2003). No intestino do vetor, as formas amastigotas se desenvolvem inicialmente nas formas promastigotas procíclicas. Em seguida, passam por um processo denominado metaciclogênese e tornam-se promastigotas metacíclicas. Durante o próximo repasto sanguíneo, o inseto vetor inocula aproximadamente 100 a 10.000 formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado, as quais serão fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico, onde se diferenciarão, novamente, em amastigotas e terá início um novo ciclo (Sacks & Perkins 1984; Kimblin et al. 2008; Liese et al. 2008) (Figura 2).

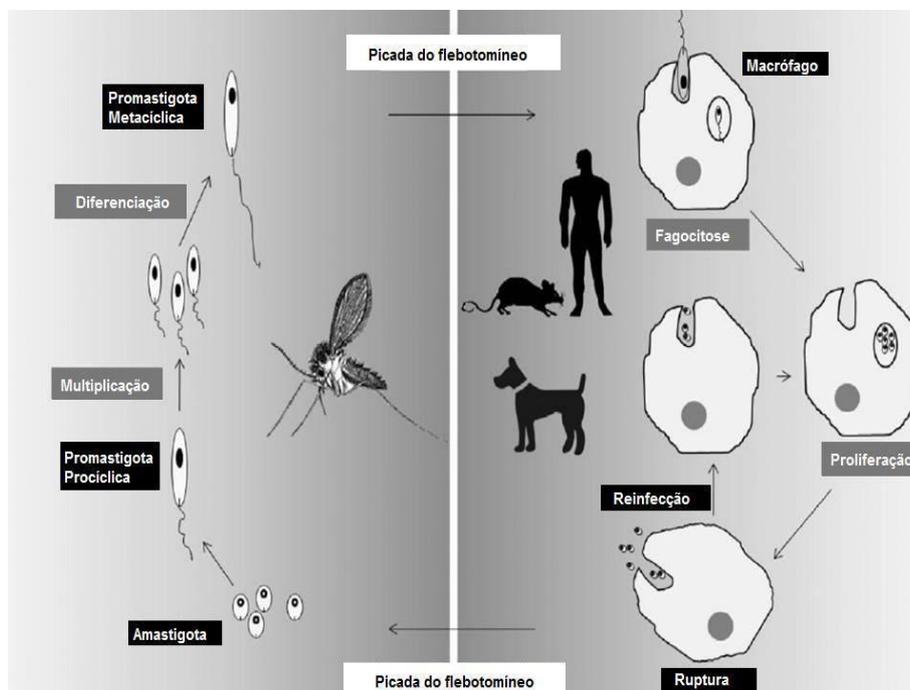


Figura 2: Esquema representativo do ciclo de vida da leishmânia.

Fonte Adaptada: Van Assche et al. (2011).

1.3. A Metaciclogênese

A metaciclogênese consiste na diferenciação das formas promastigotas procíclicas pouco infectantes em promastigotas metacíclicas infectantes. Este processo ocorre no interior do intestino médio do inseto vetor, onde o sangue contendo parasitos, é ingurgitado durante o repasto sanguíneo e, em seguida

formas promastigotas procíclicas ocorre em um período estimado de 12 a 18 horas. Entre 18 e 24 horas ocorre uma intensa proliferação destas formas promastigotas. Após 60 e 72 horas, os parasitos tendem a escapar da matriz peritrófica e se aderirem às micro vilosidades do intestino, para se protegerem das ações das enzimas digestivas e não serem expulsas durante o processo final de digestão do repasto sanguíneo. Após cerca de 5-7 dias, os parasitos se diferenciam morfológicamente e bioquimicamente das promastigotas procíclicas e alguns destes parasitos perdem a capacidade de adesão, caracterizando a diferenciação para promastigotas metacíclicas. Estas últimas migram, para a parte anterior do intestino e se acumulam na parte posterior da válvula estomacal. Estas formas podem, ainda, migrar além da válvula estomacal e atingirem o esôfago, faringe e cavidade bucal do inseto vetor já prontas para serem inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (Sacks & Kamhawi 2001; Rogers et al. 2002) (Figura 3).

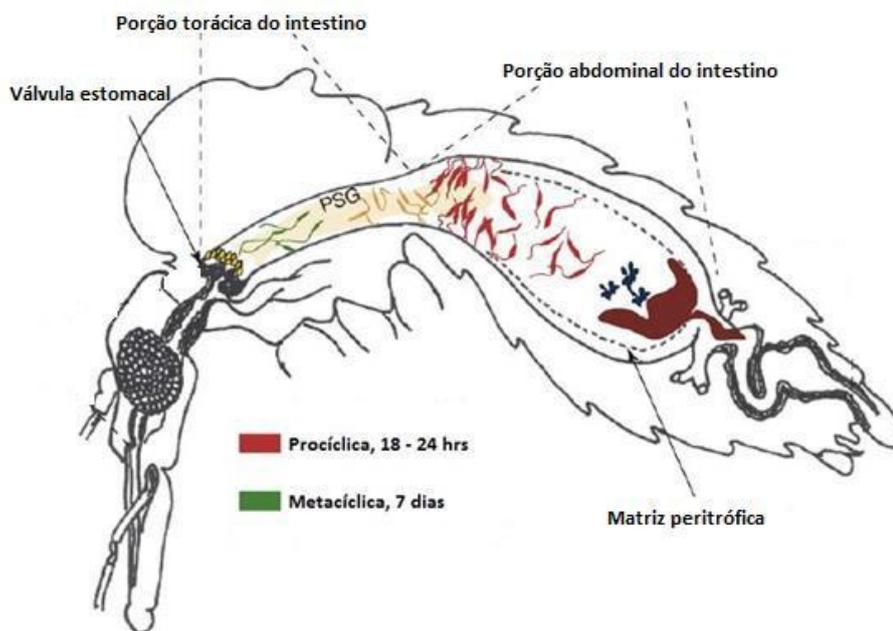


Figura 3: Esquema representativo ilustrando a diferenciação morfológica das formas promastigotas no decorrer do tempo no intestino do inseto vetor.

Fonte adaptada: Kamhawi (2006).

Os fatores que desencadeiam a metaciclogênese ainda são pouco descritos, porém, é sabido que alguns fatores podem induzir essa diferenciação como, por exemplo, condições de estresse (Kamhawi 2006). Neste processo, também ocorrem modificações na morfologia e expressão gênica,

proporcionando modificações bioquímicas e estruturais de moléculas presente na superfície do parasito (Sacks & Perkins 1984; Saraiva et al. 1995).

Essas modificações são essenciais para que as formas metacíclicas sejam capazes de interagir com células fagocíticas no hospedeiro vertebrado, sobreviver dentro dos compartimentos fagolisossômicos e resistir à lise mediada pelo sistema complemento (Sacks & Perkins 1985; Mallinson & Coombs 1989).

De acordo com as moléculas presentes nas superfícies das leishmânias, é possível distinguir seu estágio de desenvolvimento (Pimenta et al. 1991). Em geral, estes parasitos possuem a superfície celular revestida por moléculas glicosiladas, ancoradas à membrana celular, por meio de glicolípídeos como o glicofosfatidilinositol (GPI) (Ilgoutz & McConville 2001).

As promastigotas possuem, em sua superfície, glicoconjugados tais como: complexos de lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína de 63 Kda (gp63), também conhecida como protease de superfície de promastigotas, e glicosilinositol fosfolípídios (GIPL). O LPG é mais abundante do que a gp63 e GIPL são 10 vezes mais abundantes do que o LPG; porém, não está claro qual o papel que as GIPL desempenham na interação com o hospedeiro vertebrado (Joshi et al. 2002; Olivier et al. 2005). Tanto o LPG quanto a gp63 são necessários para a sobrevivência do parasito no inseto vetor e sofrem modificações durante a metaciclogênese (Saraiva et al. 1995).

O LPG é composto por cadeias lineares, que podem ou não ter ramificações, formadas por subunidades repetidas de fosfodissacarídeos de $PO_4-6Gal\beta 1,4Man\alpha 1$, que estão ligados à membrana plasmática por uma âncora de GPI (Pimenta et al. 1994). Durante a metaciclogênese, a estrutura do LPG sofre modificações no tamanho, composição, posicionamento, podendo variar entre as espécies de leishmânia. Na *L. major*, por exemplo, as cadeias de LPG são mais ramificadas e as substituições são variadas, contendo glicose, galactose e arabinose. Já a molécula LPG de *L. donovani* não possui ramificações (McConville et al. 1990; McConville et al. 1995). Além disso, a estrutura do LPG difere entre as diferentes formas da leishmânia, sendo maior nas formas metacíclicas e ausente nas formas amastigotas. Esta molécula está relacionada com a ligação do parasito ao trato intestinal do inseto vetor e é um dos principais determinantes da infectividade e

nutrientes (Cunningham et al. 2001). Em cultura, as amastigotas se diferenciam em promastigotas em um tempo de aproximadamente 48 horas. As promastigotas procíclicas estão presentes em culturas recentes, proliferando intensamente, o que caracteriza a fase logarítmica de uma cultura. Em culturas de mais de 4 dias aparecem as promastigotas metacíclicas que proliferam menos. Em culturas mais tardias de 6 a 10 dias, as leishmânias param de proliferar, caracterizando a fase estacionária, onde pode ser encontrado um maior número de parasitos diferenciados para a forma metacíclica. Isto foi confirmado para a maioria das espécies de leishmânia (Sacks & Perkins 1984; Rizvi et al. 1985; Sacks et al. 1985; Pimenta et al. 1994).

1.4. Métodos de purificação de formas metacíclicas de leishmânia

Existem técnicas baseadas na modificação da molécula de LPG para identificação e purificação de promastigotas metacíclicas de leishmânia. Estudos com *Leishmania major* e *Leishmania donovani* mostraram que as mudanças bioquímicas que ocorrem na molécula de LPG podem ser identificadas por meio da capacidade de ligação dos parasitos às moléculas de lectinas e que a ligação, ou ausência de ligação, está associada com o processo de metaciclogênese (da Silva & Sacks 1987; Sacks et al. 1995).

As lectinas compreendem um grupo estruturalmente diverso de proteínas, que apresentam uma grande variedade de especificidade de ligação a carboidratos. A maioria das lectinas é isolada de plantas da família *Leguminosae* (Grangeiro et al. 1997; Loris et al. 1998).

O método de purificação utilizando lectinas consiste em selecionar negativamente as metacíclicas, por meio de aglutinação, sendo assim, as procíclicas estarão aglutinadas com a lectina e as metacíclicas estarão livres (Saraiva et al. 2005). Isso acontece porque na superfície das formas promastigotas procíclicas há resíduos de açúcar que se ligam especificamente a determinadas lectinas, como por exemplo, à lectina de amendoim (PNA), lectina de lentilha (LL) e lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL). Muitos destes sítios de ligação são perdidos durante a metaciclogênese (Sacks et al. 1985; Almeida et al. 1993; Pinto-da-Silva et al. 2002).

Além das lectinas, existem outros métodos para selecionar as formas

metacíclicas por seleção negativa, como por exemplo, pelo uso de anticorpos monoclonais específicos para carboidratos das formas procíclicas de *L. amazonensis* (Courret et al. 1999) e *L. tropica* (Lira et al. 1998). Há ainda, métodos de purificação de formas metacíclicas que são independentes das modificações na estrutura do LPG, como por exemplo, a separação por gradiente de densidade Ficoll, sendo muito comum o uso desta técnica para a distinção de formas metacíclicas de espécies de leishmânia com alterações na molécula de LPG (Spath & Beverley 2001).

