

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IRINEU ROMERO NETO

AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DO EXTRATO BRUTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

CURITIBA
2020

IRINEU ROMERO NETO

AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DO EXTRATO BRUTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro.

CURITIBA
2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Romero Neto, Irineu
Avaliação leishmanicida do extrato bruto de fungos endofíticos. / Irineu
Romero Neto. – Curitiba, 2020.
81 p.: il.

Orientadora: Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

1. Leishmania braziliensis. 2. Fungos. 3. Endófitos. I. Título. II. Costa-
Ribeiro, Magda Clara Vieira da, 1969-. III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 616.9364



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **IRINEU ROMERO NETO** intitulada: **AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA DE EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS**, sob orientação da Profa. Dra. **MAGDA CLARA VIEIRA DA COSTA RIBEIRO**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Março de 2020.


MAGDA CLARA VIEIRA DA COSTA RIBEIRO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


FRANCISCO FILIPAK NETO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço às pessoas mais importantes da minha vida. Minha mãe e meu pai, Eunice e Irineu. Agradeço por todo o carinho, suporte, incentivo, sabedoria e preocupação, especialmente durante os meus anos longe de casa. Vocês sempre estiveram presentes, apesar dos muitos quilômetros de distância durante esta etapa da minha vida. Por todas as orações, pela torcida, por todo sacrifício que me permitiu realizar os meus sonhos e pelo amor incondicional.

A todos da minha família, especialmente meus avós Elizabeth e Irineu, minhas irmãs Carol e Isabella, minha cunhada Juliana e minha segunda mãe Sandra, vocês foram a minha força e me trouxeram felicidade em momentos difíceis. Estou morrendo de saudades de vocês!

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro, pela oportunidade de conhecer, de trabalhar e de aprender. Pelos valiosos ensinamentos e conselhos, pela amizade, cordialidade, confiança e proteção, pela disponibilidade e pelo incentivo para realização deste trabalho. Agradeço também por ter me introduzido à docência. Uma vez te contei que meus maiores exemplos de vida são mulheres incríveis e poderosas: e você é uma delas.

Agradeço à Thaís, pelo companheirismo e pela infinita dedicação e compreensão. Também agradeço à sua família, em especial meus avós de coração, vó Luzinete e vô Júlio, que me acolheram como neto e sempre me deram todo apoio.

Agradeço às ratazanas do laboratório. Juliana, a melhor amiga que uma pessoa pode ter. Obrigado pelas risadas garantidas. Por ora trazer calma, ora compartilhar os momentos de desespero. Agradeço por sempre poder contar com a minha dupla de fofoca no NB2 e de experimentos desastrosos. Pelo duo mais falante e espalhafatoso que essa universidade já viu. E obrigado pelo sagu nos almoços e por me entender só com um olhar. Letícia, a amiga que melhorava os meus dias com um sorriso carinhoso. Obrigado pela amizade, pela companhia, pelos conselhos e ensinamentos, pela melhor *playlist* de brega funk e por ser a nossa mãezona do grupo. Thayany, a rata que chegou por último mas se adaptou rápido, obrigado pela

amizade, pelos memes mais engraçados e por ter apresentado o cupom de desconto do McDonalds. Vocês foram fundamentais durante a minha trajetória e são amigades para a vida, muito obrigado! E como já diz o nome do grupo do whatsapp: esse grupo detona geral.

Agradeço aos demais amigos de laboratório, aos que já saíram e aos que permanecem, especialmente à Sílvia, Salvador, Gustavo, Luani e Marcos; aos amigos de outros laboratórios, especialmente ao Jason e Alisson, do LabMicro; e à Jéssica, do Lab Toxicologia Celular. Obrigado pelos momentos inesquecíveis dentro e fora da universidade, de muitas risadas e fofocas, de ajuda na bancada, de orientações, de repique de fungo e de incontáveis caronas.

Agradeço também aos amigos da vida, especialmente ao Willi, Luiz, Isabela, Marina, Jéssica B., Jéssica M. e Luísa. Vocês são parte da minha história e que vou levar comigo independente de qualquer distância.

Agradeço às colaborações para a realização deste trabalho. Em especial, ao laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica e ao laboratório de Toxicologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular. Os meus agradecimentos ao Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Prof. Dr. Francisco Filipak Neto, Prof. Dra. Vânia Aparecida Vicente, Prof. Ida Chapaval Pimentel e Prof. Dr. Andrey José de Andrade, pela disponibilidade, por ter aberto as portas dos laboratórios e pelos valiosos ensinamentos e orientações.

Agradeço às funcionárias da limpeza dos laboratórios, especialmente à Cléo, que se tornou uma carinhosa amiga do grupo. Agradeço também às técnicas do laboratório de Parasitologia Molecular, especialmente à Eliane, e aos técnicos de microscopia do Centro de Microscopia Eletrônica e da Microscopia Confocal da UFPR. Muito obrigado!

Agradeço a todos os outros professores e colegas que fizeram parte da minha trajetória.

Agradeço ao órgão de fomento CAPES.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná pela incrível jornada e pela oportunidade de viver essa experiência.

RESUMO

As Leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas de progressão crônica. O tratamento das Leishmanioses tem sido baseado em Antimoniais Pentavalentes que apresentam alta citotoxicidade para os pacientes afetados. Na busca por terapias alternativas, diversos compostos produzidos por fungos endofíticos revelaram propriedades leishmanicidas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida do extrato bruto dos fungos endofíticos *Diaporthe oxe* (CMRP 1418) e *Diaporthe infecunda* (CMRP 1325) em *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis*. Deste modo, os grupos experimentais foram expostos ao extrato bruto dos fungos endofíticos nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24, 48 e 72 horas. Em seguida, foi avaliada a citotoxicidade em formas promastigotas de *L. braziliensis* e em macrófagos não infectados e infectados por *L. braziliensis*; a atividade anti-amastigota em macrófagos infectados; foram quantificados os níveis de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (EROs); e foi avaliado o índice fagocítico. Os resultados revelaram que o extrato bruto de *D. oxe* apresenta propriedades leishmanicidas como a diminuição da taxa de infecção *in vitro*, sendo citotóxico para promastigotas de *L. braziliensis* e menos citotóxico para macrófagos não infectados e infectados nas menores concentrações do tratamento, contribuiu para o aumento da explosão respiratória e potencializou a atividade fagocítica em macrófagos. Comparativamente, esses resultados não foram evidentes para o extrato bruto de *D. infecunda*, que mostrou atividade leishmanicida menos promissora. Em conjunto, o tratamento com o extrato bruto dos fungos endofíticos resultou em mudanças fisiológicas do macrófago, sugerindo uma interferência na modulação de uma resposta com fenótipo M1 frente à infecção por *L. braziliensis*.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; *Diaporthe*; fungo endofítico; leishmanicida; terapia.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of chronically-evolving endemic infectious diseases. The treatment for Leishmaniasis has been based on Pentavalent Antimonials and exposes those infected to cytotoxic effects. The research for alternative therapies found that compounds of endophytic fungi have leishmanicidal properties. This study aimed to evaluate the leishmanicidal effect of crude extract of *Diaporthe oxe* (CMRP 1418) and *Diaporthe infecunda* (CMRP 1325) in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and the cytotoxicity in uninfected and infected RAW 264.7 macrophages with *L. braziliensis*. The experimental groups were exposed to treatment at 500, 250, 125 and 62.5 µg/mL concentrations for 24, 48 and 72 hours. Thus, cytotoxicity in promastigote form of *L. braziliensis* and in uninfected and infected RAW 264.7 macrophages was evaluated; the anti-amastigote activity against *L. braziliensis* was evaluated; nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) levels were quantified; and the phagocytic index was determined. The results revealed that the crude extract of *D. oxe* present antileishmanial properties as decrease the in vitro infection, being cytotoxic to promastigote form of *L. braziliensis* and less cytotoxic to uninfected and infected macrophages at lower concentrations, favored the increase of respiratory burst and enhanced the phagocytic activity in macrophages. Comparatively, these findings were not evident for *D. infecunda*, showing less promising in terms of leishmanicidal effects. Altogether, the treatment with endophytic fungi crude extract resulted in macrophage physiological changes, possibly indicating interference in the modulation of the M1 phenotype response during *L. braziliensis* infection.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; *Diaporthe*; endophytic fungi; leishmanicidal; therapy.

LISTA DE FIGURAS

1	Representação do ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	17
2	Distribuição de casos notificados de LTA em 2018 nas Américas.....	20
3	Distribuição dos casos notificados de LTA entre os anos 2000 até os dias atuais.....	21
4	A resposta imunológica frente à infecção por <i>Leishmania</i>	22
5	Polarização dos macrófagos através de diferentes vias de sinalização como indutores do desenvolvimento da resposta com fenótipos M1 e M2.....	24
6	Representação dos fatores de virulência expressos na superfície de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	25
7	Macrófagos de linhagem RAW 264.7.....	26
8	Processos realizados para a obtenção do extrato bruto dos fungos endofíticos <i>D. oxe</i> (CMRP 1418) e <i>D. infecunda</i> (CMRP 1325).....	37
9	Esquema da diluição seriada das concentrações do extrato bruto de <i>D. oxe</i> (CMRP 1418) e de <i>D. infecunda</i> (CMRP 1325) a partir da solução estoque (200 mg/mL).....	39
10	Representação do delineamento experimental.....	40
11	Ensaio de MTT com Anfotericina B (AmB) para padronização e seleção da concentração de uso.....	45
12	Ensaio de MTT com o extrato bruto de <i>D. oxe</i> (CMRP 1418).....	46
13	Ensaio de MTT com o extrato bruto de <i>D. infecunda</i> (CMRP 1325).....	47
14	Ensaio de MTT em formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	48
15	Taxa de infecção e ação anti-amastigota do extrato bruto de <i>D. oxe</i> (CMRP 1418).....	49

	Taxa de infecção após 72 horas de tratamento com o extrato bruto de	
16	<i>D. oxe</i> (CMRP 1418).....	50
	Taxa de infecção e ação anti-amastigota do extrato bruto de <i>D.</i>	
17	<i>infecunda</i> (CMRP 1325).....	51
18	Taxa de infecção com o extrato bruto de <i>D. infecunda</i> (CMRP 1325).....	52
	Quantificação dos níveis de NO com o extrato bruto de <i>D. oxe</i> (CMRP	
19	1418).....	54
	Quantificação dos níveis de NO com o extrato bruto de <i>D. infecunda</i>	
20	(CMRP 1325).....	55
	Quantificação dos níveis de EROs com o extrato bruto de <i>D. oxe</i>	
21	(CMRP 1418).....	56
	Quantificação dos níveis de EROs com o extrato bruto de <i>D. infecunda</i>	
22	(CMRP 1325).....	57
	Atividade fagocítica em macrófagos tratados com o extrato bruto de <i>D.</i>	
23	<i>oxe</i> (CMRP 1418).....	58
	Atividade fagocítica em macrófagos tratados com o extrato bruto de <i>D.</i>	
24	<i>infecunda</i> (CMRP 1325).....	58

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

Sigla	Correspondência
AmB	Anfotericina B
ATP	Adenosina trifosfato
BDA	Ágar batata dextrose
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CMRP	Culturas Microbiológicas da Rede Paranaense
CO ₂	Dióxido de carbono
CR1	<i>Complement receptor type 1</i>
CR3	<i>Complement receptor type 3</i>
DAN	2,3-diaminonaftaleno
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOAc	Acetato de etila
gp63	Metaloprotease 63
H ₂ DCFDA	2',7' diacetato de diclorofluoresceína
HCl	Ácido clorídrico
HIF-1	Fator induzível por hipóxia 1
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-23	Interleucina 23
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
kDNA	DNA mitocondrial do cinetoplasto
L. (L.)	<i>Leishmania (Leishmania)</i>

L. (V.)	<i>Leishmania (Viannia)</i>
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il] - 2,5 difeniltetrazólio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida, do inglês <i>Dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate</i>
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NK	Células <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salina, do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldeído
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRPs	Receptores de reconhecimento de padrões
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
spp	Várias espécies
TLR2	Receptor <i>Toll-like</i> tipo 2, do inglês <i>Toll-like receptor 2</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFPR	Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	<i>Leishmania</i>.....	15
2.2	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	16
2.3	Aspectos clínicos das Leishmanioses e epidemiológico da LTA.....	17
2.4	Interações parasito-hospedeiro.....	21
2.5	Macrófagos de linhagem RAW 264.7.....	25
2.6	Tratamento das Leishmanioses.....	26
2.7	Fungos endofíticos.....	27
2.7.1	Novos compostos com potencial leishmanicida.....	28
3	JUSTIFICATIVA.....	33
4	OBJETIVOS.....	35
4.1	Objetivo geral.....	35
4.2	Objetivos específicos.....	35
5	METODOLOGIA.....	36
5.1	Reagentes.....	36
5.2	Procedimentos gerais.....	36
5.2.1	Cultivo dos fungos endofíticos e obtenção do extrato bruto.....	36
	Cultivo e manutenção <i>in vitro</i> de macrófagos e de promastigotas de <i>L.</i>	
5.2.2	<i>braziliensis</i>	37
5.2.3	Delineamento experimental.....	38
	Avaliação da citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW	
5.3	264.7 não infectados e infectados por <i>L. braziliensis</i>.....	40

Avaliação da citotoxicidade em formas promastigotas de <i>L.</i>	
5.4 <i>braziliensis</i>.....	41
Atividade leishmanicida em formas amastigotas intracelulares de	
5.5 <i>L. braziliensis</i>.....	41
5.6 Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO).....	42
5.7 Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)..	42
Atividade fagocítica em macrófagos de linhagem RAW	
5.8 264.7.....	43
5.9 Análise estatística.....	43
6 RESULTADOS.....	44
6.1 Padronização e seleção das concentrações de uso.....	44
Citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não	
6.2 infectados e infectados por <i>L. braziliensis</i>.....	45
6.3 Citotoxicidade em formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>.....	47
Atividade leishmanicida em formas amastigotas intracelulares de	
6.4 <i>L. braziliensis</i> - taxa de infecção.....	48
6.5 Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO).....	53
6.6 Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)..	55
Atividade fagocítica em macrófagos de linhagem RAW	
6.7 264.7.....	57
7 DISCUSSÃO.....	60
8 CONCLUSÃO.....	70
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, com progressão crônica e que acomete os humanos quando estes invadem áreas onde ocorre o ciclo de transmissão do parasito (TRUPPEL et al., 2014). A LT, também conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) quando ocorre nas Américas, é considerada uma Doença Tropical Negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), com notificações de casos em mais de 98 países, embora 90% dos casos estão concentrados no Afeganistão, Argélia, Arábia Saudita, Brasil, Irã, Iraque, Peru e Síria (OMS, 2019).

As regiões Norte e Nordeste do Brasil concentram a maior parte dos casos da LTA, enquanto o estado do Paraná apresenta a maioria das notificações de infecção na região Sul do Brasil, tendo a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* como o principal agente etiológico (OMS, 2017). A LTA apresenta diferentes manifestações clínicas, em associação com a resposta imunológica do hospedeiro, com a cepa do parasito e a presença de co-infecções, visto que a *L. braziliensis* é responsável por provocar úlceras limitantes na pele, bem como resultar em um quadro mais grave com o acometimento das mucosas, principalmente nasal e da cavidade oral, que pode resultar em lesões deformantes e destrutivas (DE VRIES, REEDIJK e SCHALLIG, 2015; LEAÑEZ et al., 2019).

Atualmente, o tratamento disponível para as Leishmanioses, baseado em Antimoniais Pentavalentes (Glucantime® e Miltefosina®), Pentamidina, Anfotericina B e Anfotericina B lipossomal, é questionável quanto a sua eficácia, resultando em efeitos citotóxicos e colaterais indesejados, portanto, sendo uma das razões para o abandono do tratamento (HOTEZ e AKSOY, 2017). Além de apresentar baixa eficiência, considerando relatos de cepas resistentes circulantes, a falha na terapêutica é um fator limitante para o controle das Leishmanioses, o que torna necessária a pesquisa por novas drogas e por terapias alternativas (ANTINARELLI et al., 2015; SHOKRI et al., 2017).

Devido à importância das Leishmanioses para a Saúde Pública, terapias alternativas baseadas em metabólitos secundários de fungos endofíticos

(RODRIGUES et al., 2014; CAMPOS et al., 2015; IBRAHIM et al., 2016; ALVES et al., 2018) representam uma importante área de estudo, porém ainda pouco explorada. Fungos endofíticos colonizam diversos tecidos de plantas sem causar danos ou patologias ao seu hospedeiro e possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários com diversas bioatividades, constituindo uma abordagem alternativa para o tratamento convencional das Leishmanioses (DOS SANTOS et al., 2016).

Foi observada em estudos anteriores a capacidade de espécies de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* em produzir metabólitos secundários com propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (DOS SANTOS et al., 2016; SANTOS et al., 2016; TONIAL et al., 2016). A busca por terapias alternativas utilizando novos compostos produzidos por fungos endofíticos compreende uma área importante e prioritária, visto à necessidade de novas drogas com maior seletividade contra o parasito e que não resulte em citotoxicidade ao hospedeiro. As investigações utilizando metabólitos secundários sugerem propriedades promissoras com capacidade de polarizar macrófagos e induzir uma resposta pró-inflamatória frente à infecção por *Leishmania* (RODRIGUES et al., 2014; COTA et al., 2018).

Dessa forma, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial leishmanicida *in vitro* do extrato bruto dos fungos endofíticos *Diaporthe oxe* (CMRP 1418) e *Diaporthe infecunda* (CMRP 1325) em *L. braziliensis* e os efeitos citotóxicos em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leishmania*

Pertencentes à ordem Kinetoplastida, os tripanosomatídeos, assim chamados os protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, são formados por parasitos flagelados e intracelulares obrigatórios que apresentam o cinetoplasto rico em DNA mitocondrial (kDNA), configurando uma única mitocôndria conectada ao corpo basal e presente em todas as formas evolutivas (SOULAT e BOGDAN, 2017).

Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, cujas espécies são agentes causadores das Leishmanioses e das Tripanossomíases, respectivamente, apresentam grande importância clínica e epidemiológica e que provocam doenças infecciosas em humanos e em outros mamíferos silvestres ou domésticos (SOUZA et al., 2017).

O gênero *Leishmania* compreende espécies que apresentam ampla variedade antigênica e que permite a interação com os fagócitos do hospedeiro vertebrado, produzindo sinais que desencadeiam a secreção de mediadores e a ativação da resposta imunitária inata e adaptativa (FERNANDES et al., 2016). A infecção causada pela *Leishmania* spp expressa uma ampla diversidade de manifestações clínicas podendo estar relacionada às diferentes espécies e/ou cepa do parasito, aspectos epidemiológicos, estado imunológico do hospedeiro e presença de comorbidades e co-infecções (OYAMA et al., 2018).

Atualmente, são descritas 23 espécies de *Leishmania* infectantes ao ser humano (SABIÁ-JÚNIOR et al., 2019), que são divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, classificados de acordo com o desenvolvimento parasitário no trato digestório do inseto vetor flebotomíneo (LAINSON e SHAW, 1987). De acordo com os mesmos autores, o desenvolvimento suprapilário, quando o desenvolvimento ocorre nas porções média e anterior do trato intestinal dos vetores, é realizado por espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*; enquanto o desenvolvimento peripilário, quando o desenvolvimento ocorre na porção posterior do trato intestinal dos vetores, é realizado por espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*.

2.2 Ciclo biológico da *Leishmania* spp

A transmissão da *Leishmania* spp ocorre através da picada de insetos fêmeas hematófagas infectadas da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, quando distribuídos no Velho Mundo, ou por diversos gêneros, como *Lutzomyia*, *Psychodopygus*, *Pintomyia*, *Nyssomyia*, dentre outros, quando distribuídos no Novo Mundo (BRAZIL, RODRIGUES e FILHO, 2015).

Em seu ciclo de vida (Fig 1), a *Leishmania* spp alterna em duas formas evolutivas distintas: promastigotas e amastigotas, ambas replicativas. O ciclo biológico inicia-se durante o repasto sanguíneo quando a fêmea do vetor flebotomíneo infectado por *Leishmania* spp regurgita formas evolutivas denominadas promastigotas metacíclicas no vertebrado. As formas promastigotas são formas evolutivas extracelulares de formato fusiforme e que possuem flagelo externalizado a partir de uma bolsa flagelar na porção anterior do parasito, sendo fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro, especialmente macrófagos e células dendríticas (SABIÁ-JÚNIOR et al., 2019).

Uma vez no interior do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira, as promastigotas diferenciam-se em formas evolutivas denominadas amastigotas, adaptadas às condições intracelulares. As amastigotas são formas evolutivas intracelulares obrigatórias, de formato arredondado e com flagelo internalizado na bolsa flagelar na porção anterior do parasito, responsáveis por realizar multiplicação binária até romper a célula hospedeira, liberando amastigotas que serão fagocitadas por outros fagócitos (KAYE e SCOTT, 2011; SOULAT e BOGDAN, 2017). A capacidade de sobrevivência do parasito nos fagolisossomos é resultado da síntese de lipases e proteases que permitem o decurso da infecção e a proliferação parasitária em um ambiente inóspito (ALVES et al., 2018).

