

Caracterização do perfil infeccioso *in vitro* de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* frente ação da Zidovudina (AZT)

Camilla Luiza Batista¹, Milton Adriano Pelli Oliveira¹, Valéria de Oliveira², Ruy de Sousa Lino Junior¹, José Clecildo Barreto Bezerra¹, Marina Clare Vinaud¹

1 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás

2 Faculdade de Farmácia/Universidade Federal de Goiás

camilla.luiza@hotmail.com; mvinaud@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, Zidovudina, infectividade.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença de notificação compulsória causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* cujo ciclo biológico divide-se basicamente em duas formas evolutivas: promastigota e amastigota. A primeira, é flagelar e encontrada no intestino médio do hospedeiro invertebrado (inseto vetor do gênero *Phlebotomus*) onde divide-se exponencialmente e migra para as glândulas salivares como forma infectante. No hospedeiro vertebrado (mamíferos) torna-se parasito intracelular obrigatório, assumindo forma aflagelar (amastigota), afetando particularmente as células do sistema fagocítico mononuclear (Rey 2010). No interior dos macrófagos, de onde aproveitam todo o maquinário metabólico, as formas se dividem até que a célula hospedeira se rompa e promova a disponibilização das formas amastigotas para a infecção de novos macrófagos.

A forma promastigota é a mais utilizada para estudos *in vitro*, sua principal característica morfológica é a presença de flagelo que, assim como no inseto vetor, modifica seu tamanho à medida que passam-se os dias de crescimento, além disso outras modificações morfológicas, como tamanho e largura do corpo celular são observadas neste período (ZAKAI; CHANCE; BATES, 1997; SARAIVA et al., 2005).

Revisado pelo orientador.

Camilla Luiza Batista (Orientanda), Milton Adriano Pelli Oliveira (Colaborador), Valéria de Oliveira (Colaboradora), Ruy de Sousa Lino Junior (Colaborador), José Clecildo Barreto Bezerra (Colaborador), Marina Clare Vinaud (Orientadora)

A fase procíclica possui menor potencial infectante para o hospedeiro vertebrado que a metacíclica, isto se explica pelo fato de que a fase procíclica ou fase de crescimento logarítmico é um momento de intensa atividade metabólica (SACKS et al., 1985; STANKOV et al., 2010). Além disso, a forma metacíclica possui uma morfologia diferenciada, com maior potencial infectante, considerando que há uma relação entre metabolismo e morfologia (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).

A fase do ciclo de vida do parasito que ocorre em mamíferos também pode ser reproduzida *in vitro* utilizando-se cultura de macrófagos tanto humanos como murinos. Sabe-se que estes fazem parte do quadro de células efectoras do sistema imune e por esse motivo desempenham papel fundamental na morte de patógenos intracelulares. No entanto, esta é a célula hospedeira do gênero *Leishmania* (HANDMAN; BULLEN, 2002; ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSEL, 1999).

Dentre os mecanismos utilizados pelos macrófagos para morte de patógenos intracelulares está a produção de óxido nítrico (NO), uma molécula bastante instável derivada da guanidino nitrogênio de L-arginina e catalizada pela enzima óxido-nítrico-sintase (NOS), cuja forma induzível (iNOS) é produzida a partir de estímulos imunológicos como citocinas e lipopolissacarídeos (LPS) (PANARO et al., 1999).

A colonização dessas células em diferentes nichos do organismo do hospedeiro vertebrado caracteriza as diversas manifestações clínicas de acordo com as espécies que o gênero possui.

A distribuição geográfica da doença bem como sua crescente transmissão deve-se intrinsecamente à relação patógeno-vetor-hospedeiro e a sua co-existência num mesmo ambiente possuidor de recursos favoráveis à sobrevivência destes, tais como: presença de reservatório, clima e biodisponibilidade de alimento. Destacam-se aí dados epidemiológicos recentes que descrevem uma urbanização do inseto vetor da leishmaniose, cuja origem silvestre distribui-se hoje em zona rural, periurbana e urbana (DESJEUX et al., 2004).

Assim as diferentes espécies de *leishmania* determinam a incidência anual da doença que chega a dois milhões de novos casos, distribuídos mundialmente entre 88 países (WHO, 2007), sendo que no Brasil dados de 2005 do Ministério da Saúde revelam que as várias espécies de agentes etiológicos, algumas mais frequentes que outras, estão presentes em todas as unidades federativas do país. Além disso, há uma estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) de que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com aproximação de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O preocupante enfoque atual concentra-se em casos de leishmaniose associados à infecção pelo vírus HIV, que é de caráter pandêmico, onde destacam-se pacientes que evoluíram para o quadro da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS). O primeiro caso desta co-infecção foi relatado em 1985, no sul da Europa, sendo que o número de casos subsequentes cresceu drasticamente após esta data e hoje chega a 35 o número de países relatando esta co-infecção (WHO, 2007).

