

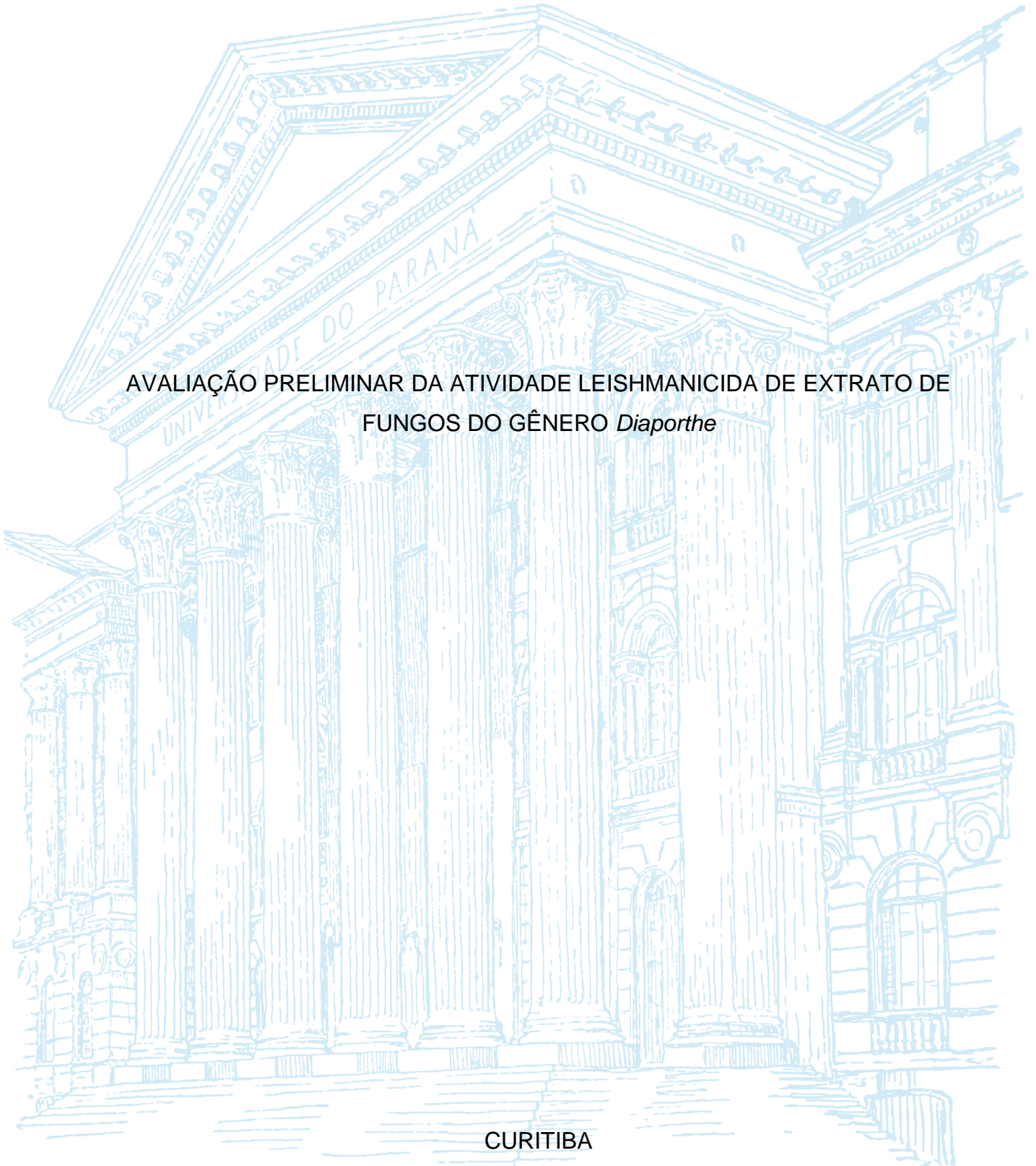
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO LUIS MACHADO PIETSCH

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATO DE
FUNGOS DO GÊNERO *Diaporthe*

CURITIBA

2018



JOÃO LUIS MACHADO PIETSCH

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATO DE
FUNGOS DO GÊNERO *Diaporthe*

Monografia apresentada ao Departamento de Patologia Básica como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro

CURITIBA

2018

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. Mais de 1 bilhão de pessoas estão sob risco de contrair essa infecção nos 89 países onde ela ocorre. Apesar disso, os tratamentos disponíveis ainda são precários, com eficácia variada, graves efeitos colaterais e de difícil administração. Sendo assim, a busca por novos fármacos no tratamento das leishmanioses é necessária. Nesse contexto, os fungos endofíticos representam uma fonte promissora de compostos naturais de interesse biotecnológico. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de quatro fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* (*D. oxe*, *D. malorum*, *D. foliar* e *D. terebinthifolli*), isolados de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira-vermelha). Os fungos foram cultivados por 14 dias em meio extrato de malte líquido para a produção de extratos de acetato de etila. Os extratos tiveram sua toxicidade testada contra macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e contra promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* por meio de bioensaios *in vitro*. A espécie *D. foliar* produziu o extrato com maior ação contra *L. braziliensis* (IC₅₀ = 34,15 µg/mL), porém não possuiu ação contra promastigotas de *L. infantum* e foi o extrato mais tóxico para as células de mamífero (IC₅₀ = 11,62 µg/mL). Os demais extratos não demonstraram atividade leishmanicida. Os resultados obtidos nesse trabalho são preliminares, porém elucidam as características citotóxicas de *D. foliar* e, possivelmente de *D. malorum* e indicam a existência de compostos de atividade biológica sobre macrófagos e *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose. Endofíticos. *Diaporthe*. *L. braziliensis*. *L. infantum*. Bioprospecção.

ABSTRACT

The leishmaniasis are diseases caused by more than 20 species of parasites of *Leishmania* genus. More than 1 billion people are currently at risk of infection in the 89 countries it occurs. Nevertheless, the treatments available are still limited, with variable efficacy, severe side effects and of complicated administration. Thus, the search for new drugs efficient in the treatment of leishmaniasis are urgently needed. In this context, endophytic fungi represent a promising source of natural compounds of biotechnological interest. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of four entophytic fungi belonging to genus *Diaporthe* (*D. oxe*, *D. malorum*, *D. foliar* e *D. terebinthifoli*), isolated from *Schinus terebinthifolius* (Aroeira-vermelha). The fungi were cultivated for 14 days in malt extract liquid medium for the production of the ethyl acetate extracts. The extracts had their toxicity tested *in vitro* against murine macrophages of the RAW 264.7 cell line and against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes. *D. foliar* produced the extract with the higher activity against *L. braziliensis* (IC₅₀ = 34.15 µg/mL), however it have not shown activity against *L. infantum* promastigotes and had the highest toxicity against the mammalian cells (IC₅₀ = 11.62 µg/mL). The other extracts have not shown leishmanicidal activity. The results found in this study are preliminary; however, it elucidates the cytotoxic characteristics of *D. foliar* and, possibly of *D. malorum*, and indicate the existence of compounds with biological activity on macrophages and *L. braziliensis*.

Key-words: Leishmaniasis. Endophytes. *Diaporthe*. *L. braziliensis*. *L. infantum*.

Bioprospecting.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	OBJETIVOS	8
2.1	OBJETIVO GERAL	8
2.2	OBJETIVOS ESPÉCIFICOS	8
3	REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1	EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	9
3.2	MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA DE <i>Leishmania</i>	13
3.3	TAXONOMIA – <i>Leishmania</i>	15
3.4	TAXONOMIA – FLEBOTOMÍNEOS	18
3.5	DIAGNÓSTICO	19
3.6	TRATAMENTO	21
3.6	FUNGOS ENDOFÍTICOS E METABOLISMO SECUNDÁRIO	26
3.7	O GÊNERO <i>Diaporthe</i>	30
3.8	MATABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DE ENDOFÍTICOS	32
4	METODOLOGIA	37
4.1	PRODUÇÃO DOS EXTRATOS	37
4.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	37
4.3	ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM PROMASTIGOTAS	38
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS	39
5.1	PRODUÇÃO DOS EXTRATOS	39
5.2	CITOTOXICIDADE	40
5.3	ATIVIDADE LEISHMANICIDA	41
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	46
8	PERSPECTIVAS	46
<u> </u>	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 1 bilhão de pessoas estão sob risco de contrair as doenças nos 89 países onde ela ocorre (WHO, 2016).

Existem duas principais formas da doença, a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose visceral (LV). A forma cutânea é a mais comum, acometendo entre 700 mil e 1,2 milhão de pessoas no mundo, causa feridas indolores no local da picada do vetor. Já a forma visceral é menos comum, porém mais grave, levando a morte na maioria dos casos quando não tratada. Acomete entre 200 mil e 400 mil pessoas por ano e é responsável por causar entre 20.000 e 40.000 mortes (ALVAR et al., 2012).

O Brasil possui uma média anual de 26.965 casos de LC, com média de 15,7 casos a cada 100.000 habitantes, sendo *Leishmania braziliensis* a espécie responsável pela maioria dos casos (MELO; ROSSONI; TEODORO, 2017). Para a LV, a média anual de casos é de 3.418, com média de 1,8 casos a cada 100.000 habitantes (DOS REIS et al., 2017), *Leishmania infantum* é a única causadora de LV nas Américas (READY, 2014).

Tanto para LC, quanto para a LV houve uma expansão da distribuição geográfica e aumento no número de casos nas últimas décadas. Atualmente o Brasil é o único país com incidência alta tanto de leishmaniose cutânea, quanto de leishmaniose visceral (WHO, 2016).

As leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas, uma vez que estão relacionadas às áreas empobrecidas e possuem pouco investimento e interesse público e privado na pesquisa e desenvolvimento de vacinas, tratamentos e prevenção.

Ainda não há vacinas utilizadas na prevenção da doença e as drogas de primeira linha utilizadas atualmente no tratamento possuem alta toxicidade, requerem administração por um longo período e geralmente por via parenteral com acompanhamento médico (SILVA et al., 2017). Em algumas regiões a eficácia desses fármacos é bastante reduzida devido a linhagens de parasitos resistentes (KATO et al., 2014). Outros medicamentos de fácil administração com efeitos colaterais mais tênues e alta eficácia, como a miltefosina, e a anfotericina B lipossomal, ainda tem seu uso limitado devido ao seu alto custo (SUNDAR, 2001).

Novos compostos, efetivos no tratamento das leishmanioses e acessíveis as populações das áreas endêmicas, são urgentemente necessários.

Os fungos endofíticos, especialmente os presentes em plantas com propriedades medicinais, representam uma grande fonte de compostos de interesse farmacêutico e biotecnológico, como antibióticos, antifúngicos e antiprotozoários (KUMAR; CHANDRA; CHOUDHARY, 2017). As metodologias utilizadas na bioprospecção de extratos e compostos produzidos por esses microrganismos vem se aprimorando cada vez mais e possibilitando a descoberta de produtos naturais promissores (PETERSEN; AMSTUTZ, 2013).

Neste trabalho, os extratos de quatro espécies do gênero *Diaporthe* foram avaliados com objetivo de detectar possíveis compostos com ação leishmanicida. Os fungos endofíticos foram isolados de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), conhecida como aroeira- vermelha. A espécie *S. terebinthifolius* é utilizada na medicina popular como antitérmica, analgésica, depurativa e no tratamento de doenças do sistema urogenital. Por outro lado, a literatura científica relata que essa planta apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, e antiulcerogênica (CARVALHO et al., 2013).

Os fungos do gênero *Diaporthe* (*Phomopsis*) (Ascomycota: Diaporthales) são amplamente distribuídos e podem ser encontrados como saprófagos, patogênicos e endofíticos (THOMPSON et al., 2011). Como endofítico, *Diaporthe* está entre os gêneros mais comumente encontrados em uma grande variedade de plantas e possui grande potencial na produção de metabólitos de interesse farmacêutico, incluindo compostos com atividade antiprotozoários (YAN et al., 2018; GOMES et al., 2013; TANNEY et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação dos extratos de *Diaporthe* spp. em células de mamífero e *Leishmania* spp.

2.2 OBJETIVOS ESPÉCÍFICOS

Avaliar a viabilidade e/ou citotoxicidade em macrófagos da linhagem RAW 264.7 expostos aos extratos de *Diaporthe oxae*, *Diaporthe malorum*, *Diaporthe foliar* e *Diaporthe terebinthifolii* nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 e 7,8125 µg/mL.

Avaliar a viabilidade e/ou citotoxicidade em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* exposto aos extratos de *Diaporthe oxae*, *Diaporthe malorum*, *Diaporthe foliar* e *Diaporthe terebinthifolii* nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 e 7,8125 µg/mL.

Avaliar a viabilidade e/ou citotoxicidade em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* exposto aos extratos de *Diaporthe oxae*, *Diaporthe malorum*, *Diaporthe foliar* e *Diaporthe terebinthifolii* nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 e 7,8125 µg/mL.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. São parasitos intracelulares de ciclo heteroxênico, com um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado (vetor), da subfamília Phlebotominae (Diptera: Psychodidae), cujas fêmeas transmitem os parasitos durante o repasto sanguíneo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 1 bilhão de pessoas estão sob risco de contrair a doença nos 89 países onde ela ocorre (WHO, 2016).

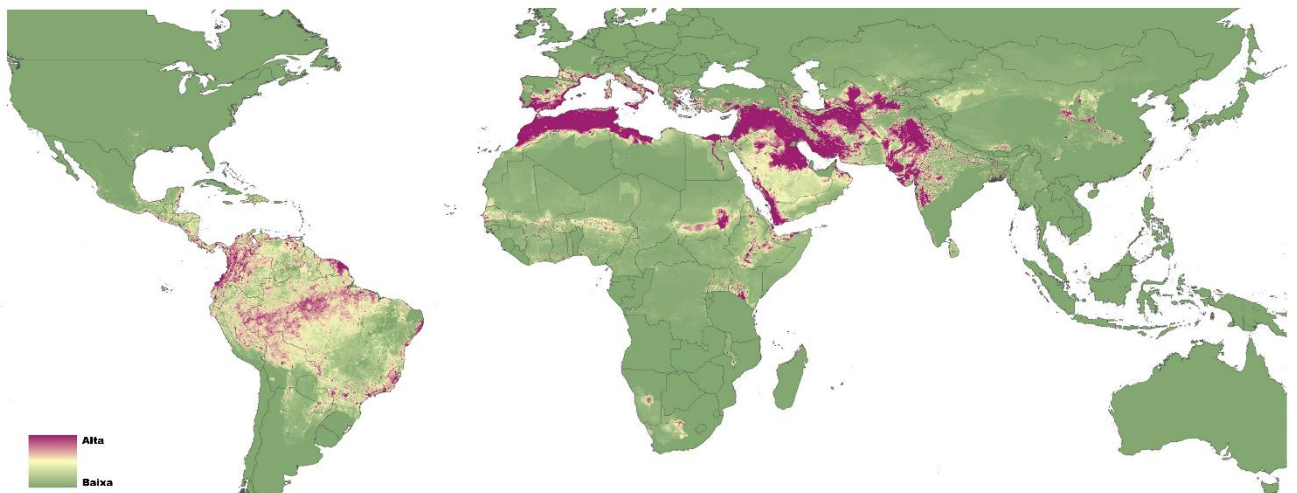
Acredita-se que os casos de leishmaniose são subdiagnosticados e subnotificados em todo o globo devido principalmente aos casos subclínicos (assintomáticos ou oligossintomáticos) e a sua relação com populações mais pobres, onde a infraestrutura para diagnóstico e o acesso a agentes de saúde são precários e escassos. Esses fatores, juntamente com os casos que aparecem em hospitais privados ou não governamentais, dificultam a obtenção de números precisos sobre a incidência das leishmanioses (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; EJAZI; ALI, 2013).