Já foi descrito que as formas promastigotas metacíclicas de *L. (V.) braziliensis* em culturas na fase estacionária podem ser obtidas por seleção negativa usando lectina BPL (Pinto-da-Silva et al. 2002). A BPL reconhece especificamente os resíduos β -Gal (1-3)GalNAc do LPG, presente na superfície das formas promastigotas procíclicas, promovendo, assim, a aglutinação destas formas, deixando livres as metacíclicas (Almeida et al. 1993).

1.5. Meios de cultivo para leishmânia

O primeiro relato de cultivo de *L. donovani* foi feito em 1904, utilizando sangue acidificado com ácido cítrico (Rogers 1904). Em seguida, surgiram outros meios de cultivo como, por exemplo, o Novy-MacNeal-Nicolle medium (NNN) que é composto com água destilada e ágar sangue, neste meio, em geral, eram necessárias de três a quatro semanas para que houvesse o crescimento dos parasitos (Hockmeyer et al. 1981).

Culturas de leishmânias em diferentes meios e temperaturas abaixo de 28°C têm sido muito utilizadas experimentalmente. As formas promastigotas obtidas a partir de culturas axênicas possuem características semelhantes aos seus homólogos encontrados no inseto vetor, no que diz respeito à morfologia, componentes bioquímicos e propriedades biológicas, como a infectividade *in vivo* e *in vitro* (Lemesre et al. 1997; Schuster & Sullivan 2002).

O cultivo *in vitro* de espécies de leishmânia é um método útil para adquirir quantidades de parasitos suficientes para fins de diagnóstico, melhorar o conhecimento sobre a relação parasito-hospedeiro e determinar características imunológicas e biológicas. O cultivo permite, ainda à manutenção em longo prazo, de populações ativas e com intensa capacidade

de proliferação (Agarwal & Jain 1996).

Os diferentes meios desenvolvidos nos últimos anos são classificados em bifásicos (semissólidos) e monofásicos (líquidos). Em geral, os meios líquidos são mais utilizados para cultura de leishmânias, pois os meios semissólidos exigem uma maior manipulação (Grekov et al. 2011).

Meios de cultura enriquecidos com soro, o que inicialmente utilizados para o cultivo de células de mamíferos e de insetos, tem sido usados com sucesso no cultivo de diferentes espécies de leishmânia. Estes incluem os meios: 199H, RPMI 1640, Schneider's Drosophila, Dulbecco, Grace, dentre outros (Chance et al. 1974; Hendricks et al. 1978; Childs et al. 1979). Todos estes meios requerem a adição de 10-30% de soro bovino fetal (SBF) como um fator importante para o crescimento de formas promastigotas de leishmânia por longos períodos de tempo (Merlen et al. 1999).

Em geral, microrganismos são exigentes e requerem muitos nutrientes durante o crescimento em cultura. Os componentes e/ou diferentes lotes de meios podem ser tóxicos e podem prejudicar o crescimento. Muitos meios incluem na sua composição soro humano ou animal, que é um componente caro, de composição variável e podem conter fatores que são prejudiciais ao crescimento de parasitos, incluindo agentes infecciosos que, por exemplo, podem interferir nos resultados de experiências bioquímicas e/ou imunológicas (Merlen et al. 1999; Visvesvara & Garcia 2002).

Há meios de cultivo que são adaptados para cultivos de diferentes espécies de leishmânias e não possuem soro. Estes meios são enriquecidos com grande concentração de aminoácidos, vitaminas, albumina bovina, hormônios e urina humana (Howard et al. 1991; Armstrong & Patterson 1994).

Além de permitir o crescimento, o meio de cultivo deve ser capaz de manter as características intrínsecas e extrínsecas dos parasitos. Uma das características das espécies de *L. (V.) braziliensis* é a sua alta exigência para crescer e se adaptar em meios líquidos, sendo que existem relatos que estes parasitos podem perder a sua capacidade de proliferação após poucas passagens no meio. Embora existam vários componentes envolvidos no processo de cultivo, o SBF pode ser um dos fatores limitantes do crescimento (Shaw & Lainson 1981; Celeste & Guimaraes 1988; Lemesre et al. 1988; Merlen et al. 1999; Oliveira et al. 2010).

1.6. Infecção de camundongos BALB/c

Infecções experimentais em animais são comumente utilizadas para aumentar as chances de isolar parasitos ou para estudos da patogênese da doença. Camundongos ou hamsters são os animais que mais são utilizados em laboratório para estudo da leishmaniose. Os camundongos apresentam diferentes graus de susceptibilidade a diferentes espécies de leishmânias sendo, por exemplo, resistentes a *L. (V.) braziliensis* (Singh 2006). Em casos de infecção em camundongos BALB/c, é necessário obter os parasitos após 4-7 dias de cultura, pois é neste período que os parasitos em cultura entram em fase estacionária e apresentam uma virulência maior comparada com aqueles da fase logarítmica (Sacks & Perkins 1984; Sacks 1989).

Camundongos BALB/c infectados com *L. (V.) braziliensis* desenvolvem lesões pequenas, nodulares e com cura espontânea, diferente das lesões causadas por infecção com *L. major*, que provoca úlceras progressivas (Rocha et al. 2007). Isto ocorre devido ao desenvolvimento de uma resposta imune, caracterizada pela presença de altos níveis de INF- γ , baixos níveis interleucina 4 (IL), IL-10 e IL-13 quando os animais são infectados com *L. (V.) braziliensis*, enquanto na infecção por *L. major*, há uma resposta polarizada com a presença de elevados níveis de arginase I e IL-4. (Costa et al. 2011). A citocina INF- γ é essencial para o controle de infecções por *L. (V.) braziliensis*, pois ativam elementos microbicidas de macrófagos como, por exemplo, a produção de óxido nítrico (NO) (DeKrey et al. 1998). Já a presença de altos níveis de IL-4 e arginase I favorecem o crescimento dos parasitos *in vivo* (Iniesta et al. 2005; Kropf et al. 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários (Goto & Lindoso 2010; Viana et al. 2012). Um total de 98 países apresenta atualmente transmissão endêmica da leishmaniose, sendo que a estimativa global de incidência da leishmaniose cutânea é de 700 mil a 1,2 milhão de casos por ano. O Brasil é um dos 10 países responsáveis por 70 a 75% dos casos de leishmaniose cutânea em todo o mundo (WHO 2011), onde as principais espécies causadoras são: *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

O cultivo de leishmânias em laboratórios é importante para obtenção deste protozoário em quantidade suficiente para estudos realizados *in vitro* e *in vivo*. Estes estudos são de fundamental importância para uma melhor compreensão da biologia da relação leishmânia-hospedeiro, permitindo investigar formas de se interferir na doença.

As formas promastigotas obtidas a partir de culturas axênicas possuem características semelhantes aos seus homólogos no vetor no que diz respeito à morfologia, componentes bioquímicos e propriedades biológicas (Lemesre et al. 1997).

A espécie de *L. (V.) braziliensis* possui dificuldade para crescer e se adaptar em meios líquidos. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, foram descritos que diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*, incluindo parasitos obtidos de LM e de LCL, podem perder a capacidade de proliferação após alguns repiques em cultura. Este mecanismo é pouco conhecido, porém um dos motivos pode ser devido à falta de adaptação destes parasitos a determinadas condições de cultura. No entanto, a adaptação de diferentes cepas de parasitos pode variar, e alguns parasitos podem ser mais exigentes quanto à composição do meio de cultura, mesmo pertencendo à mesma espécie (Dorta et al. 2012). Embora existam vários componentes envolvidos no processo de cultivo, o SBF pode ser um dos fatores limitantes deste crescimento (Celeste & Guimaraes 1988; Merlen et al. 1999; Visvesvara & Garcia 2002; Oliveira et al. 2010).

Diante do exposto, é importante uma avaliação de diferentes lotes de SBF para o preparo de meio de cultura de *L. (V.) braziliensis*. Nesta avaliação deve-se levar em consideração que, além de permitir o crescimento do parasito, o meio de cultura deve manter as características biológicas dos parasitos, como a metaciclogênese e a capacidade de infecção.

3. OBJETIVO

Avaliar o desempenho de diferentes lotes de SBF no preparo de meio para cultura de *L. (V.) braziliensis*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1. Realizar a curva de crescimento de duas cepas de *L.(V.) braziliensis*, em meios de Grace contendo diferentes lotes de SBF.

3.1.2. Avaliar a atividade metabólica de duas cepas de *L.(V.) braziliensis*, em meios de Grace contendo diferentes lotes de SBF.

3.1.3. Comparar a porcentagem de formas promastigotas metacíclicas de duas cepas de *L.(V.) braziliensis*, geradas em meios de Grace contendo diferentes lotes de SBF.

3.1.4. Comparar o desenvolvimento da lesão em camundongos infectados por duas cepas de *L.(V.) braziliensis*, cultivadas em meios de Grace contendo cinco diferentes lotes de SBF.

3.1.5. Avaliar técnicas para selecionar lotes de SBF para cultivo de *L.(V.) braziliensis*.

3.1.6. Comparar a composição bioquímica dos diferentes lotes de SBF testados.

4. METODOLOGIA

4.1. Parasitos

Foram utilizados duas cepas de parasitos da espécie *L. (V.) braziliensis*, obtidas de pacientes com LTA e armazenadas no banco de leishmânias (Leishbank) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG). Um isolado foi oriundo de LM MHOM/BR/2006/PPS (PPS6m) e o outro de LCL MHOM/BR/2006/CSA7c (CSA7c), sendo ambos caracterizados como *L. (V.) braziliensis*, como descrito anteriormente (Oliveira et al. 2010). As formas promastigotas das leishmânias foram mantidas em meio de Grace completo (Sigma, St Louis, MD, EUA) suplementado com 20% SBF (SBF, Cripion, Andradina, SP, Brasil, lote 20650) inativado 56 °C 30 min, 2mM L-glutamina (Sigma), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) e mantidas em estufa BOD, a 26 °C. Alternativamente, foram utilizados para o cultivo de leishmânias, cinco meios de Grace completo, suplementando com os diferentes lotes de SBF, como representado na tabela 1. O meio 1, já descrito, foi caracterizado como o lote padrão ouro, ou seja, aquele em que as formas promastigotas em fase logarítmica foram mantidas, e a partir deste, foram realizados os repiques para os respectivos meios contendo os diferentes lotes de SBF teste, para que posteriormente fossem realizados os ensaios. Todos os repiques foram iniciados com 5×10^5 leishmânias/mL.

Tabela 1: SBF utilizados para a suplementação dos meios de Grace completo.

	Lotes de SBF	Marca	
Meio 1	20650	Cripion, SP, Brasil	Padrão ouro
Meio 2	20700	Cripion, SP, Brasil	Teste
Meio 3	18040998-fe	LGC Biotecnologia, SP, Brasil	Teste
Meio 4	L005	Cripion, SP, Brasil	Teste
Meio 5	20710	Cripion, SP, Brasil	Teste

4.2. Curva de Crescimento

Após o repique com 5×10^5 leishmânias/mL nos diferentes meios, os parasitos foram quantificados diariamente em hematocitômetro durante 6 dias. Foram avaliadas as curvas de crescimento em dois períodos distintos para cada cepa de *L. (V.) braziliensis*. Para a realização da curva de crescimento 1 os parasitos obtidos na fase logarítmica de cultura no meio 1 foram repicados para os novos meios de Grace contendo os diferentes lotes teste de SBF, caracterizando a primeira passagem nestes meios, conforme representado na figura 5.