Durante a hematofagia, a fêmea do vetor flebotomíneo pode se infectar com fagócitos do hospedeiro vertebrado parasitados por amastigotas intracelulares. Os reservatórios são fundamentais para a manutenção do ciclo biológico da *Leishmania* spp, podendo compreender animais silvestres e/ou domésticos, que variam de

região para região, como fonte alimentar para o repasto sanguíneo do inseto e que não desenvolvem patologia quando infectados (TRUPPEL et al., 2014).

As células parasitadas ingeridas durante a hematofagia são lisadas no interior do tubo digestório do vetor flebotomíneo, liberando formas amastigotas que diferenciam-se em promastigotas, sendo estas responsáveis pela multiplicação binária em diferentes porções do trato intestinal do inseto - dependendo do subgênero pertencente - dando origem a numerosas promastigotas metacíclicas que bloqueiam o proventrículo do inseto e, portanto, são regurgitadas pelo flebotomíneo durante o próximo repasto sanguíneo em um vertebrado (KAYE e SCOTT, 2011).

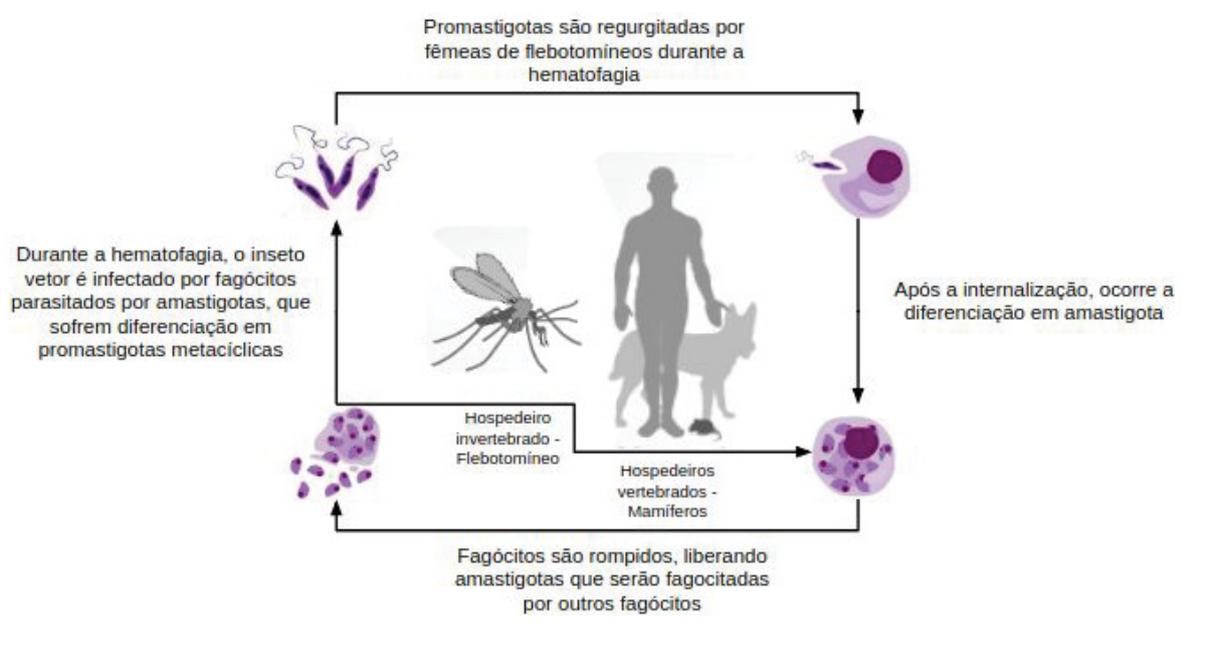


Figura 1. Representação do ciclo biológico da *Leishmania* spp. Fonte: SABIÁ-JÚNIOR et al., 2019 (adaptado).

2.3 Aspectos clínicos das Leishmanioses e epidemiológico da LTA

De acordo com os primeiros estudos sobre a epidemiologia das Leishmanioses, as doenças eram caracterizadas como exclusivamente rurais, mas tornaram-se comuns em áreas suburbanas e urbanas com o passar do tempo (GONTIJO e CARVALHO, 2003; GONTIJO e MELO, 2004). O novo padrão da distribuição dos casos está relacionado a consequências da gestão pública desorganizada, envolvendo aspectos ambientais, sociais e econômicos,

relacionados à descontrolada urbanização (êxodo rural), ao aumento do desmatamento e à entrada do homem em áreas de mata. O grande fluxo migratório de populações das áreas rurais para os centros urbanos e a construção de ferrovias, hidrelétricas e estradas foram constituídos como fator de risco para a disseminação desta parasitose (MELO, ROSSONI e TEODORO, 2018).

Segundo a OMS (2017), as Leishmanioses são doenças infecciosas e não contagiosas, de caráter endêmico, que apresentam alta morbidade e mortalidade e com prevalência em países tropicais e subtropicais. A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, é responsável pelo aparecimento de alterações viscerais, como hepatomegalia e/ou esplenomegalia e comprometimento da medula óssea, causada devido à metástase de parasitos e de fagócitos parasitados a partir do local da picada do inseto flebotomíneo infectado (GONTIJO e CARVALHO, 2003; GONTIJO e MELO, 2004).

A LTA pode ser classificada em três formas clínicas: a forma cutânea, a forma mucocutânea e a forma cutânea-difusa. A forma cutânea apresenta lesões cutâneas limitadas, ulcerativas ou não, únicas ou múltiplas e indolores, sendo esta a forma mais prevalente e com evolução à cura na maioria dos casos. A forma mucocutânea tem como características lesões ulcerativas no trato respiratório superior e cavidade oral, como nariz e septo nasal, boca, palato duro e faringe. Há o surgimento das complicações após meses ou anos após a resolução das feridas cutâneas primárias e que apresenta grande morbidade por destruir tecidos e provocar lesões desfigurantes e que são porta de entrada para infecções secundárias. A forma cutâneo-difusa é caracterizada por múltiplas lesões cutâneas, não ulcerativas, papulares e disseminadas por meio das vias hematogênica e/ou linfática, estreitamente relacionada com a imunossupressão do hospedeiro vertebrado e com a virulência do parasito (GONTIJO e CARVALHO, 2003; GONTIJO e MELO, 2004; SOULAT e BOGDAN, 2017).

O gênero *Leishmania* compreende várias espécies como agentes etiológicos da forma cutânea da LTA no Novo Mundo, sendo as espécies do subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, L. (V.) *guyanensis*, L. (V.) *colombiensis*, L. (V.) *peruviana*, L. (V.) *panamensis*, L. (V.) *lainsoni*, L. (V.) *naiffi*, L. (V.) *shawi* e L. (V.)

lindenbergi; enquanto as espécies do subgênero *Leishmania* são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (L.) pifanoi* (OMS, 2017). O desenvolvimento da forma mucocutânea da doença ocorre em 3 a 5% dos casos da forma cutânea, sendo que a ausência de tratamento ou tratamento inadequado e condições de imunossupressão são fatores de risco, tendo a *L. (V.) braziliensis* como a principal espécie envolvida nesta complicação da doença (COTA et al., 2018; OPAS, 2019).

De acordo com as últimas estimativas, 97 países são considerados endêmicos para as Leishmanioses. Um total de 68 países são endêmicos tanto para LT quanto para LV e 21 países são endêmicos somente para LT (OMS, 2019). No período de 2001 a 2018, foram registrados 989.096 casos de LTA distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos nas Américas (Fig 2), com maior ocorrência de casos no Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (OPAS, 2019). De acordo com a OMS, entre 700.000 e um milhão de casos de Leishmaniose são notificados em 102 países, com 20.000 a 30.000 relatos de morte por ano (PELLISSIER et al., 2018).

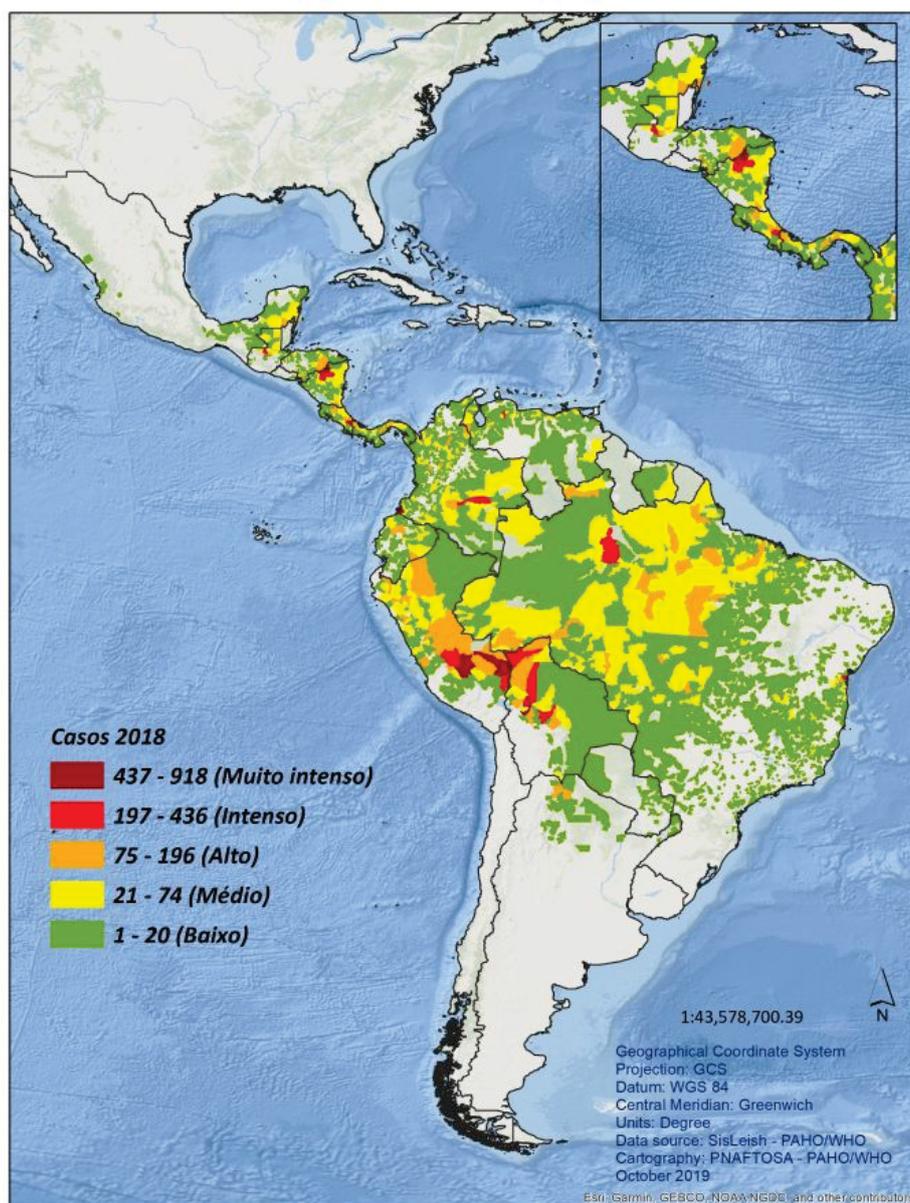


Figura 2. Distribuição de casos notificados de LTA em 2018 nas Américas. Fonte: OMS, 2019.

Do total de 59.789 casos de LTA em 2018, o Brasil reportou 27.85% dos casos (16.651), seguido da Bolívia (16.432), Colômbia (6.362), Peru (6.321), Nicarágua (3.722) e Venezuela (2.612). No Brasil, observa-se uma tendência para a diminuição dos casos notificados de LTA (Fig 3), com o registro de 12.690 casos em 2016, 19.395 casos em 2015 e 19.402 casos em 2014. Entretanto, nos últimos dois anos, um aumento dos casos de LTA foi observado (OPAS, 2019).

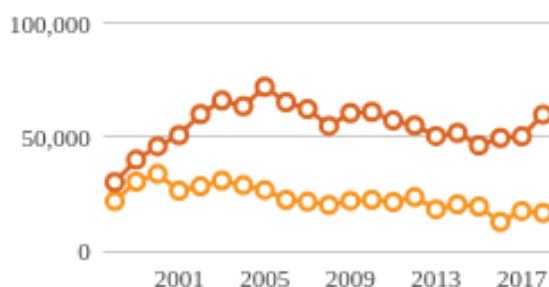


Figura 3. Distribuição dos casos notificados de LTA nas Américas (laranja escuro) e no Brasil (laranja claro) entre os anos 2000 até os dias atuais. Fonte: OPAS, 2019.

2.4 Interações parasito-hospedeiro

A resposta imune é iniciada por células presentes no local da inoculação do parasito pelo vetor flebotomíneo, como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e *natural killer* (NK). Estas células são fagócitos que reconhecem os microrganismos por meio de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), os receptores de superfície *Toll-like receptor 2* (TLR2), conferindo a resposta inata no início da infecção (SCOTT e NOVAIS, 2016; SACHET, LIANG e OEHLER, 2017).

Os macrófagos atuam como células hospedeiras para a replicação e a sobrevivência da *Leishmania* e como células efetoras que implicam na morte do parasito. A ativação destes fagócitos resulta na alteração de suas propriedades biológicas, como crescimento, diferenciação, diapedese e quimiotaxia, capacidade de fagocitose, promoção da expressão de moléculas de superfície, aumento da transcrição de mRNA, dentre outras. Todo esse processo resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, de arginina, espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), mediando a importante resposta pró-inflamatória e implicando na morte do parasito intracelular (KEDZIERSKI e EVANS, 2014).

A interleucina 12 (IL-12) promove imunidade mediada pela estimulação de células Th1, como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, NK e linfócitos B, sendo fundamental na indução à produção e secreção de interferon gama (IFN- γ) por células T CD4. Em sinergismo com fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IFN- γ é a citocina chave que resulta no aumento dos níveis de NO (Fig 4), pelo aumento

da expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), conduzindo à atividade leishmanicida efetiva *in vitro* e *in vivo*, além de garantir o controle da multiplicação e expansão do parasito (OLEKHNOVITCH e BOUSSO, 2015).

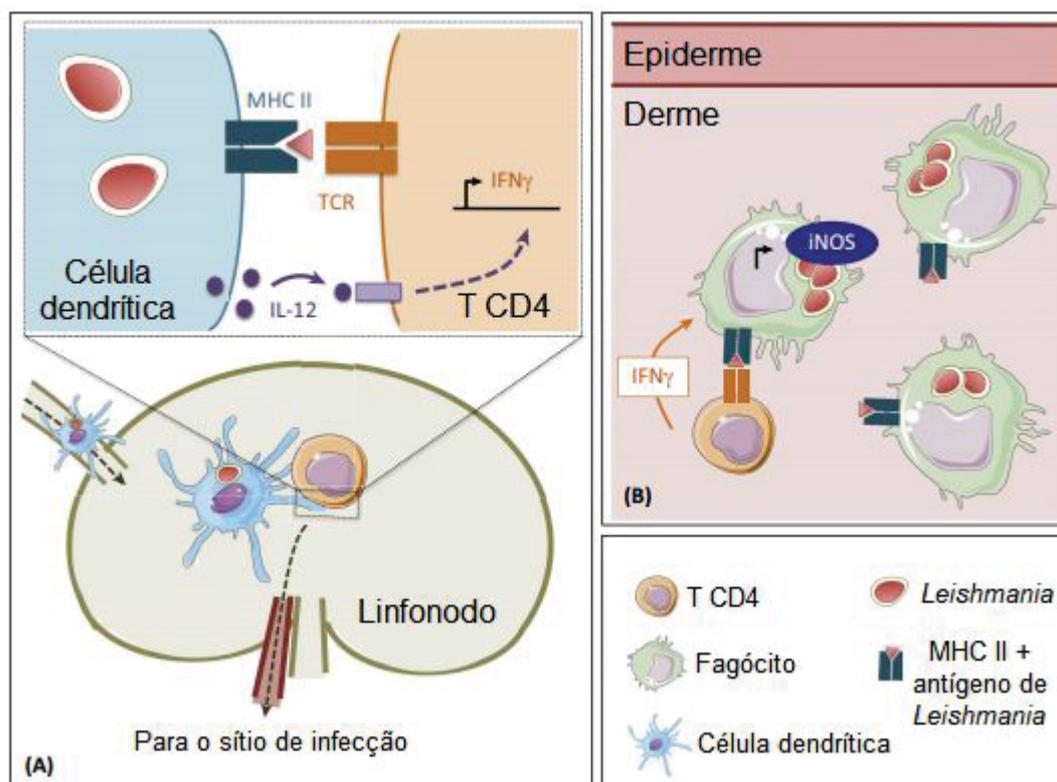


Figura 4. A resposta imunológica frente à infecção por *Leishmania*. A resposta Th1 contra a *Leishmania* ocorre nos linfonodos através da interação entre células dendríticas infectadas e linfócitos T CD4, com a produção de IFN- γ mediada por IL-12 (A). No sítio de infecção, os linfócitos T CD4 reconhecem os fagócitos através das moléculas MHC de classe II e a presença de IFN- γ promove o aumento na expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), induzindo a produção de NO (B). Fonte: OLEKHNOVITCH e BOUSSO, 2015 (adaptado).

Ainda, segundo os mesmos autores, a expressão de iNOS é induzida pela sinalização inata de células T CD4⁺ e a produção de NO é acentuada no local da infecção. A produção de NO ocorre no citoplasma das células infectadas, o que permite a rápida difusão no fagolisossomo e ação direta no parasito intracelular (MAUËL e RANSIJN, 1997; LEMESRE et al., 1997).

As designações M1 e M2 estão associadas com a mudança e a regulação dos fenótipos dos macrófagos. Sendo assim, os macrófagos M1 representam a primeira

linha de defesa contra patógenos e são caracterizados pela capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23, possuir alto índice fagocítico e produzir EROs e NO; desta forma, promovendo a resposta Th1 pela modulação via IL-12 (PELLISSIER et al., 2018). Entretanto, a infecção por *Leishmania* spp resulta em diversas alterações morfológicas e fenotípicas nos macrófagos infectados, como proliferação celular, diferenciação celular, migração celular, atividade fagocítica, inibição das vias de sinalização pró-inflamatória, levando a uma resposta do fenótipo M2 (KEDZIERSKI e EVANS, 2014).

O paradigma da infecção por *Leishmania* spp está relacionado à indução da ativação de macrófagos para ambos os fenótipos (M1 e M2) (Fig 5). De fato, o desenvolvimento da resposta com fenótipo M1 durante o curso da infecção ocorre por meio da sinalização de citocinas pró-inflamatórias, como a modulação via IL-12, TNF- α e IFN- γ , resultando na produção de NO. Entretanto, o desenvolvimento da resposta com fenótipo M2 durante o curso da infecção é induzida através da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a modulação via IL-4, IL-10 e IL-13, bem como por fatores de virulência da superfície do parasito, como lipofosfoglicano (LPG) e metaloprotease 63 (gp63), resultando na inibição do processo inflamatório e, portanto, na sobrevivência da *Leishmania* spp e na progressão da doença (ATRI, GUERFALI e LAOUINI, 2018).

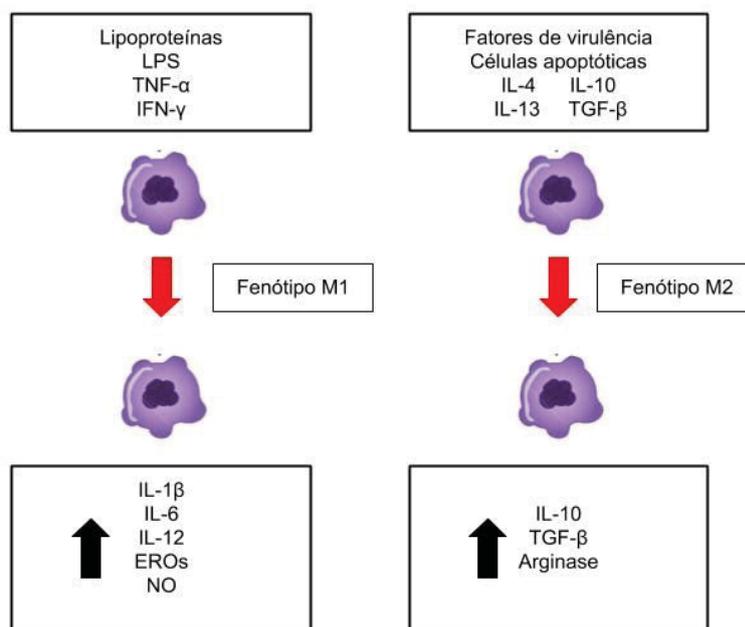


Figura 5. Polarização dos macrófagos através de diferentes vias de sinalização como indutores do desenvolvimento da resposta com fenótipos M1 e M2. Fonte: ATRI, GUERFALI e LAQUINI, 2018 (adaptado).

O sistema complemento possui grande importância na resposta imunológica inata frente à infecção por *Leishmania* spp. No sítio de inoculação das formas infectantes do parasito, o reconhecimento das formas infectantes - promastigotas metacíclicas - ocorre por meio de receptores de superfície dos fagócitos, como receptores 1 e 3 do complemento (CR1 e CR3, respectivamente), por exemplo (HORIKAWA e PENA, 2011).