Existem duas principais formas da doença, a leishmaniose cutânea ou tegumentar (LC ou LT) e a leishmaniose visceral (LV). A leishmaniose cutânea é a forma mais comum, acometendo entre 700 mil e 1,2 milhão de pessoas no mundo. Causa feridas indolores no local da picada do vetor, são feridas de textura granulosa e bordas elevadas, que podem levar a infecções secundárias e estigmatização social (WHO, 2016).

As manifestações clínicas da doença dependem diretamente da espécie do parasito e do sistema imune do hospedeiro. De acordo com esses fatores, pacientes infectados podem passar anos sem apresentar sinais e sintomas ou desenvolver variações mais graves das doenças. A leishmaniose cutânea, além de causar feridas dérmicas, pode evoluir para as formas de Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), com presença de múltiplos nódulos ulcerados ou não, e a forma Mucocutânea (LM), que causa lesões nas mucosas das vias aéreas superiores, podendo causar desfiguração (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A LC ocorre no Novo Mundo desde o sul do Texas, até a América do Sul, com exceção de Chile e Uruguai, porém os casos se concentram principalmente na bacia Amazônica e outras áreas de floresta úmida das Américas do Sul e Central. Já no Velho mundo, ocorre na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia e África Central (FIGURA 1) (PIGOTT et al., 2014). Mais de 70% dos casos ocorrem em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Síria e Sudão. Nos 12 países considerados de alta incidência de LC, 399 milhões de pessoas correm risco de contrair a doença.

FIGURA 1 - RISCO PREVISTO PARA **LEISHMANIOSE CUTÂNEA**. DA COR VERDE (BAIXA PROBABILIDADE DE OCORRÊNCIA) ATÉ ROXO (ALTA PROBABILIDADE DE OCORRÊNCIA).



FONTE: Adaptado de PIGOTT et al. (2014).

A forma visceral, também conhecida como calazar, é menos comum, porém é a forma mais grave, levando a morte na maioria dos casos quando não tratada. Acomete entre 200 mil e 400 mil pessoas por ano e é responsável por causar entre 20.000 e 40.000 mortes, os sintomas relacionados são: febre, tosse, diarreia, mal-estar e hepatoesplenomegalia (ALVAR et al., 2012).

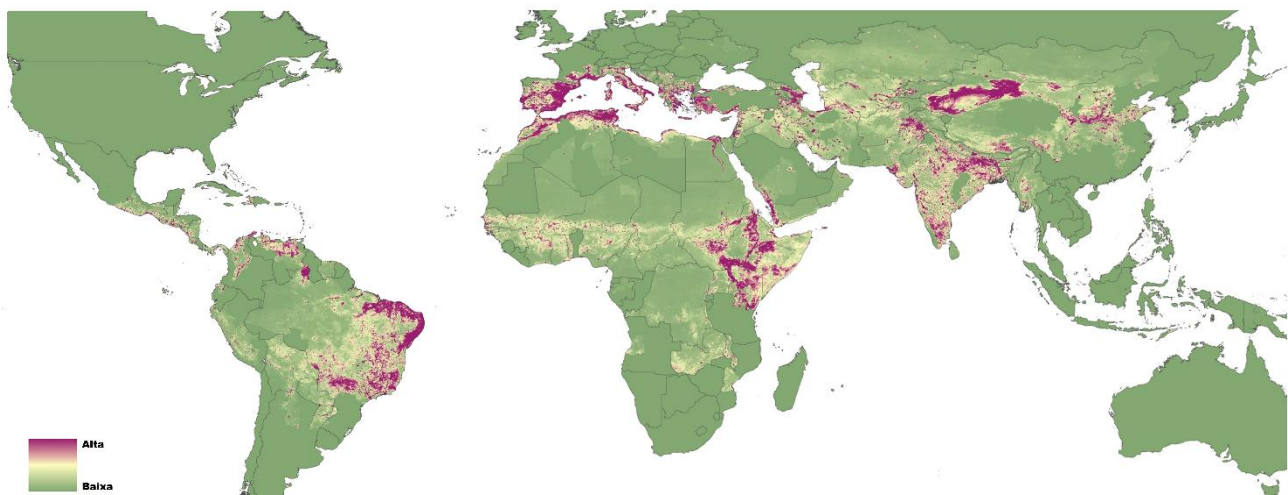
Estima-se que 90% dos casos de LV ocorram em 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul, havendo em torno de 556 milhões de pessoas em risco nos 14 países considerados de alta incidência pela OMS (WHO, 2016).

No Velho Mundo, a LV ocorre na bacia do mediterrâneo, China central, Índia, Oriente Médio e no Chifre da África. No Novo Mundo ocorre principalmente na costa

do nordeste brasileiro, com focos esporádicos distribuídos pelo resto da América do Sul e Central (FIGURA 2) (PIGOTT et al., 2014).

A Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC), é uma complicação da leishmaniose visceral que causa erupções cutâneas nodulares ou papulares em pacientes já recuperados da LV (ZIJLSTRA et al., 2003). Ocorre principalmente no leste africano, onde cerca de 50-60% dos casos de LV devidamente tratados evoluem para LDPC em pacientes sudaneses. No subcontinente indiano ocorre após cerca de 10-20% dos casos de LV (SINGH; SHARMA; MISHRA, 2011).

FIGURA 2 - RISCO PREVISTO PARA **LEISHMANIOSE VISCERAL**. DA COR VERDE (BAIXA PROBABILIDADE DE OCORRÊNCIA) ATÉ ROXO (ALTA PROBABILIDADE DE OCORRÊNCIA).



FONTE: Adaptado de PIGOTT et al. (2014).

O Brasil possui uma média anual de 26.965 casos de LC, com média de 15,7 casos a cada 100.000 habitantes (MELO; ROSSONI; TEODORO, 2017). Para a LV, o Brasil concentra mais de 90% dos casos das Américas, sendo a média anual de casos de 3.418, com média de 1,8 casos a cada 100.000 habitantes (DOS REIS et al., 2017). O Brasil é o único país com alta incidência tanto de leishmaniose cutânea, quanto de leishmaniose visceral (WHO, 2016). Tanto para LC, quanto para a LV houve uma expansão da distribuição geográfica e aumento no número de casos nas últimas décadas (WERNECK, 2014; DOS REIS et al.; MELO; ROSSONI; TEODORO, 2017; BEZERRA et al., 2018).

A transmissão da leishmaniose pode ocorrer em ciclos zoonóticos, antroponóticos ou antropozoonóticos. No Novo Mundo, a LC recebe o nome de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e está ligada aos ciclos silvestres e

zoonóticos da doença. Preguiças, roedores, marsupiais e canídeos silvestres são incriminados como os principais reservatórios. Animais sinantrópicos (roedores) e domésticos (cães, gatos, equinos) também são acometidos pela doença, mas seu papel na manutenção dos parasitos como reservatório ainda é incerta (BRASIL, 2016). Ainda no Novo Mundo, a LV é causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* e vem expandindo suas áreas de ocorrência e se aproximando cada vez mais de centros urbanos, sendo os cães domésticos os principais reservatórios (WERNECK, 2014). No Brasil a eutanásia de cães com diagnóstico positivo é recomendada como forma de controle da doença (BRASIL, 2006).

No velho mundo, a principal espécie causadora de LV é *Leishmania (Leishmania) donovani* e as transmissões ocorrem principalmente em áreas peridomiciliares e em ciclos antroponóticos. Os ciclos da LC são tanto antroponóticos, nas regiões de ocorrência de *Leishmania (Leishmania) tropica*, quanto antroozoonóticos, com *L. (L) major* e *L. (L) aethiopica* como as principais espécies (DU et al., 2016).

A ocorrência das leishmanioses tem aumentado globalmente nas últimas décadas e diversos fatores estão relacionados com a incidência, distribuição e o seu recente aumento (BEZERRA et al., 2018).

A pobreza se destaca como um fator determinante no risco destas infecções. Condições precárias de moradia e sanitárias, como ausência de gestão de resíduos e saneamento, atraem e favorecem a procriação dos flebotomíneos. A falta de escolaridade e acesso a serviços médicos, má nutrição e constante exposição aos vetores nos ambientes de residência e trabalho também aumentam os riscos de contrair essa doença. Por essas razões, a leishmaniose e a pobreza acabam compondo um ciclo vicioso. A doença causa morbidade prolongada, estigma social, evasão escolar, dificuldades no trabalho e até mesmo a morte, no caso da LV. Em crianças pode prejudicar o desenvolvimento cognitivo e a educação, fatores que contribuem para o empobrecimento e, conseqüentemente, a maior exposição à doença (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; ROSA et al., 2011).

O desmatamento também é apontado como um fator relacionado às leishmanioses. A substituição das florestas por plantações ou moradias levam as pessoas a habitarem locais próximos ao ambiente natural dos flebotomíneos e reservatórios. Cães e outros animais domésticos atraem os vetores para perto das

residências e o ciclo da doença torna-se periurbano ou doméstico (ORYAN; AKBARI, 2016).

O aumento dos casos de leishmaniose e a expansão da doença para áreas não endêmicas possuem relação com a globalização, o aquecimento global e guerras e conflitos. O aquecimento global permite a expansão da área de ocorrência dos vetores, possibilitando a presença da doença em áreas antes não endêmicas. Também houve um aumento do número de casos em viajantes voltando de regiões tropicais e subtropicais, seja por viagens internacionais a turismo ou excursões militares (ORYAN; AKBARI, 2016; PAVLI; MALTEZOU, 2010; STEVERDING, 2017). Há estudos que demonstram que migrantes e turistas possuem maior risco de desenvolver a doença que a população local. Nesses casos de importação da doença para fora de áreas endêmicas, os diagnósticos costumam ser atrasados, pois a falta de contato com a doença leva a baixa suspeita de leishmaniose (ORYAN; AKBARI, 2016).

Guerras, conflitos, migrantes e refugiados também estão correlacionados com a incidência de leishmaniose. Na Síria, a guerra causou o colapso da infraestrutura de saúde do país, desabrigou grande parte da população e causou a concentração de milhares de refugiados em situações precárias de moradia e higiene. As migrações para áreas endêmicas causam a exposição da população, por outro lado a migração para áreas não endêmicas pode introduzir a doença em novos locais. Entre 2004 e 2008, a incidência de LC na Síria foi estimada em 23.000 casos por ano, tendo mais do que dobrado poucos anos depois. Em 2012, 53.000 casos foram reportados, e na primeira metade de 2013, 41.000 casos. Além disso, acredita-se que grande parte dos casos não são reportados, sendo assim a real incidência pode ser ainda maior. Países como a Turquia, Líbano e outros que receberam grande quantidade de refugiados sírios também apresentaram aumento dos casos de LC (DU et al., 2016; STEVERDING, 2017).

3.2 MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA DE *Leishmania*

As espécies de *Leishmania* possuem ciclo de vida heteroxênico digenético, com duas formas celulares. Quando no intestino do flebotomíneo, assumem o estado de promastigotas com forma alongada, extremidades afiladas e um longo flagelo na região anterior. O flagelo garante grande mobilidade ao parasito para

migrar no interior do vetor, além disso possui função de fixação nas microvilosidades do epitélio do intestino médio dos flebotomíneos e funções sensoriais (SUNTER; GULL, 2017). Existem ainda subdivisões da fase promastigota em procíclica, nectomônada, haptomônada, paramastigota e metacíclica, baseado em diferenças no tamanho do corpo celular e do flagelo, no formato celular, na sua localização dentro do inseto e suas características reprodutivas e infectivas (FIGURA 3) (FREITAS et al., 2012).

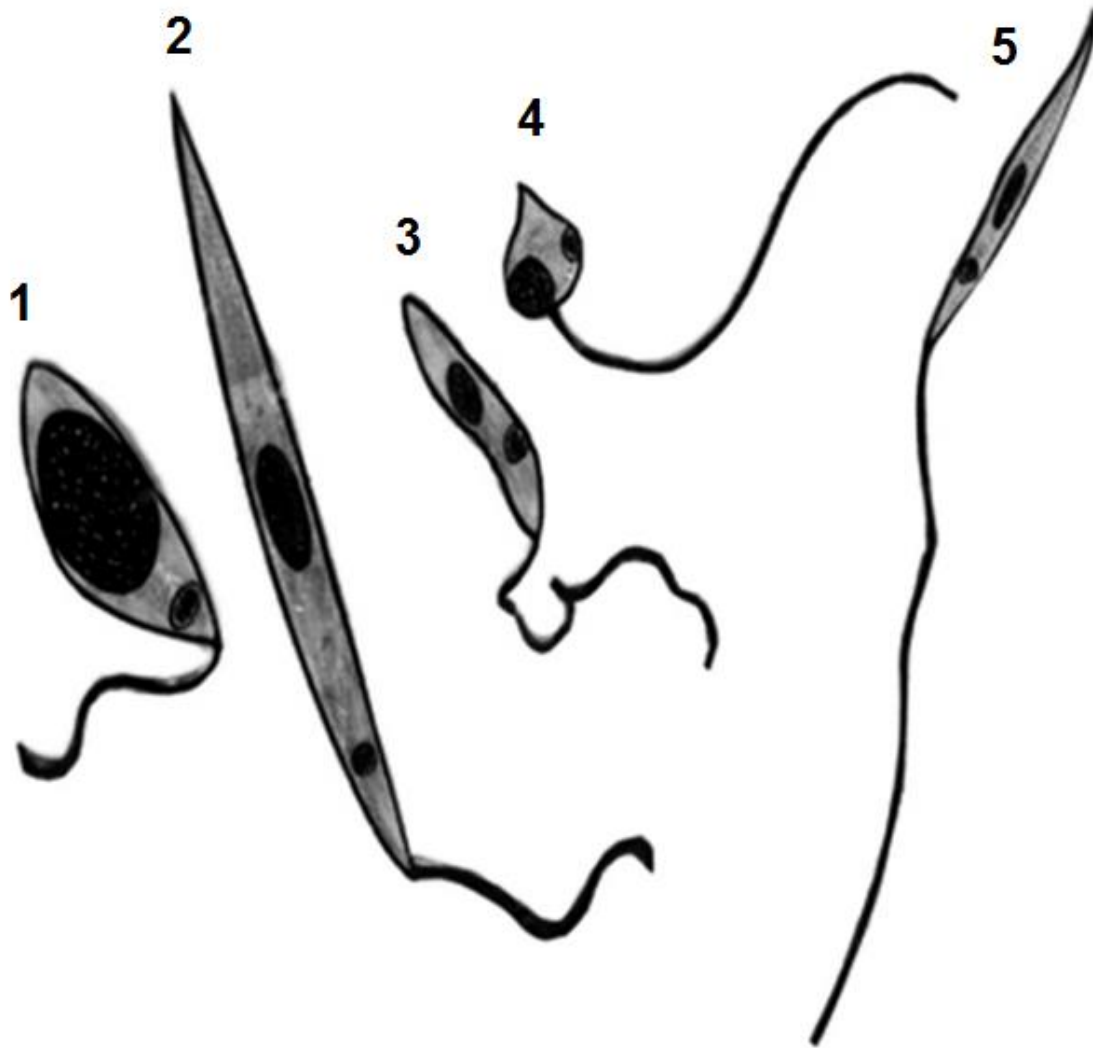
Quando uma fêmea de flebotomíneo infectada pica um hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são regurgitadas e o dano causado pelo aparelho bucal do vetor recruta células de defesa para o local da picada, dando início à fagocitose dos parasitos (SUNTER; GULL, 2017).

