



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**



**Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica**

**Tarcila de Araújo Alves**

**MANAUS - AMAZONAS - BRASIL**

**2019**

**Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de fungos isolados de amostras de solo da região amazônica**

**Tarcila de Araújo Alves**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Biotecnologia. Sob orientação do Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva e coorientada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Regina A.C.N. Moreira.

**MANAUS – AMAZONAS - BRASIL**

**2019**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Alves, Tarcila de Araujo  
A474a Avaliação in vitro da atividade leishmanicida de fungos isolados  
de amostras de solo da região amazônica / Tarcila de Araujo Alves.  
2019  
78 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva  
Coorientadora: Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. fungos . 2. Leishmaniose Tegumentar Americana. 3.  
sobrenadantes liofilizados. 4. ação leishmanicida. I. Silva, Carlos  
Gustavo Nunes da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



### 137ª. ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 21 de junho (sexta-feira) de 2019, às 09h, no auditório do Bloco M, Mini-Campus, Setor Sul – UFAM, **Tarcila de Araujo Alves** defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada: "Avaliação *in vitro* de atividade *leishmanicida* de fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica."

#### Banca de Examinadores:

| Membros                                            | Parecer       | Assinatura                                         |
|----------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------|
| Dra. Flávia Regina Almeida Campos Naief<br>Moreira | Aprovada (X)  | Assinatura: <u>Flávia R. A. C. P. Moreira</u>      |
|                                                    | Reprovada ( ) | CPF: <u>026.284.346-51</u>                         |
| Dra. Iza Marineves Almeida da Rocha                | Aprovada (X)  | Assinatura: <u>Iza Marineves Almeida da Rocha</u>  |
|                                                    | Reprovada ( ) | CPF: <u>242.823.322-04</u>                         |
| Dra. Juliana Gomes de Souza Oliveira               | Aprovada (X)  | Assinatura: <u>Juliana Gomes de Souza Oliveira</u> |
|                                                    | Reprovada ( ) | CPF: <u>129.164.917-01</u>                         |

Manaus, 21 de junho de 2019.

Resultado Final: Aprovado (a) (X)  
Reprovado (a) ( )

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Dr. Edson Luiz de Andrade  
Coordenador

Coordenador PPGBIOTEC/UFAM

*Dedico este Trabalho*

*Aos meus avós Francisco e Rosa que continuam a me guardar e amar no lugar em que estão.*

*E à minha avó Eleadina que mesmo distante se lembra de mim em suas orações e me mantém em seu coração com tanto carinho.*

## **Agradecimentos**

A Deus, por ter me dado toda força, perseverança e por ter me permitido trilhar essa trajetória.

Aos meus pais, Rosalina e Leonei pelo apoio, amor, carinho, proteção, conforto e incentivos dedicados a mim.

À toda a minha família, em especial aos meus irmãos, Thaisa e Thiago por todo amor e incentivo dedicados à mim.

À minha sobrinha Ana Beatriz por iluminar meus dias com seus sorrisos e afeto.

À minhas amigas irmãs Renatha Frazão e Wanessa Cancela por sempre estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, me proporcionando entretenimento e carinho.

Aos meus amigos do curso de Biologia, em especial: Sara Maia, Lucas Falcão, Jéssica Nery, Magda Rabelo, Sheila Lima, Luana Yamille, Maria Phamela, Gabriele Bernardo, Jéssica Tavares, Carol Moras e Violeta Areosa que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e acreditando no meu potencial.

Aos amigos que fiz no PPG Biotec, em especial à Samanta, Aparecida e Jeniffer. Sei que levarei suas amizades preciosas para o resto da vida.

À todas as minhas amigas da célula Pedras Vivas, em especial à Damy Caroline por ser uma líder e amiga presente que pôde me acompanhar neste caminho e por me manter constantemente em suas orações.

À Rêgila cuja colaboração foi essencial para a realização dos experimentos e por sua amizade que se tornou essencial para mim.

À CAPES pela concessão da bolsa que permitiu a realização deste projeto.

Ao PPG Biotec por permitir me permitir a realização do mestrado e pelo concessão da bolsa.

À Universidade Federal do Amazonas por ter sido uma segunda casa e um verdadeiro lar durante os últimos 7 anos da minha acadêmica.

Ao meu orientador Carlos Gustavo Nunes da Silva pela confiança em mim depositada.

À minha coorientadora Flávia Regina A. C. N. Moreira por todos os ensinamentos e amizade criados nos últimos anos que a tornaram minha mãe científica.

À Coleção de Microorganismos de Interesse Médico pela estrutura disponibilizada que tornou a realização desse trabalho possível, em especial à Juliana por sempre ser tão acessível e gentil e me acolher tão bem durante a estadia.

À Dra. Liliane Coelho por todos os conselhos, incentivo e auxílio durante a realização dos experimentos.

À equipe do Laboratório de Análises Biológicas da Faculdade de Farmácia da UFAM, em especial à Márcia de Jesus por toda simpatia e auxílio durante a execução dos experimentos com culturas de células.

À Fundação de Medicina Tropical por ceder as cepas de *Leishmania* spp utilizadas no experimento.

Ao Laboratório de Micologia do INPA por ceder as cepas dos fungos para os experimentos.

Ao EXO pelos momentos de descanso e alegria proporcionados.

*“Há um momento na vida de todo menino normal em que surge um desejo furioso de ir a algum lugar e descobrir um tesouro enterrado.”*

*As Aventuras de Tom Sawyer*

*Mark Twain*

## Resumo

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária com grande disseminação no Continente Americano. Dessa forma, a bioprospecção de novos agentes anti leishmania é essencial para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e com menores efeitos colaterais para pacientes de LTA que os utilizados atualmente. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é testar a ação de sobrenadantes de 6 espécies fúngicas (*Aspergillus calidoustus*; *A. fumigatus*; *Fusarium solani*; *Penicillium citrinum*; *P. esclerotiorum* e *P. purpurogenum*), isoladas do solo amazônico contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. guyanensis*. Foram realizados ensaios *in vitro* contra promastigotas e amastigotas incubadas com sobrenadantes de cultura das 6 espécies fúngicas nas concentrações 125, 250, 500 e 750 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura (RPMI e Dmen) e Pentamidina (30 mg/mL). Estes sobrenadantes também foram avaliados quanto a sua citotoxicidade sobre células humanas de linhagem MRC-5 e quanto à produção de NO. Antes de iniciar os ensaios *in vitro* foi feita uma curva de crescimento onde foi o terceiro dia como o melhor para realização dos bioensaios com os promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Foi observado que *A. calidoustus* (CI50%=6382 µg/mL), *F. solani* (CI50%=739,2µg/mL) e *P. purpurogenum* (CI50%=503,67 µg/mL) durante o ensaio de atividade anti promastigota. *A. calidoustus* foi efetivo na concentrações de 500 µg/mL e 750 µg/mL apresentou atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* em 48 e 72 horas ( $p<0.05$ , ANOVA dois critérios; pós-hoc Tukey). *F. solani* foi efetivo somente na concentração de 750 µg/mL em 72 horas contra promastigotas de *L. amazonensis*. Já *P. purpurogenum* foi efetivo tanto nas concentrações de 500 µg/mL quanto 750 µg/mL também contra promastigotas de *L. amazonensis* em 72 horas. *A. fumigatus* foi o único sobrenadante com ação contra promastigotas de *L. guyanensis* (CI50=654,6 µg/mL). *P. citrinum* e *P. esclerotiorum* não apresentaram ação contra promastigotas de nenhuma espécie. Em seguida, foram feitos teste de citotoxicidade contra fibroblastos humanos, onde apenas *A. fumigatus* foi citotóxico e excluído nos testes posteriores. Em relação aos experimentos com amastigotas somente *A. calidoustus* e *F. solani* apresentaram atividade contra amastigotas de *L. guyanensis* reduzindo o número de parasitas no interior de macrófagos (RAW 264.7) após 24 horas de incubação com 750 µg/mL em relação ao controle negativo ( $p<0.05$ , ANOVA: um critério; pós-hoc Tukey). Quando avaliados quanto à produção de NO em macrófagos previamente estimulados por LPS, todas as 6 espécies exibiram aumento significativo ( $p=0.01$ , ANOVA) na produção de NO em baixas concentrações, porém o efeito não foi observado em concentrações mais altas. Entretanto, este mesmo efeito não foi visto nos sobrenadantes de *F. solani* e *P. purpurogenum* durante a dosagem de NO em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* e tratados com os sobrenadantes nas concentrações de 500 e 750 µg/mL. Somente os sobrenadantes de cultura de *A. calidoustus* na concentração de 750 µg/mL apresentaram efeito, diminuindo significativamente a produção de NO em resposta a amastigotas de *L. amazonensis*.

**Palavras-chave:** Leishmaniose tegumentar americana, Bioprospecção, Fungos de solo.

## Abstract

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is an infectious-parasitic disease widespread in the American Continent. Thus, the bioprospecting of new leishmanicidal agents is fundamental for the development of more effective and with less side effects than those currently used. This study is testing the action of 6 fungal species (*Aspergillus calidoustus*, *A. fumigatus*, *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *P. sclerotiorum* and *P. purpurogenum*) isolated from the Amazonian soil against promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and *L. guyanensis*. *In vitro* assays were performed against promastigotes and amastigotes incubated with culture supernatants of 6 fungal species at concentrations 125, 250, 500 and 750 µg / mL. These supernatants were also evaluated for their cytotoxicity under MRC-5 strain human cells and for NO production. At the beginning of the experiments a growth curve was made where the third day was chosen for the bioassays for *L. amazonensis* and *L. guyanensis* promastigotes. As negative control culture medium (RPMI and Dmen) and positive control Pentamidine (30 mg / mL) were used. After evaluation of anti promastigote activity it was observed that *A. calidoustus* (IC<sub>50</sub> = 638.2 µg / mL), *F. solani* (IC<sub>50</sub> = 739.2 µg / mL) and *P. purpurogenum* (IC<sub>50</sub> = 503.67 µg / mL) activity. The concentration of 750 µg / mL showed activity against *L. amazonensis* promastigotes within 72 hours (p <0.05, two-way ANOVA; post-hoc Tukey). *A. fumigatus* was the only supernatant acting against *L. guyanensis* promastigotes (IC<sub>50</sub> = 654.6 µg / mL). *P. citrinum* and *P. esclerotiorum* showed no action against promastigotes of any species. Subsequently, cytotoxicity tests were performed against human fibroblasts, where only *A. fumigatus* was cytotoxic and excluded in subsequent tests. Regarding the experiments with amastigotes, only *A. calidoustus* and *F. solani* showed activity against *L. guyanensis* amastigotes reducing the number of macrophage parasites (RAW 264.7) after 24 hours of incubation with 750 µg / mL compared to negative control. (p <0.05, ANOVA: one criterion; post hoc Tukey). When evaluated for NO production Regarding NO dosage in macrophages previously stimulated by LPS, all 6 species exhibited a significant increase (p = 0.01, ANOVA) in NO production at low concentrations, but the effect was not observed at higher concentrations. However, this same effect was not seen in *F. solani* and *P. purpurogenum* supernatants during NO dosing in macrophages infected with amastigotes of *L. amazonensis* and *L. guyanensis* and treated with supernatants at concentrations of 500 and 750 µg / mL. Only, only *A. calidoustus* culture supernatants at the 750 µg / mL concentration had any effect, significantly decreasing NO production in response to *L. amazonensis* amastigotes