A gravidade da associação *Leishmania*/HIV se deve a descrição de alterações no curso natural da infecção, dentre elas estão: desvio do perfil infeccioso de espécies de *Leishmania* para formas mais graves da doença como sua visceralização, principalmente; aumento do índice de recidiva da doença e o grande destaque para a redução da resposta terapêutica ao medicamento antileishmania.

No entanto, há subnotificação dos casos de visceralização não caracterizados como infecção oportunista de imunocomprometidos segundo a listagem do CDC (WHO, 2007). Dentre os principais tratamentos para leishmaniose cutânea e visceral estão os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, cujas ações baseiam-se em alterações na bioenergética do metabolismo dos parasitos, bloqueando a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, no entanto traz, como um dos efeitos adversos, um distúrbio de repolarização do aparelho cardiovascular. A droga de segunda escolha para tratamento é a anfotericina B que apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática de *Leishmania* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Entretanto, outros estudos verificaram que a terapia antirretroviral em pacientes imunodeprimidos alterou tanto o curso da infecção pelo vírus quanto o das infecções oportunistas (WHO, 2007), daí a indicação da promissora utilização destes fármacos em infecções concomitantes por HIV e Leishmaniose. Neste âmbito propõe-se a utilização da zidovudina (AZT) para o tratamento de leishmanioses, um análogo nucleosídeo cuja ação inibitória da transcriptase reversa do vírus HIV não age em enzimas celulares hospedeiras como a DNA polimerase, visto que estudos prévios realizados por Peyron et al. (2005) tem demonstrado atividade antileishmania deste composto.

Sabe-se que o AZT possui atividade antileishmania *in vitro* causando alterações morfológicas em formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, como a diminuição do tamanho flagelar e celular e aumento da largura celular do parasito, como descrito por Aguiar et al. em 2010.

2 OBJETIVOS

Avaliar o perfil infectante *in vitro* de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* expostas a diferentes concentrações de Zidovudina e a ação deste frente a infecção estabelecida.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultura dos parasitos *in vitro*

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cedidas pelo Laboratório de Imunologia Celular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás e foram mantidas em cultivo em placas de acrílico, com 24 poços, sob meio líquido de Grace (Grace's Insect Medium – Gibco®) acrescido de soro fetal bovino estéril na diluição de 1:5 em meio de cultura, L-glutamina na diluição de 1:100 e antibióticos (penicilina e estreptomicina) na diluição de 1:200 mantidos à temperatura de 26° C.

3.2 Cultura de células

Utilizou-se macrófagos e monócitos leucêmicos de camundongo da linhagem RAW 264.7 que foram cedidas pelo Laboratório de Citocinas do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás e cultivadas em placas de acrílico, 24 poços, em meio RPMI 1640 SIGMA, USA, acrescido de soro fetal bovino inativado 10%, L-glutamina (200µM), penicilina e streptomina (1:200), HEPES (1M) e 2-mercaptoetanol (50mM) mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂).

3.3 Zidovudina

O fármaco (fabricante Imphazan lote 970430) foi cedido pela Prof. Valéria de Oliveira, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, de onde preparou-se uma solução estoque diluída em DMSO na concentração de 1000 µM.

3.4 Avaliação da infectividade

Durante o cultivo das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* estas foram expostas, no 3º e no 6º dia de crescimento, às concentrações de 1, 10, 20, 30, 40 e 50 µM de Zidovudina diluída em DMSO por 24 horas. Em seguida incubou-se com macrófagos murinos, RAW 264.7, por 24 e 48 horas, em lamínulas redondas 13 mm de diâmetro (Deckglaser, Alemanha), determinando-se a infecção (realizou-se três experimento independentes). Assim, as lâminas confeccionadas foram coradas com panótico e fotografadas para registro e digitalização dos resultados obtidos. Avaliou-se as formas quanto à infectividade segundo os parâmetros: quantidade de células infectadas, dentre 100 a 200 células, e número médio de parasitos por célula, sob microscopia óptica (aumento de 400 vezes). Determinou-se o índice de infecção multiplicando-se a porcentagem de células infectadas pelo número médio de parasitos por células infectadas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 Avaliação da ação da zidovudina frente infecção estabelecida