O flagelo presente nas promastigotas também possui função importante na internalização dos parasitos pelos fagócitos. Enquanto outros parasitos intracelulares flagelados, como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* sp., forçam ativamente sua entrada nas células que habitam, a infecção por *Leishmania* é fortemente dependente da capacidade fagocítica das células do hospedeiro (FORESTIER, 2011). Entretanto, acredita-se que o flagelo possua função como estrutura sensorial que regula a expressão de proteínas capazes de modular a atividade fagocítica das células hospedeiras durante o contato (ROTUREAU et al., 2009).

A internalização de *Leishmania* ocorre em um vacúolo parasitóforo, onde o parasito se orienta com o corpo celular voltado para o núcleo do macrófago e o flagelo voltado para a periferia. Nessa posição, o parasito realiza movimentos oscilatórios contínuos do flagelo, que resultam em danos na membrana plasmática do macrófago e interferem na composição do vacúolo parasitóforo e na capacidade de combate intracelular ao parasito. Em seguida, o flagelo perde sua atividade e regride com a diferenciação do parasito para a forma amastigota (SUNTER; GULL, 2017; FORESTIER et al., 2011).

As formas amastigotas são circulares, aflageladas e menores que as promastigotas. São intracelulares preferencialmente em macrófagos e células dendríticas do hospedeiro vertebrado, mas também podem infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário, como neutrófilos e fibroblastos (KIMA, 2007).

FIGURA 3 - FORMAS EVOLUTIVAS DAS PROMASTIGOTAS DE LEISHMANIA.



FONTE: Adaptado de FREITAS et al. (2012).

LEGENDA: 1. Procíclica; 2. Nectomônada; 3. Haptomônada; 4. Paramastigota e 5. Metacíclica.

3.3 TAXONOMIA – *Leishmania*

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) pertence ao Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastea (Honigberg, 1963 emenda Vickerman, 1976), Subclasse Metakinetoplastina (Vickerman, 1976), Ordem Trypanosomatida (Kent, 1880), Família Trypanosomatidae (Doflein, 1901) e Subfamília Leishmaniinae (Maslov e Lukes, 2012 emenda Espinosa, 2016) (CAVALIER-SMITH, 1993; MASLOV; PODLIPAEV; LUKEŠ, 2001; AKHOUNDI et al., 2016; BARRATT et al., 2017; ESPINOSA et al., 2018). A morfologia dentro do gênero é bastante conservada, havendo apenas variações no tamanho das formas amastigotas em algumas

espécies (SUNTER; GULL, 2017). Antes das técnicas moleculares, a classificação dentro do gênero era feito através de características extrínsecas, como distribuição geográfica, especificidade de hospedeiros, desenvolvimento no vetor e em meios de cultura e características patológicas em humanos (STEVENS et al., 2001). Com o avanço das técnicas moleculares, características bioquímicas, genéticas e imunológicas passaram a ser consideradas para a identificação das espécies e estabelecimento das relações filogenéticas, porém as definições de espécies e subespécies, assim como seus agrupamentos em complexos, está sempre em constante revisão (RAMÍREZ et al., 2016).

Aproximadamente 53 espécies já foram descritas para o gênero *Leishmania* (desconsiderando as sinonímias), dessas, 31 são capazes de parasitar mamíferos e cerca de 20 já foram incriminados como patógenos humanos (AKHOUNDI et al., 2016). Lainson e Shaw (1987) propuseram a classificação de *Leishmania* em subgêneros de acordo com o local de desenvolvimento dos parasitos no trato digestivo do flebotomíneo. As espécies que colonizavam as porções do intestino médio anteriores ao piloro são consideradas suprapilárias, e pertencem ao subgênero *Leishmania*. As espécies que estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e na porção abdominal do intestino médio são ditas peripilárias, e pertencem ao subgênero *Viannia*. Parasitos com desenvolvimento do tipo hipopilárico são restritos ao intestino posterior e compõe o subgênero *Sauroleishmania* (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).

Posteriormente, Copulillo et al. (2000) propuseram a divisão do gênero *Leishmania* em dois grupos, Euleishmania e Paraleishmania. O grupo Euleishmania engloba os subgêneros *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e o complexo *Leishmania enriettii*, enquanto o grupo Paraleishmania é composto por *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis*, juntamente com o gênero *Endotrypanum*. Esse gênero é considerado grupo irmão de *Leishmania*, entretanto sua posição taxonômica ainda é pouco compreendida. As linhagens descritas foram isoladas de preguiças e possuem ciclo de vida com desenvolvimento intraeritrocítico com formas epimastigotas ou tripomastigotas, porém análises moleculares indicam que *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri* possuem uma maior proximidade genética com *Endotrypanum* do que com as espécies patogênicas de *Leishmania* (FRANCO; GRIMALDI, 1999). Dos membros do grupo Paraleishmania, apenas *L. colombiensis* foi confirmada como patogênica para humanos, causando tanto a forma cutânea,

quanto a visceral da leishmaniose. As demais espécies têm como hospedeiros preguiças ou porcos-espinhos. *Paraleishmania* é um grupo polifilético e sua história evolutiva ainda não está bem resolvida (AKHOUNDI et al., 2016; CUPOLILLO et al., 2000; MOMEN; CUPOLILLO, 2000).

Das 53 espécies de *Leishmania*, 29 ocorrem no Velho Mundo, 20 no Novo Mundo, três em ambos, e uma espécie ocorre na Austrália. O subgênero *Viannia* é restrito ao Neotrópico, possui nove espécies que causam as formas cutânea e mucocutânea da doença. O subgênero *Leishmania* contém treze espécies e ocorre tanto no Novo Mundo, quanto no Velho Mundo. Possui espécies causadoras das formas visceral, cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e dérmica pós calazar (AKHOUNDI et al., 2016) (QUADRO - 1). O subgênero *Sauroleishmania* possui 21 espécies de parasitos exclusivos de lagartos e exclusivos do Velho Mundo (STEVENS et al., 2001).

No Brasil, 8 espécies já foram identificadas, sendo 6 do subgênero *Viannia* e duas do subgênero *Leishmania* (BRASIL, 2016). A LTA é causada principalmente por *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis* e *L. (L) amazonensis* (MELO; ROSSONI; TEODORO, 2017). Já a Leishmaniose visceral é causada por *L. (L) infantum*. Previamente chamada de *L. chagasi*, a linhagem presente no Novo Mundo foi identificada como pertencente a mesma espécie presente na Europa, tendo sido trazida para a América durante a colonização, cerca de 500 anos atrás, através de cães e ratos infectados. Sendo assim, *L. chagasi* foi sinonimizada com *L. infantum*, permanecendo o nome mais antigo (MAURÍCIO, IL., STOTHARD, JR., MILES, 2000).

QUADRO 1 – CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE *Leishmania*.

(continua)

Subgênero	Espécie	Patologia*	Acomete Humanos	Distribuição**	Distribuição
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	LC/LCD	X	VM	Leste da África (Etiópia e Quênia)
	<i>L. amazonensis</i>	LC/LCD/LMC	X	NM	América do Sul (Bolívia, Brasil e Venezuela)
	<i>L. arabica</i>	-	-	VM	Arábia Saudita
	<i>L. aristidesi</i>	-	-	NM	Panamá
	<i>L. donovani</i>	LV/LDPC	X	VM	África Central, Sul da Ásia, Oriente Médio, Índia e China
	<i>L. gerbilli</i>	-	-	VM	Ásia Central, Sul da Mongólia e Irã

QUADRO 2 – CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE *Leishmania*.

(conclusão)

Subgênero	Espécie	Patologia*	Acomete Humanos	Distribuição**	Distribuição
	<i>L. forattinii</i>	-	-	NM	Brasil
	<i>L. infantum</i>	LV/LC	X	VM/NM	Norte da África e países do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central e América do Sul e Central
	<i>L. major</i>	LC	X	VM	Norte e Centro da África, Oriente Médio e Ásia Central
	<i>L. mexicana</i>	LC/LCD	X	NM	EUA, Equador, Peru e Venezuela
	<i>L. tropica</i>	LC/LV	X	VM	Norte e Centro da África, Oriente Médio, Ásia Central e Índia
	<i>L. turanica</i>	-	-	VM	Ásia Central, Sul da Mongólia e Irã
	<i>L. venezuelensis</i>	LC	X	NM	Norte da América do Sul
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	LC/LMC	X	NM	América do Sul e Guatemala
	<i>L. guyanensis</i>	LC/LMC	X	NM	Norte da América do Sul, Bolívia, Brasil, Guiana Francesa e Suriname
	<i>L. lainsoni</i>	LC	X	NM	Bolívia, Brasil e Peru
	<i>L. lindenbergi</i>	LC	X	NM	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	LC	X	NM	Brasil e Guiana Francesa
	<i>L. panamensis</i>	LC/LMC	X	NM	Brasil, Colômbia, Panamá e Venezuela
	<i>L. peruviana</i>	LC/LMC	X	NM	Bolívia e Peru
	<i>L. shawi</i>	LC	X	NM	Brasil
	<i>L. utingensis</i>	Desconhecido	-	NM	Brasil

FONTE: Adaptado de: STEVERDING (2017) e AKHOUNDI et al (2016).

LEGENDA: *LC = Leishmaniose Cutânea; LCD = Leishmaniose Cutânea Difusa; LMC = Leishmaniose Mucocutânea; LV = Leishmaniose Visceral; LDPC = Leishmaniose Dérmica Pós Calazar. **VM = Velho Mundo; NM = Novo Mundo.

3.4 TAXONOMIA – FLEBOTOMÍNEOS

A classificação taxonômica dos Phlebotominae apresenta mais de 800 espécies reconhecidas, sendo a maior parte delas no Novo Mundo (KATO et al., 2010). A classificação como proposta por Young e Duncan (1994) divide os flebotomíneos neotropicais nos gêneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*, sendo

que o gênero *Lutzomyia* concentra a maior parte das espécies e as únicas confirmadas como vetores de *Leishmania* (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Eunice Galati propôs em 2003 uma nova classificação para os flebotomíneos neotropicais, que inclui 931 espécies divididas em 23 gêneros, 20 subgêneros e 6 subtribos (GALATI, 2018). A classificação dos flebotomíneos, especialmente os do Neotrópico, ainda é discutida e a classificação de Young e Duncan ainda é bastante utilizada.

No Velho Mundo, ocorrem os gêneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* (KATO et al., 2010). O gênero *Phlebotomus* é dividido em treze subgêneros e contém todas as espécies incriminadas como vetores de *Leishmania* no Velho Mundo. Já o gênero *Sergentomyia* é o responsável pela transmissão das espécies de *Sauroleishmania*, enquanto *Chinius* possui apenas quatro espécies restritas a região da Oceania (AKHOUNDI et al., 2016).

No Brasil os flebotomíneos são popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros, dependendo da localização geográfica. As principais espécies envolvidas na transmissão são *Lutzomyia longipalpis*, *Lu. cruzi*, *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis*, *Lu. wellcomei*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. migonei* (BRASIL, 2016).

Os flebotomíneos representam a principal via de transmissão de *Leishmania* spp., entretanto mecanismos alternativos de transmissão natural estão sendo investigados. Parasitos viáveis de *L. infantum* foram isolados de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) que se alimentaram de cães naturalmente infectados. Esses resultados demonstram o potencial dos carrapatos como vetores de *Leishmania* spp., entretanto mais estudos são necessários para confirmar a competência desses animais na manutenção da leishmaniose visceral (MEDEIROS-SILVA et al., 2015)

3.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce da leishmaniose é muito importante principalmente em áreas de transmissão antroponótica, onde o tratamento dos pacientes é recomendado mesmo em casos assintomáticos para evitar a transmissão da doença via vetor ou via transfusão sanguínea (GUERIN et al., 2002; MICHEL et al., 2011).

Além disso, esporotricose, infecções cutâneas por *Mycobacterium*, hanseníase, cromoblastomicose e outros tipos de úlceras são comuns em locais endêmicos para leishmaniose cutânea e possuem sintomatologia muito similar a essa doença. Sendo assim, é necessário o diagnóstico diferencial para realizar o correto tratamento (GOTO; LINDOSO, 2010).

O padrão ouro para o diagnóstico das leishmanioses é a visualização direta do parasito em microscópio óptico. Para a LC, aspirados do local da ferida ou esfregaços de biópsias são corados com Giemsa e examinados em busca das formas amastigotas dos parasitos (HERWALDT, 1999). Amostras de lesões também podem ser utilizadas para o diagnóstico por cultivo dos parasitos em meio ágar sangue, formalmente chamado Novy, McNeal e Nicolle (NNN), ou por sua inoculação em animais suscetíveis, geralmente hamsters (GOTO; LINDOSO, 2010). Essa metodologia possibilita a caracterização e identificação das espécies, entretanto é cara, trabalhosa e requer tempo para chegar ao diagnóstico.

Para a LV, os parasitos são obtidos através de aspirados sanguíneos preferencialmente do baço, para maior sensibilidade, mas também é possível utilizar amostra da medula óssea, linfonodos ou fígado (DE RUITER et al., 2014).

Técnicas mais sofisticadas e caras raramente estão disponíveis nas regiões endêmicas, fazendo com que o diagnóstico direto seja amplamente utilizado. Entretanto, a sensibilidade do método depende da carga parasitária e da habilidade do examinador. É recomendado que seja utilizado sempre mais de um método para um diagnóstico mais preciso (REITHINGER et al., 2007).

Diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas para o diagnóstico através da detecção do DNA de *Leishmania*, essas técnicas possibilitam além de confirmar a doença, identificar a espécie causadora, o que não é possível facilmente através de outros métodos (GOTO; LINDOSO, 2010).

As técnicas moleculares possuem altíssima sensibilidade e especificidade e a velocidade na obtenção dos resultados, entretanto o alto custo e a necessidade de infraestrutura laboratorial e pessoas especializadas ainda limitam essa técnica em regiões endêmicas (REITHINGER et al., 2007).

Métodos sorológicos são bastante usados em estudos epidemiológicos, porém pouco efetivos para diagnósticos. As técnicas clássicas de sorologia, como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), o DAT (*Direct Agglutination Test*) e o IFAT (*Immunofluorescence Antibody Test*), possuem eficiência variada de acordo

com a região geográfica e são trabalhosas e demoradas (EJAZI; ALI, 2013; MANDAL et al., 2008). Os testes rK39 e KAtex são exemplos de kits comerciais bastante práticos e com resultados mais reproduzíveis devido a sua padronização, entretanto a sensibilidade e especificidade ainda são baixas. Além disso, os testes sorológicos falham em distinguir infecções passadas e presentes, sendo pouco útil em regiões endêmicas e no diagnóstico da LDPC (REITHINGER et al., 2007).

Outro método imunológico bastante comum é o teste de Montenegro, que consiste na inoculação intradérmica de antígenos de promastigotas de *Leishmania* e na avaliação da resposta imune no local da injeção após 48 e 72 h. O resultado é considerado positivo quando a área sensibilizada na pele é superior ou igual a 5 mm de diâmetro, em pacientes não infectados espera-se que ocorra pouca ou nenhuma reação na pele. O teste sofre dos mesmos problemas das outras técnicas sorológicas e seu uso é mais comum para estudos de prevalência (ANTONIO et al., 2014; GOTO; LINDOSO, 2010).