**Palavras-chave:** American Cutaneous Leishmaniasis, Bioprospecting, Soil Fungus

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Mapa de distribuição e ocorrência de Leishmaniose Cutânea no mundo.....                                                                                                                                                                                                              | 18 |
| Figura 2 Número de casos de Leishmaniose cutânea e mucosa por regiões, sub-regiões e em países selecionados do continente Americano. ....                                                                                                                                                     | 19 |
| Figura 3 Casos de Leishmaniose Tegumentar por regiões brasileiras, 2010 -2017.....                                                                                                                                                                                                            | 19 |
| Figura 4 Esquema do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp .....                                                                                                                                                                                                                              | 22 |
| Figura 5 Esquemas de ação do NO na resposta imune inata realizada por neutrófilos (A) e monócitos (B)25                                                                                                                                                                                       |    |
| Figura 6 Esquema da produção de iNOS por dias de infecção durante as três fases da infecção com <i>L. major</i> em camundongos tratados .....                                                                                                                                                 | 28 |
| Figura 7 Curvas de crescimento de <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. guyanensis</i> (B) .....                                                                                                                                                                                                  | 45 |
| Figura 8 Número de parasitos vivos em controles e concentração de extrato de <i>A. calidoustus</i> em <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. guyanensis</i> (B) .....                                                                                                                              | 47 |
| Figura 9 Número de parasitos vivos em controles e concentração de extrato de <i>A. fumigatus</i> em <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. guyanensis</i> (B) .....                                                                                                                                | 49 |
| Figura 10. Número de indivíduos vivos durante as 72 em <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. guyanensis</i> (B) em diferentes concentrações de extrato de <i>F. solani</i> .....                                                                                                                  | 50 |
| Figura 11 Número de indivíduos vivos durante 72 horas em <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. guyanensis</i> (B) em diferentes concentrações de extrato de <i>P. purpurogenum</i> .....                                                                                                          | 51 |
| Figura 12Número de indivíduos vivos durante as 72 em <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. guyanensis</i> (B) em diferentes concentrações de extrato de <i>P. citrinum</i> . ....                                                                                                                 | 52 |
| Figura 13 Número de indivíduos vivos durante as 72 em <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L.guyanensis</i> (B) em diferentes concentrações de extrato de <i>P. esclerotiorum</i> . ....                                                                                                            | 53 |
| Figura 14 Quantificação do NO nos extratos de <i>A. calidoustus</i> (A), <i>F. solani</i> (B), <i>P. purpurogenum</i> (C), <i>P. citrinum</i> (D) e <i>P. esclerotiorum</i> (E).....                                                                                                          | 56 |
| Figura 15. Atividade anti-amastigota em macrófagos de camundongo de linhagem RAW 264.7: Percentual de macrófagos infectados com amastigotas de <i>L.amazonensis</i> (A) e <i>L.guyanensis</i> (B) em durante 24 horas de exposição ao sobrenadante de cultura de <i>A. calidoustus</i> .....  | 58 |
| Figura 16 Atividade anti-amastigota em macrófagos de camundongo de linhagem RAW 264.7: Percentual de macrófagos infectados com amastigotas de <i>L.amazonensis</i> (A) e <i>L.guyanensis</i> (B) em durante 24 horas de exposição ao sobrenadante de cultura de <i>F. solani</i> .....        | 59 |
| Figura 17. Atividade anti-amastigota em macrófagos de camundongo de linhagem RAW 264.7: Percentual de macrófagos infectados com amastigotas de <i>L.amazonensis</i> (A) e <i>L.guyanensis</i> (B) em durante 24 horas de exposição ao sobrenadante de cultura de <i>P. purpurogenum</i> ..... | 60 |
| Figura 18. Inibição da produção de NO em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. guyanensis</i> (B) após 24 horas de exposição aos sobrenadantes de fungos <i>A. calidoustos</i> , <i>F. solani</i> e <i>P. purpurogenum</i> .....   | 61 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Percentual de parasitos mortos às 72 horas de cultivo durante tratamento com extratos filtrados .....                                                    | 54 |
| Tabela 2: Valores de Concentração Inibitória de 50 % de promastigotas de <i>Leishmania</i> spp após 72 horas de exposição a sobrenadantes de cultura fúngica ..... | 54 |
| Tabela 3: Valores de viabilidade celular das substâncias na linhagem MRC-5, após 24 horas de exposição.....                                                        | 55 |

## Lista de Siglas e Abreviaturas

|                                    |                                           |
|------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>AmB</b>                         | Desoxicolato de Anfotericina B            |
| <b>AmBisome</b>                    | Desoxicolato de Anfotericina B Lipossomal |
| <b>BH4</b>                         | Tetraidrobiopterina                       |
| <b>C3b</b>                         | Proteína do Complemento 3 b               |
| <b>C3bi</b>                        | Proteína do Complemento 3 b inativada     |
| <b>C5b</b>                         | Proteína do Complemento 5 b               |
| <b>C9</b>                          | Proteína do Complemento 9                 |
| <b>CR1</b>                         | Receptor de Proteína do Complemento 1     |
| <b>CR3</b>                         | Receptor de Proteína do Complemento 3     |
| <b>Dexa</b>                        | Dexametasona                              |
| <b>Doxo</b>                        | Doxorrubicina                             |
| <b>GP</b>                          | Glicoproteínas                            |
| <b>GP63</b>                        | Glicoproteínas de 63 kDa                  |
| <b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b> | Ácido Fosfórico                           |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>     | Interferon $\gamma$                       |
| <b>IL-12</b>                       | Interleucina 12                           |
| <b>IL-2</b>                        | Interleucina 2                            |
| <b>IL-4</b>                        | Interleucina 4                            |
| <b>IL-5</b>                        | Interleucina 5                            |
| <b>iNOS</b>                        | Óxido Nítrico Sintase Induzida            |
| <b>LC</b>                          | Leishmaniose Cutânea                      |
| <b>LCD</b>                         | Leishmaniose Cutânea Difusa               |
| <b>LMC</b>                         | Leishmaniose Mucocutânea                  |
| <b>LPG</b>                         | Lipofosfoglicanos                         |
| <b>LPKD</b>                        | Leishmaniose Pós-Calazar Dérmica          |
| <b>LPS</b>                         | Lipofosfoglicano                          |
| <b>LR</b>                          | Leishmaniose Reincidente                  |
| <b>LT CD4+</b>                     | Linfócito T Auxiliar                      |
| <b>LTA</b>                         | Leishmaniose Tegumentar Americana         |
| <b>LV</b>                          | Leishmaniose Visceral ou Calazar          |
| <b>MAC</b>                         | Complexo de Ataque à Membrana             |
| <b>NOS</b>                         | Óxido Nítrico Sintase                     |
| <b>PCR</b>                         | Reação de Polimerase em Cadeia            |
| <b>Sb<sup>+3</sup></b>             | Antimoniais Trivalente                    |
| <b>Sb<sup>+5</sup></b>             | Antimoniais Pentavalentes                 |
| <b>Th</b>                          | Linfócitos T Auxiliares                   |
| <b>Th1</b>                         | Linfócitos T Auxiliares 1                 |
| <b>Th2</b>                         | Linfócitos T Auxiliares 2                 |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>     | Fator de Necrose Tumoral $\alpha$         |

## Sumário

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Introdução .....                                                                                                                   | 16 |
| 2 Referencial Teórico.....                                                                                                           | 17 |
| 2.1 Epidemiologia.....                                                                                                               | 17 |
| 2.2 Taxonomia.....                                                                                                                   | 20 |
| 2.3 Ciclo Biológico .....                                                                                                            | 21 |
| 2.4 Características imunológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana .....                                                          | 22 |
| 2.5 Diagnóstico.....                                                                                                                 | 28 |
| 2.6 Tratamento.....                                                                                                                  | 29 |
| 2.7 Fungos de solo .....                                                                                                             | 33 |
| 3 Justificativa.....                                                                                                                 | 35 |
| 4 Objetivo.....                                                                                                                      | 36 |
| 4.1 Objetivo Geral .....                                                                                                             | 36 |
| 4.2 Objetivos Específicos.....                                                                                                       | 36 |
| 5. Material e Métodos.....                                                                                                           | 36 |
| 5.1 Obtenção de sobrenadantes de culturas fúngicas.....                                                                              | 38 |
| 5.1.1 Espécimes fúngicos .....                                                                                                       | 38 |
| 5.1.2 Obtenção dos sobrenadantes de cultura fúngica .....                                                                            | 38 |
| 5.2 Atividade anti leishmania dos sobrenadantes fúngicos contra as formas promastigotas <i>in vitro</i> . .....                      | 38 |
| 5.2.1 Manutenção dos parasitos e preparo de massa parasitária.....                                                                   | 38 |
| 5.2.2 Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. ....                                                    | 39 |
| 5.2.3 Determinação da atividade anti leishmania e da concentração inibitória 50% (CI50).....                                         | 39 |
| 5.3 Atividade anti-leishmania <i>in vitro</i> em amastigota .....                                                                    | 40 |
| 5.3.1 Obtenção, cultivo e criopreservação de macrófagos de linhagem RAW 264.7 .....                                                  | 40 |
| 5.3.2 Ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i> com fibroblastos de pulmão (MRC-5).....                                              | 41 |
| 5.3.3 Infecção dos macrófagos com <i>Leishmania</i> spp.....                                                                         | 41 |
| 5.4.1 Quantificação de nitrito (NO) .....                                                                                            | 42 |
| 5.4 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) em células de linhagem MRC-5.....                                                    | 43 |
| 5.5 Determinação da atividade anti amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. dos sobrenadantes de cultura– Ensaios <i>in vitro</i> ..... | 43 |
| 5.5 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Leishmania</i> spp.....                   | 44 |

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.6 Análise estatística .....                                                                                                    | 44 |
| 6. Resultados .....                                                                                                              | 44 |
| 6.1 Curvas de Crescimento.....                                                                                                   | 44 |
| 6.2 Atividade anti leishmania e CI 50 % em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. guyanensis</i> .....                   | 45 |
| 6.3 Citotoxicidade dos sobrenadantes fúngicos contra fibroblastos humanos de linhagem MRC-5.....                                 | 54 |
| 6.4 Atividade de dos sobrenadantes de culturas fúngicas contra amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. guyanensis</i> ..... | 57 |
| 7 Discussão.....                                                                                                                 | 61 |
| 8 Considerações finais .....                                                                                                     | 68 |
| 9. Referências .....                                                                                                             | 68 |

## 1 Introdução

A Leishmaniose é considerada uma doença negligenciada de grande relevância nos países tropicais e subtropicais, o que garantiu sua participação na lista de metas de erradicação até 2022 pela Organização Mundial de Saúde (2019). Ela é uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania* spp, que possuem ciclo de vida heteróximo, ou seja, duas formas de vida em hospedeiros distintos: um díptero flebotomíneo e um mamífero (KILLICK-KENDRICK, 1999; RATH, 2003; BANULS *et al*, 2007; INBAR *et al*, 2017). A Leishmaniose possui duas formas: cutânea (tegumentar) e visceral (SILVA *et al*, 2012). Sua forma tegumentar é extremamente disseminada no Continente Americano sendo conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (SILVA *et al*, 2012 ; OMS, 2019) .