Para a realização da curva 2 de crescimento, os parasitos foram obtidos na fase logarítmica da cultura utilizada para a curva de crescimento 1 e repicados para novos meios de Grace contendo os seus respectivos lotes teste de SBF, caracterizando a segunda passagem em meios contendo diferentes soros (Figura 5).

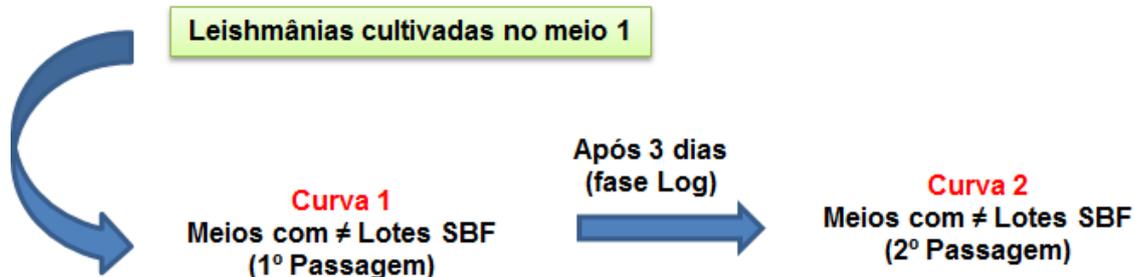


Figura 5: Esquema representativo do período de avaliação das curvas de crescimento.

4.3. Avaliações da atividade metabólica

A atividade metabólica das formas promastigotas em fase logarítmica foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetilazol-2i)-2,5-difenil brometo de tetrazólio). O ensaio baseia-se na redução do sal de tetrazólio [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide] pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase gerando cristais violeta de formazan. Esta redução só ocorre em células viáveis, sendo assim, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de células vivas

(Dutta et al. 2005).

Foram realizados testes de MTT em três condições diferentes, diferindo entre si, na quantidade de passagem dos parasitos pelos meios de Grace contendo os diferentes lotes teste de SBF.

Para a realização do teste de MTT 1, 5×10^5 leishmânias/mL obtidas na fase logarítmica de cultura no meio 1, foram repicadas para novos meios de Grace contendo os diferentes lotes teste de SBF, caracterizando a primeira passagem nestes meios, assim como foi feito na curva de crescimento 1 (figura 5). O esquema deste primeiro repique está representando na figura 6.

Para realização do teste de MTT 2, 5×10^5 leishmânias/mL foram obtidas na fase logarítmica da cultura utilizada para a curva 1, e repicadas para novos meios de Grace contendo os seus respectivos lotes teste de SBF, caracterizando a segunda passagem neste meios, assim como foi feito na curva de crescimento 2 (figura 6).

Para realização do teste de MTT 3, 5×10^5 leishmânias/mL foram obtidas na fase logarítmica da cultura utilizada para a curva 2, e repicadas para novos meios de Grace contendo os seus respectivos lotes teste de SBF, caracterizando a terceira passagem neste meios (Figura 6).

Depois de realizadas as passagens pelos meios contendo os diferentes lotes teste de SBF, os parasitos recuperados foram lavados e submetidos ao teste de MTT. Os testes de MTT foram realizados em placas de 96 poços (Costar), foram adicionados 20 μ L de MTT (5 mg/mL) a cada poço com volume final de 100 μ L, contendo 5×10^5 leishmânias/mL. A cultura foi mantida em estufa BOD a 26 °C por período 24 h, seguido da adição de 100 μ L de DMF (Dimetilformamida) 50% - SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10% por 18 h a 37°C para solubilizar os cristais de formazan. A densidade óptica foi determinada a 550 nm, em leitor de microplacas (MULTISKAN).

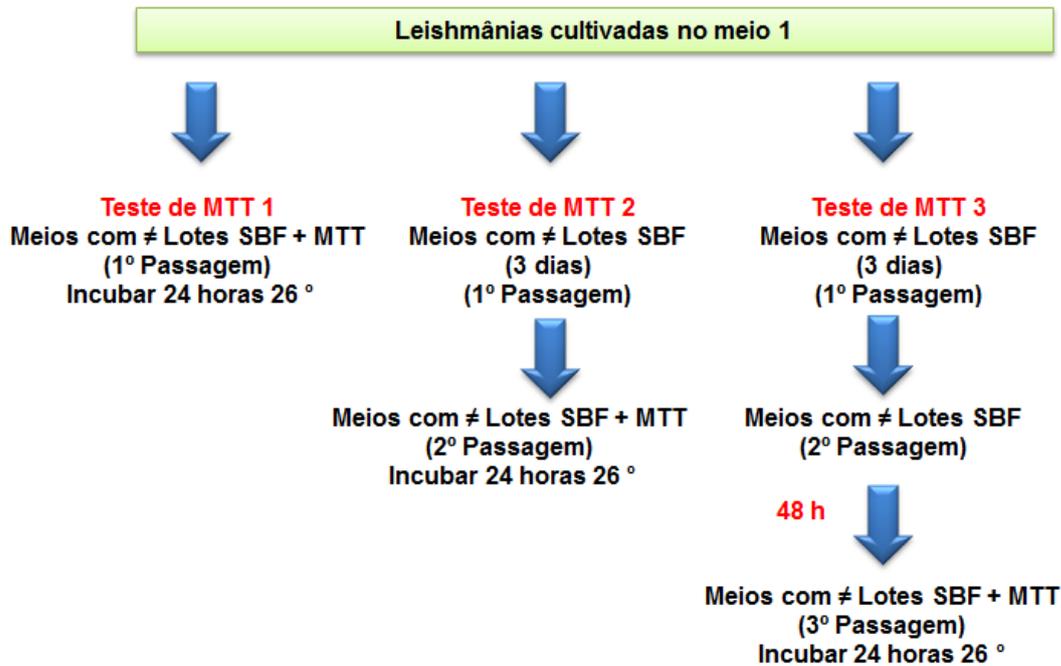


Figura 6: Esquema representativo do período de avaliação dos testes de MTT.

4.4. Quantificações das formas metacíclicas

Para avaliação da metaciclogênese, os parasitos obtidos na fase logarítmica de cultura no meio 1, foram repicados para novos meios de Grace contendo os respectivos lotes teste de SBF. Após seis dias de cultura, as formas promastigotas foram lavadas 3x com PBS e ressuspendidas para $1,5 \times 10^7$ leishmânias/mL em PBS (100 μ L). Foram adicionados 100 μ g/ml de lectina de *Bauhinia purpurea* (BPL, Vector Laboratórios, Bulingame, CA, EUA), após 30 min de incubação, à temperatura ambiente, a suspensão foi homogeneizada suavemente, centrifugada a 40 x g (5 min) e as formas promastigotas metacíclicas foram coletadas do sobrenadante, e quantificadas em hematocítômetro. O percentual de metacíclicas foi determinado pela multiplicação da quantidade de formas promastigotas recuperadas x 100 dividida pela quantidade de leishmânias total na amostra sem lectina.

4.5. Camundongos e infecção *in vivo*

Para avaliação da infectividade, os parasitos obtidos na fase logarítmica

de cultura no meio 1, foram repicados para novos meios de Grace contendo os respectivos lotes testes de SBF. Após seis dias de cultura, as formas promastigotas foram lavadas 3x com PBS e ressuspendidas para $1,0 \times 10^7$ leishmânias em 50 μL em PBS. A infecção experimental foi realizada pela injeção da suspensão de parasitos no coxim plantar posterior esquerdo dos animais. A lesão desencadeada na pata infectada foi monitorada semanalmente durante um período de 5 semanas com auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Kawasaki, Japan) comparando-se com o tamanho da pata não infectada.

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, mantidos no Biotério do IPTSP/UFG em salas climatizadas, a 22°C , com ciclos de claro e escuro de 12 horas, em estante ventilada (ALESCO, SP) com alimentação e água *ad libitum*. Após cinco semanas de infecção, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina/cetamina e eutanasiados. Para cada grupo de experimentos foram utilizados 5 camundongos.

4.6. Dosagens bioquímicas

Os lotes de SBF foram inativados a 60°C durante 1 hora e armazenados a -20°C . A quantidade de albumina, cálcio, creatinina, ureia, glicose, cloro, sódio, potássio, proteínas totais, colesterol presentes nos diferentes lotes de SBF foram avaliadas por metodologias automatizadas utilizando o princípio colorimétrico e/ou enzimático (equipamento ARCHITECT c8000, reagentes ABBOTT). A quantificação de hemoglobina foi realizada por meio de fotometria (equipamento XE-2100 – Roche, reagente Sulfolyser).

4.7 Análises estatísticas

Os resultados foram comparados para avaliar a significância das diferenças, utilizando o teste Anova one-way seguido por Tukey, usando o programa GraphPad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA). Os dados

foram apresentados em gráficos contendo média \pm desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Uma passagem em cultura não discrimina lotes ruins de SBF pela técnica de quantificação de parasitos

A adaptação dos parasitos aos meios contendo diferentes lotes de SBF foi avaliada por meio da curva de crescimento. Após o primeiro repique, os parasitos apresentaram um perfil de crescimento similar em todos os meios. Os parasitos da cepa PPS6m atingiram um número maior do que $1,0 \times 10^7$ leishmânias/mL em todos os meios, após o terceiro dia de cultivo, exceto no meio 3 (Figura 7A). O mesmo foi observado para os parasitos da cepa CSA7c, porém a partir do quarto dia (Figura 7B). O maior número dos parasitos PPS6m foi alcançado no meio 1 em relação aos outros meios, e no meio 2, em relação ao meio 3, sendo que os outros meios propiciaram um menor crescimento dos parasitos, principalmente no terceiro e quarto dia (Figura 7A). Em CSA7c, o maior número de parasitos foi alcançado apenas no meio 1 em relação aos outros meios, principalmente no sexto dia (Figura 7B). Os menores números de parasitos, foram observados no meio 3, para ambos os isolados, no terceiro dia de cultura (Figura 7A-B).