3.6 TRATAMENTO

Antimoniais pentavalentes, como o Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) e o Estibogluconato de Sódio (Pentostam®), são as drogas de primeira-linha no tratamento das leishmanioses há mais de 70 anos. Entretanto, diversos efeitos colaterais e dificuldades práticas limitam sua eficácia. Esses compostos possuem alto custo e necessitam aplicação diária por via parenteral e por um longo período (20 a 30 dias). Fraqueza, náusea, vômito, diarreia, cólicas abdominais, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, mialgia e dores musculares localizadas, no caso de administração via intramuscular, são efeitos colaterais típicos desses tratamentos. Apesar de serem usados a bastante tempo, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desses medicamentos (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Variações e aprimoramentos dos fármacos convencionais são alternativas para a melhora na eficácia dos tratamentos. A administração parenteral do antimoniato de meglumina dificulta seu uso correto e causa sua rápida eliminação pela via renal, fazendo necessário a administração de múltiplas doses. A associação dos antimoniais com sistemas carreadores pode aumentar a biodisponibilidade

desses fármacos pela via oral, facilitando a aplicação do tratamento e melhorando sua eficácia. A associação do antimoníato de meglumina com a β -Ciclodextrina se mostrou eficiente em facilitar a absorção pela via oral (DEMICHELI et al., 2004).

A encapsulação dos antimoniais em lipossomos também demonstrou aumentar a eficácia, principalmente no combate à LV. Os lipossomos são usados como um sistema de carregamento, pois são naturalmente capturados pelas células do sistema fagocítico mononuclear, conseqüentemente causando um direcionamento maior dos fármacos aos parasitos. Testes *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a eficiência do antimoníato de meglumina encapsulado por lipossomos é centenas de vezes maior que a mesma droga administrada livremente (ALVING et al., 1978; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Apesar da alta eficácia, a produção de antimoniais encapsulados ainda possui limitações tecnológicas, como pouca estabilidade e baixa eficiência no encapsulamento da droga, entretanto progressos tem sido observados no aprimoramento dessas metodologias (BORBOREMA et al., 2011; 2016).

Existem ainda drogas de segunda linha no tratamento das leishmanioses, como a Anfotericina B, a Paromomicina, a Pentamidina e a Miltefosina.

A anfotericina B é um antifúngico usado no tratamento das leishmanioses desde a década de 60 (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). A interação do fármaco com os esteróis presentes na membrana plasmática resulta na formação de um poro, causando a morte dos parasitos. Sua seletividade se deve a alta afinidade ao ergosterol, o esteroide predominante na membrana de fungos, *Leishmania* e *Trypanosoma*, enquanto em mamíferos o colesterol, que possui menos afinidade pela anfotericina B, é predominante (EJAZI; ALI, 2013).

A anfotericina B apresenta ótimas taxas de cura e relapsos são raros, contudo o tratamento também é longo e via parenteral. Os efeitos colaterais mais comuns incluem nefrotoxicidade, hipocaliemia, febre, mal-estar severo e, em alguns casos, pode levar a morte. Sendo assim, a anfotericina B não apresenta vantagens sobre os antimoniais e é utilizada apenas em regiões onde a resistência aos antimoniais é bastante prevalente (PAVLI; MALTEZOU, 2010).

Formulações lipossomais da anfotericina B apresentam eficácia similar a anfotericina B convencional, porém sua toxicidade é muito menor. A anfotericina B lipossomal (AmBisome®), consiste em pequenos lipossomos unilamelares compostos de colesterol e outros fosfolípidios que revestem a anfotericina B e,

devido a diminuição do ritmo de excreção, aumentam a disposição da droga no plasma (BEKERSKY et al., 2002). Enquanto o tratamento padrão com anfotericina B comum sugere doses totais de 15 a 20 mg/kg, administradas em infusões de 1 mg/kg em dias alternados, a baixa toxicidade da anfotericina B lipossomal permite dosagens maiores em um menor número de infusões (HAMILL, 2013).

Na Índia, o estado de Bihar é responsável por cerca de 90% dos casos de LV do país e 50% dos casos do mundo. Na região o ciclo da doença é antroponótico e o uso incorreto de medicação levou à prevalência de linhagens de *L. donovani* resistentes aos antimoniais pentavalentes, tornando necessário o uso de medicamentos alternativos, principalmente a Anfotericina B (SUNDAR, 2001).

Nessa região, a administração de uma dose única de 10 mg/Kg de Anfotericina B lipossomal apresentou resultados comparáveis ao tratamento com Anfotericina B convencional e com menor custo, devido ao menor tempo de hospitalização necessário (SUNDAR, SHYAMGARWAL; RAI; MURRAY, 2010). A administração em infusão única também contribui para evitar novos casos de resistência, pois impossibilita o abandono precoce do tratamento pelo paciente.

A Miltefosina (hexadecilfosfocolina) é o único medicamento oral disponível para o tratamento da LV, é um análogo da fosfatidilcolina e inicialmente foi desenvolvido como um medicamento anticâncer (EJAZI; ALI, 2013). Sua administração por via oral e sua baixa toxicidade são vantagens do seu uso, entretanto o preço elevado, a fetotoxicidade e a eficácia variável aparecem como desvantagens. Os efeitos colaterais mais comuns são danos ao trato gastrointestinal, anorexia, náusea, vômito e diarreia.

A eficácia do tratamento é variável entre as espécies de *Leishmania* e até mesmo entre populações da mesma espécie de diferentes regiões (MACHADO et al., 2010). As diferenças na sensibilidade dos parasitos podem ser explicadas pelos diferentes níveis na expressão de proteínas relacionadas a internalização do medicamento. A baixa expressão do gene LbRos3 em *L. braziliensis* diminui a formação de complexos de transporte na membrana do parasito, explicando sua menor susceptibilidade à Miltefosina quando comparada a *L. donovani* (SÁNCHEZ-CAÑETE et al., 2009).

A Miltefosina também é potencialmente teratogênico, sendo seu uso contraindicado para gestantes, bem como a contracepção é recomendada para

mulheres durante e de 3 a 4 meses após o tratamento com Miltefosina (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ; SARAVOLATZ, 2015).

Além do efeito direto sobre o parasito, a Miltefosina possui efeitos imunomodulatórios, estimulando a produção de uma série de citocinas e favorecendo a fagocitose e eliminação natural do parasita pelo sistema imune (EJAZI; ALI, 2013).

A Paromomicina (aminosidina) é um antibiótico de amplo espectro produzido por *Streptomyces rimosus* e isolado a primeira vez em 1956. Apesar de ser um antibiótico antigo, apenas recentemente a Paromomicina teve seu uso aprovado para o tratamento das leishmanioses (WIWANITKIT, 2012). Esse composto age inibindo a síntese proteica ao se ligar a subunidade ribossomal 30S, impedindo a iniciação da tradução ou causando erros na leitura do mRNA e, conseqüentemente, a inserção incorreta de aminoácidos (SUNDAR; JAYA, 2008).

A Paromomicina possui alta eficácia com baixo custo, baixa toxicidade e o período de administração é relativamente curto, o que faz do composto uma potencial droga de primeira-linha para o tratamento das leishmanioses em todo o mundo. Seu uso combinado com os antimoniais pentavalentes apresentou resultados muito positivos, indicando uma sinergia entre esses medicamentos, com aumento na eficácia e diminuição no tempo do tratamento (SUNDAR; JAYA, 2008; WIWANITKIT, 2012).

Reformulações da Paromomicina na forma de pomada foram desenvolvidas e apresentaram resultados variados. A busca por medicamentos de uso tópico para o tratamento da LC é interessante pela facilidade do tratamento e toxicidade baixa e restrita ao local da aplicação. Variadas formulações da Paromomicina associada com cloreto de metilbenetônio, com ureia e com gentamicina já foram testadas e mostraram resultados positivos, entretanto sua eficácia ainda é bastante variada dependendo da região e das espécies tratadas (ASILIAN et al., 2003; WEINRAUCH; KATZ; EL ON, 1987; SOTO et al., 1998, 2002; SUNDAR; JAYA, 2008).

Entre os fatores que interferem na eficácia dos tratamentos, temos as diferentes espécies e populações de *Leishmania*, a farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos e as variações na resposta imune dos pacientes. A infecção por HIV representa um fator de risco para a infecção por *Leishmania*, sendo casos de coinfeções HIV-*Leishmania* bastante comuns, principalmente para LV. Assim como nos pacientes com imunocomprometimento

causados por desnutrição ou imunossupressivos quimioterápicos, as coinfeções com HIV podem resultar em complicações mais severas e manifestações atípicas da doença, o que pode retardar o diagnóstico e dificultar o tratamento. Nesses casos, independente do tratamento utilizado, a eliminação completa do parasito dificilmente ocorre, resultando em relapsos após períodos oligossintomáticos e assintomáticos (PAVLI; MALTEZOU, 2010; MICHEL et al., 2011).

A vulnerabilidade e as complicações em pacientes imunocomprometidos são explicadas pela baixa contagem de linfócitos TCD4⁺ (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Os linfócitos auxiliares Th1 são os principais responsáveis pelo controle parasitário e a proteção imune relacionado a *Leishmania*. Essas células produzem citocinas pró inflamatórias (TNF- α , Interleucina 12 e IFN- γ) e ativam os macrófagos, tornando-os capazes de eliminar os parasitos (REITHINGER et al., 2007). Portanto, vacinas e imunoterapias que induzam respostas fortes e de longa duração das células Th1 são vistas como o método ideal de combate preventivo e imunoterapêutico às leishmanioses (DUTHIE et al., 2012).

Modelos desenvolvidos para avaliar o custo/benefício da aplicação de vacinas indicam que mesmo vacinas com tempo de proteção relativamente curto e de baixa eficácia poderiam ser mais custo-efetivas que os tratamentos atuais, tanto para LC quanto para LV, além de evitar a morbidade e mortalidade da população (LEE et al., 2012; BACON et al., 2013). Apesar disso, o desenvolvimento de vacinas que tem como alvo a resposta imune T-dependente tem se mostrado mais desafiador quando comparado às vacinas que induzem resposta imune por anticorpos. Os testes com vacinas de primeira geração tiveram resultados insatisfatórios, enquanto as vacinas de segunda geração, feitas com proteínas recombinantes, foram mais promissoras e continuam em desenvolvimento com seguidos avanços tanto em suas composições quanto nos adjuvantes (GILLESPIE et al., 2016).

As vacinas para leishmaniose mais avançadas até o momento são a LEISH-F1, LEISH-F2 e LEISH-F3. Desenvolvidas pelo *Infectious Disease Research Institute* (IDRI), essas vacinas possuem variações nos adjuvantes e pequenas diferenças na composição dos peptídeos, que aprimoraram os antígenos e facilitaram os processos de produção das vacinas (IBORRA et al., 2018). LEISH-3 foi aprovada apenas na fase I até então, enquanto LEISH-F1 e LEISH-F2 já passaram nas fases I e II dos ensaios clínicos, apresentando segurança, capacidade imunogênica e

eficiência imunoterapêutica, tanto no uso em conjunto com os quimioterápicos, quanto no uso exclusivo (GILLESPIE et al., 2016; COLER et al., 2015).

As proteínas presentes na saliva dos flebotomíneos também induzem respostas específicas dos linfócitos Th1 e estão relacionadas com os processos de infecção e a construção de imunidade contra *Leishmania*. Atualmente, o uso de proteínas salivares recombinantes, juntamente com antígenos recombinantes do parasito, é promissor para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes. A vantagem dessas vacinas é que a resposta imune é precisamente direcionada para o local da picada e potencializada nos momentos iniciais da infecção. Além disso, picadas de vetores não infectados podem auxiliar na manutenção de uma memória imunológica de maior prazo. Apesar das vantagens, o uso de proteínas salivares ainda possuem limitações e estão em fases preliminares de desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2015).

3.6 FUNGOS ENDOFÍTICOS E METABOLISMO SECUNDÁRIO

O termo “endofítico” surgiu com Heinrich A. de Bary em 1866 para descrever organismos ocorrendo internamente aos tecidos vegetais, diferenciando-os dos epifíticos, que ocorrem na superfície das plantas (SUN; GUO, 2012). Segundo Petrini (1991), endofíticos são organismos que residem pelo menos uma parte de sua vida em tecidos vegetais, intra ou extracelularmente, sem causar danos aparentes em seus hospedeiros. Esses organismos podem estar presentes em todos os tecidos da planta, raízes, caule, folhas, pecíolos, etc. e ser mutualistas, comensais benignos, decompositores ou até mesmo patógenos em fase assintomática (PETRINI, 1991).

Os fungos endofíticos em sua maioria pertencem ao filo Ascomycota, havendo também representantes dos filios Basidiomycota, Zygomycota e Oomycota. Ocorrem em todos os tipos de plantas conhecidas. Sua presença já foi observada em um amplo espectro taxonômico, incluindo algas, briófitas, pteridófitas, caducifólias, coníferas e líquens (ROSA et al., 2011; SUN; GUO, 2012). O nível de especificidade dos endofíticos por seus hospedeiros é variado, algumas espécies possuem a capacidade de habitar diversas plantas, enquanto outras possuem apenas um hospedeiro (PETRINI, 1991). Há também casos onde a mesma espécie de fungo pode ser endofítica ou patogênica a depender de seu hospedeiro.

Diaporthe phaseolorum, por exemplo, é uma espécie endofítica em *Laguncularia racemosa*, uma planta de manguezal, porém é patogênica em soja (*Glycine max*) (GOMES et al., 2013).

Existe um balanço entre a virulência dos fungos e os mecanismos de defesa da planta que determina a relação endofítico/hospedeiro. Fatores ambientais, tais como umidade, temperatura, iluminação e nutrientes, interferem na estrutura populacional dos endofíticos e na sua relação com o hospedeiro. O desbalanceamento dessas relações pode levar a eliminação do fungo ou sua transformação em um patógeno prejudicial à planta (KUMAR; CHANDRA; CHOUDHARY, 2017; JIA et al., 2016).

A transmissão dos fungos pode ocorrer de forma vertical, crescendo nas inflorescências e sementes, e sendo passados da planta mãe para seus descendentes. Os fungos com esse tipo de transmissão são mais associados a relações mutualísticas com o hospedeiro. Além da transmissão vertical, as plantas possuem fungos mais generalistas que são transmitidos de forma horizontal, esses são geralmente mais oportunistas e possuem maior virulência, portanto são mais propensos a uma relação antagônica com a planta (SAIKKONEN; SAARI; HELANDER, 2010).

Fungos em geral produzem uma série de compostos não diretamente relacionados ao seu crescimento, geração de energia ou manutenção geral da atividade celular. Esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários e comumente possuem propriedades bioativas, muitas delas de interesse farmacêutico. Em 1928, Alexander Fleming observou que uma colônia de *Penicillium rubens*, que cresceu por acidente em uma de suas placas de cultivo, inibia o crescimento de suas colônias de *Staphylococcus* (FLEMING, 1929). O trabalho de Fleming serviu de base para o isolamento do metabólito secundário mais conhecido, o antibiótico penicilina, responsável por um enorme avanço no tratamento de infecções bacterianas (BORUTA, 2017).

Desde a descoberta de Fleming, centenas de outros compostos isolados a partir de fungos foram caracterizados. Entre os compostos de grande interesse biotecnológico e econômico podemos citar diversos outros antibióticos, mas também antifúngicos, agentes imunossupressivos, antitumorais, hipocolesterolêmicos, antioxidantes, pigmentos, como o β -caroteno, entre outros (ADRIO; DEMAIN, 2003; KUMAR; CHANDRA; CHOUDHARY, 2017).