No Brasil, a LTA afeta principalmente a população de baixa renda que habita as regiões periurbanas e urbanas (DANTAS-TORRES, 2006; BRASIL, 2019). Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2019) a cura clínica é caracterizada pela epitelização das úlceras e a total resolução da infiltração do eritema, que ocorre seguindo uma média de 3 a 12 meses de tratamento.

As terapias atuais são baseadas em aplicação parenteral de antimoniais pentavalentes durante cerca de seis meses (BRASIL, 2019). No Brasil, a droga de primeira escolha é o glucantime (CATALDO *et al*, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Contudo, tanto o glucantime quanto as drogas de segunda escolha (Pentamidina e Anfotericina B) apresentam muitos efeitos colaterais para os pacientes, levando a baixa adesão ao tratamento (CAMPOS, 2012; CASTRO *et al*, 2017). Deste modo a busca por terapias alternativas para a LTA se most de extrema relevância.

A bioprospecção de agentes com atividade anti leishmania, tanto leishmanicida (eliminam os parasitos) quanto leishmanioestática (reduzem o crescimento dos parasitos), é um importante caminho para a criação de novos fármacos mais eficientes e menos invasivos aos pacientes. Atualmente muitos estudos estão sendo realizados utilizando extratos fitoterápicos baseados na medicina popular (DUARTE *et al*, 2016, AMEIDA-SOUZA, 2016, CARVALHO *et al*, 2016; ODONNE *et al*, 2017). Entretanto, ainda há pouco conhecimento sobre a utilização de substâncias fúngicas para esta ação. Levando em consideração a grande diversidade fúngica na região Amazônica e o uso dos fungos em diversas áreas da biotecnologia, principalmente no

desenvolvimento de medicamentos, a bioprospecção de fungos para atividade anti leishmania mostra-se um campo aberto a investigação.

## **2 Referencial Teórico**

### **2.1 Epidemiologia**

As Leishmanioses são um grupo de doenças de natureza infecto-parasitária que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais. Dados atualizados da OMS confirmaram sua ocorrência em 85 países entre 2016-2019 (OMS, 2019). A doença é causada por cerca de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e apresenta características clínicas, imunológicas e patológicas distintas de acordo com a espécie do parasito e com o estado imunológico do paciente (GONTIJO e CARVALHO, 2003; ESPIAU *et al*, 2017).

As leishmanioses se manifestam principalmente em quatro formas clínicas: cutânea (LC), mucocutânea (LMC), cutânea difusa (LCD), visceral ou Calazar ( LV ) (OLIVEIRA *et al*, 2011). Também são descritas duas formas menos ocorrentes, são estas: pós Calazar dérmica ( LPKD ) e recidivante ( LR ) (Noazin, 2008).

A leishmaniose tegumentar é a forma mais comum, enquanto a LV é considerada a mais grave segundo a OMS (2019) como visto na figura 1. Em 2017, estima-se que 90% dos casos de LC ocorreriam em 7 países endêmicos: Brasil, Etiópia, Quênia, Somália, Índia, Sudão do Sul e Sudão. Os países com maior ocorrência de casos de LC entre 2016-2019 são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (OMS, 2019). Nas Américas, as Leishmanioses continuam sendo um problema de saúde pública que acomete a população de baixa renda, sobretudo em países em desenvolvimento (OMS, 2019).

Em 2016, os Estados Membros da Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS/OMS - aprovaram mediante a Resolução CD55.R09 do Conselho Diretivo um plano de ação para eliminação das doenças negligenciadas em conjunto com medidas posteriores à eliminação destas 2016-2022. Todas as formas de Leishmanioses estão inseridas neste plano de ação (OMS, 2019).

A Leishmaniose Cutânea e Mucosa ocorre em 20 países do Continente Americano, sendo endêmica de 18 deles. Foram reportados um total de 940.396 casos novos de LC e LM em 17 dos 18 países endêmicos no período de 2001 à 2017 com média de 55.317 casos por ano. Cerca de 90% dos casos de LC relatados no Continente Americano são provenientes da Bolívia, Brasil e Peru. Contudo, ainda neste relatório epidemiológico OPAS/OMS (2019) foi observado uma redução de 35 % no número de casos de LTA no Brasil em 2016 (figura 2).

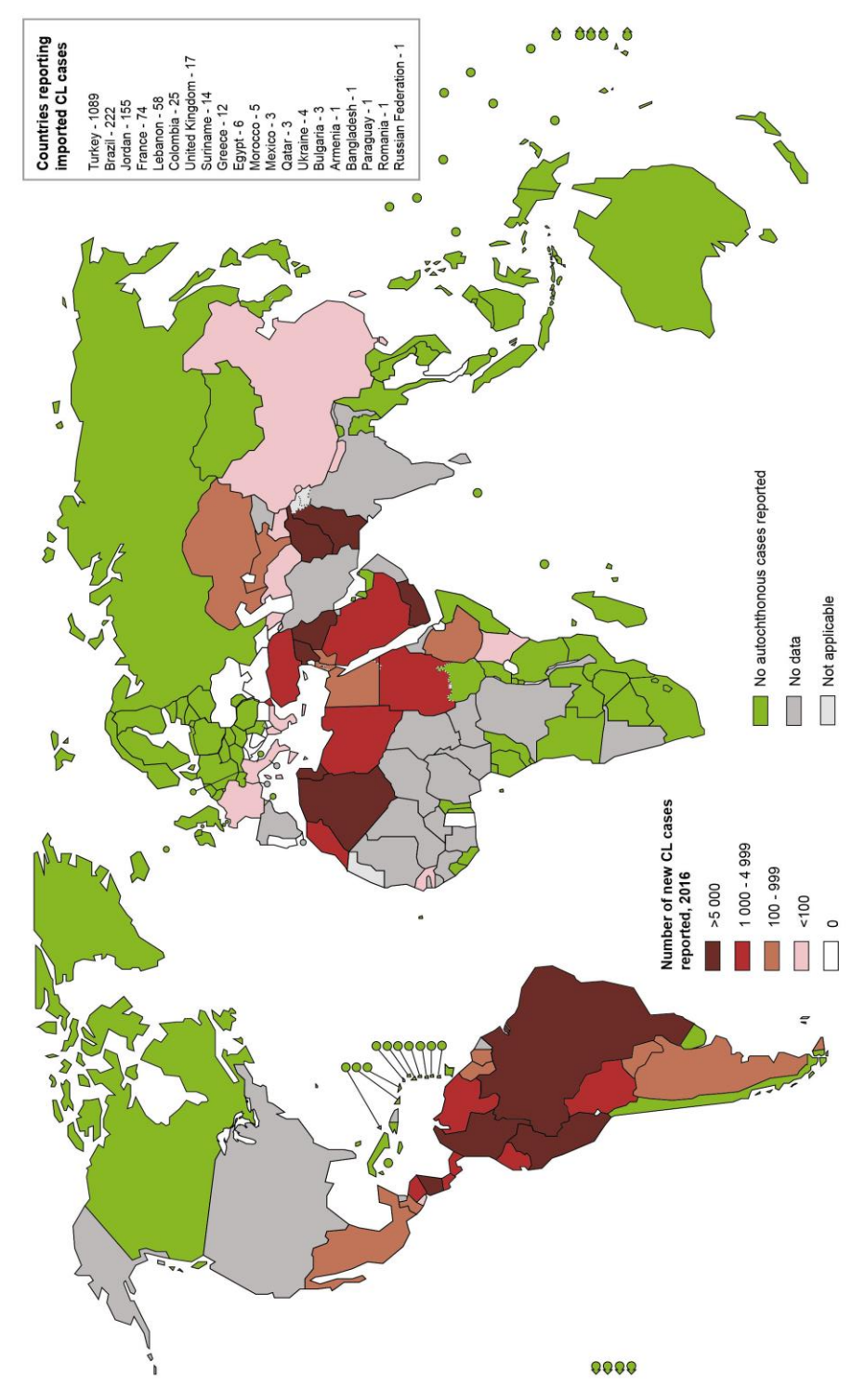


Figura 1 Mapa de distribuição e ocorrência de Leishmaniose Cutânea no mundo

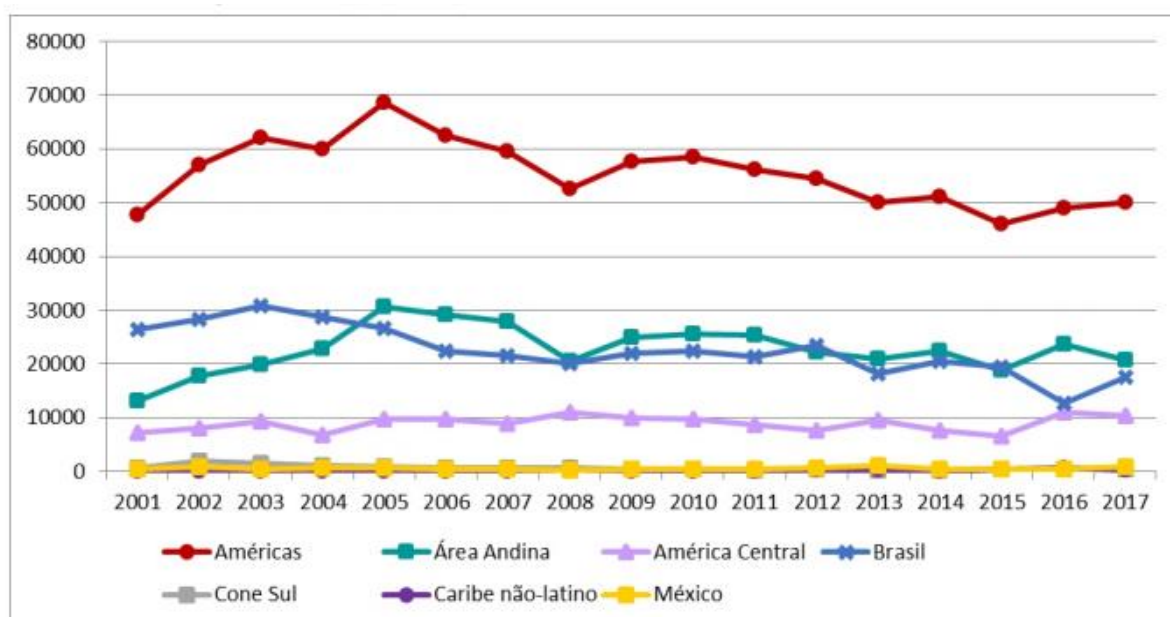


Figura 2 Número de casos de Leishmaniose cutânea e mucosa por regiões, sub-regiões e em países selecionados do continente Americano.

No Brasil foram relatados 17.528 casos de LTA em 2017 (Ministério da Saúde, 2019). A média de casos registrados no Brasil é de cerca de 21.000 casos/ano, e o coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes nos últimos 5 anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) como visto na figura 3.