A atividade fagocítica por vias CR1 e CR3 resulta na inibição da ativação e sinalização celular e no bloqueio da atividade imunomoduladora da célula hospedeira, além de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Isto ocorre porque essa interação não desencadeia a produção de enzimas NADPH oxidase e resulta em *down-regulation* da via de sinalização JAK-STAT e na ativação de proteínas quinases (MAPKs - *mitogen-activated protein kinases*), classificadas como um grupo de enzimas específicas de serina/treonina, cuja atividade promove a síntese de mediadores pró-inflamatórios e de NO. Além dos fatores de virulência do parasito envolvidos durante a interação

parasito-hospedeiro (Fig 6), como a presença de LPG e gp63 (OLIVIER et al., 2012; LIU e UZONNA, 2012; NOGUEIRA et al., 2016).

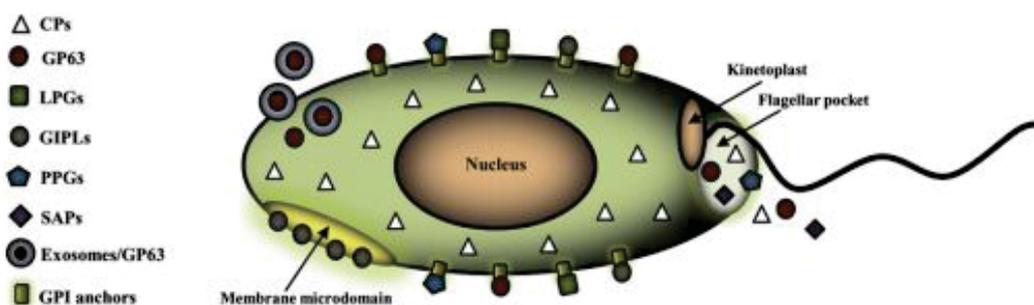


Figura 6. Representação dos fatores de virulência expressos na superfície de formas promastigotas de *Leishmania* spp. Secreção dos fatores de virulência por meio dos exossomos ou pela via clássica de secreção através da bolsa flagelar na porção anterior do parasito. Fonte: OLIVIER et al., 2012.

A resistência do parasito no processo de infecção é desencadeada, principalmente, pela inibição na produção de IL-12 e, por consequência, causando *down-regulation* na resposta imunológica, o que culmina na sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado (PELLISSIER et al., 2018). Além disso, a *Leishmania* adquiriu capacidade de bloquear mecanismos vitais de células dendríticas, como diminuição da fosforilação e degradação de moléculas da via de tradução e ativadores de transcrição, dentre outros, conferindo um comprometimento na resposta inata pró-inflamatória (KEDZIERSKI e EVANS, 2014).

2.5 Macrófagos de linhagem RAW 264.7

Os macrófagos de linhagem RAW 264.7 (Fig 7) são células de linhagem estabelecida oriundas de células de tumor induzido por vírus (*Abelson Leukemia Virus*) em camundongo BALB/c *Mus musculus* macho adulto (ATCC, 2019). A linhagem RAW 264.7 possui propriedades aderentes, com alta taxa proliferativa e alta taxa fagocítica, além de ser de fácil manipulação e cultivo. São células úteis para testes de citotoxicidade devido ao metabolismo semelhante ao de macrófagos de culturas primárias, entretanto, não sofrem senescência replicativa (RASCHKE et al., 1978).

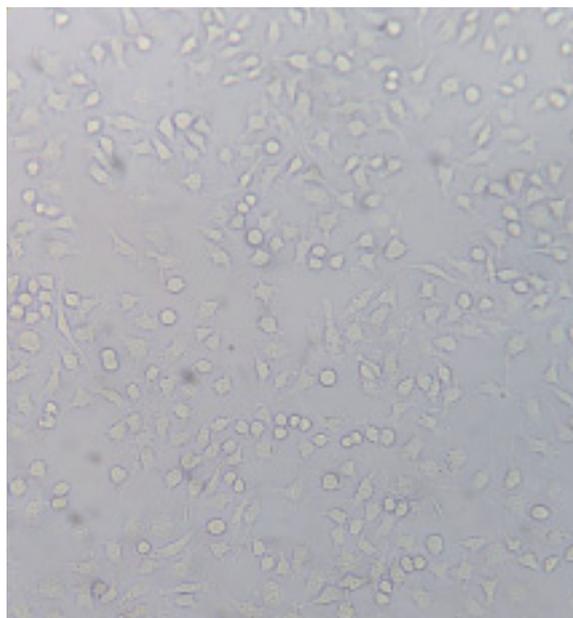


Figura 7. Macrófagos de linhagem RAW 264.7. Cultivo após 24 horas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos¹ observados em microscópio invertido. Fonte: o autor.

2.6 Tratamento das Leishmanioses

O tratamento convencional das Leishmanioses está longe de ser satisfatório. As opções de drogas para as diversas manifestações clínicas apresentam diversas limitações: alta citotoxicidade e efeitos colaterais graves, resultando no abandono do tratamento; baixa eficiência, visto relatos de cepas resistentes às drogas; alto custo dos compostos; dentre outras (ANTINARELLI et al., 2015; SHOKRI et al., 2017).

Desde a sua aplicação médica e veterinária em 1945, as drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são baseadas em Antimoniais Pentavalentes, como Estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), tanto para infecções cutâneas do Novo Mundo quanto para infecções do Velho Mundo. O mecanismo de ação dos fármacos ainda não é muito bem elucidado. Estudos relatam que os Antimoniais podem interferir na ação da topoisomerase I de formas evolutivas de *Leishmania* spp, causando uma desregulação no metabolismo das purinas e resultando na diminuição na síntese de

¹ A solução de antibióticos utilizada foi composta por 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

ATP; bem como podem induzir a imunomodulação com aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e da capacidade fagocítica dos fagócitos, portanto, elevando a produção de EROs e resultar em estresse oxidativo, levando a danos no DNA da célula hospedeira (PASSERO et al., 2013; MOREIRA et al., 2017).

Como segunda linha de escolha para o tratamento das Leishmanioses, encontra-se o antifúngico poliênico Anfotericina B®, derivado de *Streptomyces nodosus*, cujo mecanismo de ação está relacionado à capacidade de interação com o ergosterol da membrana celular do parasito, resultando na formação de poros na membrana e levando ao aumento da polarização da célula, resultando na morte do parasito (MOSTAFAVI et al., 2019).

Contudo, os efeitos colaterais causados pelo uso das drogas convencionais são bastante severos, incluindo: náusea, diarreia, cólica abdominal, *rash* cutâneo, mialgia, artralgia, fadiga, fraqueza, pancreatite, bradicardia, alterações eletrocardiográficas, anemia hemolítica e complicações renais, cardíacas e hepáticas; e ambas as terapêuticas requerem prolongada terapia com aplicação intramuscular ou intravenosa e com acompanhamento médico (PASSERO et al., 2013; MOREIRA et al., 2017; MOSTAFAVI et al., 2019).

2.7 Fungos endofíticos

O termo endofítico refere-se a um grupo de microrganismos simbióticos que colonizam as plantas, principalmente as folhas, galhos, caules, casca, frutos, raízes e estruturas reprodutivas, constituindo uma relação com benefícios para ambos os organismos envolvidos (CHATTERJEE, GHOSH e MANDAL, 2020). Os fungos endofíticos constituem uma fonte promissora de metabólitos secundários potencialmente bioativos com aplicação na área médica e na agricultura, com atividades antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, antitumoral, antipirética, imunossupressora, dentre outras aplicações (DE MEDEIROS et al., 2018).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, pertencente à família Anacardiaceae, também conhecida como aroeira-vermelha ou aroeira-da-praia, é uma árvore largamente distribuída no território nacional, principalmente em regiões de Mata

Atlântica, sendo que as folhas, frutos e sementes têm sido utilizados na medicina popular como agentes naturais com propriedades anti-inflamatória, antiviral, cicatrizante, diurética, estimulante digestivo, tônico, bem como aplicadas para o tratamento de infecções urinárias e respiratórias (DOS SANTOS et al., 2016). Estudos mostram que o extrato bruto obtido das folhas da aroeira-vermelha apresenta efeitos antialérgico, antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório e propriedades cicatrizantes (DA SILVA et al., 2017; PATOCKA e ALMEIDA, 2017).

Diversos estudos relatam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antifúngicas dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos obtidos das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi, principalmente espécies do gênero *Diaporthe* (GOMES et al., 2013; SANTOS et al., 2016; TONIAL et al., 2016). Além disso, os isolados endofíticos do gênero *Diaporthe* são considerados como uma importante fonte natural de compostos para o combate a microrganismos multirresistentes (DOS SANTOS et al., 2016; CHEPKIRUI e STADLER, 2017).

O gênero *Diaporthe* apresenta distribuição mundial e possui diferentes plantas hospedeiras, podendo ser isolados em diferentes temperaturas e condições climáticas. Gomes et al. (2013) reportaram que espécies do gênero *Diaporthe* podem ser classificadas como endofíticas, saprofíticas ou patogênicas; e que, em alguns casos, alguns isolados podem ser endofíticos para determinadas espécies de plantas e patogênicos para outras. Ainda de acordo com os mesmos autores, os fungos *D. endophytica*, *D. terebinthifolii*, *D. schini*, *D. infecunda*, *D. mayteni*, *D. oxe*, *D. paranensis*, *D. raonikayaporum*, *D. brasiliensis* e *D. inconspicua* foram introduzidos como novos fungos endofíticos.

2.7.1 Novos compostos com potencial leishmanicida

Diante das limitações da terapêutica convencional, novos compostos produzidos por fungos endofíticos têm grande potencial terapêutico, porém ainda pouco explorado. Realizando uma busca bibliográfica nas principais fontes de dados científicos (PubMed, SciELO e MEDLINE) até janeiro de 2020, somente Rodrigues et al. (2014) investigaram os mecanismos de ação *in vitro* e *in vivo* do metabólito

secundário produzido pelo fungo endofítico *Aspergillus* em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, apresentando dados promissores em relação à redução da taxa de infecção em modelos animais. Todavia, as investigações realizadas com extrato bruto ou metabólitos secundários de fungos endofíticos focam no *screening* de concentrações inibitórias nas formas evolutivas do parasito e no efeito citotóxico em linhagens celulares, sem que haja a investigação dos mecanismos celulares envolvidos.

Dentre os estudos relacionados à atividade leishmanicida de metabólitos secundários e/ou extrato bruto de fungos endofíticos, observa-se que os estudos restringem-se, principalmente, às espécies *L. amazonensis* (CAMPOS et al., 2008; COTA et al., 2011; SANTIAGO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014; CAMPOS et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; BRISSOW et al., 2017; ALVES et al., 2018) e *L. donovani* (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008; MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011; HIGGINBOTHAM et al., 2013; METWALY et al., 2015; ELKHAYAT et al., 2015; IBRAHIM et al., 2016), agentes causadores da LTA no Novo Mundo (podendo evoluir para a forma disseminada da doença) e da LV no Velho Mundo, respectivamente.

Apesar da ampla distribuição e da importância clínica e epidemiológica da espécie *L. braziliensis*, agente etiológico das formas cutânea e mucocutânea da LTA, a investigação por novos compostos naturais produzidos por fungos endofíticos não é relatada na literatura (COTA et al., 2018).

Diversas classes de metabólitos secundários com ação leishmanicida de diversos gêneros de fungos endofíticos foram relatados, como ácido pilifórmico, ácido tricoderônico, ácido xilárico e citocalasina D de *Nectria pseudotrichia* (COTA et al., 2018); ácido kójico de *Aspergillus* spp (RODRIGUES et al., 2014); citocalasina H (alcaloide) de *Diaporthe phaseolorum* (BRISSOW et al., 2017); butirrolactona de *Aspergillus terreus* (ELKHAYAT et al., 2015); terreína e terrenolide de *Aspergillus terreus* (DA SILVA et al., 2017); integracide (triterpeno) de *Fusarium* sp (IBRAHIM et al., 2016); dicetopiperazina (alcaloide) de *Trichosporum* sp (METWALY et al., 2015); cochlioquinona, isocochlioquinona e anidrocochlioquinona (terpenos) de *Cochliobolus sativus* (NASCIMENTO et al., 2015); e cercosporina (quinona),

paumarumicina e preussomerina dos fungos *Mycosphaerella* sp e *Edenia* sp, respectivamente (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011). Contudo, dados e mecanismos sobre a ação dos compostos são pouco explorados e/ou não respondidos.

No estudo de Campos et al. (2008), dois compostos produzidos pelo fungo endofítico *Cochliobolus* sp, isolado da planta *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae), foram identificados como cochlioquinona A e isocochlioquinona A e observados quanto à sua atividade em formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Ambos os compostos apresentam atividade leishmanicida, reduzindo a viabilidade do parasito em 60% e 70%, respectivamente. Em estudo mais recente de Campos et al. (2015), 82 espécies de fungos endofíticos foram isoladas da árvore *Caesalpinia echinata* (Fabaceae), também conhecida como pau-brasil. O extrato bruto dos isolados foi testado contra formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, revelando atividade leishmanicida de quatro isolados endofíticos: dois isolados do gênero *Fusarium*, um isolado do gênero *Xylaria* e a espécie *Nectria pseudotrichia*, com redução da viabilidade do parasito entre 45-77%.

Os compostos cochlioquinona A e isocochlioquinona A também foram identificados no estudo de Nascimento et al. (2015), bem como o metabólito secundário anidrocochlioquinona A, produzidos por *Cochliobolus sativus*, isolado da planta *Vernonia polyanthes* (Asteraceae), revelando atividade leishmanicida com redução da viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, outros compostos foram testados contra formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e revelaram resultados promissores (COTA et al., 2011).

Achados mais recentes, ainda em relação à espécie *L. amazonensis*, destacam-se as investigações conduzidas por da Silva et al. (2017), que relataram a presença dos compostos terreína, butirolactona I e butirolactona V como agentes com atividade leishmanicida em formas promastigotas, além de tripanocida e esquistossomicida, obtidos pela espécie *Aspergillus terreus*-F7, isolado da planta *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae). Assim como por Brissow et al. (2017), que identificaram o metabólito secundário citocalasina H como agente com atividade leishmanicida, também em formas promastigotas, além de efeito citotóxico em amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e em formas adultas de *Schistosoma*

mansoni, obtido pelo fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum*, isolado da árvore *Combretum lanceolatum* (Combretaceae). Nessa mesma temática, Alves et al. (2018) apresentaram resultados promissores com o extrato bruto de quatro isolados fúngicos, sendo eles: *Vermisporium* sp, *Emericella nidulans*, *Dichotomophthora boerhaaviae* e *Dichotomophthora portulacae*, em que o tratamento reduziu a taxa de infecção *in vitro* em 78,88%, 39,65%, 63,17% e 98,13%, respectivamente, e resultou na diminuição da viabilidade de aproximadamente 50% em formas promastigotas.

Rodrigues et al. (2014) obtiveram resultados promissores em seu estudo utilizando ácido kójico, um metabólito secundário produzido por algumas espécies de *Aspergillus*, possuindo aplicabilidade como agente cosmético e como aditivo alimentar, por exemplo. Os autores observaram que o tratamento resultou na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos, levando à formação de EROs e à redução do número de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Além disso, em experimentos *in vivo*, foi possível observar que a aplicação tópica do ácido kójico promoveu a produção de fibras de colágeno do tipo I nos sítios da infecção, bem como na diminuição do tamanho da lesão cutânea.

A atividade leishmanicida também foi investigada para *L. donovani*, agente etiológico da LV no Velho Mundo, utilizando metabólitos secundários de diversos fungos endofíticos. Martínez-Luis et al. (2008), utilizando o fungo endofítico *Edenia* sp, isolado da planta *Petrea volubilis* (Verbenaceae), caracterizaram cinco novos compostos com ação leishmanicida, dentre eles: paumarumicina e preussomerina. Em estudo mais recente realizado por Martínez-Luis et al. (2011), um *screening* de concentrações foi realizado utilizando o extrato bruto de diversos isolados fúngicos, com redução de viabilidade parasitária de até 90%, em espécies pertencentes aos gêneros *Edenia*, *Penicillium*, *Diaporthe*, *Nectria*, *Mycosphaerella*, *Sternocarpella* e *Aspergillus*.

No estudo conduzido por Elkhayat et al. (2015) o fungo endofítico *Aspergillus terreus*, isolado das raízes da planta *Carthamus lanatus* (Asteraceae) revelou-se promissor, com capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade leishmanicida, dentre eles: terrenolide S, terretonina e butirolactona VI. Ainda avaliando em *L. donovani*, integracides H, I e J foram descritos como metabólitos

produzidos por *Fusarium* sp, isolado da planta *Mentha longifolia* (Labiatae), com ação leishmanicida (IBRAHIM et al., 2016).

Apesar da ampla distribuição geográfica no Brasil, a *L. braziliensis* detém inexpressiva literatura no que se refere aos estudos conduzidos com compostos leishmanicidas de origem fúngica. Cota et al. (2018) reportaram pela primeira vez a investigação do fungo endofítico *Nectria pseudotrichia*, isolado da planta *Caesalpinia echinata* (Brazilwood), como uma fonte natural de metabólitos secundários com ação em formas promastigotas e em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, dentre eles: ácido pilifórmico, ácido tricolorônico, ácido xilárico e citocalasina D.

3 JUSTIFICATIVA

O gênero *Diaporthe* é conhecido e descrito como uma fonte natural de diversos compostos com propriedades bioativas, dentre elas atividade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana e que podem ser utilizados como mecanismos de controle biológico (SANTOS et al., 2016; TONIAL et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2018). Além disso, estudos anteriores revelaram que o extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325) apresentaram importante atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (DOS SANTOS et al., 2016). No estudo conduzido por Martínez-Luis et al. (2011), observou-se que isolados do gênero *Diaporthe* possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários com efeito citotóxico contra *L. donovani* e *Trypanosoma cruzi*.

O aumento de casos documentados em relação à falha terapêutica para as Leishmanioses tem sido observado em várias regiões do mundo (FERNANDES et al., 2016). No Brasil, bem como em outras regiões da América do Sul, o tratamento ineficiente e casos de resistência parasitária são notificados, dentre muitos estes relacionados à *L. braziliensis*. Rugani et al. (2018) observaram que essa espécie quando proveniente de laboratório demonstra maior sensibilidade *in vitro* ao tratamento com Antimoniais Pentavalentes em relação a outras espécies do subgênero *Viannia*. Ainda de acordo com os autores, maior resistência foi observada utilizando parasitos isolados de pacientes com LTA com histórico de tratamento não responsivo ou recidivas.

A pesquisa utilizando metabólitos secundários produzidos por várias espécies de fungos endofíticos mostrou-se promissora (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2015; BRISSOW et al., 2017; ALVES et al., 2018), mas ainda pouco explorada. Em sua maioria, os estudos que utilizaram fungos endofíticos são limitados, visto que os mecanismos de ação dos compostos sobre a *Leishmania* spp e as vias de sinalização celular e de morte da célula hospedeira e do parasito não são investigados. Além disso, a atividade leishmanicida sobre a espécie *L. braziliensis* é insuficientemente reportada na literatura (COTA et al., 2018), embora a mesma seja responsável por desenvolver a forma mucocutânea da doença e por possuir grande distribuição no território nacional (OMS, 2017).

Considerando a problemática envolvendo a terapia convencional das Leishmanioses, torna-se importante a investigação de novos compostos e suas aplicações como uma abordagem alternativa para o tratamento da ATL. Dessa forma, a avaliação das propriedades leishmanicidas de compostos produzidos por fungos endofíticos e do efeito citotóxico em células hospedeiras não infectadas e infectadas mostra-se necessária e promissora.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade leishmanicida do extrato bruto dos fungos endofíticos *Diaporthe oxe* (CMRP 1418) e *Diaporthe infecunda* (CMRP 1325) em promastigotas e amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* e avaliar a citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325) em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis*;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325) em formas promastigotas de *L. braziliensis*;
- Avaliar a citotoxicidade da Anfotericina B em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis* e em formas promastigotas de *L. braziliensis*;
- Avaliar a taxa de infecção em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados por *L. braziliensis* após a exposição ao extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325);
- Quantificar os níveis de NO e de EROs de macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis* após a exposição ao extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325);
- Avaliar a atividade fagocítica em macrófagos de linhagem RAW 264.7 incubados com *L. braziliensis* e *Saccharomyces cerevisiae* após a exposição ao extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325).

5 METODOLOGIA

5.1 Reagentes

Anfotericina B foi obtida pela Secretaria de Saúde do Paraná (SESA); meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) foi obtido pela Cultilab (Campinas, São Paulo, Brasil); soro fetal bovino (SFB), 2,3-diaminonaftaleno (DAN), paraformaldeído (PFA) e solução de penicilina estreptomicina foram obtidos pela Invitrogen (Eugene, OR, EUA); 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA) foi obtido pela Thermo Fisher (Waltham, MA, EUA); brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), tripsina-EDTA e 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) foram obtidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido pela Synth (Diadema, São Paulo, Brasil); e acetato de etila (EtOAc) foi obtido pela Merck (Alemanha).