Como endofíticos, os fungos produzem metabólitos secundários que alteram significativamente a fisiologia de seus hospedeiros. As associações entre plantas e fungos ocorrem há pelo menos 400 milhões de anos (KRINGS et al., 2007), e este longo período de coevolução possibilitou que sistemas complexos e eficientes de cooperação mutualística se desenvolvessem, com os endofíticos se especializando e aumentando a compatibilidade com seus hospedeiros, o que impactou diretamente na ecologia das plantas (ROSA et al., 2011).

Os metabólitos secundários produzidos pelos endofíticos são capazes de conferir a seus hospedeiros resistência a fatores de estresse abióticos (pH, temperatura, pressão osmótica) e bióticos (bactérias, fungos, nematódeos e insetos) (ROSA et al., 2011; HUBBARD; GERMIDA; VUJANOVIC, 2014; JIA et al.; TANNEY et al., 2016). Juntamente com fatores genéticos, ambientais e nutricionais, os endofíticos interferem diretamente no crescimento e desenvolvimento de seus hospedeiros. Em plantas medicinais estão relacionados a qualidade e quantidade de compostos bioativos produzidos, seja auxiliando a planta na produção desses compostos através de modificações em rotas metabólicas ou diretamente produzindo-os (JIA et al., 2016). Alguns compostos com sua produção previamente atribuída a uma planta, eram na verdade produzidos por seus endofíticos. Sendo assim, plantas popularmente conhecidas por suas propriedades medicinais representam uma fonte valiosa de fungos promissores (KUMAR; CHANDRA; CHOUDHARY, 2017).

Outro grande reservatório de metabólitos com altíssimo potencial biotecnológico são os fungos isolados de ambientes extremos. Habitats com alta radiação, alta salinidade, pressões e temperaturas extremas e acidez variável costumam abrigar espécies únicas e com metabólitos exclusivos (CHÁVEZ et al., 2015).

A produção de metabólitos secundários *in vitro*, assim como em condições naturais, é influenciada por diversas condições, tais como pH, temperatura, oxigenação, tempo de incubação, composição do meio de cultura e até mesmo o tipo de frasco de cultura (ELIAS et al., 2006). Portanto, selecionar linhagens eficazes na produção de compostos de interesse não é o único desafio, mas também induzir a produção desses compostos em condições artificiais (BORUTA, 2017). Apesar do imenso potencial biotecnológico dos microrganismos presentes no ambiente, muitos deles não crescem em meios de cultura padrão e a síntese em laboratório de todo o

espectro metabolômico de uma espécie é praticamente impossível (SUN; GUO, 2012). A informação genômica dos microrganismos deixa claro que o potencial de produção de compostos naturais é muito maior do que o obtido em condições laboratoriais comuns, entretanto uma série de metodologias existe para potencializar a produção dos microrganismos *in vitro* (CHIANG et al., 2011).

O metabolismo secundário dos fungos não apresenta um papel fisiológico durante a fase exponencial de crescimento, sendo geralmente produzidos na fase estacionária, especialmente quando as fontes de nutrientes essenciais (carbono, nitrogênio, fosfato) começam a se exaurir. Sendo assim, é importante avaliar as condições de incubação fornecidas durante o desenvolvimento dos fungos, tais como o tempo de cultivo e o meio de cultura mais adequado para a espécie analisada e o propósito do estudo (ROSA et al., 2011). Meios de cultura sólidos possuem produção maior de metabólitos, havendo grande variação entre diferentes meios, entretanto, em comparação com o cultivo líquido, a quantidade de constituintes indesejáveis e outros compostos prejudiciais a pureza do extrato cru, como ácidos graxos, também é muito maior (VANDERMOLEN et al., 2013).

Uma forma de induzir a expressão de grupos genéticos normalmente crípticos em condições laboratoriais é através de modificadores epigenéticos. Moléculas como 5-azacitidina e cloridrato de hidralazina possuem atividade inibitória de DNA metiltransferase e são capazes de diminuir a repressão mediada por metilação de diferentes genes em uma grande variedade de fungos (GONZÁLEZ-MENÉNDEZ et al., 2016). Outras enzimas de atividade inibitória da acetilação de histonas atuam na descompactação da heterocromatina, possibilitando a transcrição de genes antes silenciados (GONZÁLEZ-MENÉNDEZ et al., 2016; ALBRIGHT et al., 2015). A indução de estresse celular, oxidativo ou osmótico por exemplo, também é eficaz em desencadear a expressão de mecanismos moleculares de defesa, resultando em uma produção mais rica de metabólitos (BORUTA, 2017).

A co-cultura de organismos também demonstra ser uma forma eficaz de induzir a produção de genes silenciados em condições padrões. O acréscimo de outros fungos ou bactérias no cultivo de endofíticos simula o microbioma presente em condições naturais, possibilitando a ocorrência de diversas interações que possam desencadear a produção de compostos não observados no cultivo simples (VINALE et al.; WAKEFIELD et al., 2017).

A alteração dos parâmetros ideais de crescimento de uma cultura, com intenção de aumentar a quantidade e diversidade de compostos produzidos é conhecida como OSMAC (*One Strain, Many Compounds*), essa metodologia visa focar em um número relativamente reduzido de organismos, porém otimizando ao máximo a sua produção de compostos (VANDERMOLEN et al., 2013).

Um exemplo de ampliação da produção pela metodologia OSMAC foi observada para *Aspergillus ochraceus*. Com a metodologia padrão, apenas um composto principal havia sido descrito para essa espécie, com produtividade de até 8 mg/L. Entretanto, com as variações na composição dos meios de cultura e frascos de cultivo foram descobertos 15 novos compostos com produtividade de até 94 mg/L (BODE et al., 2002; FUCHSER; ZEECK, 1997).

3.7 O GÊNERO *Diaporthe*

Os avanços das técnicas moleculares permitiram a identificação mais precisa dos microrganismos. Em diversos grupos, as formas sexuadas e assexuadas de fungos, antes classificadas como espécies diferentes, passaram a ser consideradas como pertencentes a mesma espécie. Dessa forma o gênero *Phomopsis* foi reconhecido como anamorfo (estado assexuado) das espécies do gênero *Diaporthe*. Existem cerca de 1.000 espécies descritas para cada gênero, incluindo muitas formas sexuadas e assexuadas da mesma espécie (ROSSMAN et al., 2015; UDAYANGA et al., 2012).

Os fungos do gênero *Diaporthe* (Ascomycota: Diaporthales) são amplamente distribuídos e podem ser encontrados como saprófagos, patogênicos e endofíticos (THOMPSON et al., 2011).

Como patógeno, *Diaporthe* spp. pode acometer humanos e outros mamíferos (GARCIA-REYNE et al., 2011), entretanto é como patógeno de plantas que possui grande variedade de hospedeiros e é causador de diversas doenças, algumas inclusive de importância econômica (SANTOS et al., 2011).

Como endofítico, *Diaporthe* está entre os gêneros mais comumente encontrados em uma grande variedade de plantas e possui grande potencial na produção de metabólitos de interesse farmacêutico (YAN et al., 2018; (TANNEY et al., 2016; CHEPKIRUI; STADLER, 2017). Em *D. endophytica* e *D. terebinthifolii*, isolados das plantas medicinais *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) e *Schinus*

terebinthifolius (Anacardiaceae), foi encontrada ação inibitória contra o fungo patogênico *Phyllosticta citricarpa*, que em laranjas, limões, tangerinas e seus híbridos causa a doença conhecida por mancha preta (SANTOS et al., 2016).

Quatro linhagens de *Diaporthe*, isoladas da planta *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), demonstraram produzir compostos orgânicos voláteis capazes de inibir o crescimento de diversos fungos patogênicos (YAN et al., 2018).

Dois novos metabólitos obtidos de uma linhagem de *Diaporthe* sp., isolada a partir de folhas *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae), demonstraram inibir o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da tuberculose (BUNGIHAN et al., 2011).

Quinze linhagens de *Diaporthe* isolados de *Cinchona ledgeriana* (Rubiaceae) produzem quininas alcaloides que possuem aplicações no tratamento da malária e de arritmias cardíacas, além de diversas funções na indústria química (MAEHARA et al., 2013; MINK et al., 2008).

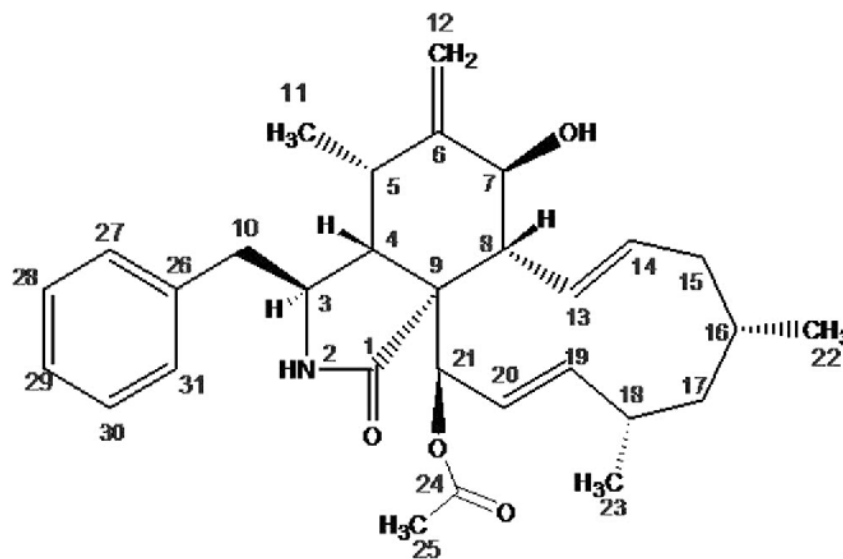
Espécies de *Diaporthe* já foram descritas como produtores de taxol, um metabólito secundário muito utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer (KUMARAN; HUR, 2009). Outra linhagem de *Diaporthe* sp., proximamente relacionada a *D. pseudomangiferae*, demonstrou atividade citotóxica contra células de melanoma humano (MANDAVID et al., 2015). *D. maritima* produziu compostos com atividade contra o fungo patogênico *Microbotryum violaceum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis*, além de atividade anti-inseto no besouro *Scolytus scolytus* (TANNEY et al., 2016).

Metabólitos secundários com ação contra parasitos sanguíneos, como *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania*, também já foram descritos. O extrato de *Diaporthe phaseolorum*, isolado como endofítico de *Vigueira arenaria* (Asteraceae), apresentou atividade inibitória da enzima gGAPDH de *T. cruzi*, na concentração de 100 µg/mL, a inibição da enzima foi de 95 %. A enzima gGAPDH é um homotetrâmero que catalisa a oxidação de gliceraldeído-3-fosfato juntamente com a redução de NAD⁺, e, devido à sua importância no metabolismo dos parasitos, representa um alvo potencial de compostos tripanocidas. O mesmo extrato a 50 µg/mL também apresentou atividade inibitória de 60,7% contra a enzima adenina fosforibosiltransferase (APRT) de *Leishmania tarentolae* (GUIMARÃES et al., 2008).

Em outro estudo, os extratos de *D. phaseolorum*, isolado das raízes de *Combretum lanceolatum* (Myrtales), foram fracionados e levaram ao isolamento do

composto 18-des-oxicitocalasina H (FIGURA 4). Esse composto apresentou baixa citotoxicidade e reduziu a viabilidade de *L. amazonensis* com valor de $IC_{50} = 9,2 \mu\text{g/mL}$. Além de atividade contra *Leishmania*, os extratos de *D. phaseolorum* e o composto 18-des-oxicitocalasina H apresentaram ação contra *T. cruzi* e *Schistosoma mansoni*, assim como atividade antioxidante (BRISSOW et al., 2017).

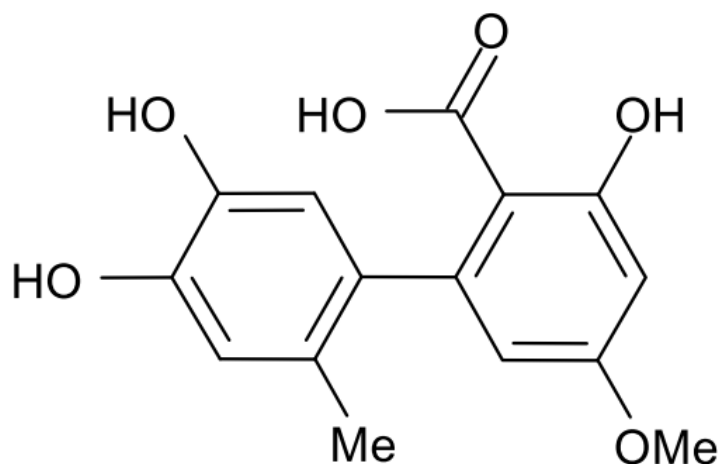
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA 18-DES-HIDROXICITOCALASINA H, ISOLADO DE *D. phaseolorum*.



FONTE: Brissow et al. (2012).

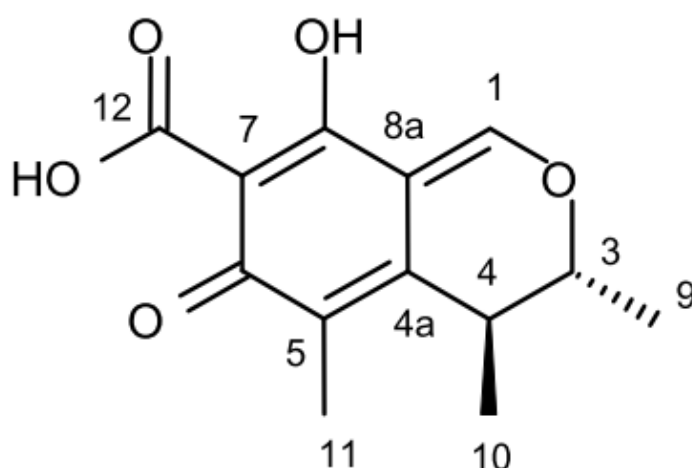
3.8 MATABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DE ENDOFÍTICOS

O extrato bruto extraído da planta *Trixis vauthieri* (Asteraceae) mostrou atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (RIBEIRO et al., 1997). Posteriormente, o extrato produzido pelo fungo *Alternaria* sp., isolado de *Trixis vauthieri*, apresentou atividade inibitória de 99% quando testada a $20 \mu\text{g/mL}$ contra a enzima Tripanotiona redutase. Essa enzima é responsável pela proteção contra estresse oxidativo em espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania*, é essencial para a sobrevivência desses organismos e, portanto, é considerada um alvo válido no desenvolvimento de drogas. O fracionamento do extrato resultou no composto alenusina (FIGURA 5), com IC_{50} de $4,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ na inibição da Tripanotiona redutase (COTA et al., 2008).

FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ALTENUSINA. ISOLADO DE *Alternaria* sp.

FONTE: Adaptado de Cota et al. (2008).

O composto citrinina (FIGURA 6), fracionado a partir do extrato metanólico de uma linhagem de *Penicillium janthinellum* endofítica da fruta de *Melia azedarach* (Meliaceae), apresentou ação inibitória contra *L. mexicana* de 100% após 48 h de exposição na concentração de 40 µg/mL. Com 20 µg/mL, a inibição foi de 81,2% após 48 h. A citrinina é um policetídeo produzido principalmente por *Penicillium citrinum* e várias espécies de *Aspergillus* (MARINHO et al., 2005).