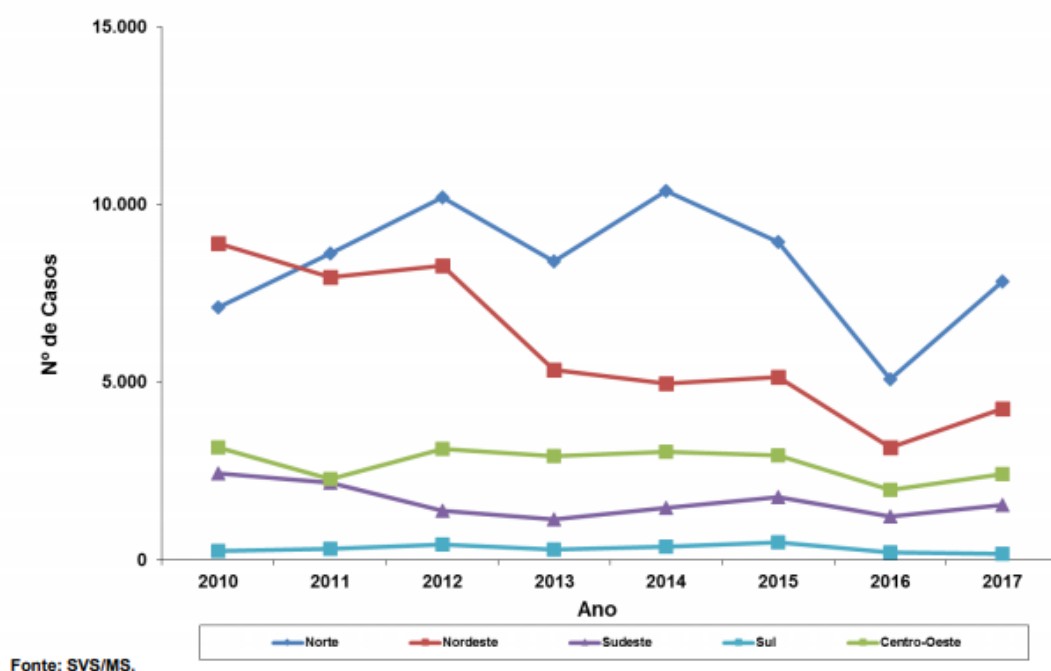


Figura 3 Casos de Leishmaniose Tegumentar por regiões brasileiras, 2010 -2017.

As Leishmanioses são endêmicas na região Amazônica. No ano de 2017 foram registrados 1.929 confirmados de LTA somente no Estado do Amazonas pelo SINAN (2019). Segundo dados da Fundação de Medicina Tropical, durante o ano de 2018 foram registrados 574 casos de LTA no Estado do Amazonas. Sendo 97,6% na forma cutânea e 2,4% na forma mucosa (FMT, 2019).

## 2.2 Taxonomia

O gênero *Leishmania* pertence à família Tripanosomatidae, que é caracterizada por ser formada por parasitos que apresentam um único flagelo com cinetoplasto pequeno em sua base (MASLOV *et al*, 2001). O termo “cinetoplasto” foi definido por Alexeieff em 1917 e refere-se a uma estrutura específica da ordem Kinetoplastida formada por grânulos basofílicos, localizados próximo ao corpo basal de um flagelo (CAMARGO e BASANO, 2004). De acordo com as características clínicas e epidemiológicas da doença, as espécies são classificadas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* (CAMARGO e BASANO, 2004).

Segundo Espiau *et al* (2017), as células de *Leishmania* em condições naturais e artificiais apresentam rápida adaptação ao meio e sucesso de sobrevivência da população devido ao seu grande potencial fenotípico. As espécies descritas e já isoladas de pacientes na região Amazônica são: *Leishmania* (V.) *guyanensis*, L. (V.) *braziliensis*, L. (V.) *lainsoni*, L. (V.) *naiffi*, L. (V.) *shawi*, L. (L.) *amazonensis*, L. (L.) *mexicana* e L.(V.) *lindenbergi* (GRIMALDI e TESH, 1993).

*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* encontra-se disseminada em áreas de igapó e várzea da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão) (BRASIL, 2019). Seus hospedeiros naturais são mamíferos silvestres de pequeno porte como marsupiais e roedores, e como vetor tem o flebotomíneo *Lutzomyia flaviscutellata* (Ordem Díptera; Família Psychodidae; Sub-Família Phlebotominae), de hábitos noturnos e pouco antropofílicos. Já a *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* distribui-se ao norte da bacia Amazônica (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e apresenta diversos mamíferos nativos como hospedeiros naturais, como a preguiça (*Choleopus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), e a mucura (*Didelphis marsupialis*). Entre seus vetores, o mais conhecido é o *Lutzomyia umbratili*, que é encontrado na copa das árvores durante o dia, atacando intensamente o ser humano quando perturbado e que também podem invadir habitações humanas a até 80 m de distância da mata (LIMA, 2012). Contudo, Teles *et al* (2017) também observou a presença de Leishmanias do subgênero *Viannia* em dípteros das espécies *Trichophoromyia auraensis* e *Th. ruifreitasi* no Acre.

## 2.3 Ciclo Biológico

O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* é digenético heteróximo (LAINSON e SHAW, 1978; GONTIJO *et al*, 2003), ou seja, o parasito necessita de mais de uma espécie de hospedeiro para completar seu desenvolvimento (figura 4). Estas espécies se tratam do vetor invertebrado e um hospedeiro vertebrado. Durante o seu ciclo biológico nos organismos hospedeiros, estes flagelados apresentam duas formas evolutivas: amastigota e promastigota.

A forma amastigota é parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (ESPIAU *et al*, 2017). As amastigotas são caracterizadas pelo formato arredondado, não possuem flagelo aparente e são imóveis, e se multiplicam obrigatoriamente dentro de células do sistema linfomonocitário (BAILEY e LOCKWOOD, 2007). As amastigotas se alojam nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos, onde se multiplicam por divisão assexuada até o rompimento celular, disseminando-se por via hematogênica e linfática, sendo então fagocitadas por outros macrófagos (BAILEY *et al*, 2017).

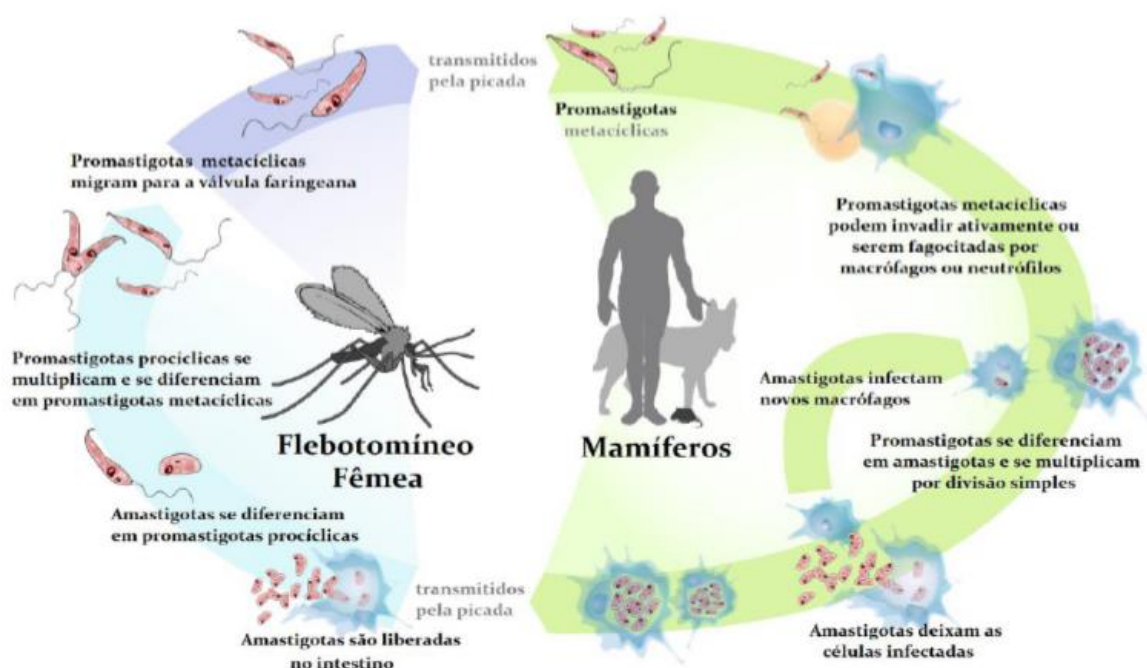
A forma promastigota apresenta-se como uma célula flagelada, alongada, de vida livre e natante que é encontrada no interior dos vetores invertebrados do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. (LAINSON e SHAW, 1978).

De modo geral, durante o ciclo biológico, os flebotomíneos ingerem as formas amastigotas durante o repasto sanguíneo em um animal infectado. Os parasitos se alojam em partes do intestino do flebotomíneo onde se diferenciam em promastigotas procíclicas e ligam-se ao lúmen do trato digestório devido às glicoproteínas de membrana ali presentes (LESSA e CARVALHO *et al*, 2007; ESPIAU *et al*, 2017). Segundo Almeida (2012). No sistema digestório do díptero, os protozoários multiplicam-se por divisão simples e assexuada. Em seguida passam por modificações fisiológicas e se convertem em promastigotas metacíclicas.

A forma promastigota metacíclica é reconhecida por ser mais infectiva ao hospedeiro mamífero. Para que a promastigota procíclica se diferencie em promastigota metacíclica, ela passa por um processo de diferenciação no trato digestório do hospedeiro invertebrado, conhecido por metaciclogênese. Durante este processo ocorre uma série de mudanças estruturais e metabólicas nos parasitos. Entre essas mudanças pode-se destacar alterações na expressão de moléculas de lipofosfoglicano (LPG) na membrana plasmática do protozoário que favorecem a infecção do vertebrado (KILLICK *et al*, 1974; LAINSON *et al*, 1987) tendo com efeito significativo aumentar a resistência das formas metacíclicas à lise pelo Sistema Complemento do hospedeiro mamífero (SACKS, 1984). Durante a metaciclogênese também ocorre a expressão

gênica de algumas proteínas exclusivas da forma metacíclica, por exemplo, a proteína META e o fator de transcrição NAT-1, ambos relacionadas a virulência do parasito. Também há aumento na expressão da glicoproteína de 63 KDaltons (GP63) (SACKS *et al*, 1990; BRODIN *et al*, 1992; MARÍN *et al* 2000). A metaciclogênese pode ser simulada em culturas de *Leishmania* spp *in vitro*: durante o final da fase logarítmica é possível identificar parasitos com características da forma metacíclica em grandes concentrações. (SACKS e PERKINS, 1989; MENDES *et al*, 2018).

Tais mudanças permitem a liberação do epitélio intestinal e a migração para a proboscíde do inseto após aproximadamente 4 a 5 dias, onde bloqueiam o proventrículo. Neste processo, durante o repasto sanguíneo as formas promastigotas são regurgitadas e penetram na pele lesada, iniciando a infecção (CAMPOS, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2011; OMS, 2019) .



**Figura 4** Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* spp (ALMEIDA, 2012).

## 2.4 Características imunológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A infecção por *Leishmania* sp. se caracteriza por lesões que variam de autocicatrizantes a infecções disseminadas e fatais dependendo de fatores como variação genética, condição nutricional e resposta imunológica do hospedeiro, da natureza da infecção e da espécie do parasito (BOGDAN e ROLINGHOFF, 1998; SCOTT e NOVAIS, 2017). Por outro lado, o sucesso da

sobrevivência intracelular do parasito depende da resistência do mesmo ao estresse oxidativo no interior de macrófagos ativados (VASCONCELOS *et al*, 2018).

A resposta imunológica à entrada do parasito *Leishmania* sp. é descrita em fases de acordo com as células ativadas e envolvidas (VON STEBUT, 2007):

- Primeira fase: ocorre a internalização do flagelado na célula após sua ligação aos receptores de membrana e sua disseminação nos macrófagos presentes no tecido subcutâneo. Caracteriza-se pelo acúmulo de parasitas no interior dos macrófagos sem que ocorra a lesão;
- Segunda fase: verifica-se a migração e ativação das células do sistema imune inato, as lesões se tornam aparentes;
- Terceira fase: ocorre a migração das células dendríticas e linfócitos T e a oclusão da lesão;
- Fase crônica: os parasitos vestigiais contribuem para a manutenção da imunidade do hospedeiro de acordo com seu estado de saúde.