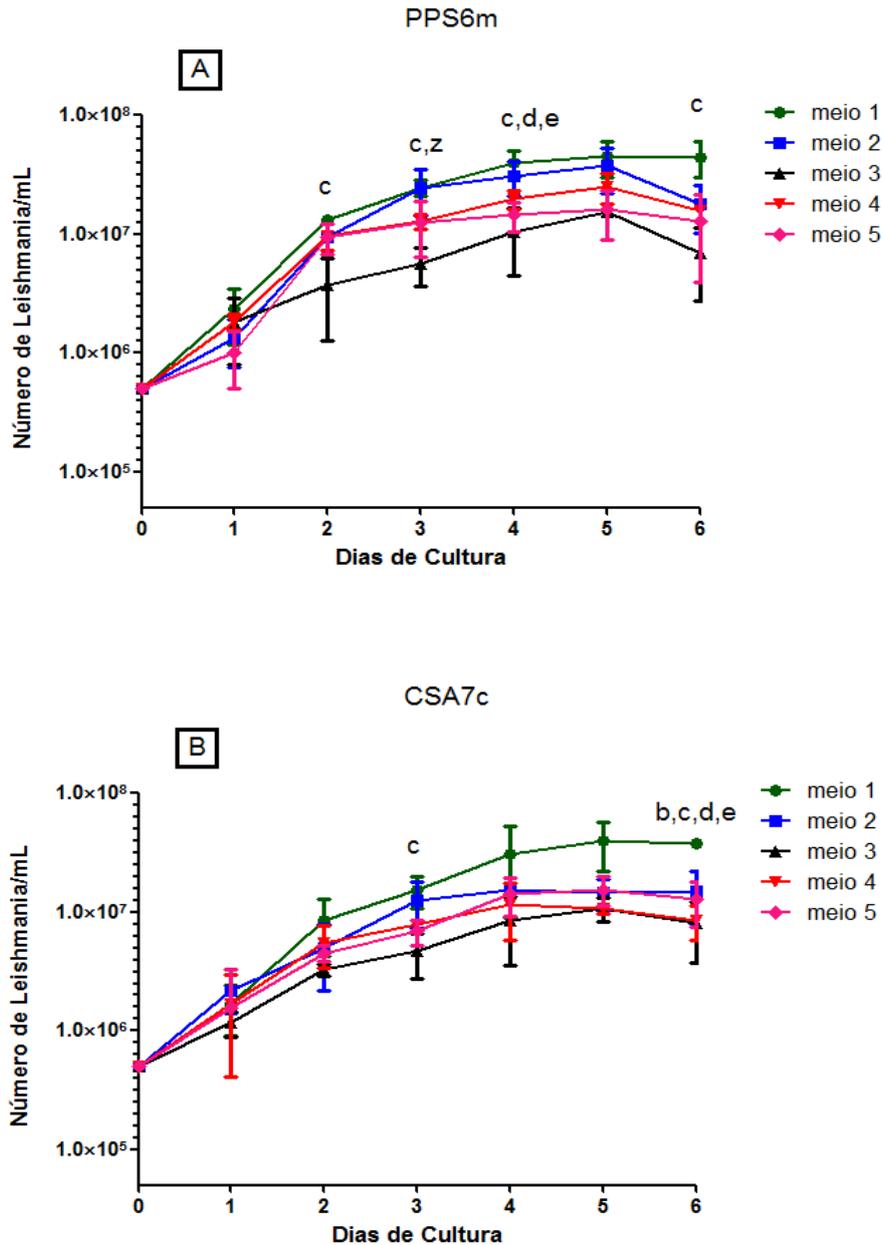


Figura 7: Adaptação dos parasitos após primeira passagem para meio de Grace com diferentes lotes de Soro Bovino Fetal. Os gráficos representam a curva de crescimento de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* PPS6m (A) e CSA7c (B). Os parasitos obtidos na fase logarítmica de cultura do meio de Grace 1, foram repicados para novos meios contendo diferentes lotes teste de soro bovino fetal. As linhas representam o crescimento dos parasitos no decorrer dos dias. Os dados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As letras **b**, **c**, **d** e **e** significam diferença estatisticamente significativa entre o meio 1 e os meios 2, 3, 4 e 5 respectivamente. As letras **x**, **y** e **z** significam diferença estatisticamente significativa entre o meio 2 e os meios 3, 4 e 5 respectivamente. Os dados foram avaliados por ANOVA One-way seguido por Tukey e foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

Após o segundo repique nos meios contendo os respectivos lotes de SBF, foi observado que apenas o meio 1 foi capaz de sustentar o crescimento dos parasitos tanto para PPS6m quanto para CSA7c, atingindo um número superior a $1,0 \times 10^7$ leishmânias/mL no segundo dia para PPS6m, e no terceiro dia para CSA7c (Figura 8 A-B). O número de parasitos dos outros meios foi inferior a $1,0 \times 10^7$ leishmânias/mL no decorrer de todo período experimental.

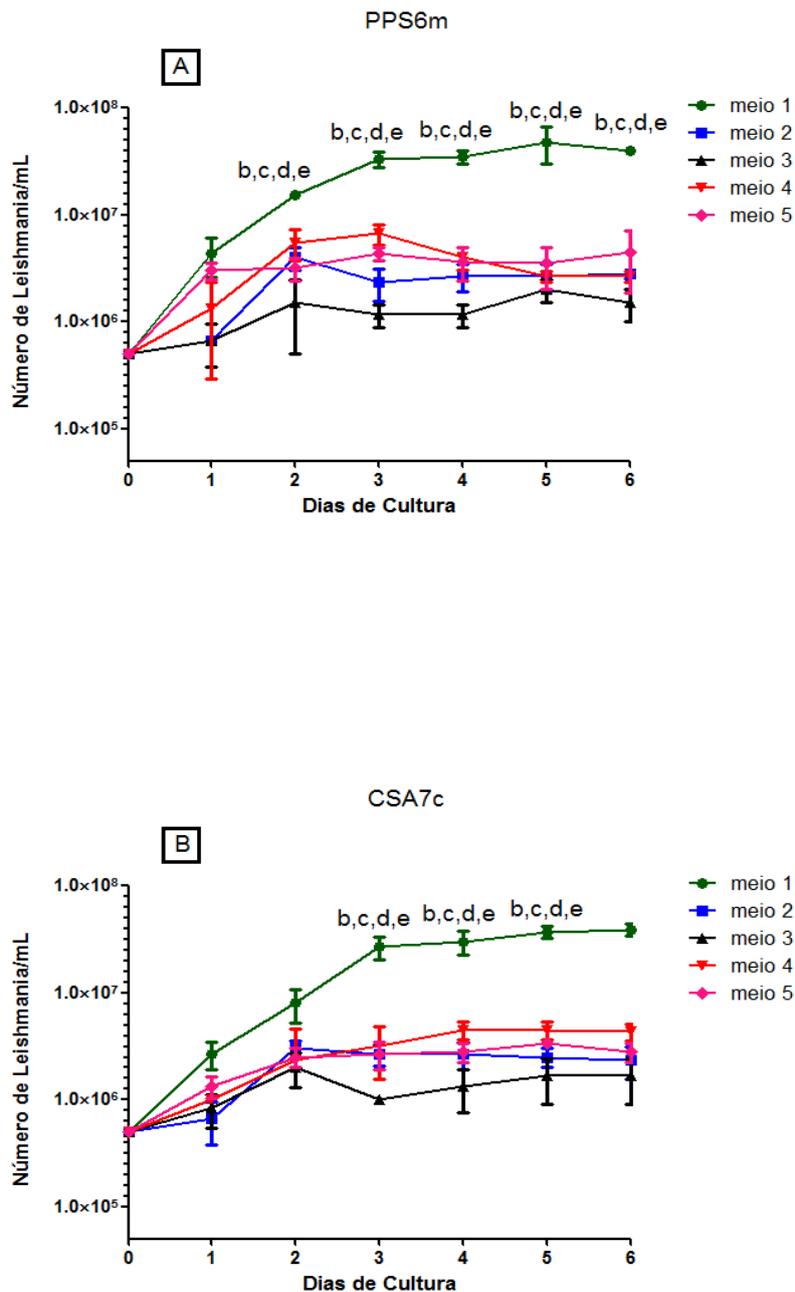


Figura 8: Adaptação dos parasitos após segunda passagem para meio de Grace com diferentes lotes de Soro Bovino Fetal. Os gráficos representam as curvas de crescimento de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* PPS6m (A) e CSA7c (B). Os parasitos obtidos na fase logarítmica de cultura da curva 1, fora repicados para novos meios contendo diferentes lotes teste de soro bovino fetal. As linhas representam o crescimento dos parasitos no decorrer dos dias. Os dados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As letras **b**, **c**, **d** e **e** significam diferença estatisticamente significativa entre o meio 1 e os meios 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Os dados foram avaliados por ANOVA One-way seguido por Tukey e foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

5.2 Duas ou mais passagens em cultura discrimina lotes ruins de SBF pelo teste de MTT

A atividade metabólica de promastigotas foi avaliada após diferentes repiques. As formas promastigotas foram cultivadas no meio de Grace 1 e posteriormente foram transferidas para meios contendo os diferentes lotes de SBF para avaliação com o teste de MTT. Como mostrado na Figura 9, a simples transferência das leishmânias para meios com diferentes lotes de soro foi suficiente pra discriminar alguns lotes de SBF que não são apropriados para cultivo de leishmânia, uma vez que, para a cepa PPS6m os parasitos cultivados no meio 1 apresentaram uma melhor atividade metabólica, quando comparado com os parasitos cultivados nos meios 3 e 4. Por outro lado, os parasitos presentes no meio 5 possuíam uma atividade metabólica semelhante aos parasitos presentes no meio 1 e maior do que a observada nos parasitos dos meios 2, 3 e 4. Os parasitos no meio 2 apresentaram uma atividade metabólica semelhante ao meio 1 e maior a observada nos meios 3 e 4. Para a cepa CSA7c, o resultado foi semelhante. Os parasitos cultivados nos meios 1 e 5 continuaram apresentando uma maior atividade metabólica, porém, parasitos cultivados no meio 1 apresentaram maior atividade metabólica somente que os parasitos cultivados no meio 3 (Figura 9).

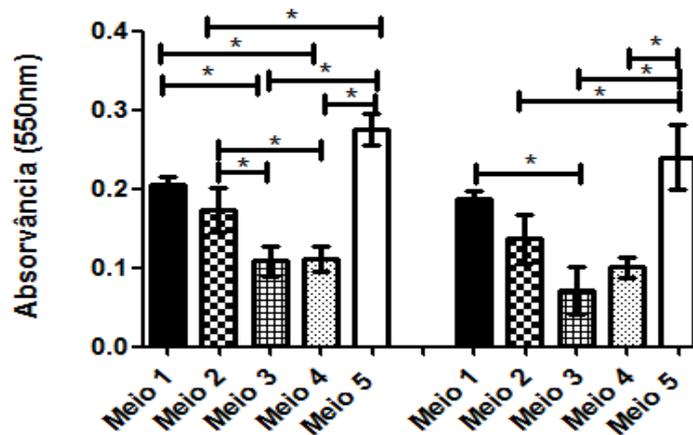


Figura 9: Avaliação da atividade metabólica em meios de Grace contendo diferentes lotes de Soro Bovino Fetal. Os gráficos representam a atividade metabólica de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (PPS6m e CSA7c). Os parasitos obtidos na fase logarítmica de cultura do meio de Grace 1, foram ressuspensos em novos meios contendo diferentes lotes teste de soro bovino fetal para a realização do ensaio de MTT. Os dados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0,05$ indicam diferenças entre os meios. Os dados foram avaliados por ANOVA One-way seguido por Tukey.

A atividade metabólica dos parasitos no meio 1 e no meio 5 foi semelhante, enquanto os demais meios foi inferior. Com o objetivo de observar se a atividade metabólica das leishmânias no meio 5 era preservada em uma segunda passagem, foi realizado um segundo repique para novos meios contendo os respectivos lotes de SBF. Os resultados mostraram que o lote de SBF presente no meio 1 continuou proporcionando uma boa atividade metabólica para os parasitos em ambos os isolados, assim como o meio 5 (Figura 10). O meio 2 apresentou-se pior em relação ao meio 1, diferente do que foi observado após a simples transferência para os meios contendo os diferentes lotes de SBF (Figura 9).