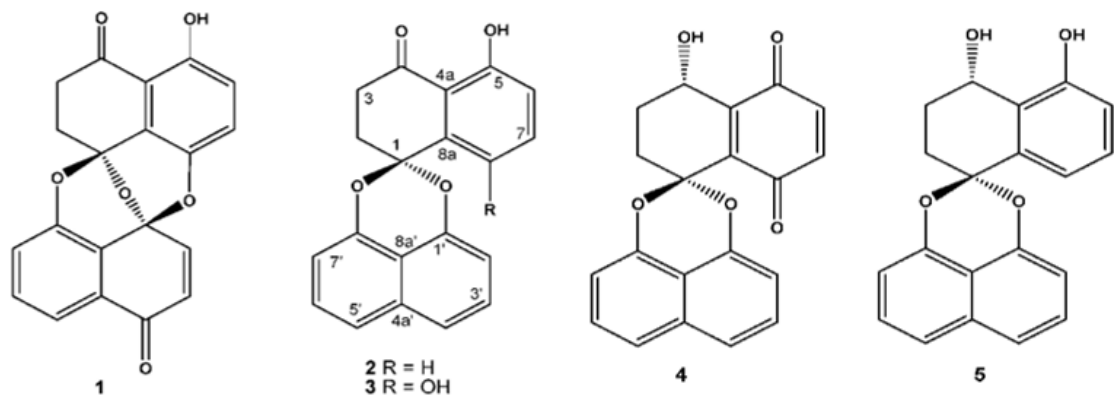
FIGURA 6 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CITRININA. ISOLADO DE *Penicillium janthinellum*.

FONTE: Adaptado de Marinho et al. (2005).

O fracionamento do extrato de *Edenia* sp., isolada da folha de *Petrea volubilis* (Verbenaceae), resultou em 5 compostos (FIGURA 7) com ação

leishmanicida. O composto mais ativo, preussimerina (FIGURA 7.1), apresentou valor de $IC_{50} = 0,12 \mu M$ contra amastigotas de *L. donovani*, similar à ação da anfotericina B ($IC_{50} = 0,09 \mu M$), entretanto a citotoxicidade apresentada contra células de Vero de mamífero também foi relativamente alta ($IC_{50} = 9,0 \mu M$). Palmamuricina CP17 e palmamuricina CP18 apresentaram valores contra *L. donovani* de $IC_{50} = 1,34 \mu M$ e $IC_{50} = 0,62 \mu M$ respectivamente, porém a toxicidade em células Vero foi menor (174 e 152 μM , respectivamente). Os compostos também foram testados contra *T. cruzi* e *P. falciparum* e não apresentaram bons resultados, mostrando atividade seletiva contra *Leishmania* (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008).

FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Edenia* sp.



FONTE: Adaptado de Martínez-Luis et al. (2008).

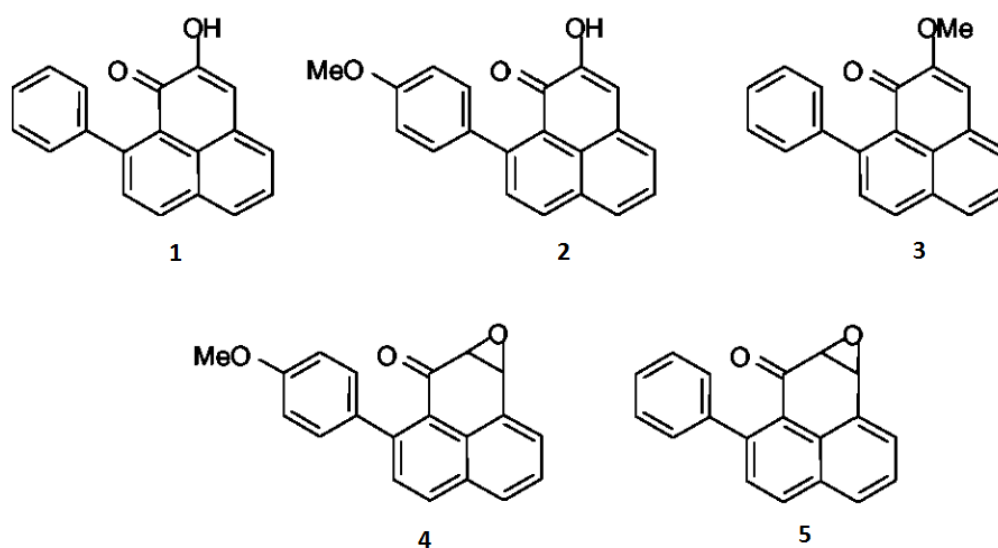
LEGENDA: 1. Preussomerina eg1, 2. Palmamuricina cp2, 3. Palmamuricina cp17, 4. Palmamuricina cp18, 5. Cj12,371.

Duas fitoalexinas extraídas do rizoma de bananeira (*Musa acuminata*: Zingiberales), juntamente com um derivado e dois precursores de sua síntese (FIGURA 8), demonstraram atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. donovani* e amastigotas de *L. infantum*. Anigorufone é uma fitoalexina antifúngica produzida pela bananeira quando infectada por *Fusarium oxysporum*, um fungo saprofítico patogênico causador da doença do Panamá. Todos os compostos inibiram a proliferação de ambos os parasitas em concentrações variando entre 10,3 e 68,7 $\mu g/mL$ (LUQUE-ORTEGA et al., 2004).

O extrato bruto obtido do endofítico *Cochliobolus* sp., isolado de *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae), apresentou ação leishmanicida de 90% na concentração de 20 $\mu g/mL$. Nessa mesma concentração, o extrato apresentou 100% de inibição da enzima Tripanotona Redutase (TryR). O fracionamento do extrato levou a

identificação dos compostos cochlioquinona A e isocochlioquinona A (FIGURA 9), ambos com atividade contra amastigotas de *L. amazonensis*, $IC_{50} = 1,7 \mu M$ e $IC_{50} = 4,1 \mu M$, respectivamente. Os compostos foram testados em 3 linhagens de células cancerígenas humanas e não apresentaram atividade, demonstrando seletividade contra os parasitas (CAMPOS et al., 2008).

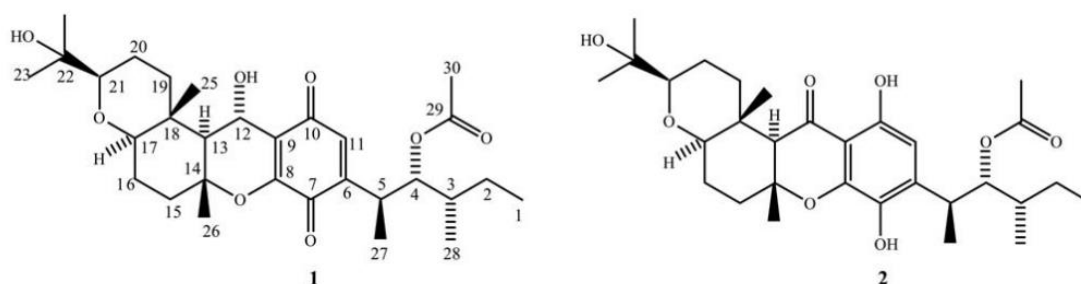
FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS COM AÇÃO LEISHMANICIDA EXTRAÍDOS DE *Musa acuminata*



FONTE: Adaptado de Luque-Ortega et al. (2004).

LEGENDA: 1. Anigorufone: 2-hidroxi-9-fenil-fenalen-1-ona; 2. Derivado da anigofurona ref5: 2-hidroxi-9-(p-metoxifenil)-fenalen-1-ona; 3. Fitoalexina ref20, 2-metoxi-9-fenil-fenalen-1-ona; 4. Epóxido precursor da anigofurona ep5, 2,3-epoxi-9-(p-metoxifenil)fenalen-1-ona e 5. Epóxido precursor da anigofurona ep6, 2,3-epoxi-9-fenil-fenalen-1-ona.

FIGURA 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Cochliobolus* sp.



FONTE: Adaptado de Campos et al. (2008)

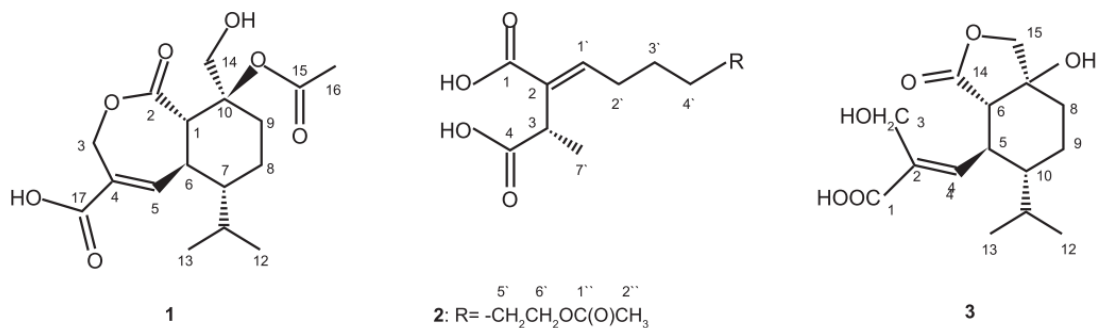
LEGENDA: 1. Cochlioquinona A. 2. Isocochlioquinona A.

Um total de 313 endofíticos foram isolados da planta nativa do continente antártico *Deschampsia antarctica* (Poaceae). Entre esses, 19 apresentaram ação contra amastigotas de *L. amazonensis* de mais de 70% na concentração de 20

$\mu\text{g/mL}$. *Phaeosphaeria herpotrichoides* apresentou valor de $\text{IC}_{50} = 0,2 \mu\text{g/mL}$, equivalente a droga controle Anfotericina B. Outras 5 espécies, *Phaeosphaeria* sp. UFMGCB 2669, *Oculimacula* sp. UFMGCB 2567, *Phaeosphaeria* sp. UFMGCB 2528, *Helgardia* sp. UFMGCB 2630 e *Herpotrichia* sp. UFMGCB 2682, apresentaram valores de IC_{50} ente 0,4 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (SANTIAGO et al., 2012).

O extrato obtido do fungo *Nectria pseudotrichia*, isolado da árvore *Paubrasillia echinata* (Fabaceae), apresentou atividade contra amastigotas de *L. amazonensis* com $\text{IC}_{50} = 4,6 \mu\text{g/mL}$ (CAMPOS et al., 2015). O fracionamento do extrato levou a sete compostos, dos quais três (FIGURA 10) apresentaram forte atividade leishmanicida contra amastigotas de *L. braziliensis* e baixa citotoxicidade contra células das linhagens Vero e THP-1. Os compostos que apresentaram melhor resultado foram ácido 10-Acetiltricoderônico A, com valor de $\text{IC}_{50} = 21,4 \mu\text{M}$, ácido 6'-Acetoxipiliforme com $\text{IC}_{50} = 28,3 \mu\text{M}$ e ácido hidroheptidílico com $\text{IC}_{50} = 24,8 \mu\text{M}$ (COTA et al., 2018).

FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Nectria pseudotrichia*.



FONTE: Adaptado de Cota et al. (2018).

LEGENDA: 1. 10-acetiltricoderônico a 2. Ácido 6'-acetoxipiliforme 3. Ácido hidroheptidílico.

4 METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS

Para a produção dos extratos, foram utilizadas as espécies de fungo: *Diaporthe foliar* (CMRP1429), *Diaporthe malorum* (CMRP1321), *Diaporthe oxe* (CMRP1419) e *Diaporthe terebinthifolii* (CMRP1430).

Os fungos foram obtidos na Coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná. Todas as culturas foram previamente isoladas das folhas de *S. terebinthifolius* (Aroeira-vermelha) e identificadas a nível de espécie como descrito anteriormente (SANTOS, 2017).

As espécies foram inoculadas em meio ágar extrato de malte (MEA) 2% (20g/L extrato de malte; 20g/L dextrose; 1g/L peptona; 15g/L ágar) e incubadas a 28° C por 7 dias. Cinco *plugs* de 6 mm de diâmetro do meio de cultura contendo os micélios foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio Extrato de Malte líquido (20g/L extrato de malte; 20g/L dextrose; 1g/L peptona). As culturas foram mantidas a 28°C por 14 dias com agitação orbital (120 rpm). O produto do cultivo foi filtrado com algodão e gaze para a separação do micélio e filtrado novamente em papel filtro qualitativo 80g. Os compostos foram extraídos adicionando acetato de etila (EtOAc) na proporção 3x1, o solvente foi então removido por rotaevaporação a 45° C. O produto final foi pesado e diluído em DMSO na concentração de 200 mg/mL e mantido refrigerado a -20°C até o uso.

4.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para o teste de toxicidade, macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies) complementado com 10% de Soro Fetal Bovino Fetal (SFB). Em microplacas de 96 poços, 20.000 (2×10^4) células foram adicionadas por poço em volume final de 200 μ L e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂ para a aderência das células. Em seguida, as células foram expostas aos extratos em concentrações entre 500 e 7,8125 μ g/mL em diluição seriada e incubados por 48 horas a 37°C e 5% CO₂.

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio). O MTT possui coloração amarela e é reduzido

por oxirredutases NAD(P)H dependentes presentes nas mitocôndrias de células viáveis, resultando em cristais insolúveis de formazan ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan), com coloração roxa (BAHUGUNA et al., 2017). Em cada poço foram adicionados 200 µL de RPMI com MTT na concentração de 0,5 mg/mL, após 2 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂ os poços foram lavados com PBS 1x e os cristais de formazan solubilizados em 100 µL de DMSO. A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro, quantificando a absorbância em comprimento de onda igual a 550 nm.

Todas as amostras foram testadas em triplicatas e em três experimentos independentes. Como controle negativo foi usado meio de cultura com DMSO v/v 0,25%.

4.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM PROMASTIGOTAS

Para avaliar a atividade leishmanicida dos extratos dos fungos, promastigotas de *L. braziliensis* da linhagem MHOM/BR/75/M2904 e *L. infantum* da linhagem MCAN/BR/2007/CG-1 foram cultivadas a 24°C em meio RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies) suplementado com 10% SFB e 10% Penicilina (10.000 U/mL) e Estreptomicina (10.000 µg/mL). Após cinco dias de crescimento nessas condições, os parasitos foram distribuídos em uma placa de 96 poços (5x10⁶ células/poço) e incubados com os extratos por 48 horas a 24°C em concentrações entre 500 e 7,8125 µg/mL em diluição seriada.

Para avaliar a efetividade dos extratos, 50 µL de MTT 2,5 mg/mL foram adicionados em cada poço e a placa incubada por 4 horas a 24°C. Em seguida a placa foi centrifugada a 4.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o restante suspenso em 100 µL de DMSO.

Cada concentração foi testada em triplicata e em três experimentos independentes. Como controle negativo foi usado apenas meio de cultura com DMSO v/v 0,25%.

A leitura foi feita em espectrofotômetro, quantificando a absorbância a 570 nm.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de IC₅₀ dos compostos foram calculados através de uma regressão não-linear em um modelo inibitório de dose-resposta. O software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows foi utilizado para os cálculos. O IC₅₀ representa a quantidade, em concentração (µg/mL), de determinado extrato ou composto, necessária para inibir um processo biológico à metade (SANTIAGO et al., 2012).

5 RESULTADOS

5.1 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS

Após o cultivo em meio extrato de malte líquido por 14 dias a 28°C e 120 rpm, os fungos apresentaram aparências bastante distintas (FIGURA 11). A produtividade de cada espécie também variou.

D. terebinthifolii foi o mais produtivo com 0,385 g produzidas em 1 litro de meio de cultura. *D. foliar* produziu 0,309 g, *D. malorum*, 0,290 g e *D. oxe*, 0,282.

FIGURA 11 – CULTURAS DE *Diaporthe* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE.



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Da esquerda para a direita: *D. foliar*; *D. oxe*; *D. terebinthifolii*, *D. malorum*.