5.2 Procedimentos gerais

5.2.1 Cultivo dos fungos endofíticos e obtenção do extrato bruto

Os fungos endofíticos *Diaporthe oxe* (CMRP 1418) e *Diaporthe infecunda* (CMRP 1325) foram obtidos da Coleção de Culturas Microbianas, do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (LABMICRO - UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

Os isolados foram repicados e cultivados em meio ágar batata-dextrose (BDA) (200 g/L de batata cozida, 20 g/L de dextrose e 20 g/L de ágar bacteriológico, pH 6.0) por 7 dias a 28°C. Cinco *plugs* de 6 mm (Milímetros) de diâmetro de ágar contendo micélio foram transferidos para Erlenmeyer contendo meio líquido batata-dextrose (200 g/L de batata cozida e 20 g/L de dextrose, pH 5.5), que foram incubados em *shaker* por 14 dias a 28°C com rotação de 120 rpm (Rotação por minuto). O produto da fermentação foi filtrado e extraído com acetato de etila (1:1). O solvente foi evaporado utilizando rotaevaporador a 40°C e o extrato bruto foi ressuscitado em DMSO (Dimetilsulfóxido) 100% na concentração estoque de 200 mg/mL (Fig 8), de acordo com dos Santos et al. (2016).

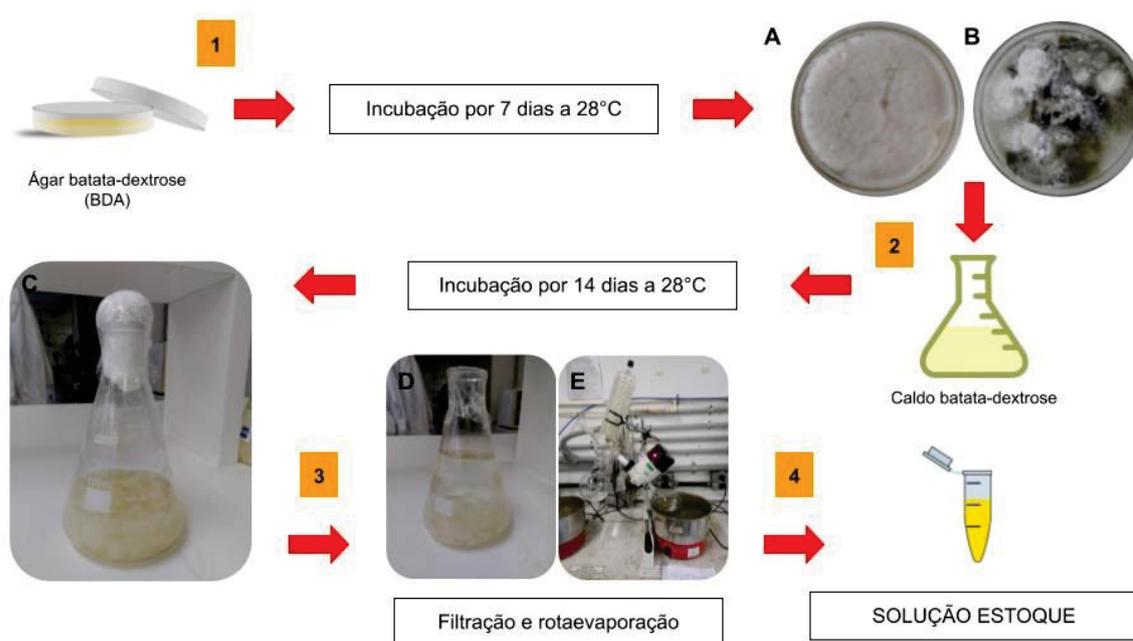


Figura 8. Processos realizados para a obtenção do extrato bruto dos fungos endofíticos *D. oxe* (CMRP 1418) (A) e *D. infecunda* (CMRP 1325) (B). Etapa 1: plaqueamento dos isolados em meio sólido agar batata-dextrose (BDA) e incubação por 7 dias a 28°C. Etapa 2: passagem de *plugs* para o caldo batata-dextrose e incubação por 14 dias a 28°C a 120 rpm para fermentação e desenvolvimento do micélio (C). Etapa 3: filtração do produto da fermentação com acetato de etila (D) e, posteriormente, rotaevaporação do solvente orgânico (E) para obtenção do extrato bruto. Etapa 4: ressuspensão do extrato bruto em DMSO para solução estoque. Fonte: o autor.

5.2.2 Cultivo e manutenção *in vitro* de macrófagos e de promastigotas de *L. braziliensis*

Os macrófagos de linhagem RAW 264.7 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) foram cultivados e mantidos em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), pH 7,3 com 2 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22 μm , suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) em incubadora a 37°C e 5% CO_2 (Dióxido de Carbono) e a 24°C, respectivamente (GLINSKI et al., 2016; TAVAKOLI et al., 2019).

Para a realização dos ensaios, os parasitos foram diluídos em paraformaldeído (PFA) 4% na proporção 1:10, contados em câmara de Neubauer sob microscopia de luz. Em seguida, o volume necessário do meio de cultura contendo formas promastigotas foi repassado para tubos Falcon, estes centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina).

5.2.3 Delineamento experimental

Para os experimentos, os macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram ressuspensos com o uso de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, referência T4174) na concentração final de 0,5 mg/mL de tripsina e 0,2 mg/mL de EDTA, por um período de 3-5 minutos a 37°C, contados em câmara de Neubauer, plaqueados e cultivados durante 24 horas para adesão e adaptação.

Os macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram plaqueados a 5×10^4 células/100 µL/poço em placas de 96 poços (para os ensaios de citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis*; e para quantificação dos níveis de NO e de EROs) e em placas de 24 poços (para os ensaios de taxa de infecção em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados por *L. braziliensis*; e de atividade fagocítica) contendo lamínulas de vidro estéreis de 13 mm adicionando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas.

Para a infecção, os macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram incubados com *L. braziliensis* na proporção 5:1 (sendo 5 parasitos para 1 macrófago) por 24 horas a 37°C e 5% CO₂, sendo $2,5 \times 10^5$ células/100 µL/poço de promastigotas de *L. braziliensis* na fase logarítmica (quinto dia).

Na sequência, os poços foram lavados duas vezes com PBS (tampão fosfato salina) estéril (1X) e expostos ao extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* em diluição seriada de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL considerando os tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas a 37°C e 5% CO₂ (Fig 9).

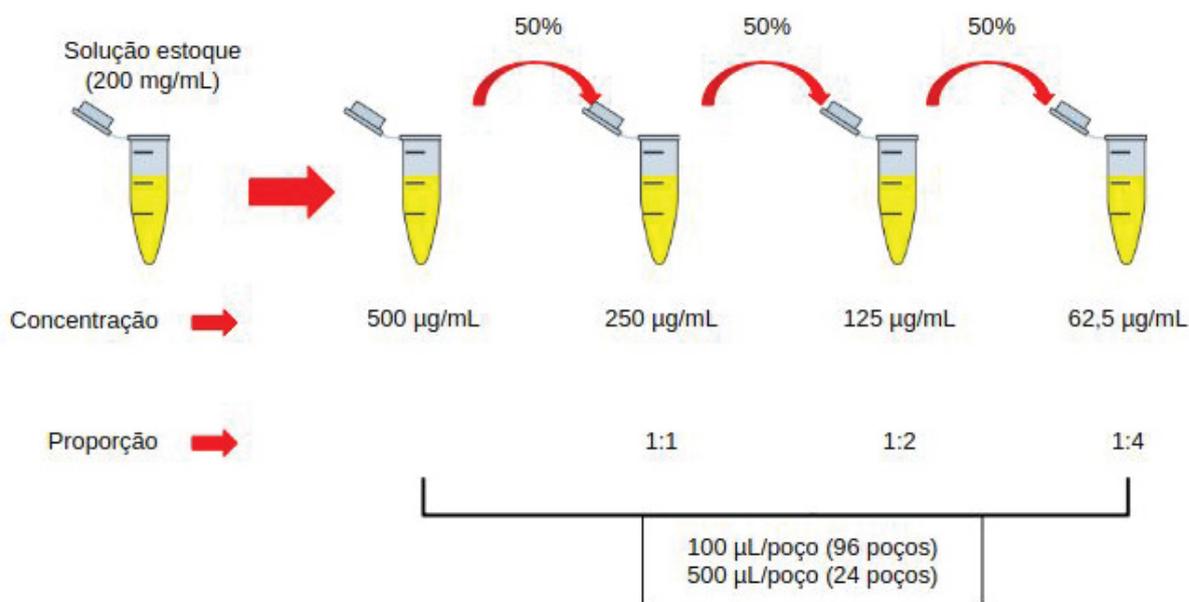


Figura 9. Esquema da diluição seriada das concentrações do extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325) a partir da solução estoque (200 mg/mL). Fonte: o autor.

Como controle para todos os experimentos, foi utilizada Anfotericina B (12,5 µg/mL) como tratamento de referência (controle positivo). Promastigotas de *L. braziliensis* e macrófagos incubados com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 0,3% de DMSO foram considerados como grupo controle não tratado. A concentração de DMSO foi utilizada em todas as diluições do extrato bruto dos fungos endofíticos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e em três experimentos independentes. O delineamento experimental está representado na figura 10.

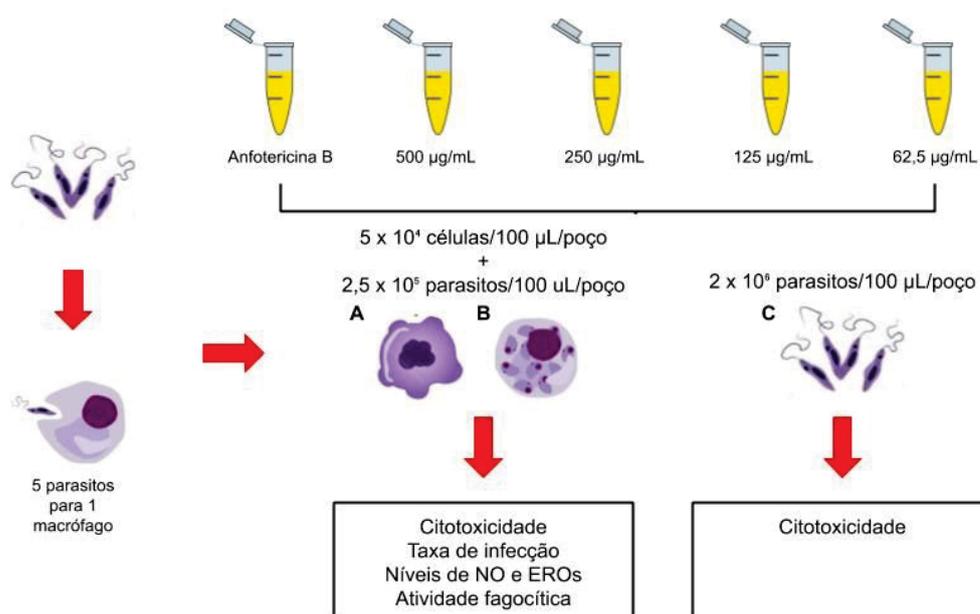


Figura 10. Representação do delineamento experimental. Os grupos experimentais testados foram: macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (**A**); macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados por *L. braziliensis* (**B**); e formas promastigotas de *L. braziliensis* (**C**); tratados com o extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325) e com Anfotericina B por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, os experimentos foram conduzidos para avaliar a citotoxicidade, a taxa de infecção, os níveis de NO e EROs e a atividade fagocítica. Fonte: o autor.

5.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis*

Após as exposições de 24, 48 e 72 horas ao extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda*, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril (1X) e os macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados foram incubados com 100 µL/poço de MTT (Amresco, referência 0793) a 0,5 µg/mL. Após 2 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril (1X) e foram adicionados 100 µL/poço de DMSO (Synth, referência D1011.01.BJ). Em seguida, a absorbância foi quantificada em espectrofotômetro de microplacas (BioTek, Winooski, VT, EUA; modelo Epoch, *software* operacional Gen5) usando o comprimento de onda de 570 nm (nanômetros) (LIEBEL et al., 2015).

O método baseia-se na capacidade dos macrófagos viáveis em clivar o anel tetrazólico do MTT, formando cristais insolúveis de formazan através de enzimas

desidrogenases mitocondriais, caracterizada pela coloração roxa do meio após dissolução com DMSO, permitindo a quantificação da absorbância por espectrofotometria.

5.4 Avaliação da citotoxicidade em formas promastigotas de *L. braziliensis*

Formas promastigotas de *L. braziliensis* na fase logarítmica (quinto dia) foram plaqueadas a 2×10^6 células/100 μL /poço em placas de 96 poços e expostas ao extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* por 24, 48 e 72 horas a 24°C. Então, foram adicionados 10 μL /poço de MTT estoque (5 mg/mL) (Amresco, referência 0793) para concentração final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}/100 \mu\text{L}/\text{poço}$. Após 2 horas de incubação a 24°C, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 4.000 g, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de DMSO (Synth, referência D1011.01.BJ) (SHOKRI et al., 2017).

Em seguida, a absorbância foi quantificada em espectrofotômetro de microplacas (BioTek, Winooski, VT, EUA; modelo Epoch, *software* operacional Gen5) usando o comprimento de onda de 570 nm.

5.5 Atividade leishmanicida em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*

Os macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis a 5×10^4 células/100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, infectados com $2,5 \times 10^5$ células/100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de promastigotas de *L. braziliensis* na fase logarítmica (quinto dia) e incubados a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas seguido das exposições ao extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* por 24, 48 e 72 horas.

Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril (1X), fixados com PFA (Paraformaldeído) 4% por 10 minutos e marcados com 250 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de DAPI (1:2000 em meio de cultura RPMI 1640) por 10 minutos protegidos da luz. As lâminas foram montadas com 5 μL de solução de glicerina e PBS estéril (1X) (1:1) e seladas com esmalte (SARKAR et al., 2018).

O número total de macrófagos, o número total de macrófagos infectados e o número total de amastigotas intracelulares foram determinados utilizando

microscopia confocal (Nikon, Shinagawa, TJ, Japão; Nikon Eclipse Ti, Nikon A1r MP system, software NIS-Elements Viewer 4.20). Aproximadamente, 300 macrófagos foram contados por grupo experimental.

5.6 Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO)

Após as exposições ao extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* por 24, 48 e 72 horas, os níveis de nitrito foram mensurados no sobrenadante de macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis* (5×10^4 células/100 μL /poço) (GLINSKI et al., 2016).

Em seguida, 50 μL /poço do sobrenadante das células foram transferidos para microplacas pretas de 96 poços e foram adicionados 10 μL /poço do reagente DAN (0,5 $\mu\text{g/mL}$ do DAN em ácido clorídrico (HCl 0.62 M)) para incubação a 24°C por 30 minutos protegidos da luz. Posteriormente, 5 μL /poço de hidróxido de sódio (NaOH 2.8 M) foram adicionados. A quantificação dos níveis de nitrito foi determinada utilizando comprimento de onda de 365 nm (excitação) e de 450 nm (emissão) por espectrofluorimetria (Tecan, Männedorf, ZH, Suíça; *Infinite M200*, software *i-Control* 1.6).

5.7 Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Após as exposições de 24, 48 e 72 horas ao extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda*, os macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis* (5×10^4 células/100 μL /poço) foram incubados com 100 μL /poço de H₂DCFDA (10 μM) a 37°C e 5% CO₂ por 15 minutos protegidos da luz.

Após duas lavagens com PBS estéril (1X), 300 μL /poço de PBS estéril (1X) foram adicionados aos poços. A quantificação dos níveis de EROs foi determinada utilizando comprimento de onda de 488 nm (excitação) e de 530 nm (emissão) por espectrofluorimetria (Tecan, Männedorf, ZH, Suíça; *Infinite M200*, software *i-Control* 1.6) (SALGADO et al., 2018).

5.8 Atividade fagocítica em macrófagos de linhagem RAW 264.7

Os macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis a 5×10^4 células/100 μ L/poço, expostos ao extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* por 24, 48 e 72 horas. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril (1X) e os macrófagos foram incubados com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* a $2,5 \times 10^5$ células/100 uL/poço e promastigotas de *L. braziliensis* na fase logarítmica (quinto dia) a $2,5 \times 10^5$ células/100 uL/poço a 37°C e 5% CO₂ por 2 horas.

Após a incubação, os poços foram novamente lavados duas vezes com PBS estéril (1X), fixados com PFA 4% por 10 minutos e marcados com 250 μ L/poço de DAPI (1:2000 em meio de cultura RPMI 1640) por 10 minutos protegidos da luz. As lâminas foram montadas com 5 μ L de solução de glicerina e PBS estéril (1X) (1:1) e seladas com esmalte.

O número total de macrófagos, o número total de macrófagos com células internalizadas e o número total de células internalizadas foram determinados utilizando microscopia confocal (Nikon, Shinagawa, TJ, Japão; Nikon Eclipse Ti, Nikon A1r MP system, software NIS-Elements Viewer 4.20). Aproximadamente, 300 macrófagos foram contados por grupo experimental.

O índice fagocítico (*phagocytic index*) foi calculado pela fórmula: $(A/B) \times (B/C)$, onde: A: número de células internalizadas; B: número de macrófagos com células internalizadas; e C: número total de macrófagos (GLINSKI et al., 2016).

5.9 Análise estatística

Os resultados representam as médias das triplicatas obtidas em três experimentos independentes e foram analisados por ANOVA utilizando o software *GraphPad Prism* 8.3.0, sendo que $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Padronização e seleção das concentrações de uso

Após a obtenção do extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda*, um *screening* de concentrações foi realizado em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis* e em formas promastigotas de *L. braziliensis* para uma avaliação prévia dos efeitos citotóxicos dos tratamentos. Neste sentido, o ensaio de MTT foi empregado aos três grupos experimentais utilizando oito concentrações seriadas de cada extrato bruto, bem como oito concentrações seriadas da droga convencional Anfotericina B.

As concentrações testadas para cada extrato bruto partiram das seguintes diluições seriadas: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125 e 3,90625 µg/mL. As concentrações testadas para a Anfotericina B partiram das seguintes diluições seriadas: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,390625 µg/mL.

Os grupos experimentais foram tratados com as diluições seriadas por 24, 48 e 72 horas a 37°C e 5% CO₂ e a 24°C, respectivamente. A seguir, o ensaio de MTT foi realizado em triplicatas (LIEBEL et al., 2015) e três experimentos independentes foram conduzidos.

Os efeitos citotóxicos em macrófagos não infectados e infectados por *L. braziliensis* e em formas promastigotas de *L. braziliensis* foram observados somente após a exposição das concentrações mais altas do extrato bruto dos fungos endofíticos, sendo elas: 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL. Dessa forma, essas concentrações do extrato bruto foram selecionadas para a realização dos testes futuros.

Com relação à Anfotericina B, a concentração de 12,5 µg/mL foi escolhida para a realização dos testes futuros, visto a redução da viabilidade celular dos grupos experimentais em torno de 50% após 24 horas de exposição (Fig 11). Além disso, o efeito citotóxico mostrou-se tempo-dependente para todos os grupos experimentais, embora maior redução da viabilidade de macrófagos não infectados e de formas promastigotas de *L. braziliensis* tenha sido observada, revelando baixa seletividade do tratamento convencional às células hospedeiras parasitadas.

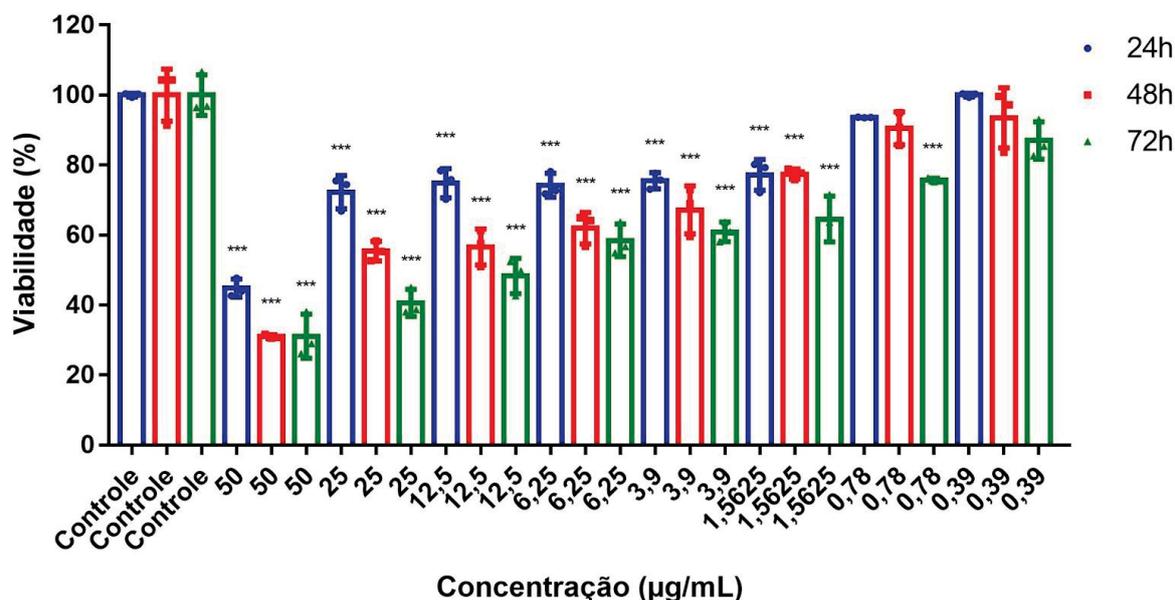


Figura 11. Ensaio de MTT com Anfotericina B (AmB) para padronização e seleção da concentração de uso. A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados expostos à Anfotericina B nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,390625 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

6.2 Citotoxicidade em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis*

O ensaio de MTT é amplamente utilizado em estudos que analisam os efeitos citotóxicos em modelos *in vitro*. A citotoxicidade da exposição ao extrato bruto de *D. oxe* foi avaliada em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (Fig 12A) e infectados por *L. braziliensis* (Fig 12B). O ensaio revelou que as concentrações testadas não apresentaram efeito citotóxico após 24 horas de exposição. Após 48 horas de exposição, a viabilidade celular foi reduzida em macrófagos não infectados nas concentrações de 500 µg/mL (em 33,57%, $p < 0,001$), 250 µg/mL (em 24,29%, $p < 0,001$) e 125 µg/mL (em 14,53%, $p < 0,01$), bem como em macrófagos infectados nas mesmas concentrações, em 27,85%, 18,85% e 17,70% ($p < 0,001$), respectivamente.