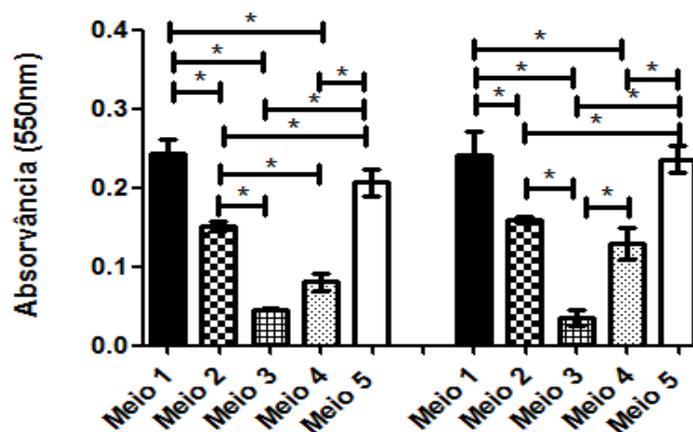


Figura 10: Avaliação da atividade metabólica dos parasitos após a segunda passagem em meios de Grace contendo diferentes lotes de Soro Bovino Fetal. Os gráficos representam a atividade metabólica de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (PPS6m e CSA7c). Os parasitos obtidos na fase logarítmica de cultura da curva 1, foram repicados para novos meios de Grace contendo os seus respectivos lotes teste de soro bovino fetal para a realização do ensaio de MTT. Os dados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0,05$ indicam diferenças entre os meios. Os dados foram avaliados por ANOVA One-way seguido por Tukey.

Com o intuito de verificar se um novo repique dos parasitos era capaz de discriminar o meio 5 do meio 1, foi realizado um terceiro repique para novos meios contendo os respectivos lotes de SBF. Os resultados mostraram que em ambas as cepas de parasitos, mesmo após terceira passagem, os parasitos presentes nos meios 1 e 5 possuem uma atividade metabólica semelhante e superior aos parasitos nos demais meios (Figura 11).

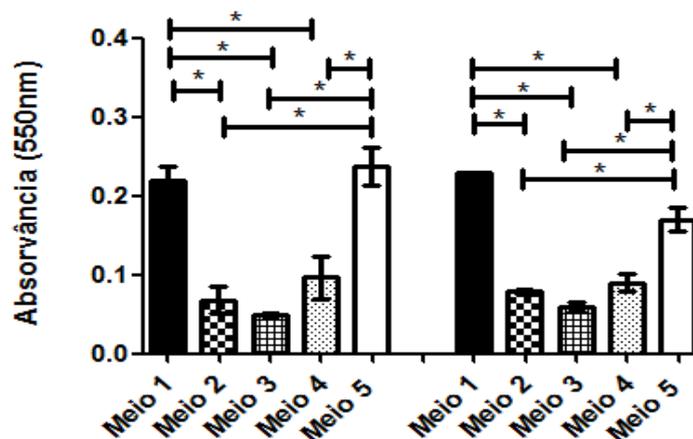


Figura 11: Avaliação da atividade metabólica dos parasitos após terceira passagem em meios de Grace contendo diferentes lotes de Soro Bovino Fetal. Os gráficos representam a atividade metabólica de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (PPS6m e CSA7c). Os parasitos obtidos na fase logarítmica de cultura da curva 2, foram repicadas para novos meios de Grace contendo os seus respectivos lotes teste de soro bovino fetal e, em seguida, o ensaio de MTT foi realizado. Os dados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0,05$ indicam diferenças entre os meios. Os dados foram avaliados por ANOVA One-way seguido por Tukey.

5.3. A cepa PPS6m apresentou diferença na porcentagem de formas promastigotas metacíclicas gerada durante o cultivo nos meios

As formas promastigotas em fase estacionária foram submetidas ao ensaio de aglutinação com BPL, após cultivo nos meios contendo os lotes de SBF. Os dados mostraram que para a cepa PPS6m, os parasitos cultivados no meio 1 proporcionaram maior porcentagem de metacíclicas em relação aos parasitos cultivados no meio 4. Na cepa CSA7c, independente do lote de SBF utilizado nos meios, não houve diferença na porcentagem de metacíclicas recuperadas (Figura 12).

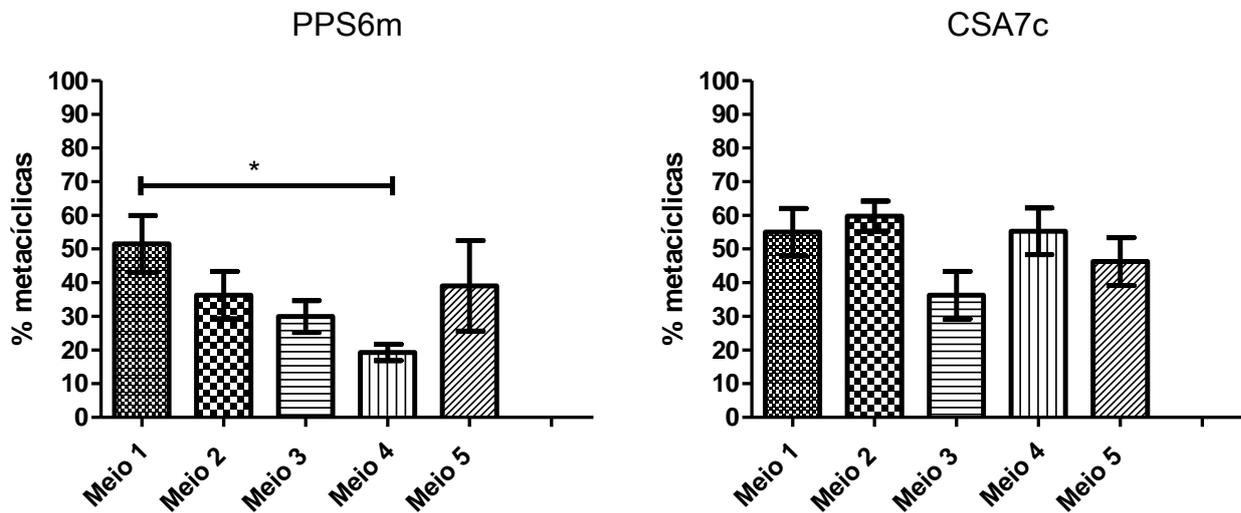


Figura 12: Recuperação de formas promastigotas metacíclicas cultivadas em meio de Grace contendo diferentes lotes de Soro Bovino Fetal. Os gráficos representam a porcentagem de formas metacíclicas de *L. (V.) braziliensis* (PPS6m e CSA7c). Os parasitos foram cultivados em meio de Grace contendo diferentes lotes de soro bovino fetal durante 6 dias e, em seguida, foram submetidas ao teste de aglutinação em lectina *Bauhinia purpurea*. A porcentagem formas promastigotas metacíclicas que foi coletada no sobrenadante foi determinada em relação ao total de parasitos. Os dados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, realizados em triplicatas. * $p < 0,05$ indica diferença entre os meios. Os dados foram avaliados por ANOVA One-way seguido por Tukey.

5.4. Parasitos em fase estacionária causam lesões semelhantes em camundongos BALB/c independente dos lotes de SBF presentes nas culturas

Considerando que para a cepa PPS6m, os lotes de SBF 1 e 4, proporcionaram maior e menor porcentagem de metacíclicas, respectivamente, os parasitos cultivados nestes meio, foram utilizados para a infecção dos animais, tanto para PPS6m, quanto para CSA7c, buscando verificar se há interferência no tamanho das lesões provocadas pelos parasitos cultivados nestes diferentes meios.

As lesões desenvolvidas nos camundongos BALB/c foram pequenas. Com a cepa PPS6m, a lesão começou a se desenvolver após a segunda semana de infecção (Figura 13), os resultados mostraram que os parasitos cultivados nos dois meios são capazes de provocar lesões semelhantes nos camundongos, mesmo o meio 4 proporcionando uma baixa porcentagem de promastigotas metacíclicas (Figura 12).

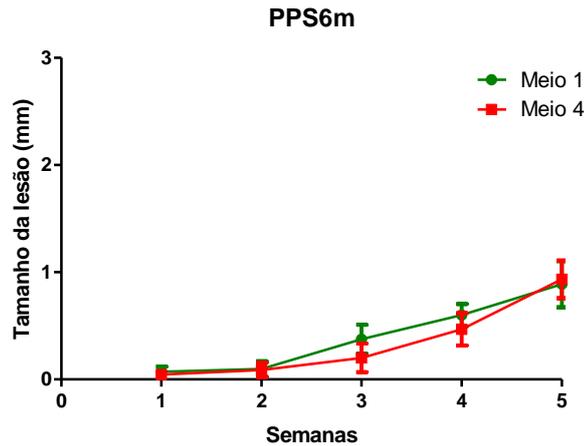


Figura 13: Lesão desencadeada em camundongos BALB/c infectados com parasitos PPS6m cultivados em meio de Grace contendo diferentes lotes de Soro Bovino Fetal. Os gráficos representam o tamanho da lesão de camundongos BALB/c infectados com formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (PPS6m). Os parasitos foram cultivados em meio de Grace contendo diferentes lotes de soro bovino fetal durante 6 dias, em seguida, foram inoculados na pata esquerda dos camundongos. Os gráficos representam a diferença entre a pata infectada e a pata não infectada. Os dados representam as médias \pm SD de dois experimentos com cinco animais por grupo. Os dados foram avaliados por ANOVA One-way seguido por Tukey.

Diferente do isolado PPS6m, com a cepa CSA7c, as lesões começaram a se desenvolver um pouco mais precocemente, logo após a primeira semana de infecção e assim como na cepa PPS6m, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 14).

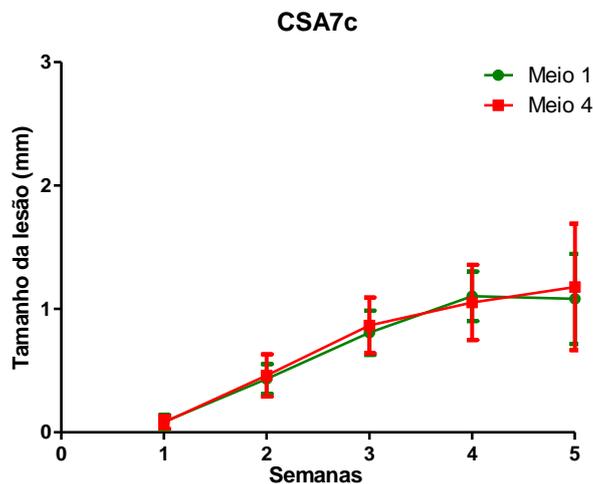


Figura 14: Lesão desencadeada em camundongos BALB/c infectados com parasitos CSA7c cultivados em meio de Grace contendo diferentes lotes de Soro Bovino Fetal. Os gráficos representam o tamanho da lesão de camundongos BALB/c, infectados com formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (CSA7c). Os parasitos foram cultivados em meio de Grace contendo diferentes lotes de soro bovino fetal durante 6 dias, em seguida, foram inoculados na pata esquerda dos camundongos. Os gráficos representam a diferença entre a pata infectada e a pata não infectada. Os dados representam as médias \pm SD de dois experimentos com cinco animais por grupo. Os dados foram avaliados por ANOVA One-way seguido por Tukey.