5.2 CITOTOXICIDADE

No presente estudo, como os extratos aqui testados não haviam sido avaliados para macrófagos murinos (linhagem RAW 264.7) nem mesmo para *Leishmania* spp, inicialmente foi realizada uma diluição seriada partindo de 500 µg/mL até 7,8125 µg/mL a fim de verificar quais as concentrações mantinham as células mais viáveis.

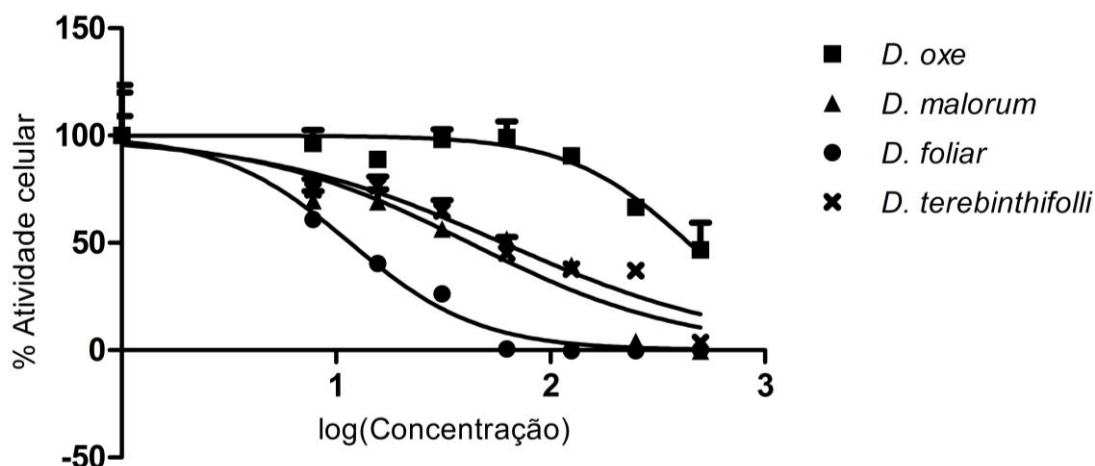
Através do ensaio com MTT, a avaliação da citotoxicidade demonstrou que as quatro espécies produziram extratos com diferentes níveis de atividade citotóxica dose-dependente. A maior citotoxicidade foi observada com o extrato de *D. foliar* com $IC_{50} = 11,62$ µg/mL, *D. malorum* apresentou citotoxicidade de $IC_{50} = 41,93$ µg/mL, *D. terebinthifolii* $IC_{50} = 59,98$ µg/mL enquanto *D. oxe* apresentou a menor citotoxicidade $IC_{50} = 440,9$ µg/mL (TABELA 1; FIGURA 12).

O R^2 varia entre 0,0 e 1,0 e indica o quanto o modelo inibitório de dose-resposta utilizado se adequa aos resultados obtidos. Quando R^2 é igual a 0,0, a melhor curva prevista pelo modelo não se encaixa aos resultados com maior precisão que uma reta horizontal que passa pela média dos valores de Y. Já quando R^2 é igual a 1,0, todos os valores obtidos experimentalmente estão contidos na curva prevista pelo modelo. Sendo que quanto mais próximo de 1,0 for o valor de R^2 , mais o modelo é preciso em determinar um valor de Y dado um ponto no eixo X (MOTULSKY, 2016).

TABELA 1 – ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS RAW 264.7.

Extratos	RAW 264.7	
	IC_{50} µg/mL (95% CI)	R^2
<i>D. oxe</i>	440,9 (329-591)	0,723
<i>D. malorum</i>	41,93 (27,85-63,11)	0,818
<i>D. foliar</i>	11,62 (8,521-15,86)	0,877
<i>D. terebinthifolii</i>	59,98 (44,58-80,70)	0,881

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 12– ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Diaporthe* spp. EM CÉLULAS RAW 264.7.

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: O eixo Y representa em porcentagem a atividade enzimática medida pelo ensaio com MTT. O controle negativo (apenas meio de cultura contendo DMSO v/v 0,25%) representa 100% de atividade celular.

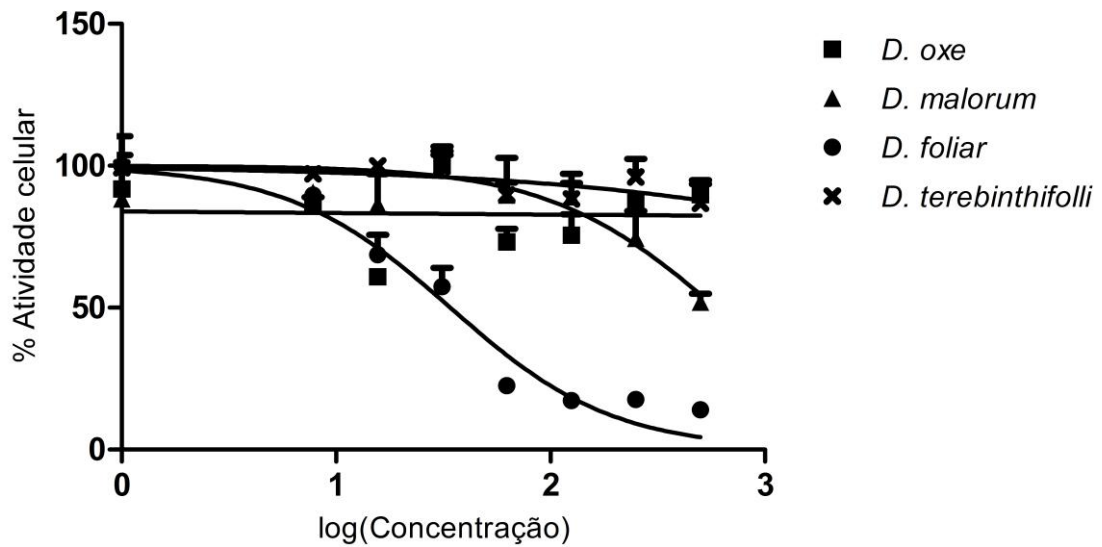
5.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

O extrato de *D. foliar* apresentou atividade leishmanicida contra *L. braziliensis* com valor de $IC_{50} = 34,15 \mu\text{g/mL}$, *D. malorum* apresentou $IC_{50} = 577,1 \mu\text{g/mL}$ (TABELA 2). Os extratos das demais espécies apresentaram valor de R^2 muito baixo ($<0,5$) nas concentrações testadas e não foram considerados (FIGURA 13).

TABELA 2 – ATIVIDADE CITOTÓXICA EM PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* E *L. infantum*.

Extratos	<i>L. braziliensis</i>		<i>L. infantum</i>	
	$IC_{50} \mu\text{g/mL}$ (95% CI)	R^2	$IC_{50} \mu\text{g/mL}$ (95% CI)	R^2
<i>D. oxe</i>	-	-	-	0,412
<i>D. malorum</i>	577,1 (394,6-844)	0,534	244,5 (103,5-577,6)	0,489
<i>D. foliar</i>	34,15 (26,93-43,31)	0,915	301,0 (104,8-864,9)	0,445
<i>D. terebinthifolii</i>	-	0,188	-	0,327

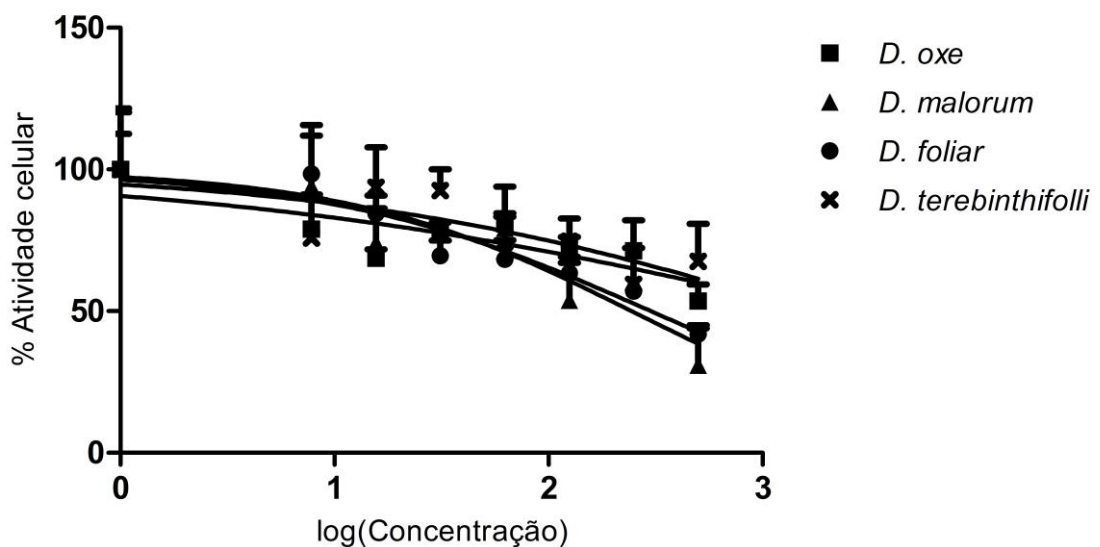
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 13 – ATIVIDADE LEISHMANICIDA PARA *L. braziliensis*.

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: O eixo Y representa em porcentagem a atividade enzimática medida pelo ensaio com MTT. O controle negativo (apenas meio de cultura contendo DMSO v/v 0,25%) representa 100% de atividade celular.

Nenhum extrato apresentou atividade leishmanicida dose-dependente em promastigotas de *L. infantum* nas concentrações testadas (FIGURA 14).

FIGURA 14 – ATIVIDADE LEISHMANICIDA PARA *L. infantum*.

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: O eixo Y representa em porcentagem a atividade enzimática medida pelo ensaio com MTT. O controle negativo (apenas meio de cultura contendo DMSO v/v 0,25%) representa 100% de atividade celular.

6 DISCUSSÃO

As leishmanioses se encontram entre as Doenças Tropicais Negligenciadas mais impactantes no Brasil e no Mundo (HOTEZ et al., 2014). Tanto a forma cutânea, quanto a visceral vem se expandindo territorialmente e em número de casos (BEZERRA et al., 2018).

L. (Viannia) braziliensis é a espécie mais prevalente e agressiva causadora de leishmaniose cutânea no Brasil, pode levar ao desenvolvimento das formas mais severas, mucocutânea e difusa, em aproximadamente 3 a 5 % dos casos (MACHADO et al., 2010).

Para a forma visceral, *L. (Leishmania) infantum* é o único agente etiológico nas Américas. Antes considerada uma doença rural, desde a década de 80, a LV vem expandindo suas áreas de ocorrência para regiões antes não endêmicas e próximas aos grandes centros urbanos. Atualmente a LV ocorre em 21 dos 27 estados brasileiros, causando aproximadamente 3.500 casos por ano (MARTINS-MELO et al., 2014).

A droga de primeira linha utilizada para o tratamento no Brasil é o antimoniato de meglumina (Glucantime®), um antimonial pentavalente de toxicidade moderada e que requer administração diária por longos períodos e por via intramuscular ou intravenosa (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Compostos naturais derivados de plantas e fungos ainda estão em primeiro plano no descobrimento de novas drogas, incluindo tratamentos para infecções microbianas e parasitárias, carcinomas, entre outros (PETERSEN; AMSTUTZ, 2013). Os fungos endofíticos são fungos que residem pelo menos parte de suas vidas intra ou extracelularmente sem causar sintomas aparentes de infecção aparentes em seus hospedeiros (PETRINI, 1991). Esses microrganismos apresentam enorme diversidade de espécies e compostos produzidos, em especial os endofíticos de plantas medicinais e regiões tropicais de grande biodiversidade (YU et al., 2010).

Os extratos das quatro espécies de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe*, isolados de *S. terebinthifolius*, apresentaram efeitos citotóxicos bastante diferentes contra células de mamífero. O extrato menos tóxico foi o de *D. oxe* (IC₅₀ = 440,9 µg/mL) e o mais tóxico foi o de *D. foliar* (IC₅₀ = 11,62 µg/mL).

O extrato de *D. terebinthifolii* apresentou citotoxicidade na concentração de 59,98 µg/mL, o que pode ser considerado moderado. O extrato dessa espécie já demonstrou atividade contra patógenos de origem bacteriana e fúngica, entre eles *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (SANTOS, 2017), *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae* (MEDEIROS et al., 2018) e *Phyllosticta citricarpa* (SANTOS et al., 2016). A citotoxicidade moderada do extrato de *D. terebinthifolii* descrita nesse trabalho confirma a espécie como promissora para avaliação leishmanicida.

Medeiros et al. (2018) identificaram os compostos diaportina e ortosporina a partir do extrato de *D. terebinthifolii*. Ambos os compostos demonstraram atividade microbicida, entretanto a eficácia do extrato bruto foi superior aos compostos isolados, e até mesmo superior ao antibiótico ampicilina, utilizado como controle positivo, indicando a possível existência de sinergismo com outros compostos presentes em menor quantidade no extrato.

O mesmo estudo de Medeiros et al. (2018) também testaram diferentes condições de cultivo do fungo para produção de extratos, concluindo que para, *D. terebinthifolii* as condições mais eficientes são: extrato de malte como fonte de carbono, peptona como fonte de nitrogênio, pH 5,8, temperatura de 28°C e agitação orbital de 120 rpm. Os endofíticos de *S. terebinthifolius*, incluindo *Diaporthe* sp., demonstram grandes diferenças quantitativas e qualitativas na produção de extratos a depender das condições utilizadas, o que evidencia que os parâmetros de cultivo devem ser avaliados para cada espécie (TONIAL et al., 2016).

D. foliar produziu o extrato com maior toxicidade contra células de mamíferos (IC₅₀ = 11,62 µg/mL). A mesma espécie também foi a mais tóxica contra *L. braziliensis* (IC₅₀ = 34,15 µg/mL), demonstrando seletividade para as essas duas células. Santos (2016) reportou atividade do extrato de *D. foliar* e *D. malorum* contra *C. albicans*.

Apesar de ter apresentado atividade contra *L. braziliensis*, o extrato de *D. foliar* não foi efetivo contra *L. infantum*. Diferenças intra e interespecíficas na susceptibilidade já foram reportadas para outras drogas. *L. braziliensis* possui, naturalmente, menor sensibilidade ao tratamento com miltefosina quando comparada a *L. donovani*. Isso ocorre devido a diferenças na expressão de transportadores de membrana responsáveis pela internalização da droga nessas espécies (SÁNCHEZ-CAÑETE et al., 2009). Diferenças significativas na

sensibilidade à miltefosina também já foram observadas entre *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) peruviana* e *L. (L) mexicana* (YARDLEY et al., 2005). Com relação aos antimoniais pentavalentes, *L. (V) braziliensis* também demonstrou maior resistência ao antimoniato de meglumina em comparação com *L. (L) guyanensis* (AREVALO et al., 2007). Além disso, diferenças na resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina foram observadas entre linhagens de *L. (V) braziliensis* de diferentes regiões do Brasil (MACHADO et al., 2010). Esses dados reforçam a importância do tratamento diferenciado em relação às espécies de *Leishmania* spp, principalmente em pacientes de regiões com grande diversidade de espécies.

A bioprospecção de grandes quantidades de compostos de ação leishmanicida é complexo devido à ausência de alvos terapêuticos e ensaios laboratoriais relevantes. As formas axênicas dos parasitos, promastigotas e amastigotas, são frequentemente utilizadas em ensaios de bioprospecção e caracterização molecular devido a praticidade em obter esses parasitos em grandes quantidades (SIQUEIRA-NETO et al., 2012). Em comparação às promastigotas, as amastigotas axênicas são consideradas modelos mais relevantes dos parasitos presentes em humanos (DEBRABANT et al., 2004). Entretanto ensaios com células axênicas, mesmo amastigotas, não refletem com fidelidade as condições encontradas em infecções naturais, onde as formas amastigotas estão confinadas em vacúolos parasitóforos, e portanto, a exposição aos compostos é menor, as condições de nutrição e pH são diferentes e os parasitos apresentam] padrões de expressão de proteínas diferentes (DE RYCKER et al., 2013).