A citotoxicidade foi observada após 72 horas de tratamento com todas as concentrações testadas em macrófagos não infectados, com redução de 54,52%, 36,77%, 24,58% e 19,76% ($p < 0,001$) da viabilidade celular. Em macrófagos infectados, a mesma resposta foi observada, porém somente nas concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ (de 26,25%, $p < 0,001$), 250 $\mu\text{g/mL}$ (de 15,71%, $p < 0,001$) e 125 $\mu\text{g/mL}$ (de 18,31%, $p < 0,001$).

O tratamento com Anfotericina B resultou no maior efeito citotóxico observado, com redução da viabilidade celular de 25,18%, 43,97% e 64,37% ($p < 0,001$) e de 28,65%, 46,43% e 75,73% ($p < 0,001$) em macrófagos não infectados e infectados após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente.

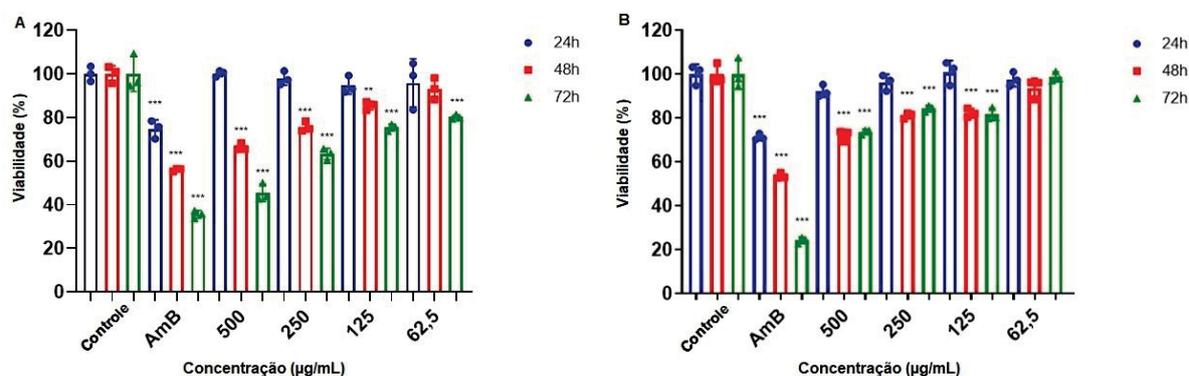


Figura 12. Ensaio de MTT com o extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418). A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (A) e infectados por *L. braziliensis* (B) expostos ao extrato bruto de *D. oxe* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

A citotoxicidade do extrato bruto de *D. infecunda* foi avaliada em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (Fig 13A) e infectados por *L. braziliensis* (Fig 13B). Diferentemente à exposição ao extrato bruto da outra espécie, o ensaio revelou efeito citotóxico em macrófagos infectados após 24 horas de exposição, com redução de 16,54% ($p < 0,001$), 12,24% ($p < 0,001$) e 4,46% ($p < 0,05$) da viabilidade celular nas concentrações de 500, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Após 48 horas de exposição, a viabilidade celular foi reduzida entre 13-16% ($p <$

0,001) em macrófagos não infectados na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ e em macrófagos infectados nas duas maiores concentrações do extrato bruto.

A exposição de 72 horas resultou na maior citotoxicidade observada em macrófagos não infectados em todas as concentrações testadas, com redução de 29,03% ($p < 0,001$), 24,01% ($p < 0,001$), 20,68% ($p < 0,001$) e 15,88% ($p < 0,01$) da viabilidade celular. Em macrófagos infectados, o resultado foi observado somente nas duas maiores concentrações testadas, com redução da viabilidade celular de 11,98% e 10,74% ($p < 0,001$).

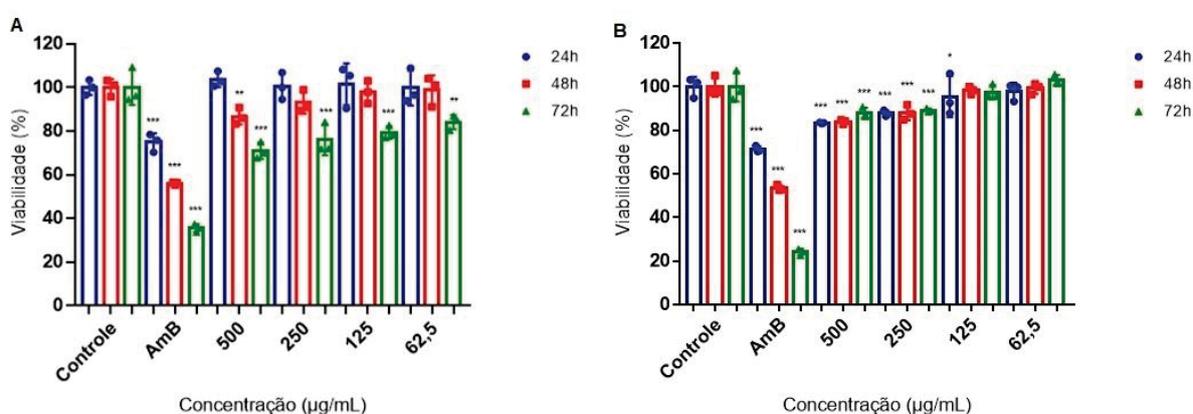


Figura 13. Ensaio de MTT com o extrato bruto de *D. infecunda* (CMRP 1325). A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (A) e infectados por *L. braziliensis* (B) expostos ao extrato bruto de *D. infecunda* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

6.3 Citotoxicidade em formas promastigotas de *L. braziliensis*

O ensaio anti-promastigota de *L. braziliensis* revelou que o tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* (Fig 14A) e de *D. infecunda* (Fig 14B) resultou na redução da viabilidade celular dos parasitos em todas as condições testadas, em relação ao grupo controle não tratado. Foi observada a resposta tempo-dependente, visto uma proporção de tempo de exposição e o aumento dos efeitos citotóxicos para o parasito.

Com relação ao extrato bruto de *D. oxe*, houve redução da viabilidade celular dos parasitos entre 66-74% ($p < 0,001$) quando expostos à concentração de 500

$\mu\text{g/mL}$; entre 41-65% ($p < 0,001$) na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$; entre 25-53% ($p < 0,001$) na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$; e entre 14-41% ($p < 0,001$) na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

A exposição com o extrato bruto de *D. infecunda* resultou em resultados semelhantes. O tratamento na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade celular entre 60-77% ($p < 0,001$); enquanto na concentração 250 $\mu\text{g/mL}$ foi reduzida entre 40-65% ($p < 0,001$) e na concentração 125 $\mu\text{g/mL}$ foi reduzida entre 24-51% ($p < 0,001$) após todos os tempos de exposição. Contudo, o tratamento na concentração 62,5 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade celular entre 20-41% ($p < 0,001$) somente após 48 e 72 horas de tratamento.

O tratamento com Anfotericina B revelou importantes efeitos citotóxicos em formas promastigotas de *L. braziliensis*, com redução da viabilidade celular do parasito de 52,30%, 90,98% e 92,94% ($p < 0,001$) após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente.

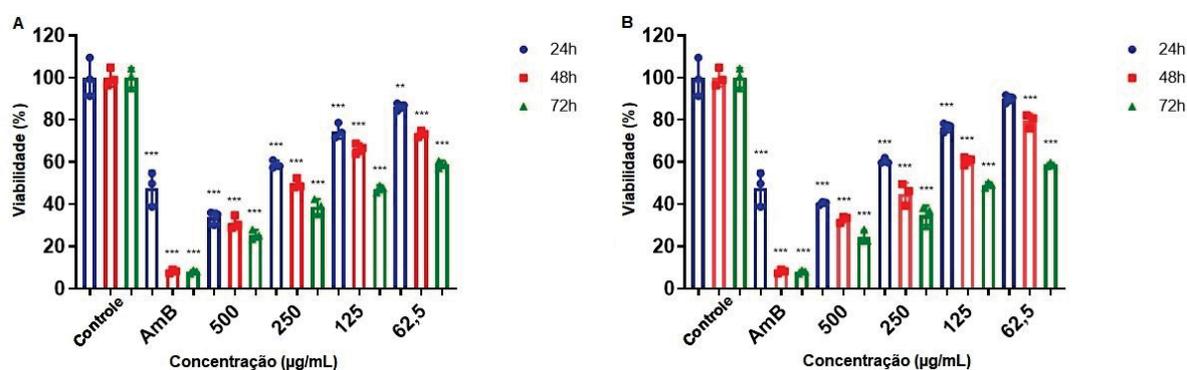


Figura 14. Ensaio de MTT em formas promastigotas de *L. braziliensis*. A citotoxicidade foi avaliada em formas promastigotas de *L. braziliensis* expostas ao extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) (A) e de *D. infecunda* (CMRP 1325) (B) nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

6.4 Atividade leishmanicida em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* - taxa de infecção

Em comparação ao grupo controle não tratado, o extrato bruto de *D. oxe* reduziu a taxa de infecção em todas as condições testadas (Fig 15A), assim como

reduziu o número de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em macrófagos de linhagem RAW 264.7 (Fig 15B).

O tratamento com Anfotericina B também reduziu a taxa de infecção em macrófagos infectados por *L. braziliensis* em 54,66%, 56,66% e 55,33% ($p < 0,001$) após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente. Houve redução do número de parasitos internalizados em todas as condições testadas.

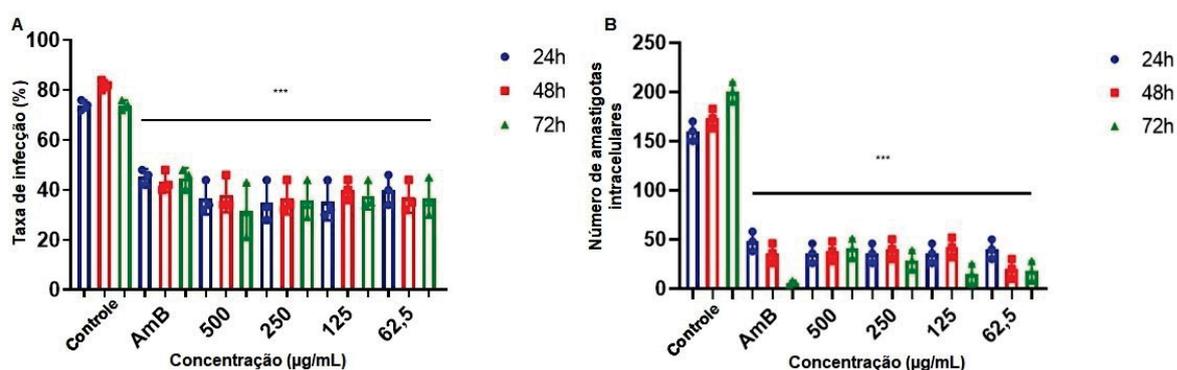


Figura 15. Taxa de infecção e ação anti-amastigota do extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418). A taxa de infecção **(A)** e o número de amastigotas intracelulares **(B)** foram avaliados em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados por *L. braziliensis* expostos ao extrato bruto de *D. oxe* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 µg/mL. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

O tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* por 72 horas reduziu o número de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* ($p < 0,001$) em todas as concentrações testadas (Fig 16).

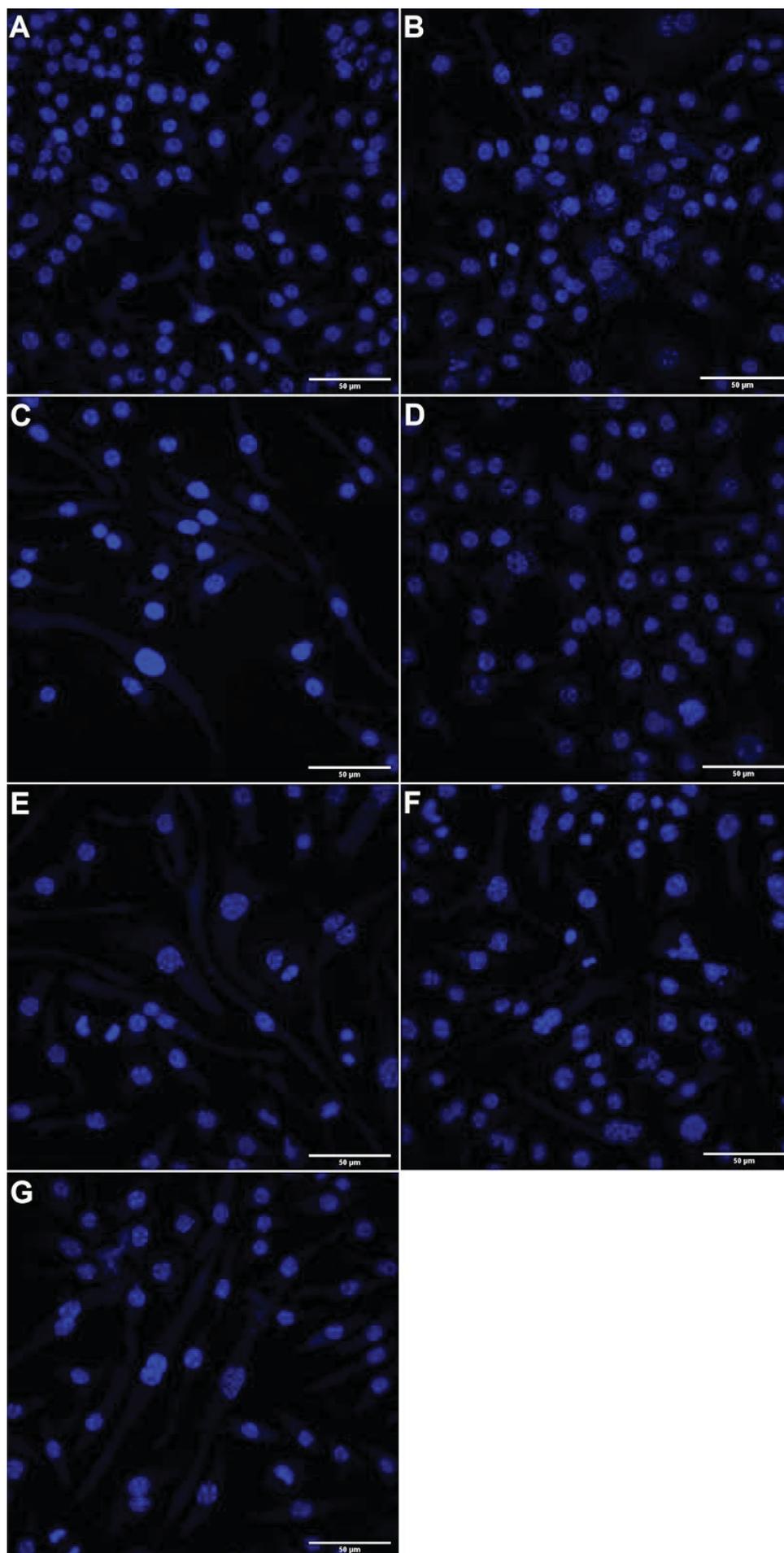


Figura 16. Taxa de infecção após 72 horas de tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418). A: macrófagos não infectados e não tratados; B: macrófagos infectados e não tratados; C, D, E e F: macrófagos infectados e tratados com extrato bruto de *D. oxe* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL G: macrófagos infectados e tratados com Anfotericina B na concentração de 12,5 µg/mL.

A taxa de infecção também foi avaliada em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados por *L. braziliensis* tratados com o extrato bruto de *D. infecunda*. O tratamento na concentração de 500 µg/mL resultou no melhor efeito anti-amastigota, visto uma redução da taxa de infecção de 41,33% ($p < 0,05$), 44,66% ($p < 0,001$) e 45% ($p < 0,001$) após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente (Fig 17A). Em relação à contagem do número de amastigotas intracelulares (Fig 17B), o tratamento de 72 horas revelou melhor efeito anti-amastigota ($p < 0,001$) em todas as concentrações testadas.

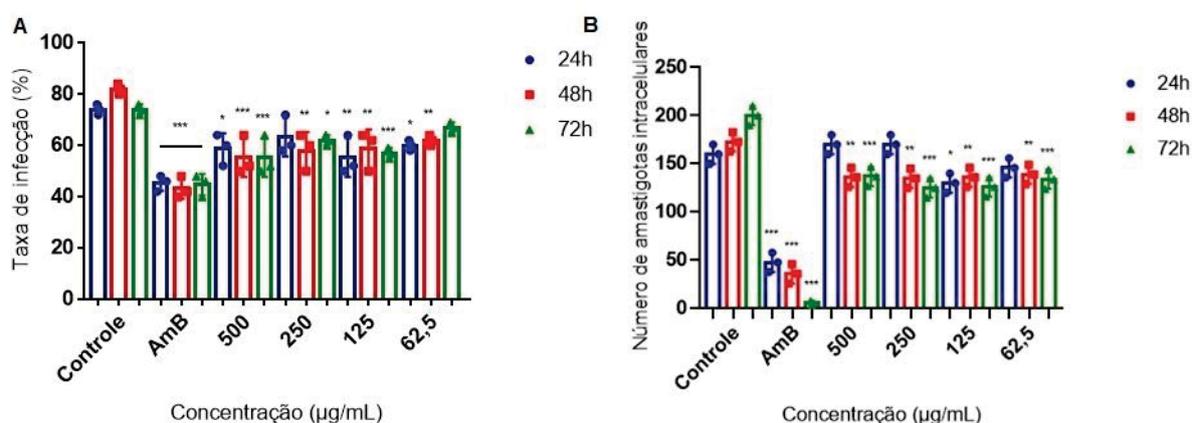


Figura 17. Taxa de infecção e ação anti-amastigota do extrato bruto de *D. infecunda* (CMRP 1325). A taxa de infecção (A) e o número de amastigotas intracelulares (B) foram avaliados em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados por *L. braziliensis* expostos ao extrato bruto de *D. infecunda* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 µg/mL. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

O tratamento com o extrato bruto de *D. infecunda* por 72 horas também reduziu o número de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* ($p < 0,001$), em todas as concentrações testadas (Fig 18).