5.5. Meio de Grace completo, suplementado com lote de SBF 4, possui maior concentração de hemoglobina, sódio, colesterol, cloro e menor concentração de glicose

Com o intuito de verificar se algum componente específico presente nos lotes de SBF poderia explicar as diferenças encontradas nos experimentos anteriores, foram realizadas uma análise bioquímica de alguns constituintes dos soros utilizados (Tabela 2). Os resultados mostraram que o lote de SBF presente no meio de Grace 4, é constituído de uma maior concentração de hemoglobina, sódio, colesterol, cloro e menor concentração de glicose, em relação aos lotes dos outros meios.

Tabela 2 : Quantificação bioquímica dos componentes presentes nos diferentes lotes de Soro Bovino Fetal.

	SBF 1	SBF 2	SBF 3	SBF 4	SBF 5
Hemoglobina	0,0	0,0	0,0	0,2 g/dL	0
Albumina	2,1 g/dL	3,3 g/dL	2,4 g/dL	3,1 g/dL	2,7 g/dL
Cálcio	13,4 mg/dL	14,1 mg/dL	13,6 mg/dL	13,9 mg/dL	13,7 mg/dL
Creatinina	3,4 mg/dL	3,6 mg/dL	2,8 mg/dL	2,7 mg/dL	3,6 mg/dL
Ureia	34 mg/dL	34 mg/dL	34 mg/dL	37 mg/dL	35 mg/dL
Glicose	37 mg/dL	34 mg/dL	49 mg/dL	15 mg/dL	33 mg/dL
Cloro	97 mEq/L	102 mEq/L	101 mEq/L	106 mEq/L	101 mEq/L
Sódio	135 mEq/L	142 mEq/L	142 mEq/L	145 mEq/L	142 mEq/L
Potássio	>10,0 mEq/L	8,1 mEq/L	>10,0 mEq/L	>10,0 mEq/L	>10,0 mEq/L
Proteínas Totais	3,7 g/dL	4,2 g/dL	4,0 g/dL	4,2 g/dL	4,1 g/dL
Colesterol	33 mg/dL	29 mg/dL	33 mg/dL	38 mg/dL	29 mg/dL

Os dados representam a quantidade de alguns constituintes presentes em cada soro bovino fetal, utilizado para a suplementação dos meios de Grace completo. As dosagens foram realizadas por meio de metodologias automatizadas, utilizando o princípio colorimétrico e/ou enzimático (equipamento ARCHITECT c8000, reagentes ABBOTT). A quantificação de hemoglobina foi realizada por meio de fotometria (equipamento XE-2100 – Roche, reagente Sulfolyser) em um único experimento independente.

6. DISCUSSÃO

O acompanhamento da curva de crescimento é, de maneira geral, a forma mais comum de se observar se um lote de SBF é capaz de manter uma produção suficiente de parasitos para as pesquisas em laboratórios. Neste estudo, foi demonstrado que o acompanhamento da curva de crescimento após o primeiro repique pode induzir ao erro na escolha de um bom lote de SBF, já que as duas cepas utilizadas, se adaptaram bem e atingiram um crescimento que pode ser considerado satisfatório em relação ao meio de referência (Figura 7). Pelo menos uma segunda passagem dos parasitos por meios de Grace contendo diferentes lotes de SBF é indispensável para discriminar qual meio é capaz de proporcionar o melhor crescimento dos parasitos e, principalmente, sustentar o crescimento após várias passagens (Figura 8). Para que parasitos do gênero *Leishmania* sejam mantidos em meios de cultura líquido contendo SBF, é indispensável que seja escolhido um lote de SBF que mantenha as características de crescimento e a capacidade de infecção dos parasitos após vários repiques (Bates 2007). Poucos trabalhos na literatura discutem como selecionar um bom lote de SBF para a manutenção destes parasitos. Vale ressaltar que, na maioria das vezes, a percepção de que um lote de SBF não é viável para o cultivo de leishmânias só acontece quando a quantidade de parasitos produzidos ou suas características começam a ser muito diferente do que se observava anteriormente no laboratório (Dorta et al. 2012). Isto indica que houve falha na seleção do lote de SBF para realização da cultura.

Childs et al. (1978), realizou um estudo comparando curvas de crescimento de espécies de leishmânias do Novo Mundo, incluindo *L. (V.) braziliensis*, cultivadas em meios suplementados com SBF (Schneider, Grace e Mitsuhashi) com meios que necessitam da presença de sangue (Senekje, NNN e Tanabe). Neste trabalho, foi demonstrado que os meios suplementados com SBF propiciavam sucesso no cultivo dos parasitos. Além disto, foi ressaltado que é de extrema importância avaliar o crescimento dos parasitos ao longo do período de cultivo.

Lemesre et al. (1988) utilizou o acompanhamento da curva de crescimento para comparar o crescimento de *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis* com o intuito de discriminar meios de cultivo. Ele utilizou os meios

LITR9, RPMI 1640 e GLSH, sendo que os dois últimos eram suplementados com SBF. Foi demonstrado que para *L. (L.) chagasi* todos os meios foram capazes de sustentar o crescimento, ao contrário de *L. (V.) braziliensis* em que os parasitos cultivados em meio RPMI 1640 não apresentaram um bom crescimento. Os autores demonstraram, ainda, que a concentração inicial de parasitos influenciou na curva de crescimento de ambos os isolados, sendo que os parasitos não conseguiram se multiplicar quando suas densidades iniciais foram baixas. Os resultados de Lemesre et al. (1988) sugerem que os parasitos necessitam de uma quantidade mínima de alguns metabólitos produzidos pelos mesmos, em meio de cultura. Para *L. (V.) braziliensis* os parasitos atingiam um bom crescimento quando a densidade inicial era igual ou superior a 5×10^5 parasitos/mL, coincidindo com a densidade utilizada no presente estudo.

Isolados de *L. (V.) braziliensis* oriundos de pacientes com LTA podem perder a capacidade de proliferação após alguns repiques. O mecanismo que causa este fenômeno ainda não é totalmente elucidado, porém um dos fatores que podem estar interferindo são as pequenas variações na capacidade destes isolados se adaptarem aos diferentes componentes presentes nos lotes de SBF (Dorta et al. 2012)

Outra forma para avaliar a qualidade dos meios é avaliando o metabolismo dos parasitos. Nossos dados mostram que, como observado para a curva de crescimento, a simples transferência para meios contendo diferentes lotes de SBF (primeira passagem) não possibilita uma boa discriminação de um bom meio para cultivo de leishmânia baseado na análise do metabolismo pelo método do MTT. Entretanto, algumas diferenças no metabolismo foram observadas nos meios contendo os diferentes lotes. Estas diferenças não foram relacionadas com a concentração de proteína ou glicose nos soros, já que o meio 1, com menor quantidade de albumina, foi o que proporcionou melhor crescimento e o metabolismo neste meio foi igual ao do meio 5. O meio que possuía menos glicose, meio 4, proporcionou um metabolismo superior ao do meio 3, sendo que este último foi o que tinha mais glicose. Ressaltamos que o meio 5 não foi capaz de suportar o crescimento dos parasitos após a segunda passagem, como mostrado na curva de crescimento, porém este meio foi capaz de promover uma atividade metabólica igual ao do meio 1.

Não está claro porque as diferenças começam a ser melhor evidenciadas após o segundo repique. Um dos metabólitos que pode estar presente nas culturas dos parasitos é o metilglioxal. Foi demonstrado por Padmanabhan et al. (2005), em seu estudo com *L. donovani*, que o metilglioxal é um produto intermediário, formado durante o processo de glicólise, e catabolismo de aminoácidos, sendo um metabólito que possui atividade citotóxica sobre os parasitos. Em tripanossomatídeos, o metabolismo de carboidratos é essencial, e este processo ocorre em organelas específicas dos parasitos, chamadas glicossomas (Barrett et al. 1999; Moyersoen et al. 2004). Sendo assim, temos a hipótese de que este pode ser um exemplo de metabólito que pode estar inibindo o crescimento e o metabolismo dos parasitos do presente estudo. Outra possibilidade é que em um primeiro repique, a concentração e a ação destes inibidores possam não ter efeito suficiente para prejudicar significativamente o crescimento dos parasitos. Conseqüentemente, somente após dois ou três repiques é que os parasitos sofrem a ação destes inibidores, não sendo capazes de proliferar.

Além de suportar o crescimento dos parasitos, um bom meio de cultura deve ser capaz de promover um bom rendimento de leishmânias metacíclicas (Bates 2007). Neste estudo observamos variações no rendimento de metacíclicas apenas no caso do isolado PPS6m sendo que este rendimento variou de 19,3% a 51,5%. da Silva Jr (2014) também utilizaram em seus estudos a técnica de aglutinação em BPL, na mesma concentração utilizada neste estudo, para a separação de formas metacíclicas da cepa PPS6m. Estes autores observaram que foram recuperados uma porcentagem de aproximadamente 75% parasitos na forma metacíclica, ou seja, uma porcentagem maior do que a encontrado no presente estudo. É possível que o SBF utilizado no trabalho da Silva Jr et al. (2014) proporcionasse este melhor rendimento.

Além do SBF, diversas variações podem interferir na reprodutibilidade dos testes de aglutinação e, devem ser levados em consideração fatores como: a concentração das lectinas e dos parasitos, modo de preparo, velocidade de centrifugação, o tempo de incubação e o grau de pureza das lectinas utilizadas. Pinto-da-Silva et al. (2002) descreveram que dentre as 12 lectinas que foram testadas em seu estudo, a BPL é a lectina que possui uma melhor aglutinação

das formas promastigotas para *L. (V.) braziliensis*, utilizando a concentração de 32 µg/mL da BPL, eles foram capazes de obter 50% de formas metacíclicas a partir de culturas em fase estacionária. Apesar de ter sido utilizado uma diferente concentração da BPL, a porcentagem foi semelhante à encontrada no presente estudo. Cunningham et al. (2001) descreveu outros fatores que ainda podem influenciar significativamente no desenvolvimento de formas promastigotas metacíclicas, dentre eles devem ser levados em consideração à diferença entre as espécies, as condições de cultura como composição do meio, temperatura, fase da cultura (log ou estacionária) e a quantidade de parasitos. Os dados de Serafim et al. (2012) demonstraram em experimentos com *L. amazonensis* que em culturas estimuladas com CGS (antagonista do receptor de adenosina) apresentavam um maior número de formas metacíclicas após separação com gradiente de densidade de Ficoll, e que quando essas culturas tratadas com CGS eram incubadas com meio de Grace sem SBF ou nenhum outro suplemento, as leishmânias não eram capazes de recuperar a capacidade de proliferação comparada com as culturas em que foram adicionadas diferentes concentrações de adenosina, onde elas recuperavam a capacidade de proliferar, nos permitindo concluir que a falta de alguns nutrientes como neste caso, a adenosina podem favorecer a metaciclogênese.