Sendo assim, apesar de mais caros, trabalhosos e complexos, os ensaios que utilizam parasitos intracelulares são mais indicados para a triagem de drogas, pois evitam muitos falsos positivos e permitem identificar a ação de compostos que agem na interação parasito/hospedeiro (NÜHS et al., 2015).

Outro ponto a ser avaliado, é como esses extratos podem imunomodular os macrófagos infectados e não infectados com *Leishmania* spp., um passo a ser investigado posteriormente. Sabe-se que vacinas e imunoterapias que induzam respostas fortes e de longa duração das células Th1 são vistas como o método ideal de combate preventivo e imunoterapêutico às leishmanioses (DUTHIE et al., 2012).

Os resultados obtidos nesse trabalho são preliminares e devem ser aprimorados e revistos, porém elucidam as características citotóxicas das espécies testadas e indicam a existência de compostos de atividade biológica em *D. foliar* e

possivelmente em *D. malorum*. *S. terebinthifolius* e outras plantas medicinais possuem endofíticos, incluindo espécies de *Diaporthe*, que representam uma fonte promissora de compostos com potencial farmacêutico como antimicrobianos, antifúngicos e antiprotozoários.

7 CONCLUSÃO

A espécie que produziu extrato menos tóxico para as células de mamíferos foi de *D. oxe* (440,9 µg/mL) e o mais tóxico foi o de *D. foliar* (11,62 µg/mL).

O extrato do fungo *D. foliar* apresentou citotoxicidade em promastigotas *L. braziliensis* (34,15 µg/mL), principal agente etiológico da leishmaniose cutânea e mucocutânea no Brasil.

Nenhum dos extratos testados apresentou citotoxicidade para *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas.

Os endofíticos, principalmente os presentes em plantas com propriedades medicinais, representam uma fonte muito rica em compostos bioativos.

8 PERSPECTIVAS

Avaliar a viabilidade celular, a citotoxicidade e outros efeitos dos extratos *D. foliar* frente a macrófagos infectados com *L. braziliensis* e *L. infantum*;

Verificar a produção de INF- γ , IL-12, NO e outros mediadores nos macrófagos para a atividade leishmanicida.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 191–199, 2003.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALBRIGHT, J. C. et al. Large-Scale Metabolomics Reveals a Complex Response of *Aspergillus nidulans* to Epigenetic Perturbation. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 1535–1541, 2015.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2012.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, 2006.
- ALVING, C. R. et al. Therapy of leishmaniasis: Superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 6, p. 2959–2963, 1978. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.75.6.2959>>
- ANTONIO, L. de F. et al. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 5, p. 375–380, 2014.
- AREVALO, J. et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 12, p. 1846–1851, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/518041>>
- ASILIAN, A. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: Double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 5, p. 353–359, 2003.
- BACON, K. M. et al. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 480–486, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.032>>
- BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 115–118, 2017.
- BARRATT, J. et al. Isolation of Novel Trypanosomatid, *Zelonia australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Provides Support for a Gondwanan Origin of Digenous Parasitism in the Leishmaniinae. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2017.

BEKERSKY, I. et al. Pharmacokinetics , Excretion , and Mass Balance of Liposomal Amphotericin B (AmBisome) and Amphotericin B Deoxycholate in Humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 828–833, 2002.

BEZERRA, J. M. T. et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1–19, 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006697>>

BODE, H. B. B. et al. Big Effects from Small Changes : Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2002. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7%3C619::AID-CBIC619%3E3.0.CO;2-9](http://doi.wiley.com/10.1002/1439-7633(20020703)3:7%3C619::AID-CBIC619%3E3.0.CO;2-9)>

BORBOREMA, S. E. T. et al. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania (Leishmania) major*-infected macrophages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 4, p. 341–347, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.012>>

BORUTA, T. Uncovering the repertoire of fungal secondary metabolites: From Fleming's laboratory to the International Space Station. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 12–16, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1341022>>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. v. 1, p. 504–542, Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. Brasília, 2006.

BRISSOW, E. R. et al. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum-92C*, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1823–1830, 2017.

BUNGIHAN, M. E. et al. Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3–4, p. 606–609, 2011.

CAMPOS, F. F. et al. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 12, p. 1–11, 2008.

CAMPOS, F. F. et al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 1–10, 2015.

CARVALHO, M. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinales**, v. 15, p. 158–169, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722013000100022&script=sci_arttext>

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 953–994, 1993.

CHÁVEZ, R. et al. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–7, 2015.

CHEPKIRUI, C.; STADLER, M. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. **Mycological Progress**, v. 16, n. 5, p. 477–494, 2017.

CHIANG, Y. M. et al. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 137–143, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.011>>

COLER, R. N. et al. From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. **Clinical & Translational Immunology**, v. 4, n. 4, p. 1–13, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/cti.2015.6>>

COTA, B. B. et al. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 2, p. 177–182, 2008.

COTA, B. B. et al. Leishmanicidal compounds of *Nectria pseudotrichia*, an endophytic fungus isolated from the plant *Caesalpinia echinata* (Brazilwood). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 102–110, 2018.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 4, p. 142–144, 2000.

DE RUITER, C. M. et al. Molecular Tools for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3147–3155, 2014. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00372-14>>

DE RYCKER, M. et al. Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 2913–2922, 2013.

DEBRABANT, A. et al. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 205–217, 2004.

DEMICHELI, C. et al. Oral Delivery of Meglumine Antimoniate- β -Cyclodextrin Complex for Treatment of Leishmaniasis Oral Delivery of Meglumine Antimoniate – ¹⁶

-Cyclodextrin Complex for Treatment of Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 100–103, 2004.

DOS REIS, L. L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638–645, 2017.

DU, R. et al. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2016.

DUTHIE, M. S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.005>>

EJAZI, S. A.; ALI, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 1, p. 79–98, 2013.

ELIAS, B. C. et al. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, v. 161, n. 3, p. 273–280, 2006.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430–442, 2018.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 780–790, 1929.

FORESTIER, C. L. et al. Imaging host cell-leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 4, p. 319–330, 2011.

FRANCO, A. M. R.; GRIMALDI, G. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a Unique Parasite Infecting the Neotropical Tree Sloths (Edentata). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 261–268, 1999.

FREITAS, V. C. et al. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 606–612, 2012.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

FUCHSER, J.; ZEECK, A. Secondary metabolites by chemical screening, 34: Aspinolides and aspinonene/aspyrone Co-metabolites, new pentaketides produced by *Aspergillus ochraceus*. **Liebigs Annales**, n. 1, p. 87–95, 1997.

GALATI, E. A. B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae)**. Classificação e identificação de táxons das Américas. v. 1. São Paulo. Disponível em: <<http://www.fsp.usp.br/~egalati/>>

GARCIA-REYNE, A. et al. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: First report of human infection by this fungus. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, n. 2, p. 204–207, 2011.

GILLESPIE, P. M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992–2995, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.071>>

GOMES, R. R. et al. *Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 31, p. 1–41, 2013.

GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V. et al. Multicomponent analysis of the differential induction of secondary metabolite profiles in fungal endophytes. **Molecules**, v. 21, n. 234, p. 1–17, 2016.

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

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

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis : current status of control , diagnosis , and treatment , and a proposed research and development agenda Personal view. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494–501, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330990200347X>>

GUIMARÃES, D. O. et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 134–144, 2008.

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, 2013.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673698101782>>

HOTEZ, P. J. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2014.

HUBBARD, M.; GERMIDA, J. J.; VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed

viability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 109–122, 2014.

IBORRA, S. et al. Vaccine candidates against *Leishmania* under current research. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 4, p. 323–334, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1459191>>

JIA, M. et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 1–14, 2016.

KATO, H. et al. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 814–826, 2010.

KATO, K. C. et al. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: Possible role of residual sb(3) and protective effect of ascorbic acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 481–488, 2014.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>>

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.

KRINGS, M. et al. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: Infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, v. 174, n. 3, p. 648–657, 2007.

KUMAR, G.; CHANDRA, P.; CHOUDHARY, M. Endophytic Fungi : A Potential Source of Bioactive Compounds. **Chemical Science Review and Letters**, v. 6, n. 24, p. 2373–2381, 2017.

KUMARAN, R. S.; HUR, B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 21–30, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1042/BA20080110>>

LEE, B. Y. et al. The economic value of a visceral leishmaniasis vaccine in Bihar State, India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 417–425, 2012.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. Fungus-Elicited Metabolites from Plants as an Enriched Source for New Leishmanicidal Agents: Antifungal Phenyl-Phenalenone Phytoalexins from the Banana Plant (*Musa acuminata*) Target Mitochondria of *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1534–1540, 2004.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS**

Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 12, p. 1–6, 2010.

MAEHARA, S. et al. Ability of endophytic filamentous fungi associated with *Cinchona ledgeriana* to produce Cinchona alkaloids. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 2, p. 421–423, 2013.

MANDAL, J. et al. Short Report: Evaluation of Direct Agglutination Test , rk39 Test, and ELISA for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Short**, v. 79, n. 1, p. 76–78, 2008.

MANDAVID, H. et al. Secondary Metabolites Isolated from the Amazonian Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. SNB-GSS10. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1735–1739, 2015.

MARINHO, A. M. et al. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 280–283, 2005.

MARTÍNEZ-LUIS, S. et al. Antileishmanial Constituents of the Panamanian Endophytic Fungus *Edenia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 12, p. 2011–2014, 2008.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: A nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A.; LUKEŠ, J. Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397–402, 2001.

MAURÍCIO, IL., STOTHARD, JR., MILES, M. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000.

MEDEIROS-SILVA, V. et al. Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0576-5>>

MEDEIROS, A. G. De et al. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 4, p. 499–505, 2018.

MELO, H. A.; ROSSONI, D. F.; TEODORO, U. Spatial distribution of cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–10, 2017.

MICHEL, G. et al. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. **Acta Tropica**, v. 119, n. 2–3, p. 69–75, 2011.

MINK, L. et al. The physico-chemical properties of cinchona alkaloids responsible for their unique performance in chiral catalysis. **Topics in Catalysis**, v. 48, n. 1–4, p. 120–127, 2008.

MOMEN, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 583–8, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904419>>

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; SARAVOLATZ, L. D. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: Drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398–1404, 2015.

MOTULSKY, H. J. Meaning of R². GraphPad Curve Fitting Guide. Disponível em: <https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg_intepretingnonlinr2.htm>

NÜHS, A. et al. Development and Validation of a Novel *Leishmania donovani* Screening Cascade for High-Throughput Screening Using a Novel Axenic Assay with High Predictivity of Leishmanicidal Intracellular Activity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–17, 2015.

OLIVEIRA, F. et al. A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 290, p. 1–12, 2015.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>>

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis as an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 1032–1039, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.06.019>>

PETERSEN, F.; AMSTUTZ, R. **Natural Compounds as Drugs, Volume I**. Basel: Birkhäuser Basel, 2013. v. 65

PETRINI, O. Microbial Ecology of Leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. 1. ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1991. p. 179–198.

PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the Leishmaniases. **eLife**, v. 2014, n. 3, p. 1–21, 2014. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/02851#abstract>>

RAMÍREZ, J. D. et al. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep28266>>

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 2014.

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

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309907702098>>

RIBEIRO, A. et al. Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 8, p. 836–838, 1997.

ROSA, L. H. et al. Endophytic Fungi of Tropical Forests : A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases. In: RUNDFELDT, C. (Ed.). **Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies**. [s.l.] : IntechOpen, 2011. p. 469–486.

ROSSMAN, A. Y. et al. Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use. **IMA Fungus**, v. 6, n. 1, p. 145–154, 2015. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=2210-6340&volume=6&issue=1&spage=145>>

ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: A key sensory role in parasite signalling and development? **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 710–718, 2009.

SAIKKONEN, K.; SAARI, S.; HELANDER, M. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? **Fungal Diversity**, v. 41, p. 101–113, 2010.

SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P. et al. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1305–1313, 2009.

SANTIAGO, I. F. et al. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 16, n. 1, p. 95–103, 2012.

SANTOS, P. J. C. Dos et al. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research**, v. 186–187, p. 153–160, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.002>>

SANTOS, G. D. **Endophytic fungi of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): taxonomy and characterization of antimicrobial activity**. 2017. p. 1-99, Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SANTOS, J. M. et al. Resolving the diaporthe species occurring on soybean in Croatia. **Persoonia**, v. 27, p. 9–19, 2011.

SILVA, A. et al. Leishmanicidal Activity and Structure-Activity Relationships of Essential Oil Constituents. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 815, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/22/5/815>>

SINGH, N. K. et al. Draft Genome Sequences of Several Fungal Strains Selected for Exposure to Microgravity at the International Space Station. **Genome announcements**, v. 5, n. 15, p. 1–3, 2017.

SINGH, S.; SHARMA, U.; MISHRA, J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: Recent developments. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 9, p. 1099–1108, 2011.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular leishmania donovani amastigotes in human macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

SOTO, J. et al. Topical Paromomycin/Methylbenzethonium Chloride Plus Parenteral Meglumine Antimonate as Treatment for American Cutaneous Leishmaniasis: Controlled Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 56–58, 1998.
Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/516267>>

SOTO, J. M. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 2, p. 147–151, 2002.

STEVENS, J. R. et al. The molecular evolution of trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 48, n. December, p. 1–56, 2001.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

SUN, X.; GUO, L. G. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, v. 3, n. 1, p. 65–76, 2012.

SUNDAR, SHYAMGARWAL, D.; RAI, M.; MURRAY, H. W. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 2, p. 504–512, 2010.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.

SUNDAR, S.; JAYA, C. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787–794, 2008.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 1–13, 2017.

TANNEY, J. B. et al. Production of antifungal and antiinsectan metabolites by the *Picea* endophyte *Diaporthe maritima* sp. nov. **Fungal Biology**, v. 120, n. 11, p. 1448–1457, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.05.007>>

THOMPSON, S. M. et al. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. **Persoonia**, v. 27, p. 80–89, 2011.

TONIAL, F. et al. Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus terebinthifolius*. **Current**

Microbiology, v. 72, n. 2, p. 173–183, 2016.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 1–15, 2017. Disponível em: <<https://f1000research.com/articles/6-750/v1>>

UDAYANGA, D. et al. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 157–171, 2012.

VANDERMOLEN, K. M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 71, p. 1–7, 2013.

VINALE, F. et al. Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive Metabolites. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WAKEFIELD, J. et al. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–10, 2017.

WEINRAUCH, L.; KATZ, M.; EL ON, J. *Leishmania aethiopica*: topical treatment with paromomycin and methylbenzethonium chloride ointment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 16, n. 6, p. 1268–1270, 1987.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

WIWANITKIT, V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 8, p. 323–328, 2012.

YAN, D.-H. et al. Antifungal Activities of Volatile Secondary Metabolites of Four *Diaporthe* Strains Isolated from *Catharanthus roseus*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 65, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2309-608X/4/2/65>>

YARDLEY, V. et al. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 272–275, 2005.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. **Guide of the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville, Florida, Memoirs of the American Entomological Institute, Associated Publishers—American Entomological Institute v. 54. 1994.

YU, H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 437–449, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.009>>

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 87–98, 2003.