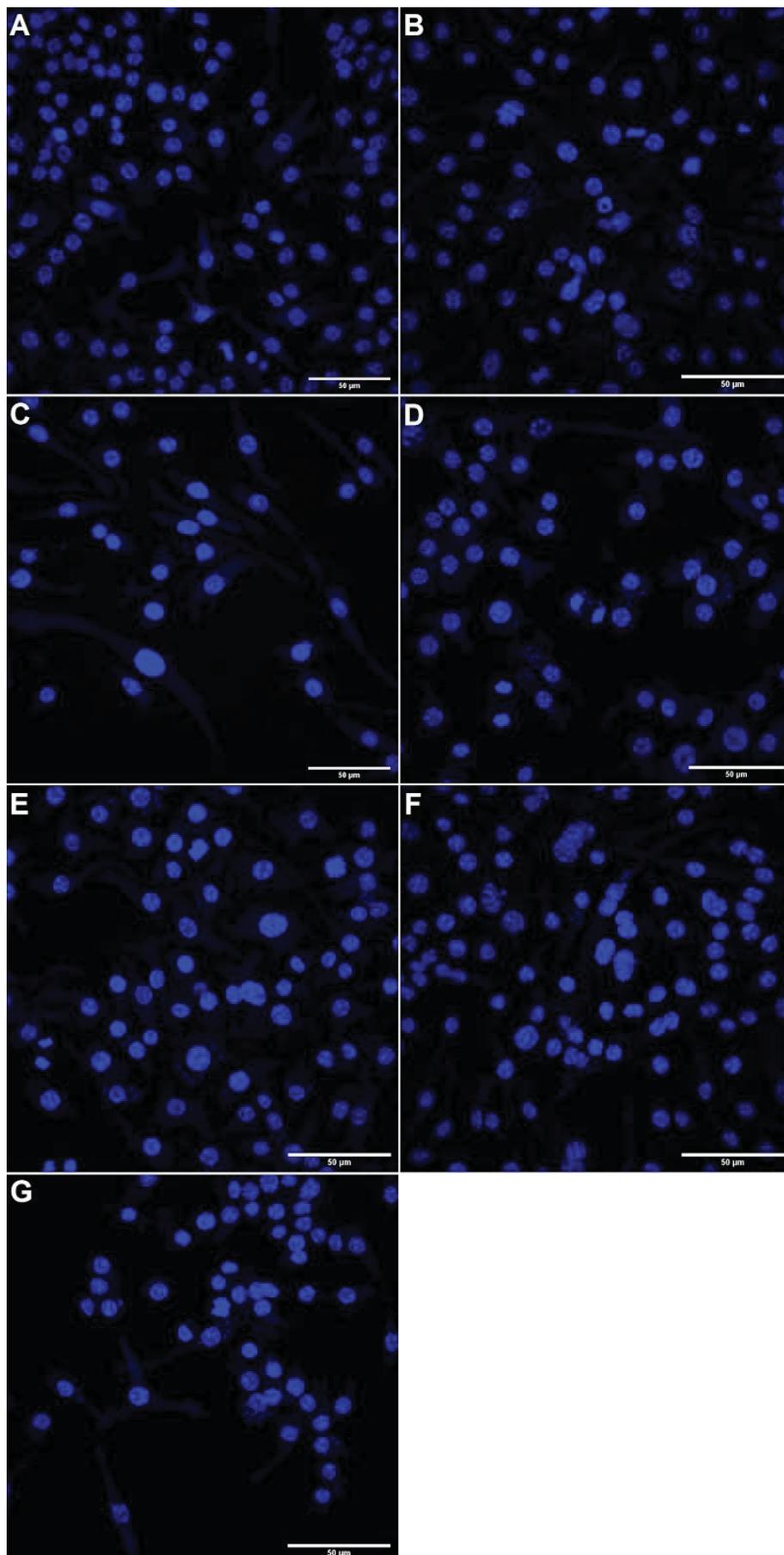


Figura 18. Taxa de infecção após 72 horas de tratamento com o extrato bruto de *D. infecunda* (CMRP 1325). A: macrófagos não infectados e não tratados; B: macrófagos infectados e não tratados; C, D, E e F: macrófagos infectados e tratados com extrato bruto de *D. infecunda* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL G: macrófagos infectados e tratados com Anfotericina B na concentração de 12,5 µg/mL.

6.5 Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO)

Em comparação ao grupo controle não tratado, o tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* revelou aumento tempo-dependente dos níveis de NO em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (Fig 19A) e infectados por *L. braziliensis* (Fig 19B). Em macrófagos não infectados, os níveis de NO foram elevados em 73,78% ($p < 0,001$), 58,39% ($p < 0,001$), 44,48% ($p < 0,001$) e 39,09% ($p < 0,01$) após 48 horas e entre 210-188% ($p < 0,001$) após 72 horas de exposição, quando utilizadas todas as concentrações testadas.

Em macrófagos infectados, os resultados foram semelhantes, visto um aumento tempo-dependente dos níveis de NO de 56,81% ($p < 0,001$), 53,10% ($p < 0,001$), 39,16% ($p < 0,001$) e 36,45% ($p < 0,01$) após 48 horas e de 172,90% ($p < 0,001$), 229,33% ($p < 0,001$), 217,52% ($p < 0,001$) e 237,85% ($p < 0,001$) após 72 horas de exposição, quando utilizadas todas as concentrações testadas.

A exposição de 24 horas não resultou em alterações da produção de NO em ambos os grupos experimentais, exceto por aumento de 41,16% ($p < 0,01$) e de 27,86% ($p < 0,05$) em macrófagos não infectados e infectados tratados com 500 µg/mL, respectivamente. O tratamento com Anfotericina B reduziu os níveis de NO somente após 24 horas de exposição em 32,72% ($p < 0,05$) em macrófagos infectados por *L. braziliensis*, com normalização dos níveis após 48 e 72 horas de exposição.

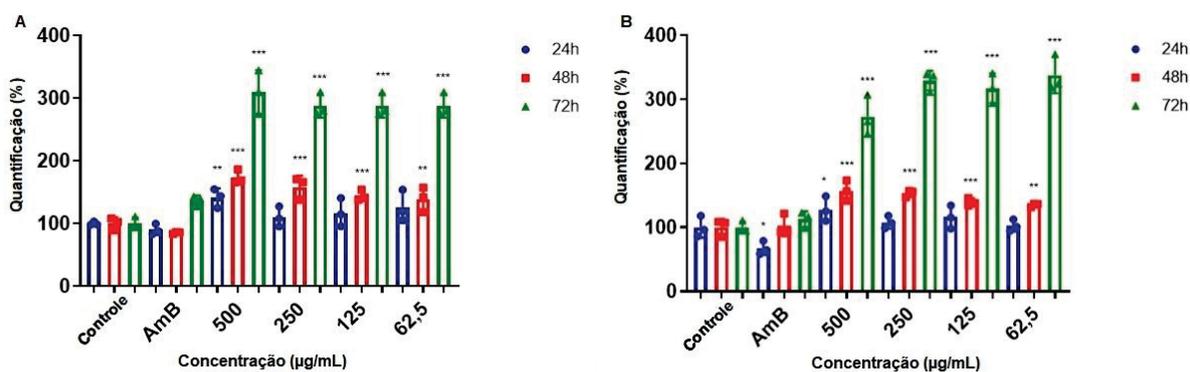


Figura 19. Quantificação dos níveis de NO com o extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418). Os níveis de NO foram mensurados em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (**A**) e infectados por *L. braziliensis* (**B**) expostos ao extrato bruto de *D. oxe* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 µg/mL. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

O tratamento com o extrato bruto de *D. infecunda* revelou aumento tempo-dependente dos níveis de NO em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (Fig 20A) e infectados por *L. braziliensis* (Fig 20B). Em macrófagos não infectados, os níveis de NO foram reduzidos entre 32-39% ($p < 0,05$) após 24 horas de exposição, sendo que, em seguida, uma normalização foi observada nas exposições de 48 e 72 horas.

Os efeitos foram potencializados em macrófagos infectados, visto que os níveis de NO foram reduzidos em 37,79% ($p < 0,01$), 35,15% ($p < 0,01$) e 31,90% ($p < 0,05$) após 24 horas e em 44,74% ($p < 0,001$), 47,59% ($p < 0,001$), 51,56% ($p < 0,001$) e 40,79% ($p < 0,01$) após 48 horas de exposição com todas as concentrações testadas, seguido de uma normalização dos níveis após 72 horas.

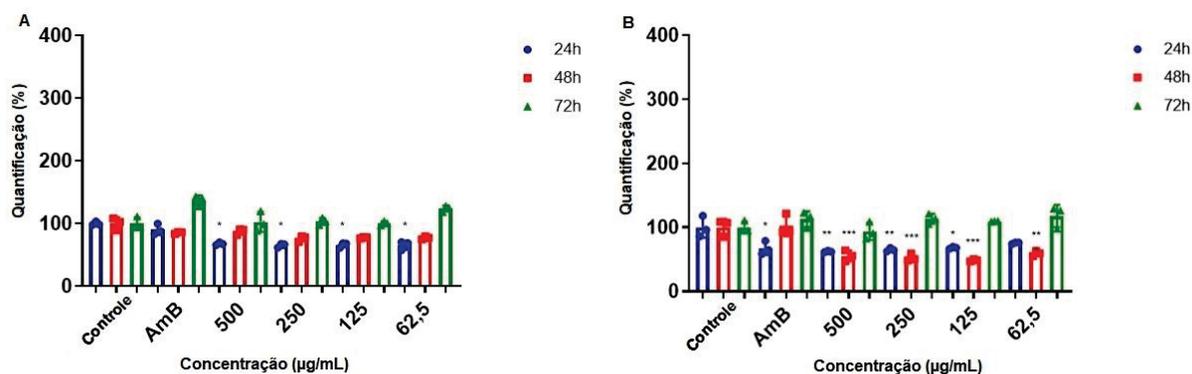


Figura 20. Quantificação dos níveis de NO com o extrato bruto de *D. infecunda* (CMRP 1325). Os níveis de NO foram mensurados em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (A) e infectados por *L. braziliensis* (B) expostos ao extrato bruto de *D. infecunda* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 µg/mL. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

6.6 Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* revelou aumento dos níveis de EROs em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (Fig 21A) e infectados por *L. braziliensis* (Fig 21B). Em macrófagos não infectados, os níveis de EROs tiveram pico de produção de 106,71% ($p < 0,001$) após 72 horas de exposição na concentração de 500 µg/mL, seguido de uma normalização na produção de EROs quando concentrações menores foram utilizadas.

Em macrófagos infectados, os resultados foram semelhantes, com pico de níveis de EROs após 72 horas quando a maior concentração foi utilizada, seguido da normalização da produção. Em ambos os grupos experimentais, a resposta observada dos tratamentos pode ser classificada como dose e tempo-dependente, visto um pico na produção de EROs quando a maior concentração do extrato bruto foi utilizada durante maior tempo de exposição, seguido de uma normalização dos níveis nas concentrações e tempos de exposição subsequentes.

O tratamento com Anfotericina B não alterou os níveis de EROs em ambos os grupos experimentais em todas as condições testadas.

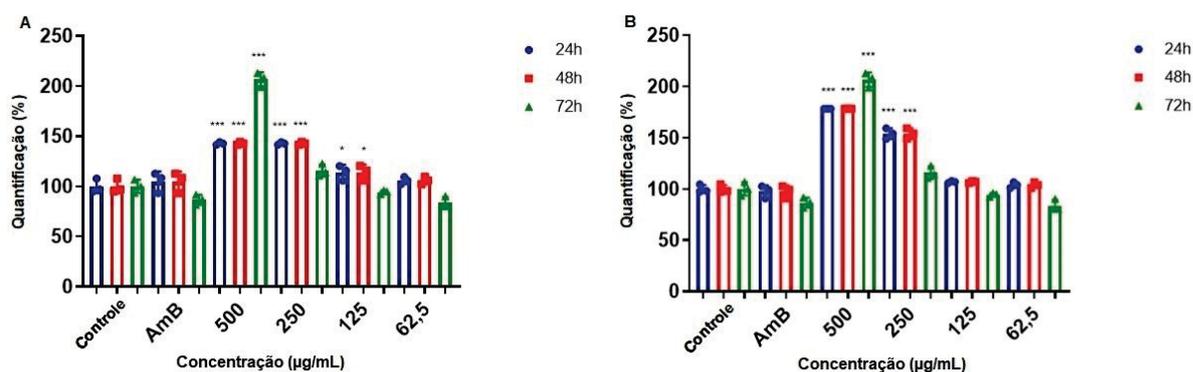


Figura 21. Quantificação dos níveis de EROs com o extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418). Os níveis de EROs foram mensurados em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (**A**) e infectados por *L. braziliensis* (**B**) expostos ao extrato bruto de *D. oxe* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 µg/mL. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

Com relação ao tratamento com o extrato bruto de *D. infecunda*, os macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (Fig 22A) tiveram aumento nos níveis de EROs entre 16-37% ($p < 0,001$) após 24 e 48 horas de exposição com todas as concentrações testadas.

A produção de EROs foi aumentada entre 19-22% ($p < 0,001$) após 24 e 48 horas de exposição com as concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL em macrófagos infectados (Fig 22B). Neste caso, a concentração de 500 µg/mL do extrato bruto não teve efeito na produção de EROs.

O tratamento com Anfotericina B não resultou em alterações na produção de EROs em macrófagos não infectados e infectados.

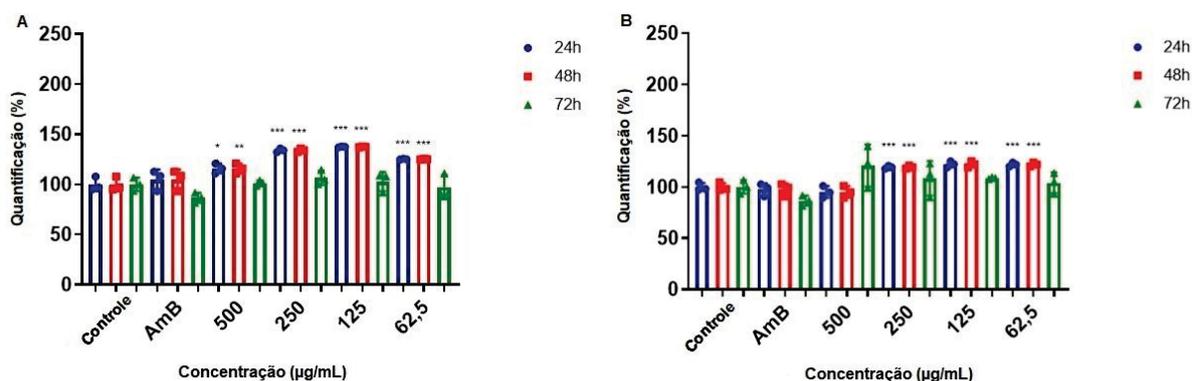


Figura 22. Quantificação dos níveis de EROs com o extrato bruto de *D. infecunda* (CMRP 1325). Os níveis de EROs foram mensurados em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados (**A**) e infectados (**B**) expostos ao extrato bruto de *D. infecunda* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 µg/mL. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

6.7 Atividade fagocítica em macrófagos de linhagem RAW 264.7

Após o tratamento com o extrato bruto dos fungos endofíticos, a atividade fagocítica foi avaliada em macrófagos de linhagem RAW 264.7 incubados com promastigotas de *L. braziliensis* e com leveduras de *S. cerevisiae*, microrganismos que não possuem os mecanismos de evasão do sistema imunológico observados pelo protozoário.

Com relação ao tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* em macrófagos incubados com *L. braziliensis* (Fig 23A), a atividade fagocítica foi potencializada quando utilizadas as duas maiores concentrações, sendo que o aumento do índice fagocítico foi observado após todos os tempos de exposição com as concentrações de 500 e 250 µg/mL, em relação ao grupo controle não tratado. Em macrófagos incubados com *S. cerevisiae* (Fig 23B), o índice fagocítico foi elevado em todas as condições testadas. O tratamento com Anfotericina B não afetou a atividade fagocítica em macrófagos incubados com ambos os microrganismos.

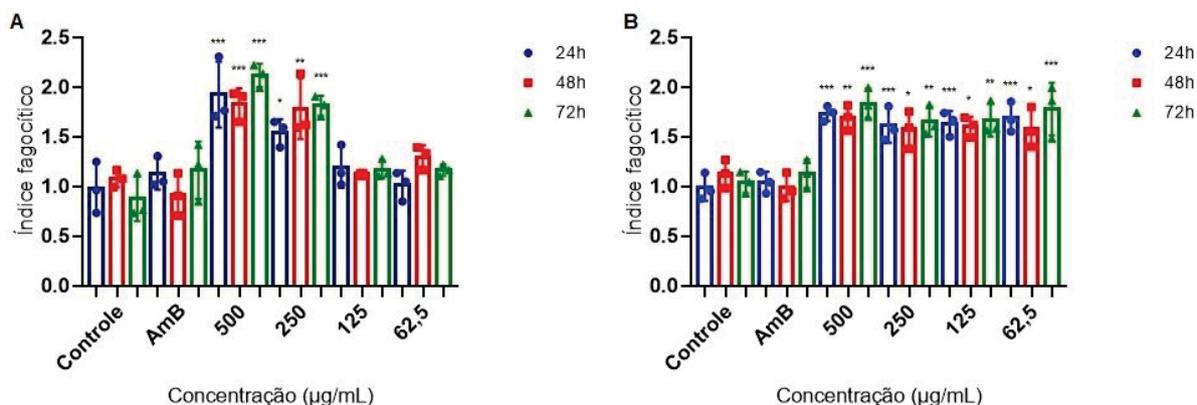


Figura 23. Atividade fagocítica em macrófagos tratados com o extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418). O índice fagocítico foi avaliado em macrófagos de linhagem RAW 264.7 incubados com promastigotas de *L. braziliensis* (A) e com leveduras de *S. cerevisiae* (B) por duas horas em seguida da exposição ao extrato bruto de *D. oxe* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 µg/mL. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

O tratamento com o extrato bruto de *D. infecunda* resultou em aumento do índice fagocítico em macrófagos de linhagem RAW 264.7 incubados com *L. braziliensis* (Fig 24A) de 30% ($p < 0,05$) após 24 horas de exposição com as concentrações de 500 e 125 µg/mL. No entanto, a atividade fagocítica em macrófagos foi potencializada ($p < 0,001$) somente na incubação com leveduras de *S. cerevisiae* (Fig 24B).

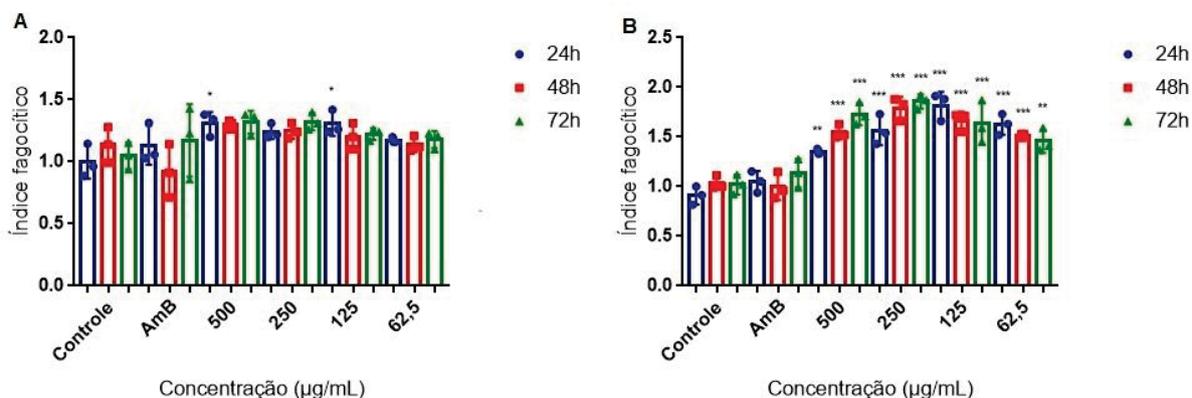


Figura 24. Atividade fagocítica em macrófagos tratados com o extrato bruto de *D. infecunda* (CMRP 1325). O índice fagocítico foi avaliado em macrófagos de linhagem RAW 264.7 incubados com promastigotas de *L. braziliensis* (A) e com leveduras de *S. cerevisiae* (B) por duas horas em seguida

da exposição ao extrato bruto do fungo endofítico *D. infecunda* nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL por 24 (azul), 48 (vermelho) e 72 horas (verde). AmB: Controle positivo na concentração 12,5 µg/mL. Controle: macrófagos não infectados e não tratados. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

7 DISCUSSÃO

A LTA está entre as dez doenças que mais acometem indivíduos no mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, compreendendo um grave problema de Saúde Pública e considerada uma importante Doença Tropical Negligenciada (OMS, 2019). Apesar dos avanços nos estudos sobre protozoários, bem como sobre as doenças parasitárias, o tratamento atual das Leishmanioses é baseado em Antimoniais Pentavalentes (Glucantime®), além de Anfotericina B e de Pentamidinas como segunda linha de escolha, sendo drogas descobertas e utilizadas há décadas que apresentam respostas ineficientes.

Nesse contexto, a pesquisa por novas moléculas, drogas e/ou compostos enquadra-se na ciência básica e faz-se de grande importância, especialmente tratando-se de doenças negligenciadas como as Leishmanioses, cujo tratamento convencional é ineficiente, citotóxico e requer longo prazo.

Diante de diversas biomoléculas e/ou compostos alternativos como agentes promissores com potencial ação leishmanicida e com propriedades imunomoduladoras, como a utilização de moléculas sintéticas (SHOKRI et al., 2017; HALDER et al., 2018; SALGADO et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2019; ESTEBAN-PARRA et al., 2019; SILVA et al., 2020), de óleos essenciais (DE MELO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015; CARVALHO et al., 2017; ROTTINI et al., 2019), de extrato de frutos (ALMEIDA-SOUZA et al., 2016; DA SILVA et al., 2018; ALMEIDA-SOUZA et al., 2018), de extrato de raízes (DA SILVA et al., 2018; FADEL et al., 2019), as investigações utilizando metabólitos secundários de diversas espécies de fungos endofíticos têm sido relatadas na literatura (CAMPOS et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015; IBRAHIM et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; BRISSOW et al., 2017; ALVES et al., 2018). Por outro lado, embora que as pesquisas conduzidas revelaram dados promissores e interessantes, os resultados ainda são pouco explorados, uma vez que os mecanismos de ação dos compostos e as vias de sinalização da célula hospedeira e de morte do parasito não são conhecidas.

A patogenia das Leishmanioses está diretamente relacionada às interações parasito-hospedeiro, destacando a importância dos mecanismos desenvolvidos

pelos protozoários do gênero *Leishmania* na imunomodulação dos fagócitos, principalmente macrófagos. O papel desempenhado pelos macrófagos é bem descrito: atuam como células hospedeiras fundamentais para a replicação e a sobrevivência do parasito, resultando na progressão da doença; e como células efetoras que implicam na morte do parasito e capazes de sinalizar e modular uma resposta pró-inflamatória frente ao parasitismo (KEDZIERSKI e EVANS, 2014).

Ao utilizar o extrato bruto de *D. oxe* (CMRP 1418) e de *D. infecunda* (CMRP 1325), foi possível avaliar a atividade leishmanicida em formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* e o efeito citotóxico em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis*.