Para a infecção dos camundongos, foram utilizados os parasitos em fase estacionária de cultura obtidos nos meios 1 e 4, pois para a cepa PPS6m, estes foram os meios que apresentaram o melhor e o pior rendimento de formas metacíclicas, respectivamente. Os dados da infecção nos mostraram que independente do lote de SBF os parasitos de ambas as cepas, conseguiram desencadear lesões semelhantes nas patas de camundongos BALB/c. Neste estudo verificou-se que a cepa CSA7c originada de paciente com LCL promoveu o aparecimento de uma lesão mais precocemente que o parasito PPS6m, sendo que esta última foi originada de paciente com LM. Isto pode ser atribuído ao fato de que parasitos oriundos de lesão LM possuem uma maior atividade enzimática para hidrolisar adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofostato (AMP) comparados com os parasitos oriundos de uma LCL, sendo assim, este excesso de ADP pode retardar a capacidade dos parasitos da cepa PPS6m começar a desencadear

as lesões em camundongos (Leite et al. 2012). O tamanho das lesões provocadas pelos parasitos de ambas as cepas, foram de aproximadamente 1mm de tamanho, após 5 semanas dados semelhantes aos descrito no trabalho de (Francesquini et al. 2014).

Os resultados obtidos a partir das dosagens bioquímicas dos componentes presentes nos diferentes lotes de SBF, nos mostraram que todos os lotes possuem quantidades semelhantes de componentes bioquímicos, com exceção do lote de SBF 4, em que foi observado uma maior quantidade de hemoglobina e uma menor quantidade de glicose. O SBF age com uma fonte de minerais, aminoácidos, vitaminas e açúcares, grupamentos heme, ácido fólico, dentre outros e, além disso, ele pode contribuir para a manutenção do pH e da osmolaridade das culturas (Childs et al. 1978; Chang & Chang 1985; Kar 1997; Schuster & Sullivan 2002). O grupo prostético heme presente nas hemoglobinas é de importância vital para os parasitos, pois está envolvido em vários processos metabólicos (Kelly et al. 2003), sendo assim, apesar do meio 4 possuir este metabólito, ele não proporciona um bom crescimento e atividade metabólica para os parasitos. Em contrapartida, este meio apresenta baixa concentração de glicose. Estudos anteriores descreveram que parasitos da família *Trypanosomatidae*, consomem glicose como fonte de energia, e esse consumo gera a produção de intermediários oxidados e ácidos orgânicos, e estes por sua vez, favorecerem a queda do pH das culturas favorecendo a metacicloênese dos parasitos (Bates & Tetley 1993; Van Hellemond et al. 1998), portanto este fenômeno pode estar acontecendo com os parasitos cultivados no meio 4, onde a baixa concentração de glicose, pode estar favorecendo a geração destes produtos e a indução precoce da metacicloênese, e ainda prejudicando a proliferação dos mesmos.

Outros componentes dos meios de cultura também são essenciais para sustentar o crescimento dos parasitos. Os dados de Nino & Camacho (2005) mostraram que *L. (V.) braziliensis* possuía um menor crescimento em meio Schneider comparado com o meio TC-100. Estes autores demonstraram que esta deficiência estava relacionada com a ausência do ácido fólico no meio Schneider, pois quando este foi adicionado, houve um aumento da taxa de replicação dos parasitos, favorecendo o crescimento em cultura. Algumas funções importantes exercidas pelos parasitos devem ser levadas em

consideração para que os mesmos sejam capazes de serem mantidos em cultura com intensa capacidade de proliferação, dentre estes fatores estão, por exemplo: a capacidade dos parasitos em sintetizar poliaminas (Burchmore & Barrett 2001), a presença de enzimas do tipo quinases ciclina-dependentes (CDKs), presentes em promastigoas em estágios proliferativo e metacíclico (Naula et al. 2005), caseína quinases, piruvato fosfato diquinase, adenosina quinase, cisteína proteinases, dentre outras (Barrett et al. 1999).

Portanto, o presente estudo nos mostra que é de extrema importância à utilização de métodos para selecionar lotes de SBF, uma vez que estes podem gerar ou faltar componentes que influenciam nas características dos parasitos em estudo, e ainda deve ser levado em consideração que para que seja selecionado um bom lote de SBF, é necessário que seja realizado pelo menos duas passagens dos parasitos em cultura nos meios contendo os lotes de SBF teste, uma vez que uma única passagem pode induzir a seleção de um lote de SBF ruim. Em contraste, os lotes de SBF que não são capazes de proporcionar a proliferação dos parasitos, são capazes de proporcionar formas promastigotas metacíclicas com capacidade de infecção em camundongos.

7. CONCLUSÕES

- 7.1.** Por meio da curva de crescimento é possível definir um bom lote de SBF para manutenção de leishmânias somente após a segunda passagem dos parasitos em cultura, porém mais passagens podem ser necessárias para uma melhor seleção.
- 7.2.** A análise da atividade metabólica pelo método de MTT não seleciona bons lotes de SBF para o cultivo de leishmânias, já que lotes ruins possibilitaram atividades metabólicas semelhantes ao lote bom.
- 7.3.** A porcentagem de leishmânias metacíclicas obtidas é independente da qualidade de SBF e do número de parasitos presente no final da fase estacionária de cultura.
- 7.4.** A capacidade dos parasitos de infectar camundongos independe da qualidade de SBF e do número de parasitos presente no final da fase estacionária de cultura. Quando as leishmânias atingem a fase estacionária, elas são capazes de induzir lesões semelhantes em camundongos, independente do lote de SBF.
- 7.5.** As modificações observadas no comportamento dos parasitos nos diferentes meios não foi devida às diferenças encontradas nos constituintes do SBF analisados neste estudo, embora as concentrações de glicose e hemoglobina possam ter interferido com os resultados do lote de SBF 4.

8. REFERÊNCIAS

1. Agarwal M, Jain A. New blood free biphasic medium with haemoglobin for cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes. *Indian Journal of Experimental Biology* 34: 1233-1236, 1996.
2. Almeida MC, Cuba CA, de Sa CM, Pharoah MM, Howard KM, Miles MA. Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* *in vitro*: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 325-329, 1993.
3. Armstrong TC, Patterson JL. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. *The Journal of Parasitology* 80: 1030-1032, 1994.
4. Barrett MP, Mottram JC, Coombs GH. Recent advances in identifying and validating drug targets in *trypanosomes* and *leishmanias*. *Trends in Microbiology* 7: 82-88, 1999.
5. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37: 1097-1106, 2007.
6. Bates PA, Tetley L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Experimental Parasitology* 76: 412-423, 1993.
7. Burchmore RJ, Barrett MP. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology* 31: 1311-1320, 2001.
8. Celeste BJ, Guimaraes MC. Growth curves of *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to Schneider's *Drosophila* medium as assessed by anti – *Leishmania* human sera. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao*

Paulo 30: 63-67, 1988.

9. Chance ML, Peters W, Shchory L. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 68: 307-316, 1974.
10. Chang CS, Chang KP. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 16: 267-276, 1985.
11. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* 5: 873-882, 2007.
12. Childs GE, Foster KA, McRoberts MJ. Insect cell culture media for cultivation of new world *Leishmania*. *International Journal for Parasitology* 8: 255-258, 1978.
13. Childs GE, McRoberts MJ, Moussa MA. Systems for the *in vitro* large-scale propagation of New World *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 73: 395-396, 1979.
14. Costa DL, Carregaro V, Lima-Junior DS, Silva NM, Milanezi CM, Cardoso CR, Giudice A, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP, Silva JS. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e965, 2011.
15. Courret N, Prina E, Mougneau E, Saraiva EM, Sacks DL, Glaichenhaus N, Antoine JC. Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *European Journal of Immunology* 29: 762-773, 1999.
16. Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science* 292: 285-287, 2001.

17. da Silva Jr IAM, Quixabeira VBL, Pereira LIA, Dorta MCL, Oliveira MAP, HORTA MF, Ribeiro-Dias F. *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*, 2014.
18. da Silva R, Sacks DL. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity* 55: 2802-2806, 1987.
19. Davies CR, Cooper AM, Peacock C, Lane RP, Blackwell JM. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 101 Pt 3: 337-343, 1990.
20. de Castro Cortes LM, de Souza Pereira MC, da Silva FS, Pereira BA, de Oliveira Junior FO, de Araujo Soares RO, Brazil RP, Toma L, Vicente CM, Nader HB, de Fatima Madeira M, Bello FJ, Alves CR. Participation of heparin binding proteins from the surface of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the adhesion of parasites to *Lutzomyia longipalpis* cells (Lulo) in vitro. *Parasites & Vectors* 5: 142, 2012.
21. DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity* 66: 827-829, 1998.
22. Dorta ML, Oliveira MA, Fleuri AK, Duarte FB, Pinto SA, Pereira LI, Ribeiro-Dias F. Improvements in obtaining New World *Leishmania* sp from mucosal lesions: notes on isolating and stocking parasites. *Experimental Parasitology* 13: 300-303, 2012.
23. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International* 54: 119-122, 2005.
23. Francesquini FC, Silveira FT, Passero LF, Tomokane TY, Carvalho AK, Corbett CE, Laurenti MD. Salivary gland homogenates from wild-caught sand flies *Lutzomyia flaviscutellata* and *Lutzomyia (Psychodopygus) complexus*

showed inhibitory effects on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *International Journal of Experimental Pathology* 95: 418-426, 2014.

24. Gontijo B, de Carvalho ML. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 71-80, 2003.

25. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 8: 419-433, 2010.

26. Grangeiro TB, Schriefer A, Calvete JJ, Raida M, Urbanke C, Barral-Netto M, Cavada BS. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *European Journal of Biochemistry/FEBS* 248: 43-48, 1997.

27. Grekov I, Svobodova M, Nohynkova E, Lipoldova M. Preparation of highly infective *Leishmania* promastigotes by cultivation on SNB-9 biphasic medium. *Journal of Microbiological Methods* 87: 273-277, 2011.

28. Hendricks LD, Wood DE, Hajduk ME. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76: 309-316, 1978.

29. Hockmeyer WT, Kager PA, Rees PH, Hendricks LD. The culture of *Leishmania donovani* in Schneider's insect medium: its value in the diagnosis and management of patients with visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 861-863, 1981.

30. Howard MK, Pharoah MM, Ashall F, Miles MA. Human urine stimulates growth of *Leishmania in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85: 477-479, 1991.

31. Howard MK, Sayers G, Miles MA. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Experimental Parasitology* 64: 147-156, 1987.

32. Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ,

Soares RP. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites & Vectors* 6: 54, 2013.

33. Ilgoutz SC, McConville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *International Journal for Parasitology* 31: 899-908, 2001.

34. Iniesta V, Carcelen J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P, Mangas M, Monroy I, Campo ML, Nieto CG, Corraliza I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infection and Immunity* 73: 6085-6090, 2005.

35. Jones TC, Johnson WD, Jr., Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of Infectious Diseases* 156: 73-83, 1987.

36. Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120: 33-40, 2002.

37. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22: 439-445, 2006.

38. Kar K. Folic acid the essential supplement to brain heart infusion broth for cultivation and cloning of *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitology* 115: (Pt 3), 231-235, 1997.

39. Kelly JX, Ignatushchenko MV, Bouwer HG, Peyton DH, Hinrichs DJ, Winter RW, Riscoe M. Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126: 43-44, 2003.

40. Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc*

Lond B Biol Sci 187: 409-419, 1974.

41. Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 10125-10130, 2008.

42. Kropf P, Fuentes JM, Fahrnich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Muller I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19: 1000-1002, 2005.