A resposta imune inicial contra o patógeno é marcada pela ação da resposta imune inata, na qual as primeiras células a atuarem contra a infecção são os neutrófilos, seguidos de macrófagos, células dendríticas, monócitos e células de Langerhans na epiderme (SILVEIRA *et al*, 2008; VASCONCELOS *et al*, 2018).

Após a infecção por *Leishmania* spp., os neutrófilos podem liberar armadilhas extracelulares (NETs-Neutrophil Extracellular Traps) que destroem as formas promastigotas através de um processo chamado NETosis. Além disso, tanto neutrófilos vivos quanto em processo de necrose podem ativar as vias de expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos infectados induzindo o controle parasitário (ALMEIDA *et al*, 2012; SCOTT E NOVAIS, 2016) (Figura 5-A).

Os monócitos também são recrutados do sangue para as lesões de acordo com a presença e CC-quimiocina 2 (CCR2) no local. Os monócitos também são reconhecidos por serem eficientes na eliminação dos parasitos através da produção de ROS (GONÇALVES *et al*, 2011) (Figura 5-B). Os monócitos e células dendríticas se dirigem para os gânglios linfáticos e promovem a diferenciação das células TH1 através produção de interleucina-12 (IL-12). As células TH1 migram para o foco da infecção e matam os parasitos ao induzir a produção de óxido nítrico (NO) e/ou aumentar a explosão respiratória (SATO *et al*, 2000; CARNEIRO *et al*, 2016).

Heinzel *et al.* (1993) mostrou em modelos murinos experimentais a existência da dicotomia na resposta imune mediada pelos linfócitos T auxiliares (Th) CD4+, que é subdividida funcionalmente em Th1 e Th2. Os linfócitos ou células Th1 conduzem à eliminação do patógeno, favorecendo a resistência à infecção, associando-se a produção de IFN- $\gamma$  (interferon gama), TNF- $\alpha$  e interleucina (IL)-2 em camundongos de linhagem C57BL-6 propiciando uma resposta eficaz pela produção de NO (SCOTT e NOVAIS, 2016). Já a resposta do tipo Th2 é associada à produção de IL-4, IL-5, observada em camundongos BALB/c, está relacionada à disseminação do parasito e ao desenvolvimento da forma visceral (CECÍLIO *et al*, 2014).

No entanto, antes mesmo disso, a ação do sistema complemento elimina a maioria dos parasitos, porém os promastigotas em fase metacíclica são resistentes ao sistema complemento (MOSSER *et al*, 1984).

A resistência do parasito ao sistema complemento é associada, entre outros fatores, à presença de dois componentes do glicocálice da *Leishmania* sp., o LPG, lipofosfoglicanos e a GP63, glicoproteína de superfície de 63 kDa (CECÍLIO *et al*, 2014). O LPG impede a formação da cascata do complemento através da prevenção da inserção do complexo C5b-C9 (MAC) do sistema complemento do hospedeiro (PIRES *et al*, 2012; CECÍLIO *et al*, 2014;). Os promastigotas em fase infectiva no sangue do hospedeiro sofrem mudanças em sua membrana plasmática, como o alongamento na estrutura do lipofosfoglicano (LPG) e a grande expressão de moléculas de GP63. Estas moléculas dificultam a ligação do complexo MAC do sistema complemento ao parasita. O GP63 inativa o C3b, clivando-o em C3bi (SACKS, 1990; BRITTINGHAM *et al*, 1995; SILVEIRA *et al*, 2008;).

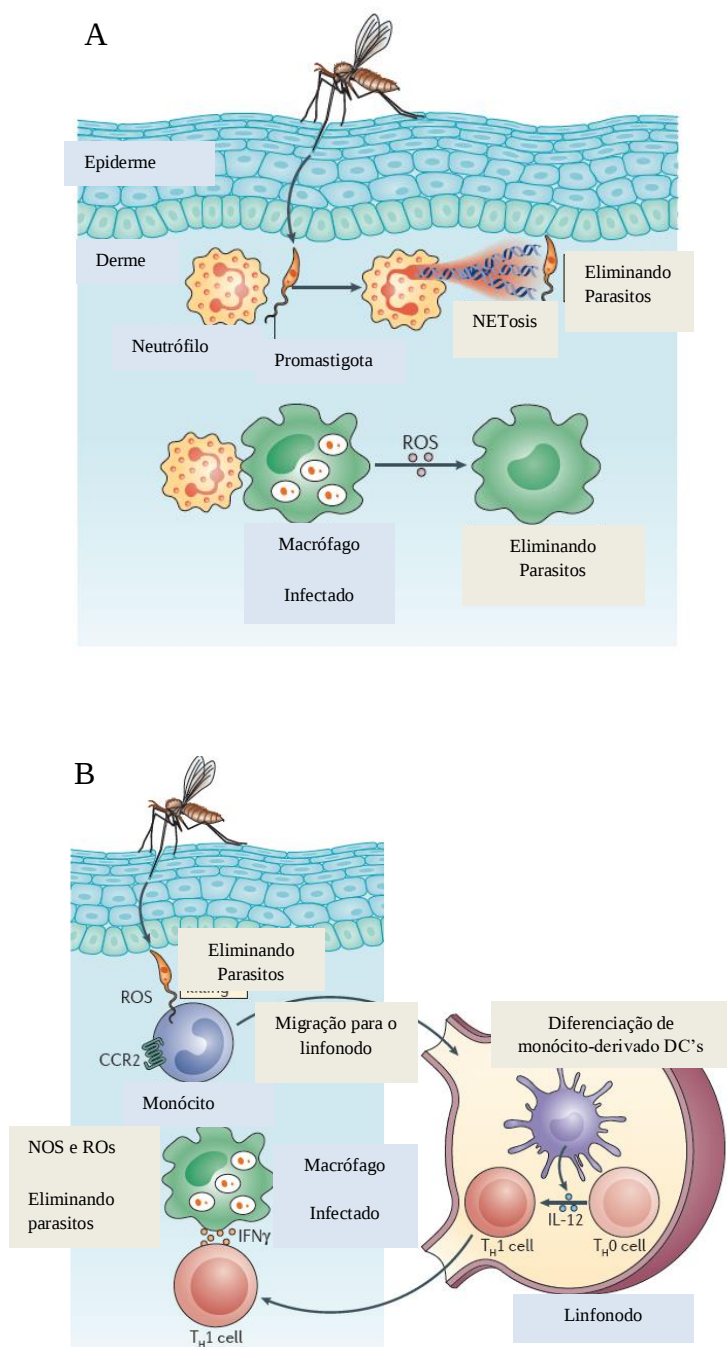


Figura 5 Esquemas de ação do NO na resposta imune inata realizada por neutrófilos (A) e monócitos (B). (SCOTT E NOVAIS, 2016).

Ao vencer esta primeira barreira, o segundo evento que precede a fagocitose por macrófagos é a adesão das promastigotas à membrana plasmática da célula. Assim a fagocitose é estimulada e a produção de intermediários reativos de oxigênio e de óxido nítrico pelos macrófagos é inibida, como relatado por Wright e Silverstein (1983). Neste processo, as moléculas C3b e C3bi atuam na opsonização do parasito. Estes componentes do Sistema Complemento então ficam aderidos à membrana plasmática do parasito através da ligação com LPG E GP63. C3b e C3bi se ligam aos receptores CR3 e CR1 presentes na membrana plasmática

dos macrófagos. A ligação destes receptores aos componentes do complemento não ativam os mecanismos oxidativos e induzem à fagocitose e à formação do fagossomo no interior dos macrófagos, as promastigotas se transformam em formas amastigotas e se multiplicam. Para isso é necessário que elas sejam capazes de inibir os mecanismos de defesa deste tipo celular. (MURRAY, 1982; PIRES *et al*, 2012 ).

Os parasitos também são capazes de modular a apoptose em macrófagos (KAMIR *et al*, 2008; SRIVASTAV *et al*, 2014), células dendríticas (VALDES-REYES *et al*, 2009; GUTIERREZ-KOBEH, 2013) e células T (MUKHERJEE *et al*, 2006), o que também representa um mecanismo de proteção das amastigotas que são intracelulares obrigatórios.

No interior dos macrófagos, duas moléculas são críticas no controle da infecção: o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o óxido nítrico (NO). Durante a fase inicial da infecção, o ânion superóxido é produzido como parte do processo de explosão respiratória em macrófagos em resposta a fagocitose. O segundo agente oxidante produzido pelo macrófago é o óxido nítrico (NO), que é gerado após a ativação do macrófago com IFN- $\gamma$  (CARVALHO *et al*, 2016).

O NO é um gás difusível que em macrófagos é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A síntese de NO é realizada em duas etapas: na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios do grupamento guanidino da L-arginina gerando um NG-hidroxi-L-arginina (NHA), esta reação utiliza NADPH e  $O_2$  e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS; na segunda etapa, se dá a conversão da NHA em NO e L-citrulina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH4) são utilizados como co-fatores na reação (MARLETTA *et al*, 1988; BREDT, 1999; OLVEIRA *et al*, 2018).

Em macrófagos ativos, superóxidos e NO são produzidos em quantidade equimolar, o que induz a produção de peronitrito ( $ONOO^-$ ), outro radical livre extremamente tóxico a patógenos (HORTA *et al*, 2012).

A produção da enzima iNOS é estimulada por diversos fatores pró-inflamatórios, como citocinas ou endotoxinas. De modo geral, as citocinas são importantes moduladoras da expressão da iNOS em macrófagos infectados: citocinas do perfil Th1 (IL - 12, IFN-  $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) induzem a síntese a iNOS, enquanto as do padrão Th2 inibem sua síntese (NATHAN e XIE, 1994).

Um dos moduladores da síntese da iNOS é o IFN- $\gamma$ , que induz a explosão respiratória em macrófagos, aumentando a eliminação dos parasitos através da produção de altos níveis de ROS e NO (BOGDAN *et al*, 1993).

O NO é caracterizado pela atuação direta nos patógenos inibindo sua proliferação. Pode também causar mutação no DNA, romper aglomerados de microorganismos (HORTA *et al*, 2012), bloquear o metabolismo e inativar fatores de virulência (BOGDAN *et al*, 2000) ou moléculas associadas a patógenos infecciosos (SILVA, 2012).

O NO pode também se difundir através das membranas celulares, podendo mediar a morte tanto de parasitas interiorizados, quanto externos aos macrófagos (OLEKHNOVITCH *et al*, 2014). É considerado então uma molécula que, em conjunto com o uso de antibióticos, contribui para a eliminação da *Leishmania* sp. (OLIVEIRA *et al*, 2018). Foi observado em literatura que o uso do fármaco Pentoxifilina, um agente vasodilatador derivado de dimetilxantina, em conjunto com antimoniais pentavalentes aumentou a síntese da iNOS, induzindo a produção de NO e potencializando o efeito dos antimoniais contra os parasitos (BRITO *et al*, 2014).