Diferentes padrões foram observados entre as duas espécies de fungos endofíticos. Com relação à citotoxicidade do extrato bruto de *D. oxe*, foi observado efeito tempo-dependente em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados; e efeito dose-dependente para o extrato bruto de *D. infecunda* em macrófagos infectados, uma vez que houve redução da viabilidade celular após o tratamento com as duas maiores concentrações (500 e 250 µg/mL).

Em macrófagos não infectados, o tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* foi citotóxico em todas as concentrações testadas após 72 horas de exposição. Em macrófagos infectados, os resultados diferiram entre as espécies: nas maiores concentrações com o extrato bruto de *D. infecunda* (500 e 250 µg/mL) após 24, 48 e 72 horas e, com o extrato bruto de *D. oxe* nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL após 48 e 72 horas de exposição. O tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* apresentou maior eficiência em macrófagos infectados, visto que menores concentrações reduziram a viabilidade celular do grupo experimental, o que não foi observado utilizando o extrato bruto da outra espécie.

Os achados são semelhantes com os de Petri et al. (2016), que avaliaram os efeitos citotóxicos da aplicação de derivados de nitro-heterocíclicos em células THP-1 não infectadas e infectadas por *L. infantum*. Da mesma forma que foi observada no presente estudo, o grupo experimental infectado mostrou-se mais resistente às ações dos tratamentos, revelando menor efeito citotóxico em comparação ao grupo experimental não infectado. Essa resposta pode ser explicada

pela maior seletividade dos compostos contra formas parasitárias, tanto para formas promastigotas provenientes de cultivo quanto para formas amastigotas intracelulares, como também pela maior sensibilidade do parasito.

Por outro lado, a aplicação do extrato bruto deve ser interpretada cautelosamente, devido a presença de diversos compostos que podem ser mais citotóxicos e/ou mais seletivos para os macrófagos não infectados e/ou a atividade sinérgica de moléculas que compõem o extrato bruto. Esta hipótese foi observada por Brissow et al. (2017), em que o tratamento com o composto isolado 18-di-hidróxi Citocalasina H resultou em menor efeito citotóxico para fibroblastos hepáticos humanos em comparação com o tratamento com o extrato bruto de *D. phaseolorum* durante o mesmo tempo de exposição.

Em comparação ao tratamento com o extrato bruto dos fungos endofíticos, o tratamento com Anfotericina B, a droga de referência utilizada nos experimentos, resultou em maior citotoxicidade para todos os grupos experimentais em todas as condições testadas, o que não foi observado principalmente com o extrato bruto de *D. oxe*.

Os efeitos adversos e citotóxicos resultados da administração das terapêuticas convencionais já foram observados em outros estudos. De acordo com Rodrigues et al. (2015), a exposição ao Glucantime demonstrou baixa seletividade contra o parasito em comparação com a utilização de óleos essenciais do fruto *Syzygium cumini* (Lam), também conhecido como jamelão, indicando maior citotoxicidade para a célula hospedeira do que para a *Leishmania*. Com relação à Anfotericina B, resultados anteriores mostraram que o tratamento em baixas concentrações (entre 1,25 e 2,50 µg/mL) são suficientes para reduzir a viabilidade celular de algumas linhagens celulares, por exemplo a GRX, uma linhagem celular hepática murina (URIBE et al., 2013). Ainda, segundo Mukherjee et al. (2010), a exposição ao Glucantime e à Anfotericina B em baixas doses pode ser citotóxica para as células de mamíferos, podendo resultar em morte celular por apoptose.

A seletividade e os mecanismos de ação do tratamento com o extrato bruto dos fungos endofíticos pode ser melhor elucidada através da avaliação das

atividades anti-promastigota e anti-amastigota e da quantificação dos níveis de NO e de EROs pela célula hospedeira infectada.

A atividade leishmanicida *in vitro* foi observada contra formas promastigotas de *L. braziliensis*. O tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* teve resultados semelhantes entre si, revelando uma resposta tempo-dependente, visto uma proporção de tempo de exposição e o aumento dos efeitos citotóxicos para o parasito. O tratamento com Anfotericina B também resultou em efeitos citotóxicos significativos, principalmente após 48 e 72 horas de exposição, com redução da viabilidade celular de 90,98% e 92,94%, respectivamente.

Os resultados obtidos no presente estudo revelam dados interessantes que evidenciam o quanto o parasito pode ser sensível ao tratamento com o extrato bruto de ambas as espécies dos fungos endofíticos. No entanto, outras metodologias devem ser conduzidas para contribuir com o entendimento dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade das moléculas e suas propriedades leishmanicidas.

Quando avaliada a taxa de infecção *in vitro* em macrófagos infectados por *L. braziliensis*, o tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* revelou atividade mais promissora, visto a maior redução da taxa de infecção e do número de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em todas as condições testadas. Em comparação, quando houve exposição ao extrato bruto de *D. infecunda*, o parasito intracelular mostrou-se mais resistente aos efeitos do tratamento, uma vez que a taxa de infecção sofreu menor redução. Contudo, o número de amastigotas intracelulares também foi reduzido em todas as condições testadas, ainda assim em menor proporção em relação à outra espécie.

A partir da infecção por *Leishmania*, os macrófagos são ativados e polarizados para desempenhar funções imunomoduladoras e induzir uma resposta pró-inflamatória, entre elas a produção de proteases, lipases, nucleases, esterases e fosfatases para a degradação do fagolisossomo; o aumento da respiração oxidativa e a produção de NO (OLEKHNOVITCH e BOUSSO, 2015). O sucesso do combate ao parasito na sua forma intracelular obrigatória e a prevenção da progressão da infecção baseia-se na eficiência da ativação celular para a indução à uma resposta pró-inflamatória desempenhada principalmente por IL-12 e IFN- γ . A resposta

imunológica de fenótipo M1 confere proteção contra a infecção por *Leishmania*, devido a produção de citocinas fundamentais na atividade leishmanicida, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 e IFN- γ (PELLISSIER et al., 2018).

Todavia, o parasito na sua forma amastigota intracelular possui capacidade de bloquear a produção de NO em macrófagos infectados através da inibição das enzimas NADPH oxidase, contribuindo para uma resposta anti-inflamatória (WANDERLEY e BARCINSKI, 2010; VAN ASSCHE et al., 2011).

A formação de NO é mediada pelo sinergismo entre IFN- γ e TNF- α durante a resposta Th1, em que ocorre a oxidação enzimática de L-arginina para a formação de NO e L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (BRUNE et al., 2013). São conhecidas três isoformas de NOS, sendo que o tipo NOS2 ou iNOS (óxido nítrico sintase induzida) está relacionado com a maior produção de NO por macrófagos. Frente à infecção por *Leishmania*, estudos demonstram que essa produção ocorre no citoplasma dos macrófagos infectados e que o NO difunde-se rapidamente no fagolisossomo, além de possuir a capacidade de atravessar a membrana celular e atuar em células vizinhas (OLEKHNOVITCH e BOUSSO, 2015). Ainda segundo os mesmos autores, é sugerido que o NO desempenha atividade leishmanicida através do desligamento das vias respiratórias do parasito, como a inibição das enzimas da via de oxidação da glicólise, levando à morte do parasito intracelular.

O aumento dos níveis de NO em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados por *L. braziliensis* expostos ao extrato bruto de *D. oxe* sugere um efeito leishmanicida dependente de NO. Em comparação, a exposição ao extrato bruto de *D. infecunda* reduziu os níveis de NO em macrófagos não infectados expostos por 24 horas e em macrófagos infectados por 24 e 48 horas, revelando uma resposta tempo-dependente, visto que os níveis foram normalizados após 72 horas de exposição.

Desta forma, o tratamento com o extrato bruto de *D. infecunda* pôde contribuir com a progressão da infecção *in vitro*, visto que importantes mecanismos moduladores de uma resposta pró-inflamatória foram prejudicados durante a fase

inicial da infecção, porém foram retomados após maior tempo de exposição ao tratamento.

O mesmo efeito foi observado quando a Anfotericina B foi utilizada. Após 24 horas de exposição, os níveis de NO diminuíram em macrófagos infectados, dados que não foram confirmados com os achados de Mukherjee et al. (2010), em que o mesmo tratamento *in vitro* com baixas doses de Anfotericina B promoveu proteção contra a infecção por *L. donovani* em células THP-1, bem como aumentou os níveis de EROs e de NO.

O tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* revelou propriedades interessantes frente à infecção por *L. braziliensis*, uma vez que a produção de NO caracteriza ativação celular e contribui para uma resposta eficiente da célula hospedeira contra o parasito intracelular, sugerindo uma reversão do processo inibitório desenvolvido pelo protozoário.

Estudos revelam a atividade leishmanicida dependente de NO de diversos compostos, corroborando os resultados do presente estudo. Machado et al. (2015) avaliaram a produção de NO em macrófagos não infectados e infectados por *L. amazonensis* expostos a complexos de vanádio, observando um aumento dos níveis de NO em células infectadas com atividade anti-amastigota promissora. Nas investigações de Halder et al. (2018), a progressão da infecção decresceu após o tratamento com nanopartículas conjugadas à lactoferrina e ácido betulínico em macrófagos peritoneais infectados por *L. donovani*, acompanhado de um aumento na expressão de iNOS e IL-12. Em experimentos *in vivo*, o tratamento com complexo de rutênio conjugado a doador de NO por 28 dias reduziu a infecção em 99,9% nos linfonodos dos modelos animais infectados por *L. braziliensis*, em que os autores correlacionaram a atividade leishmanicida à produção de NO (NASCIMENTO et al., 2019).

O processo de fagocitose na interação *Leishmania*-macrófago é responsável por um aumento fisiológico na produção de EROs, observado na interação da célula com ambas as formas evolutivas do parasito. Contudo, as formas promastigotas resultam na maior produção de superóxido, uma vez que a infecção por amastigotas

resulta na inibição da atividade das enzimas NADPH oxidase e, portanto, a formação de radicais livres seja prejudicada (VAN ASSCHE et al., 2011).

As espécies reativas de oxigênio são moléculas altamente reativas sintetizadas na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria através da atividade das enzimas NADPH oxidase. São fundamentais em diversos mecanismos celulares fisiológicos e patológicos: em situações de hipóxia, a cadeia transportadora de elétrons atua como um sensor de oxigênio, em que ocorre a produção de EROs para a indução da expressão do fator induzível por hipóxia (HIF-1); em processos infecciosos, em que ocorre uma regulação da expressão de sinais ativadores de células T; e em processos patológicos, em que as EROs participam da inflamação aguda e promovem alterações no DNA (BRUNE et al., 2013; BAUER et al., 2017).

No presente estudo, os níveis de EROs foram elevados em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis* tratados com o extrato bruto de *D. oxe* somente quando a maior concentração foi utilizada (500 µg/mL), evidenciando uma resposta dose-dependente e sugerindo uma atividade leishmanicida não-dependente de EROs.

Em comparação, o tratamento com o extrato bruto de *D. infecunda* resultou no aumento dos níveis de EROs em todas as concentrações testadas após 24 e 48 horas de exposição, com normalização dos níveis após 72 horas, sugerindo um efeito leishmanicida dependente de EROs, em concordância com Rodrigues et al. (2014). No seu estudo, em que a utilização do ácido fólico mostrou-se promissora, os autores consideraram efeito leishmanicida como EROs-dependente, visto a correlação entre a diminuição da carga parasitária e do tamanho da lesão cutânea em modelos animais infectados por *L. amazonensis*, a produção de fibras de colágeno do tipo I e o aumento na produção de EROs, sem aumento na produção de NO.

No entanto, a atividade leishmanicida de compostos não depende somente de NO ou de EROs. A redução da taxa de infecção em macrófagos murinos infectados por *L. major* também foi associada à inibição da enzima arginase, quando as células foram tratadas com resveratrol, um polifenol encontrado na pele de amendoim e nas sementes de uvas. A enzima arginase é responsável pela produção de poliaminas,

sendo uma das principais fontes metabólicas para formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp e que sintetizam tripanotona. Sendo assim, uma vez expostos ao tratamento com resveratrol, a inibição da arginase foi observada, com redução da atividade oxidativa da L-arginina em L-citrulina e da disponibilidade de poliaminas, resultando na morte do parasito (FERREIRA et al., 2014).

Embora o aumento de EROs possa ser um indicador de polarização celular para um fenótipo M1, os efeitos citotóxicos provenientes do tratamento com o extrato bruto nas maiores concentrações podem estar associados ao aumento dos níveis de EROs em todos os grupos experimentais.

Em situações de estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em excesso podem causar despolarização da membrana mitocondrial, com aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e perda do potencial da membrana, e resultar na depleção de ATP e induzir a liberação de citocromo-c e a ativação das caspases (DILBERGER et al., 2019).

Neste contexto, mais investigações devem ser conduzidas para contribuir com o entendimento dos mecanismos de ação do extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* e também avaliar a função mitocondrial após a exposição aos tratamentos, bem como os mecanismos do citocromo P450 para elucidar o papel das EROs em macrófagos de linhagem RAW 264.7 não infectados e infectados por *L. braziliensis*.

Como último parâmetro para a avaliação da imunomodulação celular no presente estudo, a atividade fagocítica foi avaliada em macrófagos tratados e incubados com promastigotas de *L. braziliensis* e com leveduras de *S. cerevisiae*.

Como mencionado anteriormente, a ativação dos macrófagos é de suma importância na sua atuação como células efetoras no combate à infecção por *Leishmania*. Esta ativação resulta em diversas alterações celulares, dentre elas a capacidade fagocítica dos fagócitos. Entretanto, é conhecida a capacidade de inibição da ativação dos fagócitos desempenhada pelo parasito, com intuito de promover uma resposta com fenótipo M2 e, portanto, culminar na sobrevivência do parasito e no progresso da infecção (KEDZIERSKI e EVANS, 2014).

Em comparação com o grupo de macrófagos não tratados, os resultados demonstraram que o tratamento com o extrato bruto de *D. oxe* e de *D. infecunda* potencializou a atividade fagocítica em células incubadas com leveduras de *S. cerevisiae*, principalmente, visto um aumento no índice fagocítico após todas as condições testadas.

Curiosamente, a capacidade fagocítica de macrófagos tratados com o extrato bruto de *D. oxe* aumentou apenas nas duas maiores concentrações, 500 e 250 µg/mL, revelando um efeito dose-dependente, quando promastigotas de *L. braziliensis* foram incubadas para a fagocitose. A atividade fagocítica com leveduras de *S. cerevisiae* pode ser explicada pela presença de receptores de membrana específicos que facilitam a interação levedura-fagócito e pela ausência da maquinaria capaz de driblar os mecanismos imunológicos da célula hospedeira, observada pelo parasito.

O tratamento com Anfotericina B não afetou a atividade fagocítica em macrófagos em nenhum experimento ou condição, corroborando os achados de Ferreira et al. (2014), que não observaram alterações no índice fagocítico de macrófagos peritoneais de murinos tratados com Anfotericina B por 24 horas e incubados com promastigotas de *L. amazonensis*.

O presente estudo avaliou a atividade leishmanicida do extrato bruto de duas espécies de fungos endofíticos com propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana conhecidas (DOS SANTOS et al., 2016). A utilização do extrato bruto produzido por *D. oxe* revelou resultados promissores em relação à atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*. O tratamento em baixas concentrações aumentou os níveis de NO em macrófagos infectados sem provocar um aumento na produção de EROs, bem como potencializou a atividade fagocítica. Os resultados sugerem que o extrato bruto de *D. oxe* esteja participando na ativação e na imunomodulação dos macrófagos em função de promover uma resposta imunológica frente à infecção por *L. braziliensis*, ao invés de apresentar-se como um agente imunossupressor, o que foi observado com Anfotericina B.

Ademais, o extrato bruto de *D. infecunda* também revelou atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*. O tratamento aumentou os níveis de EROs e reduziu o número de amastigotas intracelulares, principalmente após 72 horas de exposição. Contudo, uma diminuição dos níveis de NO foi observada. Desta forma, os resultados sugerem que o extrato bruto de *D. infecunda* apresente atividade leishmanicida EROs-dependente.

8 CONCLUSÃO

No presente estudo, a atividade leishmanicida do extrato bruto dos fungos endofíticos *D. oxe* (CMRP 1418) e *D. infecunda* (CMRP 1325) foi observada, como a diminuição significativa do índice de infecção *in vitro* e a redução de amastigotas intracelulares, além de sugerir uma indução à ativação clássica de macrófagos.

O extrato bruto de *D. oxe* revelou resultados inéditos e promissores, visto que o tratamento em baixas concentrações resultou em maior citotoxicidade em promastigotas de *L. braziliensis* e em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados por *L. braziliensis*. Além disso, o extrato bruto reduziu a taxa de infecção *in vitro*, aumentou a produção de NO e potencializou a atividade fagocítica em macrófagos. Diante disso, os metabólitos secundários produzidos por *D. oxe* são elegíveis para estudos posteriores.

Comparativamente, esses resultados não foram evidentes para o extrato bruto de *D. infecunda*, que mostrou atividade leishmanicida menos promissora, visto uma redução da taxa de infecção *in vitro* em menor proporção em relação à outra espécie e da produção de NO durante a fase inicial da infecção, bem como um aumento da explosão respiratória.

O tratamento convencional, Anfotericina B, apresentou citotoxicidade para todos os grupos experimentais em todas as condições testadas, bem como reduziu a produção de NO na fase inicial da infecção e não alterou a atividade fagocítica em macrófagos. No entanto, revelou-se como o tratamento mais citotóxico dentre os utilizados e promoveu a menor redução da taxa de infecção *in vitro*.

Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos são compostos bioativos de fonte natural com potencial leishmanicida e sugerem apresentar propriedades imunomoduladoras com capacidade de polarização dos macrófagos para regulação de uma resposta de fenótipo M1 frente à infecção por *Leishmania*.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos, as investigações das propriedades dos metabólitos secundários de fungos endofíticos devem ser continuadas a fim de complementar os dados observados no presente estudo, em vista da inexpressiva informação a respeito dos mecanismos de ação envolvidos no tratamento. Os próximos passos deverão consistir na identificação e na caracterização dos metabólitos secundários com bioatividade seletiva ao parasito.

Uma vez que os resultados do presente estudo sugerem uma participação do extrato bruto na ativação da célula hospedeira, com capacidade de polarização dos macrófagos infectados por *L. braziliensis*, faz-se necessária a quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, e IFN- γ , a avaliação *in vitro* do potencial de membrana mitocondrial, de possíveis alterações morfológicas celulares, do tipo de morte celular envolvida e quantificar a taxa de morte celular com marcadores fluorescentes específicos, dentre outras investigações.

Um dos desafios para o descobrimento de terapias alternativas é o melhor entendimento das interações parasito-hospedeiro e dos mecanismos de ação dos compostos em macrófagos infectados, visto a capacidade de evasão do sistema imunológico e da adaptação parasitária. Portanto, muitos estudos devem ser conduzidos para a compreensão da interação dos compostos com a célula hospedeira infectada a nível citomorfológico e bioquímico, além de avaliar os possíveis efeitos dos tratamentos em outros modelos e linhagens celulares a longo prazo.

De maneira geral, o sucesso dessa linha de investigação poderá elucidar os mecanismos de ação dos compostos que garantiram a redução do parasito intracelular e conferiu uma imunomodulação do macrófago frente à infecção por *Leishmania*, a fim de contribuir com o desenvolvimento de terapias alternativas para as Leishmanioses.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-SOUZA F, DA SOUZA S, TANIWAKI NN, SILVA JJ, DE OLIVEIRA RM, ABREU-SILVA AL, CALABRESE KS. *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice induces an increase in NO production and death of *Leishmania amazonensis* amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c. Nitric Oxide, 58, 2016, 51-8. DOI: 10.1016/j.niox.2016.06.004.

ALMEIDA-SOUZA F, OLIVEIRA AER, ABREU-SILVA AL, CALABRESE KS. In vitro activity of *Morinda citrifolia* Linn. fruit juice against the axenic amastigote form of *Leishmania amazonensis* and its hydrogen peroxide induction capacity in BALB/c peritoneal macrophages. BMC Res Notes, 11, 2018, 492. DOI: 10.1186/s13104-018-3555-7.

ALVES DR, MORAIS SM, PELLISSIER FT, VASCONCELOS R, FREIRE FCO, DA SILVA ING, CATANEO AHD, MIRANDA-SAPLA MM, PINTO GAS, CONCHON-COSTA I, NORONHA AAA, PAVANELLI WR. Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. PLoS One, 13, 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196796>.

ANTINARELLI LMR, DIAS RMP, SOUZA IO, LIMA WP, GAMEIRO J, DA SILVA AD, COIMBRA ES. 4-Aminoquinoline derivatives as potential antileishmanial agents. Chem Biol Drug Des, 86, 2015, 704-14. DOI: 10.1111/cbdd.12540.

ATCC. *American Type Culture Collection*. 2019. Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx>>. Acesso em: 31 jan. 2020.

ATRI C, GUERFALI FZ, LAQUINI D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. Int J Mol Sci, 19, 6, 2018, 1801. DOI: 10.3390/ijms19061801.