43. Leite PM, Gomes RS, Figueiredo AB, Serafim TD, Tafuri WL, de Souza CC, Moura SA, Fietto JL, Melo MN, Ribeiro-Dias F, Oliveira MA, Rabello A, Afonso LC. Ecto-nucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1850, 2012.

44. Lemesre JL, Darcy F, Kweider M, Capron A, Santoro F. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Acta Tropica* 45: 99-108, 1988.

45. Lemesre JL, Sereno D, Daulouede S, Veyret B, Brajon N, Vincendeau P. *Leishmania spp.*: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Experimental Parasitology* 86: 58-68, 1997.

46. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213: 377-387, 2008.

47. Lira R, Mendez S, Carrera L, Jaffe C, Neva F, Sacks D. *Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. *Experimental Parasitology* 89: 331-342, 1998.

48. Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1383: 9-36, 1998.

49. Mallinson DJ, Coombs GH. Interaction of *Leishmania* metacyclics with macrophages. *International Journal for Parasitology* 19: 647-656, 1989.
50. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology* 27: 123-147, 2013.
51. McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *The Biochemical Journal* 310: (Pt 3), 807-818, 1995.
52. McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MA, Homans SW. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 19611-19623, 1990.
53. McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *The EMBO Journal* 11: 3593-3600, 1992.
54. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians* 107: 7-14, 2014.
55. Merlen T, Sereno D, Brajon N, Rostand F, Lemesre JL. *Leishmania* spp: completely defined medium without serum and macromolecules (CDM/LP) for the continuous *in vitro* cultivation of infective promastigote forms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 41-50, 1999.
56. Moyersoer J, Choe J, Fan E, Hol WG, Michels PA. Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 603-643, 2004.
57. Murback ND, Hans Filho G, Nascimento RA, Nakazato KR, Dorval ME. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 86: 55-63, 2011.

58. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577, 2005.
59. Naula C, Parsons M, Mottram JC. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1754:151-159, 2005.
60. Nino A, Camacho M. *Leishmania (Viannia) braziliensis* growth in vitro culture relies more on folic acid availability than *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 309-310, 2005.
61. Oliveira MA, Pires Ada S, de Bastos RP, Lima GM, Pinto SA, Pereira LI, Pereira AJ, Abrahamsohn Ide A, Dorta ML, Ribeiro-Dias F. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 52: 83-88, 2010.
62. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 293-305, 2005.
63. Padmanabhan PK, Mukherjee A, Singh S, Chattopadhyaya S, Gowri VS, Myler PJ, Srinivasan N, Madhubala R. Glyoxalase I from *Leishmania donovani*: a potential target for anti-parasite drug. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337: 1237-1248, 2005.
64. Pimenta PF, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks DL. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 9155-9159, 1994.
65. Pimenta PF, Saraiva EM, Sacks DL. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology* 72: 191-204, 1991.

66. Pinto-da-Silva LH, Camurate M, Costa KA, Oliveira SM, da Cunha e Silva NL, Saraiva EM. *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* 32: 1371-1377, 2002.
67. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology* 58: 227-250, 2013.
68. Rebelo JM, Assuncao Junior AN, Silva O, Moraes JL. Occurrence of sand flies (*Diptera, Psychodidae*) in leishmaniasis foci in an ecotourism area around the Lencois Maranhenses National Park, Brazil. *Cadernos de Saude Publica* 26: 195-198, 2010.
69. Rizvi FS, Afchain D, Sherlock I, Sadigursky M, Capron A, Santoro F. Infectivity of *Leishmania* promastigotes is associated with surface antigenic expression. *Immunology Letters* 11: 317-323, 1985.
70. Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infection and Immunity* 75: 3823-3832, 2007.
71. Rogers L. Note on the Occurrence of *Leishmania donovani* bodies in "Cachexial Fevers," Including Kala-Azar. *British Medical Journal* 1: 1249-1251, 1904.
72. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124: 495-507, 2002.
73. Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology* 55: 453-483, 2001.
74. Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology* 69: 100-103, 1989.
75. Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate

and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol* 135: 564-569, 1985.

76. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417-1419, 1984.

77. ——. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 456-459, 1985.

78. Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine* 181: 685-697, 1995.

79. Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 111 (Pt 3): 275-287, 1995.

80. Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH, Wanderley JL, Bonomo AC, Barcinski MA, Moreira ME. Flow cytometric assessment of *Leishmania spp* metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology* 110: 39-47, 2005.

81. Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 374-389, 2002.

82. Serafim TD, Figueiredo AB, Costa PA, Marques-da-Silva EA, Goncalves R, de Moura SA, Gontijo NF, da Silva SM, Michalick MS, Meyer-Fernandes JR, de Carvalho RP, Uliana SR, Fietto JL, Afonso LC. *Leishmania* metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1833, 2012.

83. Shaw JJ, Lainson R. The *in vitro* cultivation of members of the *Leishmania braziliensis* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 127, 1981.

84. Silveira FT, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 239-251, 2004.
85. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research* 123: 311-330, 2006.
86. Soares RP, Margonari C, Secundino NC, Macedo ME, da Costa SM, Rangel EF, Pimenta PF, Turco SJ. Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010: 439174, 2010.
87. Spath GF, Beverley SM. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Experimental Parasitology* 99: 97-103, 2001.
88. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51: 337-351, 2011.
89. Van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AG. *Trypanosomatidae* produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 3036-3041, 1998.
90. Viana AG, Fraga CA, Batista Domingos PL, Bonan PR. Evaluation of myofibroblasts and its association with TGF-beta and IFN-gamma in lesions of patients with american tegumentary leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 87: 545-549, 2012.
91. Visvesvara GS, Garcia LS. Culture of protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 327-328, 2002.
92. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. *Geneva*: 22-26 March 2011.

93. Zakai HA, Chance ML, Bates PA. *In vitro* stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology* 116 (Pt 4): 305-309, 1998.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA	
---	--	---

Goânia, 08/ 07/ 2013

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA,
PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O N. 040/2013**

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino): Pesquisa

II - Identificação:

Título do projeto: Avaliação de diferentes métodos para selecionar soro bovino fetal para cultivo de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Pesquisador Responsável/ Unidade:
Milton Adriano Pelli de Oliveira - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP

Pesquisadores Participantes:

<input type="checkbox"/> Nome	Instituição	Formação Básica	Titulação	Função na Pesquisa
Polyana Guimarães de Oliveira				
Jéssica Cristina dos Santos				
Thiago Nattan Nunes				

Unidade onde será realizado:
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP

Data de apresentação à CEUA: 28/05/2013

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivo geral
Indicar um método ou associação de métodos para selecionar soro bovino fetal para cultivar leishmânias em laboratório.

Objetivos específicos
Comparar a curva de crescimento de dois isolados de *L. braziliensis* cultivadas em meios contendo diferentes lotes de SBF.

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia



Comparar a atividade metabólica de dois isolados de *L. braziliensis* cultivadas em meios contendo diferentes lotes de SBF.

Comparar a porcentagem de formas promastigotas metacíclicas de dois isolados de *L. braziliensis* geradas em meios contendo diferentes lotes de SBF.

Comparar o desenvolvimento da lesão em camundongos de dois isolados de *L. braziliensis* cultivadas em meios contendo diferentes lotes de SBF.

Correlacionar o crescimento em cultura, atividade metabólica, rendimento de formas metacíclicas com o desenvolvimento da lesão em camundongos.

IV - Sumário do projeto:

Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos:

Um dos objetivos de cultivar leishmânias em vários laboratórios é para promover a infecção experimental de células ou animais para uma melhor compreensão da biologia da relação leishmânia hospedeiro e para investigar formas de se interferir com a doença. Neste projeto específico, a utilização de células para avaliar a capacidade de infectar dos parasitos obtidos nos diferentes meios de cultura não é recomendada, já que a cultura de células também depende da suplementação com SBF. Assim, as diferenças entre os lotes deste suplemento poderia interferir na conclusão deste trabalho.

Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do Ambiente (ar, temperatura, umidade), Alimentação/hidratação:

Serão utilizados camundongo BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas de idade obtidos do Biotério do IPTSP/UFG. Para cada grupo de experimentos serão utilizados 5 camundongos por grupo experimental.

Grupos Experimentais.

Serão utilizados dois isolados de leishmânia obtidas de meios de cultura contendo três diferentes lotes de soro. Os três lotes selecionados (entre os cinco testados inicialmente) serão aqueles que demonstrarem a melhor curva de crescimento dos parasitos. A seleção de três dos cinco lotes será feita para minimizar o uso de animais, já que soros que não promovem um bom crescimento de parasitos não serão utilizados na prática para infecção.

Sendo assim, o número total de animais será: 5 x 2 (isolados de leishmânia) x 3 (lotes de SBF). Total= 30 animais.

Os animais serão mantidos em estantes ventiladas (Alesco) que serão adquiridas com verbas do projeto aprovado no edital Universal FAPEG 2012. As estantes ventiladas possuirão caixa confeccionada em polisulfona, nas medidas: 31cm comprimento x 20cm de largura x 13cm de altura contendo até 5 animais por gaiola. Será fornecida a vontade água acidificada e ração comercial. A sala é climatizada a 22oC com ciclos de claro e escuro de 12 hora

Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada: A infecção será na pata traseira esquerda com 1X10⁷ formas promastigotas de *L. braziliensis* cultivada em meios contendo lotes de soros diferentes.

Método de eutanásia: Os animais serão anestesiados com xilazina e cetamina antes da eutanásia que será feita por decapitação. O método de decapitação foi escolhido, pois possibilita a coleta de soro hiperimune que poderá ser utilizado em outros experimentos.

☐ **Destino do animal:**

Após a eutanásia, os animais serão acondicionados em sacos plásticos e mantidos em freezer - 20C. Posteriormente, as carcaças serão incineradas na escola de veterinária do UFG.

V - Comentários do relator frente às orientações da SBCAL

☐ **Estrutura do protocolo:** Adequada, apresenta cronograma compatível, termo de responsabilidade assinado.

☐ **Análise de sofrimento imposto, métodos alternativos e benefícios:** Os animais serão manipulados apenas por pesquisadores treinados para tal a fim de promover um estresse minimodurante a infecção e manipulação para acompanhamento da lesão e eutanásia.

☐ **Análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** De uma maneira geral, o projeto apresenta baixo para os pesquisadores, sendo que o risco maior será no momento da infecção dos animais. Esta infecção será feita por um único pesquisador previamente treinado. Em caso de acidente, o grupo conta com a colaboração da infectologista Ledice Inácia de Araújo Pereira/IPTSP/HDT que irá acompanhar o pesquisador acidentado. Todos os pesquisadores terão a disposição e deverão utilizar os EPIs como gorro, máscara, jalecos e luvas de procedimento para manuseio dos animais. Caso algum dos pesquisadores se sinta incomodado com a manipulação e sacrifício dos animais, estes serão convidados a se retirarem do recinto para evitar riscos psicológicos. A manipulação dos parasitos (leishmânias) será feita em cabine de fluxo laminar com os devidos EPIs sem a presença de materiais perfuro cortantes.

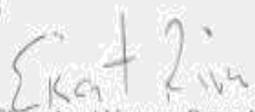
VI - Parecer da CEUA:

Diante do exposto, o parecer da CEUA sobre o projeto é **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste parecer substanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONSEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa. C

VII - Data da reunião: 08/07/2013


Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
(Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com