Notou-se a persistência da lesão cutânea durante a fase crônica da infecção causada por *L. major* em camundongos tratados com um inibidor seletivo de iNOS (L-iminoetil-lisina - L-NIL) ou em camundongos que tiveram o gene da iNOS deletados. Nos dois casos houve, também, redução ou nenhuma produção da enzima iNOS durante a fase aguda da infecção como visto na Figura 6. (DIEFENBACH, 1999)

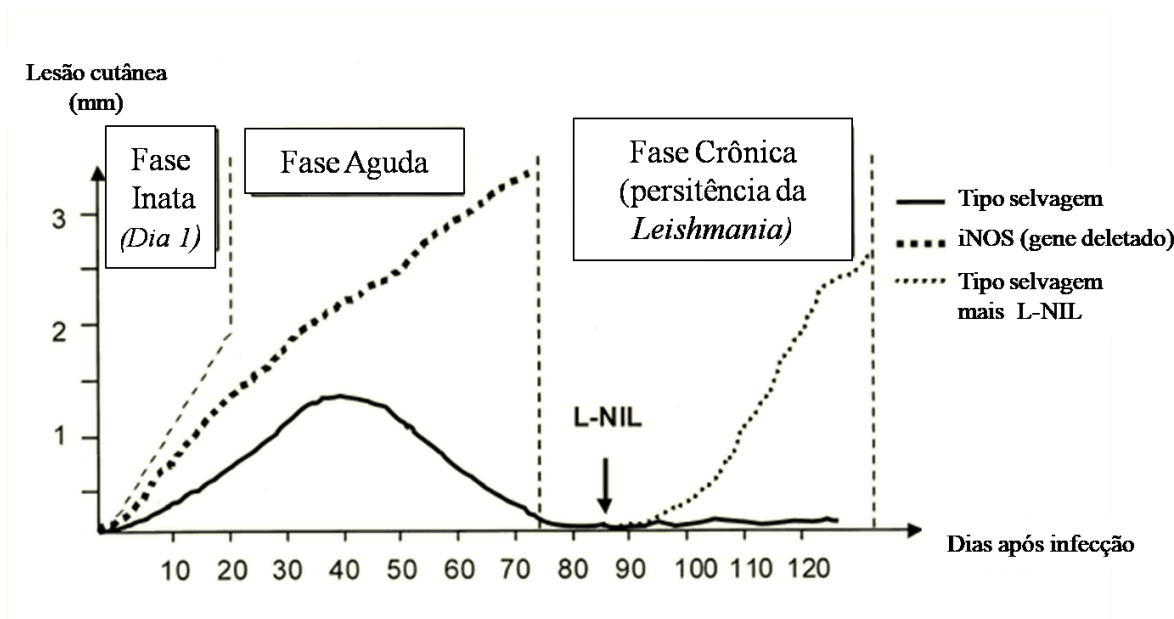


Figura 6. Esquema da produção de iNOS por dias de infecção durante as três fases da infecção com *L. major* em camundongos tratados com inibidores de iNOS L-NIL, com gene que expressa a enzima iNOS deletado e sem tratamento. (BOGDAN *et al*, 2000).

## 2.5 Diagnóstico

O diagnóstico de LTA é feito a partir de um conjunto de características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais (exame parasitológico e diagnóstico imunológico) (GONTIJO e CARVALHO, 2003; BRASIL, 2017).

As técnicas de diagnóstico parasitológico constituem-se de análise de amastigotas em esfregaço, cultura do parasito, exame histopatológico das lesões e identificação de *Leishmania* spp., por reação em cadeia de polimerase (PCR) e anticorpos monoclonais, como visto na tabela 1 (SAMPAIO *et al*, 2009; BRASIL, 2017).

Dentre os testes diagnósticos, a raspagem cutânea é o teste mais simples e comum, contudo possui apenas 70 a 75 % de precisão. Fatores como a limpeza adequada e a secagem do local são essenciais antes da raspagem. As raspagens são feitas a partir do centro e da margem da úlcera. São montadas lâminas a partir de esfregaços ou biópsias, bem como a cultura de amostras clínicas em meio de cultivo para verificar o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* spp. (SAMPAIO *et al*, 2009), essa cultura também pode ser realizada *in vivo* utilizando camundongos BALB-C (Brasil, 2017). Segundo Weigle *et al.* (1987) para que seja feito o diagnóstico definitivo, é necessário o isolamento do agente etiológico do material proveniente do tecido lesionado.

Outro meio de diagnóstico é através do Teste intradérmico (Intradermorreação de Montenegro ou da *Leishmania*) que se baseia na resposta de hipersensibilidade celular tardia, tendo a possibilidade de resposta negativa nas primeiras seis semanas após o aparecimento da lesão. É comum que o IDRM apresente resultado positivo à existência de parasitos após esse período (Brasil, 2017).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método que se baseia na amplificação do DNA do parasito em diferentes tipos de amostras, tais como pele e mucosa. Sendo um teste considerado de alta sensibilidade e especificidade por se utilizar de diversos alvos moleculares podendo ser específico para cada gênero e espécie de parasitos (Gonçalves, 2018).

Os exames histopatológicos focam em identificar a doença por meio de suas características morfológicas, histológicas e patológicas. O quadro histopatológico típico da LC é a presença de lesão na forma de dermatite granulomatosa difusa ulcerada. Porém somente a visualização do agente etiológico através do próprio exame histopatológico (utilizando técnicas histoquímicas especiais de demonstração de microrganismos), por imuno-histoquímica ou por cultura parasitária, permite a certeza da Leishmaniose durante o diagnóstico (Brasil, 2017).

## 2.6 Tratamento

Em 1912, o médico Gaspar Vianna introduziu o tratamento para LTA utilizando antimoniais trivalentes ( $Sb^{+3}$ ). Tais drogas mostraram eficácia em reduzir os níveis energéticos do parasito por atuar diretamente nos processos de  $\beta$ -oxidação e glicólise destes. Contudo foi verificado que a terapia com esta droga apresenta alta toxicidade, além de ser de difícil administração (LAISON e SHAW, 1978). Em 1937, introduziu-se a terapia com antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), que demonstrou menores efeitos colaterais e toxicidade que os antimoniais trivalentes, tornando-se a primeira opção de tratamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde (RATH, 2003; OMS, 2017). A recomendação inicial para aplicação dos antimoniais pentavalentes é por via endovenosa ou intramuscular em doses de 20 mg/kg durante 28 dias, porém este tratamento pode perdurar por mais tempo de acordo com a gravidade da infecção (OLIVEIRA, 2010; OMS, 2017).

O tratamento com antimonial pentavalente apresenta uma série de efeitos colaterais como dor no local da injeção, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias cardíacas, pancreatite e elevação transitória das transaminases hepáticas (GASSER *et al*, 1994; RATH, 2003). No Brasil, a droga de primeira escolha para o tratamento das Leishmanioses é 14-antimoniato de N-metilglucamina, Glucantime®, devido ao seu baixo

custo e ao nível relativamente baixo de ocorrência de efeitos colaterais (RATH *et al*, 2003; MISTRO *et al*, 2017; BRASIL, 2017).

Quando o tratamento com o antimonial pentavalente não apresenta os resultados esperados, outras drogas também são utilizadas como segunda escolha como a Pentamidina (BASSELIN *et al*, 1997), a Anfotericina B (TIUMAN *et al*, 2011), o Mitelfosine (SOTO *et al*, 2001) e a Azitromicina (SINAGRA, 2007). Os fármacos conhecidos e utilizados para o tratamento das Leishmanioses Tegumentares apresentam sérias problemáticas que incluem a resistência do parasito e a indução de efeitos colaterais que limitam a utilização e a eficácia destes.

A Pentamidina é utilizada principalmente em pacientes portadores de Leishmaniose Visceral causada pela *L. donovani*, pacientes hipersensíveis a antimoniais ou aqueles que não apresentaram resposta ao uso destas drogas, sendo, portanto, a segunda opção para o tratamento de Leishmaniose (RATH, 2003; OLIVEIRA *et al*, 2011). Sua aplicação é realizada em uma série de 12 a 15 doses em dias alternados, com intervalos de duas semanas para cada série, sendo o tratamento mais curto que o baseado nos antimoniais pentavalentes (RATH, 2003, MITROPOULOS *et al*, 2010; OMS, 2017). Esta droga possui alta taxa de toxicidade, tendo como efeitos adversos: anorexia, náusea, vômitos, dor de cabeça, astenia, a hipoglicemia, hipotensão, problemas cardiovasculares, intoxicação dos néfrons e em casos extremos, morte repentina (MITROPOULOS *et al*, 2010; OLIVEIRA *et al*, 2011; BRASIL, 2017).

Outra droga antileishmania com grande potencial econômico é o desoxicolato de anfotericina B (AmB) e sua forma lipossomal (AmBisome). A Anfotericina B atua sobre lipídios componentes da membrana plasmática do parasito (episterol, precursor do ergosterol) (BRASIL, 2017). A forma lipossomal da Anfotericina B diferencia-se por ser contida dentro de lipossomas formados por fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol, atingindo maiores concentrações plasmáticas que a anterior e apresentando menor nefrotoxicidade (BRASIL, 2017). Segundo Mistro *et al*. (2017), a Anfotericina B lipídica apresenta redução no tempo de tratamento e dos efeitos adversos quando comparado com Amb e Antimoniato de Metilglumina. No estudo de Solomon *et al*. (2007) foram observados efeitos colaterais (dispnéia mediana e eritema) em dois de sete pacientes tratados com Anfotericina B lipossomal na dosagem de 10mg/Kg. O uso de AmBisome® no tratamento de Leishmaniose Visceral em crianças é crescente, principalmente quando causado por *L. infantum*, entretanto, sua utilização no tratamento da LTA ainda necessita de maiores estudos (MINODIER e PAROLA, 2007). Segundo o manual de vigilância da LTA, lançado pelo Ministério da Saúde (2017) o uso de Anfotericina B é contra indicado para

cardiopatas, hepatopatas e nefropatas, sendo indicada como droga de primeira escolha em gestantes no tratamento da LTA.

Outro medicamento em estudos, porém não utilizado no Brasil, é o Miltefosine, um análogo de fosfocolina que apresenta como principal vantagem o fato de ser administrado oralmente aumentando a adesão do paciente ao tratamento (SOTO *et al*, 2001; MITROPOULOS, 2010). Soto *et al*. (2004) testaram uma dose diária dessa droga de 50 mg por 28 dias em 89 pacientes com Leishmaniose Cutânea da Colômbia e em 40 pacientes da Guatemala e foram relatados diversos efeitos colaterais, sendo os mais frequentes o vômito e a náusea. Na Colômbia foi verificada a cura da lesão em 82% dos pacientes e na Guatemala foi observada uma cura em 50% dos pacientes, fator esse que pode ser atribuído a diferenças nas espécies de parasitos envolvidos nas infecções nos dois países. Em um estudo anterior com 72 soldados colombianos foram testados duas concentrações de Miltefosine: 50-100 mg/dia durante 3 semanas e 133-150 mg/dia por 3-4 semanas, cada dose foi testada em 36 pacientes. A porcentagem de cura com a dose 50-100 mg/dia foi de 66% de pacientes, enquanto com a dose de 133-150 mg/dia foi de 94%. Porém, também houve registros de efeitos colaterais como citenose (mal estar durante movimentação), vômitos e níveis elevados de aminotransferases no sangue nos testes com diferentes concentrações da substância (SOTO *et al*, 2001). Sundar *et al*. (2006), na Índia, mostrou cura de LV por Miltefosine em 95% dos pacientes tratados, sendo adotada em conjunto com a Paramomicina no tratamento de LV neste país. Contudo, existem controvérsias quanto a sua eficácia (HENDRICKX *et al*, 2015) e quanto a segurança relacionada ao tempo de exposição ao composto (DORLO *et al*, 2014). Em estudo *in vitro* realizado em camundongos, amastigotas de *L. donovani* e *L. infantum* apresentaram resistência após reincidência de LV (HENDRICKX *et al*, 2015). Por outro lado, Sundar *et al*. (2015) afirmaram a efetividade de Miltefosine para o tratamento de LV, bem como da Leishmaniose Pós-Calazar Dérmica (PKLD).