Após cultivo das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* estas foram destinadas à infecção em células RAW 264.7, no 3º e no 6º dia de crescimento, incubadas por 24 horas sobre lamínulas redondas 13 mm de diâmetro (Deckglaser, Alemanha). Em seguida retirou-se os parasitos excedentes e realizado o tratamento das células com as concentrações 1, 10, 20, 30, 40 e 50 µM de zidovudina diluída em DMSO, por 24 e 48 horas (realizou-se três experimentos independentes). Posteriormente realizou-se a confecção de lâminas coradas com panótico. Fotografou-se as lâminas para registro e digitalização dos resultados obtidos. A ação do fármaco em células infectadas foi avaliada calculando-se o índice de infectividade como descrito no item 3.4.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da infectividade

Verificou-se que no terceiro dia de crescimento de *L. (L.) amazonensis* incubadas com zidovudina a porcentagem de células infectadas em 24 horas diminuiu nas concentrações de 30, 40 e 50µM e o número médio de parasitos por célula diminuiu nas concentrações de 20, 30, 40 e 50µM, ambos em relação aos controles. Em 48 horas a porcentagem teve uma redução nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50µM e o número médio de parasitos por célula

teve redução nas concentrações de 1, 20, 40 e 50 μ M em relação aos controles. Quanto ao índice de infectividade, em 24 horas, este diminuiu, na concentração de 1 μ M e aumentou nas concentrações de 20, 40 e 50 μ M quando comparados aos índices dos controles. Em 48 horas esse índice aumentou na concentração de 1 e 40 μ M em relação aos controles (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de células infectadas com *L. (L.) amazonensis* no 3º dia de crescimento tratada com AZT e média de parasitos por célula.

24 horas	Ctl Leish	Ctl DMSO	1 μ M	10 μ M	20 μ M	30 μ M	40 μ M	50 μ M
% células infectadas	59,3	59,1	56,08	58	57,95	52,27	54,12	50,5
Nºparasitos/célula	2,27	2,09	2,3	2,14	1,8	1,9	1,28	1,19
Índice de infectividade	26,12	28,27	24,38	27,1	32,19	27,51	42,28	42,43
48 horas								
% células infectadas	52,66	61,97	65,15	47,66	49,73	48,55	48,04	48,7
Nºparasitos/célula	1,66	1,38	1,19	1,48	1,25	1,37	1,0	1,2
Índice de infectividade	31,72	44,9	54,74	32,2	39,78	35,43	48,04	40,58

No sexto dia de crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* incubadas com zidovudina a porcentagem de células infectadas em 24 horas diminuiu nas concentrações de 30, 40 e 50 μ M e o número médio de parasitos por célula diminuiu nas concentrações de 1, 20, 40 e 50 μ M, ambos em relação aos controles. Em 48 horas a porcentagem teve uma redução nas concentrações de 10, 30, 40 e 50 μ M e o número médio de parasitos por célula teve redução nas concentrações de 1, 10 e 50 μ M em relação aos controles. Quanto ao índice de infectividade, em 24 horas, este diminuiu na concentração de 10, 30, 40 μ M e aumentou nas concentrações de 1, 20 e 50 μ M em relação aos controles. Em 48 horas esse índice diminuiu na concentração de 40 μ M e aumentou nas concentrações de 1 e 50 μ M em relação aos controles (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de células infectadas com *L. (L.) amazonensis* no 6º dia de crescimento tratada com AZT e média de parasitos por célula.

24 horas	Ctl	Ctl	1µM	10µM	20µM	30µM	40µM	50 µM
	Leish	DMSO						
% células infectadas	56,49	60,53	68,44	61,98	58,73	53,83	52,65	50,17
Nºparasitos/célula	1,46	1,55	1,01	1,69	1,4	1,46	1,42	1,01
Índice de infectividade	38,69	39,05	67,76	36,67	41,95	36,86	37,07	49,67
48 horas								
% células infectadas	70,64	64,33	64,16	62,55	69,2	53,75	52,29	58,25
Nºparasitos/célula	1,48	1,92	1,18	1,32	1,51	1,48	1,73	1,01
Índice de infectividade	47,72	33,5	54,37	47,38	45,82	36,31	30,22	57,67

4.1 Avaliação da ação da zidovudina frente infecção estabelecida

Em macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* no terceiro dia de crescimento e tratados com AZT por 24 horas a porcentagem de células infectadas diminuiu nas concentrações de 1, 30, 40 e 50µM e o número médio de parasitos por célula diminuiu nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50µM, ambos comparados aos controles. Em 48 horas de tratamento a porcentagem diminuiu nas concentrações de 30 e 40µM e o número médio de parasitos por célula diminuiu nas concentrações de 30, 40 e 50µM, quando comparados aos controles. Em macrófagos infectados com leishmanias no terceiro dia de crescimento o índice de infectividade em 24 horas diminuiu na concentração de 1µM e aumentou nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50µM em relação aos controles. Em 48 horas esse índice aumentou nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50µM em relação aos controles (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de células infectadas com *L. (L.) amazonensis* no 3º dia de crescimento e número de parasitos por célula após tratamento com AZT.