BAUER D, WERTH F, NGUYEN HA, KIECKER F, EBERLE J. Critical role of reactive oxygen species (ROS) for synergistic enhancement of apoptosis by vemurafenib and the potassium channel inhibitor TRAM-34 in melanoma cells. Cell Death & Disease, 8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.6>.

BRAZIL R, RODRIGUES AAF, FILHO JDA. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. Entomol Ornithol Herpetol, 4, 2, 2015. DOI: 10.4172/2161-0983.1000144.

BRISSOW ER, DA SILVA IP, DE SIQUEIRA KA, SENÁBIO JA, PIMENTA LP, JANUÁRIO AH, MAGALHÃES LG, FURTADO RA, TAVARES DC, SALES JUNIOR PA, SANTOS JL, SOARES MA. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum-92C*, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. Parasitol Res, 116, 7, 2017. DOI: 10.1007/s00436-017-5451-9.

BRUNE B, DEHNE N, GROSSMANN N, JUNG M, NAMGALADZE D, SCHMID T, KNETHEN AV, WEIGERT A. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal*, 19, 6, 2013, 595-637. DOI: 10.1089/ars.2012.4785.

CAMPOS FF, ROSA LH, COTA BB, CALIGIORNE RB, RABELLO ALT, ALVES TM, ROSA CA, ZANI CL. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp, an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLoS Negl Trop Dis*, 2, 12, 2008. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000348.

CAMPOS FF, JUNIOR PAS, ROMANHA AJ, ARAÚJO MSS, SIQUEIRA EP, RESENDE JM, ALVES TM, MARTINS-FILHO OA, SANTOS VL, ROSA CA, ZANI CL, COTA BB. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110, 1, 2015. DOI: 10.1590/0074-02760140243.

CARVALHO CES, JUNIOR EPCS, BRITO LM, NICOLAU LAD, CARVALHO TP, MOURA AKS, RODRIGUES KAF, CARNEIRO SMP, ARCANJO DDR, CITÓ AMGL, CARVALHO FAA. Anti-*Leishmania* activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. *Exp Parasitol*, 175, 2017, 59-67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.012>.

CHATTERJEE S, GHOSH R, MANDAL NC. Inhibition of biofilm- and hyphal-development, two virulent features of *Candida albicans* by secondary metabolites of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* having broad spectrum antifungal potential. *Microbiol Res*, 232, 2020, 126386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126386>.

CHEPKIRUI C, STADLER M. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. *Mycol Prog*, 16, 5, 2017, 477-94. DOI: 10.1007/s11557-017-1288-y.

COTA BB, OLIVEIRA DM, SIQUEIRA EP, FAGUNDES EMS, PIMENTA AMC, SANTOS DM, RABELLO A, ZANI CL. New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. *Fitoterapia*, 82, 7, 2011, 969-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.05.014>.

COTA BB, TUNES LG, MAIA DNB, RAMOS JP, OLIVEIRA DM, KOHLHOFF M, ALVES TMA, FAGUNDES EMS, CAMPOS FF, ZANI CL. Leishmanicidal compounds of *Nectria pseudotruchia*, an endophytic fungus isolated from the plant *Caesalpinia echinata* (Brazilwood). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 113, 2, 2018. DOI: 10.1590/0074-02760170217.

DA SILVA BJM, PEREIRA SWG, RODRIGUES APD, NASCIMENTO JLM, SILVA EO. In vitro antileishmanial effects of *Physalis angulata* root extract on *Leishmania infantum*. *J Intreg Med*. 16, 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.08.004>.

DA SILVA IP, BRISSOW E, FILHO LCK, SENABIO J, SIQUEIRA KA, FILHO SV, DAMASCENO JL, MENDES SA, TAVARES DC, MAGALHÃES LG, JUNIOR PA, JANUÁRIO AH, SOARES MA. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*-F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. World J Microbiol Biotechnol, 33, 62, 2017. DOI: 10.1007/s11274-017-2228-3.

DA SILVA BJM, PEREIRA SWG, RODRIGUES APD, NASCIMENTO JLM, SILVA EO. In vitro antileishmanial effects of *Physalis angulata* root extract on *Leishmania infantum*. J Integr Med, 16, 6, 2018, 404-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.08.004>.

DE MEDEIROS AG, SAVI DC, MITRA P, SHAABAN KA, JHA AK, THORSON JS, ROHR J, GLIENKE C. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. Folia Microbiol, 63, 2018, 499-505. DOI: 10.1007/s12223-018-0587-2.

DE MELO JO, BITENCOURT TA, FACHIN AL, CRUZ EMO, JESUS HCR, ALVES PR, BLANK MFA, FRANCA SC, BELEBONI RO, FERNANDES RPM, BLANK AF, SCHER R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. Acta Tropica, 128, 1, 2013, 110-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.024>.

DE VRIES HJC, REEDIJK SH, SCHALLIG HDFH. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. Am J Clin Dermatol, 16, 2015, 99-109. DOI: 10.1007/s40257-015-0114-z.

DILBERGER B, BAUMANN S, SCHMITT F, SCHMIEDL T, HARDT M, WENZEL U, ECKERT GP. Mitochondrial oxidative stress impairs energy metabolism and reduces stress resistance and longevity of *C. elegans*. Oxid Med Cell Longev, 2019. DOI: 10.1155/2019/6840540.

DOS SANTOS GD, MAIA BHLNS, DEGENHARDT J, CASAPULA I, GOMES RR, MIDORY M, GLIENKE C, RIBAS M, VICENTE VA. Comparative antimicrobial activity of the *Schinus terebinthifolius* obtained by micropropagation and outdoor grown. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 7, 2016, 22-30.

ELKHAYAT ES, IBRAHIM SR, MOHAMED GA, ROSS SA. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. Nat Prod Res, 30, 7, 2016, 814-20. DOI: 10.1080/14786419.2015.1072711.

ESTEBAN-PARRA GM, ARRIAGA JMM, DIÉGUEZ AR, QUIRÓS M, SALAS JM, MORENO MS. High antiparasitic activity of silver complexes of 5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5 a]pyrimidine. J Inorg Biochem, 201, 2019. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110810.

FADEL H, SIFAOU I, ARENCIBIA AL, BATLLE MR, JIMÉNEZ IA, MORALES JL, GHEDADBA N, BENAYACHE S, PIÑERO JE, BAZZOCCHI IL. Antioxidant and

leishmanicidal evaluation of *Pulicaria Inuloides* root extracts: a bioguided fractionation. *Pathogens*, 8, 4, 2019. DOI: 10.3390/pathogens8040201.

FERNANDES ACBS, PEDROSO RB, DE MELLO TFP, DONATTI L, VENAZZI EAS, DEMARCHI IG, ARISTIDES SM, LONARDONI MV, SILVEIRA TG. In vitro characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates from patients with different responses to Glucantime® treatment from Northwest Paraná, Brazil. *Exp Parasitol*, 167, 2016, 83-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.003>.

FERREIRA TR, FERREIRA EVA, DEFINA TP, WALRAD P, PAPADOPOULOU B, CRUZ AK. Altered expression of an RBP-associated arginine methyltransferase 7 in *Leishmania major* affects parasite infection. *Mol Microbiol*, 2014. DOI: 10.1111/mmi.12819.

GLINSKI A, LIEBEL S, PELLETIER È, VOIGT CL, RANDI MAF, CAMPOS SX, OLIVEIRA RIBEIRO CA, FILIPAK NETO F. Toxicological interactions of silver nanoparticles and organochlorine pesticides in mouse peritoneal macrophages. *Toxicol Mech Method*, 26, 4, 2016. DOI: 10.3109/15376516.2016.1159770.

GOMES RR, GLIENKE C, VIDEIRA SIR, LOMBARD L, GROENEWALD JZ, CROUS PW. *Diaporthe*: a genus endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31, 2013, 1-41. DOI: 10.3767/003158513X666844.

GONTIJO B, CARVALHO MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36, 1, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>.

GONTIJO CMF, MELO MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras de Epidemiol*, 7, 2004, 338-49. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>.

HALDER A, SHUKLA D, DAS S, ROY P, MUKHERJEE A, SAHA B. Lactoferrin-modified Betulinic Acid-loaded PLGA nanoparticles are strong anti-leishmanials. *Cytokine*, 110, 2018, 412-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.05.010>.

HIGGINBOTHAM SJ, ARNOLD AE, IBAÑEZ A, SPADAFORA C, COLEY PD, KURSAR TA. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. *PLoS ONE*, 8, 9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0073192.

HORIKAWA MM, PENA MS. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. *Revista de Biologia*, 2011, 32-37.

HOTEZ P, AKSOY S. PLoS neglected tropical diseases: ten years of progress in neglected tropical disease control and elimination... more or less. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, 4, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005355.

IBRAHIM SRM, ABDALLAH HM, MOHAMED GA, ROSS SA. Integracides H-J: New tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus *Fusarium* sp. *Fitoterapia*, 112, 2016, 161-7. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.06.002.

KAYE P, SCOTT P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9, 8, 2011, 604-15. DOI: 10.1038/nrmicro2608.

KEDZIERSKI L, EVANS KJ. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 141, 2014, 1544-62. DOI: 10.1017/S003118201400095X.

LAINSON R, SHAW JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*, 273, 1978, 595-600. DOI: 10.1038/273595a0.

LEAÑEZ J, NUNEZ J, MARCHAN YG, SOJO F, ARVELO F, RODRIGUEZ D, BUSCEMA I, AULAR AA, FORERO JSB, KOUZNETSOV VV, MARTÍN XS. Anti-leishmanial effect of spiro dihydroquinoline-oxindoles on volume regulation decrease and sterol biosynthesis of *Leishmania braziliensis*. *Exp Parasitol*, 198, 2019, 31-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.01.011>.

LEMESRE JL, SERENO D, DAULOUÈDE S, VEYRET B, BRAJON N, VINCEDEAU P. *Leishmania* spp: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. *Exp Parasitol*. 86, 1, 1997, 58-68. DOI: 10.1006/expr.1997.4151.

LIEBEL S, DE OLIVEIRA RIBEIRO CA, DE MAGALHÃES VF, DA SILVA R, ROSSI SC, RANDI MA, FILIPAK NETO F. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). *Toxicol In Vitro*, 29, 3, 2015, 479-88. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.12.022.

LIU D, UZONNA JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 83, 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00083.

MACHADO PA, MOTA VZ, CAVALLI ACL, CARVALHO GSG, DA SILVA AD, GAMEIRO J, CUIN A, COIMBRA ES. High selective antileishmanial activity of vanadium complex with stilbene derivative. *Acta Tropica*, 148, 2015, 120-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.018>.

MARTÍNEZ-LUIS S, DELLA-TOGNA G, COLEY PD, KURSAR TA, GERWICK WH, CUBILLA-RIOS L. Antileishmanial Constituents of the Panamanian Endophytic Fungus *Edenia* sp. *J Nat Prod*, 71, 12, 2008. DOI: 10.1021/np800472q.

MARTÍNEZ-LUIS S, CHERIGO L, HIGGINBOTHAM S, ARNOLD E, SPADAFORA C, IBANEZ A, GERWICK WH, RIOS LC. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. *Int Microbiol*, 14, 2, 2011, 95-102. DOI: 10.2436/20.1501.01.139.

MAUEL J, RANSIJN A. *Leishmania* spp: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp Parasitol*, 87, 2, 1997, 98-111. DOI: 10.1006/expr.1997.4205.

MELO HA, ROSSONI DF, TEODORO U. Effect of vegetation on cutaneous leishmaniasis in Paraná, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 113, 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170505>.

METWALY AM, GHONEIM MM, MUSA A. Two new antileishmanial diketopiperazine alkaloids from the endophytic fungus *Trichosporum* sp. *Der Pharma Chemica*, 7, 2015.

MOREIRA VR, JESUS LCL, SOARES REP, SILVA LDM, PINTO BAS, MELO MN, PAES AMA, PEREIRA SRF. Meglumine Antimoniate (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02360-16>.

MOSTAFAVI M, SHARIFI I, FARAJZADEH S, KHAZAEI P, SHARIFI H, POURSEYEDI E, KAKOOEI S, BAMOROVAT M, KEYHANI A, PARIZI MH, KHOSRAVI A, KHAMESIPOUR A. Niosomal formulation of amphotericin B alone and in combination with glucantime: In vitro and in vivo leishmanicidal effects. *Biomed Pharmacother*, 116, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108942>.

MUKHERJEE AK, GUPTA G, BHATTACHARJEE S, GUHA SK, MAJUMDER S, ADHIKARI A, BHATTACHRYA P, MAJUMDAR SB, MAJUMDAR S. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. *J Infect*, 61, 2, 2010, 173-84. DOI: 10.1016/j.jinf.2010.05.003.

NASCIMENTO AM, SOARES MG, TORCHELSEN FKVS, ARAÚJO JAV, LAGE PS, DUARTE MC, ANDRADE PH, RIBEIRO TG, COELHO EA, NASCIMENTO AM. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol*, 31, 2015, 1793-1800. DOI: 10.1007/s11274-015-1932-0.

NASCIMENTO NRF, AGUIAR FLN, SANTOS CF, COSTA AML, HARDOIM DJ, CALABRESE KS, ALMEIDA-SOUZA F, SOUZA EHS, LOPES LGF, TEIXEIRA MJ, PEREIRA VS, BRILHANTE RSN, ROCHA MFG. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica*, 192, 2019, 61-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.021>.

NOGUEIRA PM, ASSIS RR, TORRECILHAS AC, SARAIVA EM, PESSOA NL, CAMPOS MA, MARIALVA EF, VELASQUEZ CMR, PESSOA FA, SECUNDINO NF, RUGANI JN, NIEVES E, TURCO SJ, MELO MN, SOARES RP. Lipophosphoglycan from *Leishmania amazonensis* strains display immunomodulatory properties via TLR4 and do not affect sand fly infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, 8, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004848.

OLEKHNOVITCH R, BOUSSO P. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. Trends Parasitol, 31, 12, 2015. DOI: 10.1016/j.pt.2015.08.001.

OLIVIER M, ATAYDE VD, ISNARD A, HASSANI K, SHIO MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. Microbes and Infection, 14, 15, 2012, 1377-89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014>.

OMS. Epidemiological situation. Weekly epidemiological record, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 29 de jan. 2020.

OMS. Global leishmaniasis update, 2006-2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. Weekly epidemiological record, 2017. Acesso em: 29 de jan. 2020.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis/. Acesso em: 28 jan de 2020.

OYAMA J, FERREIRA FBP, CONTER CC, LERA-NONOSE DSSL, RAMOS-MILARÉ ACFH, VENZAZZI EAS, SILVEIRA TGV, LONARDONI MVC. American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical case. Rev Inst Med Trop SP, 60, 3, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201860003>.

PASSERO LFP, LAURENTI MD, SANTOS-GOMES G, CAMPOS BLS, SARTORELLI P, LAGO JHG. In vivo antileishmanial activity of plant-based secondary metabolites. Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components, 2013, 95-107. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00007-0>.

PATOCKA J, ALMEIDA JD. Brazilian pepper tree: review of pharmacology. Mil Med Sci Lett, 86, 1, 2017, 32-41. DOI: 10.31482/mmsl.2017.005.

PELLISSIER FT, BORTOLETI BTS, ASSOLINI JP, GONÇALVES MD, CARLOTO AMC, MIRANDA-SAPLA MM, CONCHON-COSTA I, BORDIGNON J, PAVANELLI WR. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. Front Immunol, 9, 2018, 2529. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02529.

PETRI SCS, BERL FP, TAVARES LC, SOARES SRC, LINDOSO JAL. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. Exp Parasitol, 163, 2016, 68-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.007>.

RASCHKE WC, BAIRD S, RALPH P, NAKOINZ I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. Cell, 15, 1, 1978, 261-7. DOI: 10.1016/0092-8674(78)90101-0.

RODRIGUES APD, FARIAS LHS, CARVALHO ASC, SANTOS AS, DO NASCIMENTO JLM, SILVA EO. A novel function for acid kojic, a secondary

metabolite from *Aspergillus* fungi, as antileishmanial agent. PLoS ONE, 9, 3, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.009125.

RODRIGUES KAF, AMORIM LV, DIAS CN, MORAES DFC, CARNEIRO SMP, CARVALHO FAA. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. J Ethnopharmacol, 160, 2015, 32-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024>.

ROTTINI MM, AMARAL ACF, FERREIRA JLP, OLIVEIRA ESC, SILVA JRA, TANIWAKI NN, DOS SANTOS AR, ALMEIDA-SOUZA F, DE SOUZA CDSF, CALABRESE KDS. *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) essential oil as a weapon against *Leishmania amazonensis*: in vitro assay. Molecules, 24, 14, 2019. DOI: 10.3390/molecules24142525.

RUGANI JN, QUARESMA PF, GONTIJO CF, SOARES RP, MONTE-NETO RL. Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. Biomed Pharmacother, 108, 2018, 1170-80. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.149>.

SABIÁ-JÚNIOR EF, MENEZES LFS, ARAÚJO IFS, SCHWARTZ EF. Natural occurrence in venomous arthropods of antimicrobial peptides active against protozoan parasites. Toxins, 11, 10, 2019, 563. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11100563>.

SACHET M, LIANG YY, OEHLER R. The immune response to secondary necrotic cells. Apoptosis, 31, 2017. DOI: 10.1007/s10495-017-1413-z.

SALGADO YCS, FERREIRA MB, DA LUZ JZ, NETO FF, RIBEIRO CAO. Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1. Toxicol in Vitro, 50, 2018, 40-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.02.005>.

SANTIAGO IF, ALVES TMA, RABELLO A, JUNIOR PAS, ROMANHA AJ, ZANI CL, ROSA CA, ROSA LH. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. Extremophiles, 16, 2012, 95-103. DOI: 10.1007/s00792-011-0409-9.

SANTOS PJC, SAVI DC, GOMES RR, GOULIS EH, SENKIV CC, TANAKA FA, ALMEIDA AM, TERASAWA LG, KAVA V, GLIENKE C. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. Microbiol Res, 186, 2016. DOI: 10.1016/j.micres.2016.04.002.

SARKAR A, KHAN YA, LARANJEIRA-SILVA MF, ANDREWS NW, MITTRA B. Quantification of intracellular growth inside macrophages is a fast and reliable method for assessing the virulence of *Leishmania* parasites. J Vis Exp, 133, 2016, e57486. DOI 10.3791/57486.

SCOTT P, NOVAIS FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, 16, 2016, 581-92. DOI: 10.1038/nri.2016.72.

SHOKRI A, EMAMI S, FAKHAR M, TESHNIZI SH, KEIGHOBADI M. In vitro antileishmanial activity of novel azoles (3-imidazolylflavanones) against promastigote and amastigote stages of *Leishmania major*. *Acta tropica*, 167, 2017, 73-8. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.12.027.

SILVA GL, DIAS JSM, SILVA HRV, TEIXEIRA JDS, DE SOUZA IRB, GUIMARÃES ET, MOREIRA DRM, SOARES MBP, BARBOSA MIF, DORIGUETTO AC. Synthesis, crystal structure and leishmanicidal activity of new trimethoprim Ru(III), Cu(II) and Pt(II) metal complexes. *J Inorg Biochem*, 205, 2020. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111002.

SOULAT D, BOGDAN C. Function of macrophage and parasite phosphatases in leishmaniasis. *Front Immunol*, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01838>.

SOUZA SS, CATTAPRETA CM, ALVES JMP, CAVALCANTI DP, TEIXEIRA MMG, CAMARGO EP, DE SOUZA W, SILVA R, MOTTA MCM. Expanded repertoire of kinetoplast associated proteins and unique mitochondrial DNA arrangement of symbiont-bearing trypanosomatids. *PLoS ONE*, 12, 11, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187516.

TAVAKOLI P, GHAFARIFAR F, DELAVARI H, SHAHPARI N. Efficacy of manganese oxide (Mn₂O₃) nanoparticles against *Leishmania major* in vitro and in vivo. *J Trace Elem Med Biol*, 56, 2019, 162-8. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.08.003.

TONIAL F, MAIA BHLNS, GOMES-FIGUEIREDO JA, SOBOTTKA AM, BERTOL CD, NEPEL A, SAVI DC, VICENTE VA, GOMES RR, GLIENKE C. Influence of culturing conditions on bioprospecting and the antimicrobial potential of endophytic fungi from *Schinus terebinthifolius*. *Curr Microbiol*, 72, 2016, 173. DOI: 10.1007/s00284-015-0929-0.

TRUPPEL JH, OTOMURA F, TEODORO U, MASSAFERA R, COSTA-RIBEIRO MCV, CATARINO CM, DALAGRANA L, FERREIRA MEM, THOMAZ-SOCCOL V. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? *PLoS One*, 9, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093731>.

URIBE CC, OLIVEIRA FS, GROSSMANN B, KRETZMANN NA, SILVEIRA TR, GIUGLIANI R, MATTE U. Cytotoxic effect of Amphotericin B in a myofibroblast cell line. *Toxicol In Vitro*, 27, 7, 2013, 2015-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.08.005>.

VAN ASSCHE T, DESCHACHT M, DA LUZ RAI, MAES L, COS P. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*, 51, 2, 2011, 337-51. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011.

WANDERLEY JL, BARCINSKI MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cell Mol Life Sci*, 67, 2010, 1653-9. DOI: 10.1007/s00018-010-0291-0.