Estudos recentes em Bangladesh (RAHMAN *et al*, 2017) demonstraram a eficiência e segurança dos tratamentos para Leishmaniose Visceral com Ambisome, Paramomicina e Miltefosine. A Monoterapia com Miltefosine, bem como o tratamento com pentoxifilina combinada com Sb<sup>5</sup> apresentam resultados promissores para o tratamento da Leishmaniose mucocutânea (VENTÍN *et al*, 2018). Contudo, para a LTA existem poucos estudos para que se possa afirmar a eficiência dessas drogas.

A resistência dos parasitos aos tratamentos foi demonstrada em ensaios *in vitro* (SILVA, 2017). O abandono do tratamento pelos pacientes também pode ser um fator associado ao

surgimento da resistência dos parasitos aos fármacos para o tratamento de LTA disponíveis atualmente no Brasil (BRASIL, 2017). Fumarola *et al.* (2004) relatou a reincidência da doença e a ausência de resposta durante o tratamento em pacientes co-infectados por HIV e *Leishmania* spp.

Além das reformulações dos tratamentos atuais, a bioprospecção de novos fármacos tem sido uma boa alternativa para atender a crescente demanda por novas terapias mais eficientes contra LTA. Bioprospecção refere-se à investigação sistematizada por genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de organismos vivos com possível potencial econômico para desenvolvimento de um produto (SACCARO JÚNIOR, 2013).

Entre 2016 e 2018 foram publicados diversos trabalhos voltados ao desenvolvimento de fitoterápicos baseados na etnobotânica ou produção de fitoterápicos provenientes de plantas utilizadas na medicina popular (OLIVEIRA *et al*, 2016; SILVA e OLIVEIRA , 2016; ODDONE *et al*, 2017).

Maquiaveli *et al.* (2016) demonstrou o efeito leishmanicida presente em uma fração n-butanólica de *Stachytarpheta cayennensis*, erva conhecida como Verônica ou Gervão, contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis in vitro*. Esta ação se deu por conta da inibição da via da arginase no parasito. Nessa fração havia uma mistura de verbascosídeo e isoverbascosídeo, sendo ambos inibidores dessa via. Posteriormente foi constatado que verbascosídeo não afeta a produção de citocinas ou enzimas em macrófagos murinos, sendo seletiva em sua atividade leishmanicida (MAQUIAVELI *et al*, 2016).

Passos *et al.* (2017) também relataram a atividade anti leishmania presente nas frações de extrato de folhas de *Serjania lethalis* contra *L. amazonensis*. Duarte *et al* (2016), em seus estudos com gengibre (*Zingiber officinalis Roscoe*), relatou a purificação de uma fração do extrato que estimulou a produção de nitrito e em consequência ativou a via de óxido nítrico nos macrófagos infectados por *L. amazonensis*, eliminando o parasito.

O óleo essencial produzido a partir da resina de *Ferula galbaniflua* apresentou clara atividade ( $95.70 \pm 1.82 \mu\text{g/mL}$ ) contra promastigotas de *L. amazonensis in vitro* e baixa citotoxicidade em células L6, mioblastos de *rattus norvegicus* (ANDRADE *et al*, 2016).

Outro óleo essencial que apresentou resultados positivos para as formas promastigotas e amastigotas (axênicos e em macrófagos murinos), foi o óleo obtido a partir de amostras da Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*). Neste mesmo trabalho também foi relatada baixa

citotoxicidade deste óleo para macrófagos murinos e eritrócitos humanos (CARVALHO *et al*, 2016).

Existem atualmente poucos estudos sobre a atividade anti leishmania de extratos e substâncias isoladas de fungos. Dentre esses estudos, há o realizado por Nascimento *et al*. (2015) que testaram o fungo endofítico *Cochliobolus sativus*, que apresentou atividade leishmancida contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Em outro estudo, foi testado o fungo endofítico, *Aspergillus terreus*, que apresentou atividade contra o parasito (amastigotas e promastigotas) relacionada à um derivado buteonolídeo (ELKHAYAT *et al*, 2016). Fungo de solo também podem biossintetizar nanopartículas de metais tóxicos à parasitos em forma promastigota e amastigota, como o *Fusarium oxysporum* apresentou grande atividade (0.25 e 0.50 µg/mL) contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, a partir da biossíntese de nanopartículas de prata como demonstrado por Fanti *et al*. (2018). Urdapilleta (2006) isolou 19 substâncias de líquens com atividade leishmanicida.

## 2.7 Fungos de solo

Os fungos são seres eucariotos, amplamente distribuídos, podendo ser unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (MICHEREFF *et al*, 2005). Os fungos são seres quimiorganotróficos e aeróbicos, isto explica a abundância desses organismos nas camadas superficiais dos solos, visto que nessa região existe maior teor de matéria orgânica e aeração (MALAVOLTA, 1980).

Existe um grande espectro de espécies de fungos reconhecidos como fungos de solo. Estes fungos despertam grande interesse por serem fungos que causam doenças que acometem plantações (NETO *et al*, 2000; MICHEREFF *et al*, 2005), fungos micorrízicos que auxiliam na absorção de nutrientes (SIQUEIRA, 1994; SAGGING JR. e SIQUEIRA, 1996), por seu potencial no ramo alimentício, na produção de enzimas como a celulase (KUHAD e SINGH 1993,) e no desenvolvimento de fármacos (FLEMMING, 1929; UEDA *et al*, 2014).

Os gêneros mais comuns de fungos de solo são: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Plasmodiophora*, *Rhizopus*, *Sclerotium*, *Scopulariopsis*, *Thielaviopsis* e *Trichoderma* (MICHEREFF ET AL 2005). Dentre os muitos gêneros pertencentes a este imenso grupo, destacam-se *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* devido à abundância no solo amazônico e seu grande potencial para a presença de atividade antimicrobiana.

*Aspergillus* é um gênero de fungos filamentosos pertencentes à Família Aspergillaceae (HOUBRAKEN e SAMSOM, 2011, SAMSON *et al*, 2014). Possui mais de 200 espécies com ampla distribuição na natureza. Apresenta importante papel na reciclagem de carbono, nitrogênio e solubilização de fosfatos (CARVALHO, 1969). Este grupo também apresenta espécimes patogênicos (ATCHADE *et al*, 2017) e fitopatogênicos (CARMO *et al*, 2018). Na área de biofarmacologia, é descrito que *Aspergillus fumigatus* em sua forma endofítica apresenta potencial antifúngico (LIU *et al*, 2004) e antibacteriano (CARVALHO, 2010; SILVA, 2018), assim como um exemplar marinho de *Aspergillus* sp que possui potencial antiviral (MA *et al*, 2017) e a espécie *Aspergillus terreus* que demonstrou atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* (ELKHAYAT *et al*, 2016).

O gênero *Fusarium* pertence à família Nectriaceae e inclui numerosas espécies tóxicas, sendo capazes de colonizar os mais diversos ambientes (ZABKA e PAVELA, 2018; MUNKVOLD, 2017). Existem cerca de 80 espécies fitopatogênicas de *Fusarium* sp. (LESLIE e SUMMERELL, 2006). Muitos estudos descrevem os efeitos das micotoxinas causadoras da Fusariose, doença que afeta a casca das plantas adultas e interfere na exportação de látex (PIZETTA, 2017), na produção de orquídeas ornamentais (SRIVASTAVA *et al*, 2014) e na produção de sementes do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*), grão importante à produção pecuária por ser uma importante fonte de alimentos para os bovinos (MULLER, 2017).

Em estudos bioquímicos e biomoleculares sobre o impacto dessas micotoxinas de *Fusarium* sp., foi observada a ação destas na biotransformação de enzimas do complexo CYP450 podendo causar intoxicação alimentar em mamíferos (SCHELSTRAETE *et al*, 2017). Dentro do gênero, *Fusarium solani* é a espécie mais comumente associada à lesões internas e externas em humanos (AL-HATMI *et al*, 2018). Entretanto, também existe uma aplicação considerável do gênero *Fusarium* na biofarmacologia. Estes microrganismos são utilizados para a obtenção de fármacos. Nesse gênero já foram encontradas espécies com atividade anti leishmania (FANTI *et al*, 2018), antimalárica, anticancerígena e antimicrobiana (IBRAHIM *et al*, 2017; KUMAR *et al*, 2017).

O gênero *Penicillium* também pertence à família Aspergillaceae (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011). É um gênero de grande representatividade, habitando diferentes ambientes que vão desde o solo a vegetação e áreas fechadas (VISAGIE *et al*, 2014). Dentre suas muitas funções, apresenta grande importância na produção de enzimas para diversos setores industriais (FRIEDSVALD, 2004), na produção de medicamentos antibacterianos (FLEMING, 1929;

ABRAHAM *et al*, 1941; THOM, 1945) e na indústria alimentícia (CHAVEZ, 2006). O gênero também é associado ao desenvolvimento da penicilina (FLEMMING, 1929). Na natureza sua principal importância é na decomposição de substratos orgânicos, podendo também gerar doenças nas raízes das plantas (VISAGIE *et al*, 2014). Além disso, entre os poucos casos de patogenicidade a humanos descritos em literatura, é possível relatar que *Penicillium citrinum* se torna oportunista quando em contato com um organismo imunodeprimido como relatado por Hesse *et al*. (2017).

Deste modo, todos os 3 gêneros se mostram interessantes para estudos na área de desenvolvimento de medicamentos com potencial leishmanicida.

### 3 Justificativa

Em vista do atual perfil dos tratamentos para LTA, com muitos efeitos colaterais e consequente baixa adesão por parte dos pacientes (PONTE-SUCRE *et al*, 2017), podemos verificar a necessidade de pesquisas visando à produção de novos medicamentos para esta patologia. É de fundamental relevância focar estes estudos em diferentes áreas, tanto na criação de novos tratamentos, quanto na associação destes com novas reformulações dos já utilizados (SUNDAR *et al*, 2006; SUNDAR *et al*, 2011). Aliado a esses fatores está a proposta de erradicação de doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde, tornando ainda mais importante o desenvolvimento de terapias mais eficientes contra as Leishmanioses (OMS, 2017).

A grande diversidade de fauna, flora e de microorganismo se presentes na região Amazônica desperta interesse de muitos pesquisadores para a produção de terapias mais baratas e com menores implicações pós-medicação em diferentes ramos taxonômicos. Estes focam na produção de medicamentos orais para a LTA.