24 horas	Ctl	Ctl	1µM	10µM	20µM	30µM	40µM	50 µM
	Leish	DMSO						
% células infectadas	55,09	59,8	52,6	62,8	62,9	52,8	51,7	46,8
Nºparasitos/célula	1,66	1,64	1,9	1,3	1,6	1,17	1,09	1,15
Índice de infectividade	33,6	36,46	27,68	48,3	39,31	45,12	47,43	40,69
48 horas								
% células infectadas	52,9	50,6	59,8	59,2	57,39	48,47	50,05	75,8
Nºparasitos/célula	1,9	1,66	1,99	1,7	1,82	1,1	1	1,01
Índice de infectividade	27,84	30,48	30,05	34,82	31,53	44,06	50,05	75,04

Em macrófagos infectados com leishmania no sexto dia de crescimento e tratados com AZT por 24 horas a porcentagem de células infectadas diminuiu em todas as concentrações em relação aos controles e o número médio de parasitos por célula manteve-se semelhante aos controles. Em 48 horas de tratamento a porcentagem diminuiu nas concentrações de 10 e 30µM e o número médio de parasitos por célula diminuiu nas concentrações de 1, 30, 40 e 50µM, quando comparados aos controles. Quanto ao índice de infectividade, em 24 horas, este diminuiu em todas as concentrações quando comparados aos controles. Em 48 horas esse índice aumentou nas concentrações de 1, 40 e 50µM em relação aos controles (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de células infectadas com *L. (L.) amazonensis* no 6º dia de crescimento e número de parasitos por célula após tratamento com AZT.

24 horas	Ctl	Ctl	1µM	10µM	20µM	30µM	40µM	50 µM
	Leish	DMSO						
% células infectadas	64,3	63,25	58,77	62,5	57,7	60,9	55,8	49,17
Nºparasitos/célula	1	1	1	1,2	1,25	1	1	1
Índice de infectividade	64,3	63,25	58,77	52,08	46,16	60,9	55,8	49,17
48 horas								
% células infectadas	61,76	57,9	68,76	55,39	58,66	50,8	78,6	77,2
Nºparasitos/célula	1,08	1,21	1,02	1,15	1,11	1	1	1
Índice de infectividade	57,18	47,85	67,41	48,16	52,84	50,8	78,6	77,2

5 DISCUSSÃO

O terceiro dia de crescimento de *Leishmania* spp, ou fase procíclica, caracteriza-se por menor potencial infectante para o hospedeiro vertebrado comparada a fase metacíclica (sexto dia de crescimento *in vitro*), isto se explica pelo fato de que a fase procíclica ou fase de crescimento logarítmico é um momento de intensa atividade metabólica (SACKS et al., 1985; STANKOV, 2010), no entanto comparando-se os grupos controles deste trabalho a porcentagem de células infectadas com promastigotas do terceiro dia de crescimento apresentou uma pequena diferença em relação aquelas infectadas com parasitos do sexto dia de crescimento. A porcentagem de macrófagos infectados com promastigotas, do terceiro e do sexto dia de crescimento, tratadas com AZT diminuiu nas maiores concentrações do fármaco quando comparada aos controles. O mesmo ocorreu para o número médio de parasitos por célula. Como descrito por Aguiar et al. (2010) o AZT provoca alterações morfológicas nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* nas mesmas concentrações utilizadas neste trabalho. Estas alterações acometem estruturas celulares importantes para a entrada do parasito na célula hospedeira, como o flagelo e a largura celular. Como descrito por Pimenta et al. (1991) no terceiro dia de crescimento a morfologia normal, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, das promastigotas apresenta largura e tamanho celular aumentados e flagelo pequeno em relação ao sexto dia. No sexto dia o flagelo é aumentado de tamanho enquanto que largura e tamanho celular são diminuídos (ROGERS et al., 2002). A morfologia do parasito está, portanto, diretamente relacionada à sua infectividade, assim o tratamento das leishmanias com AZT provocou alterações morfológicas no parasito sendo provavelmente o motivo pela diminuição do índice de infectividade do mesmo nas maiores concentrações do fármaco.

A suscetibilidade das formas amastigotas ao AZT foi determinada avaliando-se a média de células infectadas e o número médio de parasitos por célula e calculando-se o índice de infectividade. Observou-se uma relação dose-dependente quanto à infectividade das formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, ou seja, quanto maior a concentração de AZT maior o índice de infectividade. Experimentos *in vitro* e *in vivo* vêm demonstrando que a atividade antileishmania em macrófagos murinos é mediada por reativos intermediários do oxigênio, como o óxido nítrico (JORENS; MATTHYS; BULT, 1995; SOLBACH; LASKAY, 2000), no entanto o parasito é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior do mesmo. Esta sobrevivência é determinada por mecanismos desenvolvidos pelo parasito para a diminuição ou não produção de óxido nítrico, sendo esse mecanismo dependente do número de parasitos por célula, ou seja, quanto maior o número de amastigotas no interior do macrófago menor a

produção óxido nítrico por este (PERRELLA-BALESTIERI et al., 2002). Além disso, um estudo realizado por Amatore et al. (2010) verificou que a porção azido do AZT induz estresse oxidativo em macrófagos. Assim, o aumento da produção de óxido nítrico (NO) pela ação do AZT leva o parasito a responder reduzindo significativamente os níveis de NO no interior do macrófago para sua sobrevivência e reprodução e conseqüentemente aumentar o índice de infectividade.

6 CONCLUSÕES

Com o presente estudo conclui-se que o AZT interfere na atividade fagocítica do macrófago *in vitro* avaliado pelo aumento no índice de infectividade calculado tanto para células infectadas com *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com as maiores concentrações de AZT, quanto para células infectadas com *Leishmania (L.) amazonensis* e posteriormente tratadas com as maiores concentrações de AZT.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. **Leishmania Species: Models of Intracellular Parasitism**. Journal of Cell Science, ed. Elsevier, v.112, England, 1999.

AMATORE, C. et al. **Pro-oxidant properties of AZT and other thymidine analogues in macrophages: implication of the azido moiety in oxidative stress**. ChemMedChem., v.5, n.2, p.296-301, 2010.

DESJEUX, P. et al. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives**. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, ed. Elsevier, v. 27, p. 305-318, England, Sep, 2004.

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

HANDMAN E., BULLEN D. V. R. **Interaction of Leishmania with the host macrophage**. Trends in Parasitology, v.18, p.417, 2002.

JORENS, P. G.; MATTHYS, K. E.; BULT, H. **Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages**. Med. Inflammation, v.4, p.75–89, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Editora do Ministério da Saúde, 2º ed., Brasília, DF, 2007.

PANARO M. A., ACQUAFREDDA A., LISI S., LOFRUMENTO D. D., TROTTA T., SATALINO R., Saccia M., MITOLO V., BRANDONISIO O. **Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide.** Int J Clin Lab Res, v.29, p.122-127, 1999.

PERRELLA-BALESTIERI, F. M. et al. Microbes and Infection, v.4, p.23–29, 2002.

PEYRON, C. et al. **Synthesis and in vitro antileishmanial activity of 5-substituted-2'-deoxyuridine derivatives.** Bioorganic Chem., ed. Elsevier, v. 33, p. 439-447, U.S.A., 2005.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, E. M. B.; SACKS, D. L. **The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*.** Experimental Parasitology, v.72, p.191-204, 1991.

REY, L. **Parasitologia.** 3.ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2010.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. **The role of promastigotes secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*.** Parasitology, v.124, p.495-507, 2002.

SACKS, D. L. et al. **Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes.** The Journal of Immunology, The American Association of Immunologists, v. 135, n. 1, U.S.A., Jul, 1985.

SARAIVA, E. M. et al. **Flow cytometry assessment of *Leishmania spp* metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers.** Experimental Parasitology, ed. Elsevier, v. 110, p. 39-47, U.S.A., Jan, 2005.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. **The host response to *Leishmania major*.** Adv. Immunol, v.74, p.275–317, 2000.

STANKOV, M. V. et al. **Mitochondrial DNA Depletion and Respiratory Chain Activity in Primary Human Subcutaneous Adipocytes Treated with Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, n. 1, p. 280-287, U.S.A., Jan, 2010.

WHO. Disponível em <http://ftp.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA60/A60_10-en.pdf> Acesso em 15-04-2010.

ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. **In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*.** Parasitology, v. 116, p. 305-309, England, Nov, 1997.