Recentemente, muitas pesquisas estão sendo feitas com extratos de plantas, principalmente as utilizadas na medicina popular, tendo atividades positivas contra as duas formas do ciclo do parasito (ODONNE *et al*, 2017). Contudo, o uso de plantas pode levar a futuros problemas durante a produção de medicamentos, pois muitos extratos são retirados de plantas lenhosas, gerando grandes gastos para investimentos em produção de larga escala (ZUANAZZI e MAYORGA, 2010). Uma alternativa é a utilização de fungos para extração e isolamento de compostos com atividade anti leishmania, como já relatado em literatura para fungos endofíticos (ELKHAYAT *et al*, 2016), líquens (URDAPILLETA, 2006) e fungos de solo (FANTI *et al*, 2018). O uso desses microorganismos para produção de antibióticos é historicamente difundido, datando desde a descoberta da atividade antimicrobiana do gênero *Penicillium* (FLEMMING,

1929). Além destes, outro fator significativo para seu estudo, é a facilidade do uso destes em produção em larga escala (ABREU *et al*, 2015).

Desta maneira, focamos nossos estudos na busca por novas formas terapêuticas para tratamento da forma cutânea da Leishmaniose (LTA) utilizando fungos. Para tal, é necessário que primeiro seja realizada a bioprospecção de novos micro-organismos com este tipo de atividade. Desse modo, buscamos analisar *in vitro* a atividade anti leishmania de filtrados de sobrenadantes das espécies fúngicas *Aspergillus calidoustus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium esclerotiorum* e *Penicillium purpurogenum* isolados do solo da região Amazônica.

## **4 Objetivo**

### **4.1 Objetivo Geral**

-Avaliar *in vitro* a ação anti leishmania de sobrenadantes de culturas de fungos isolados de amostras solo da região Amazônica contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Verificar a citotoxicidade dos sobrenadantes de cultura de fungos sobre o crescimento e sobrevivência das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

- Avaliar a citotoxicidade dos sobrenadantes de cultura de fungos sobre células humanas de linhagem MRC-5;

-Calcular o índice de concentração inibitória de 50% para cada filtrado de fungos sobre as formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

## **5. Material e Métodos**

No presente estudo, serão realizados testes *in vitro* com sobrenadantes de culturas de espécies fúngicas isoladas de solo amazônico. Os fungos foram cedidos pela Coleção de Microorganismos de Interesse Médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA. A obtenção dos sobrenadantes de cultura foi realizada no Laboratório de Micologia do INPA. O

cultivo, crescimento dos parasitos e os ensaios biológicos para determinação da atividade antileishmania e citotoxicidade foram realizados nos laboratórios de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal do Amazonas - UFAM e na Coleção de Microorganismos de Interesse Médico do INPA, simultaneamente. As células de linhagem MRC-5 e RAW 264.7 foram cedidos pelo Laboratório de Análises Biológicas (Biophar) da Faculdade de Farmácia da UFAM. Os experimentos foram realizados seguindo a ordem do organograma observado na figura 7.

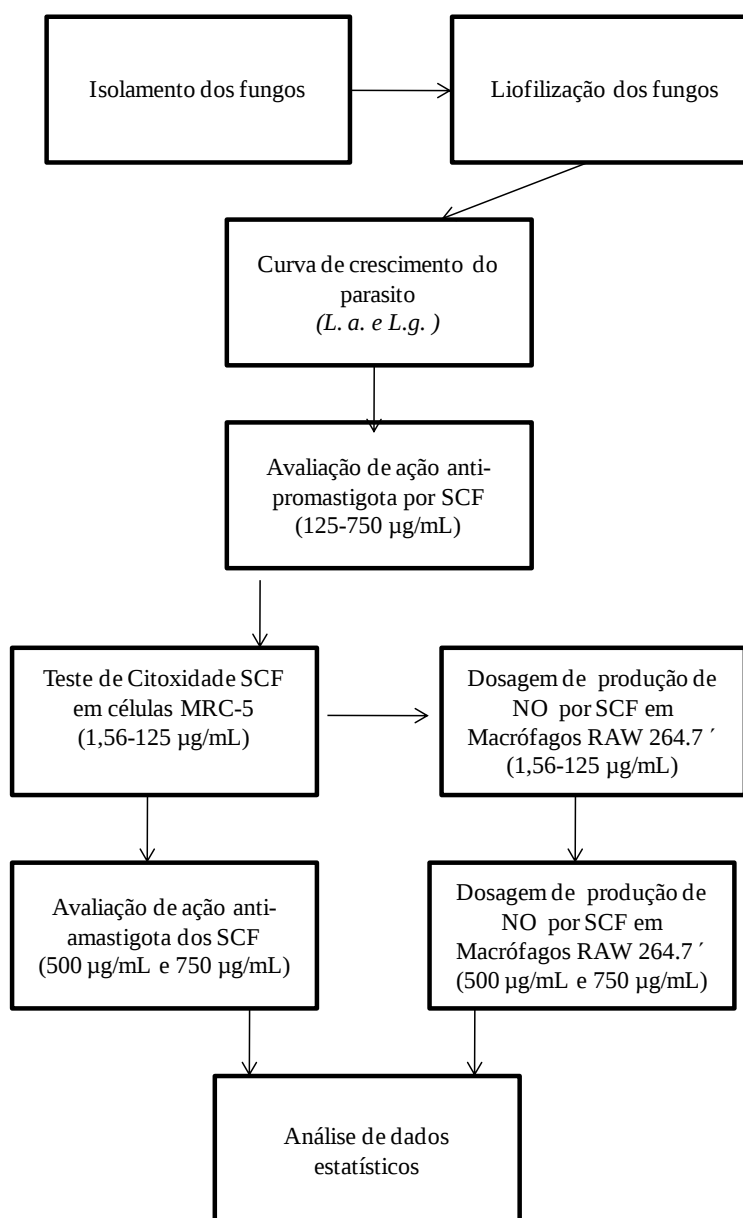


Figura 7 Organograma de realização de experimentos com sobrenadantes de cultura de fungos (SCF).

## **5.1 Obtenção de sobrenadantes de culturas fúngicas**

### **5.1.1 Espécimes fúngicos**

Os sobrenadantes de culturas fúngicas foram obtidos por meio de bioprocessos utilizando seis espécies de Ascomicetos isoladas de amostras de solo da região Amazônica na Reserva Florestal Adolpho Duke e depositadas no INPA pela equipe do Dr. João Vicente Braga de Souza. As espécies escolhidas, seguidas por código e número de depósito foram:

1. *Aspergillus calidoustus* - LM5744
2. *Aspergillus fumigatus*- LM6020
3. *Fusarium solani* - LM5733
4. *Penicillium citrinum* - LM5749
5. *Penicillium esclerotiorum* - LM5772
6. *Penicillium purpurogenum* - LM5994

### **5.1.2 Obtenção dos sobrenadantes de cultura fúngica**

O bioprocesso para produção dos sobrenadantes de cultura de fúngica foi feito por meio de cultivo submerso, realizado previamente pelas bolsistas de iniciação científica Deisiane Aroucha Passos e M<sup>a</sup> do Socorro Ribeiro em projeto anterior. Foram preparados 50 mL de Caldo Batata Dextrose (120 g/L de batata, 10 g/L de dextrose) para cada Erlenmeyer (volume de 150 mL). Nesse meio foram inoculados  $1 \times 10^4$  esporos/mL dos fungos a serem estudados e em seguida, as amostras foram incubadas por 14 dias, sob agitação orbital 130 RPM a 25 °C. Após esse período, a biomassa foi separada por filtração (filtro qualitativo tipo celulose Whatman n.4). O filtrado foi submetido a microfiltração a 0,22 µm (Millipore) e depois liofilizado. O concentrado obtido foi reconstituído em meio RPMI 1640 (Inlab Diagnostica) e submetido à determinação da atividade anti leishmania.

## **5.2 Atividade anti leishmania dos sobrenadantes fúngicos contra as formas promastigotas *in vitro*.**

### **5.2.1 Manutenção dos parasitos e preparo de massa parasitária**

Foram utilizadas duas cepas de referência de *Leishmania* spp.: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) cedidas pela Fundação de Medicina Tropical (FMT). Os parasitos foram cultivados em garrafas

de cultivo em meio RPMI 1640 completo (Inlab Diagnostica), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (aquecido a 56°C por 1h) – SFBi (Gibco), pH 7.0 e mantidos em estufa à 25°C de acordo com Jaffe *et al.* (1984). Para a criopreservação das formas promastigotas, as culturas foram centrifugadas a 130 g por 10 min a 10°C e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 (Inlab Diagnostica) completo e passado para microtubos de 1,5 mL. Em seguida, os parasitos vivos foram centrifugados em 1800 g por 15 minutos a 10 °C. Foi feita então a retirada do sobrenadante e a adição da solução de criopreservação ao precipitado. Em seguida, foi realizado o processo de congelamento: primeiramente o tubo com parasitos foi resfriado em refrigerador à 4°C por 20 minutos, seguido por freezer -20°C por mais 20 minutos e por fim a amostra foi conservada em freezer à -80°C.

### 5.2.2 Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Para a avaliação do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania* spp.,  $1 \times 10^6$  promastigotas/mL foram inoculadas em meio de cultura RPMI completo e incubadas em estufa a 25°C +/- 1°C - pH 7, por dez dias em garrafa de cultivo. A cada 24 horas, foram retiradas alíquotas, diluídas (10 µL da cultura de parasitos em 740 µL de NaCl 9%) e em seguida foram adicionados 250 µL azul de tripan 10%. Em seguida, foram retirados 10 µL desta diluição para quantificação em câmara de Neubauer (RGB), com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 400 X. A média aritmética das contagens foi utilizada para calcular o número de parasitos em 1 mL de cultura. Para os estudos, foram utilizadas as formas promastigotas de cultivo axênico na fase inicial logarítmica, na qual ocorrem as formas consideradas infectantes (FUMAROLA *et al.*, 2005). A curva foi construída utilizando o software Excel®Microsoft.

### 5.2.3- Determinação da atividade anti leishmania e da concentração inibitória 50% (CI50)

Antes dos experimentos, foi realizada observação da motilidade flagelar e morfologia do parasito (BRAZ, 2014). A atividade anti leishmania dos compostos foi avaliada utilizando-se dois parâmetros: o crescimento (atividade leishmanioestática) e a mortalidade (atividade leishmanicida) das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

Para a realização do bioensaio, as formas promastigotas foram centrifugadas a 1800 g por 15 minutos, lavadas em solução salina estéril, diluídas e contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para obtenção da concentração parasitária de  $1,5 \times 10^6$  parasitos/mL.

Os caldos metabólicos liofilizados foram solubilizados em meio RPMI completo. Os controles negativo e positivo foram: meio RPMI completo e Glucantime™ na concentração de  $3 \times 10^4$  µg/mL, respectivamente. As concentrações para avaliação dos extratos filtrados foram de 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL e 125 µg/mL. Cada alíquota apresentou volume final de 200 µL por réplica contendo inóculo com  $1,5 \times 10^6$  parasitos/mL, concentrações amostrais de extratos filtrados trabalhadas e meio RPMI. O experimento foi realizado em triplicata.

A atividade dos extratos foi avaliada pela inibição do crescimento e pela mortalidade de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* após incubação nas diferentes concentrações por de 24, 48 e 72 horas, na temperatura de 25°C em estufa. Os parasitos foram diluídos em alíquotas de (1:100) e corados com Azul de Tripán (Vetec), em seguida foram retirados 10 µL que foram quantificados por contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico (400X). Em seguida, foram calculadas as médias e desvios padrão do número absoluto e porcentagens de parasitos vivos e mortos. Os valores de  $CI_{50}$  foram calculados através do cálculo de regressão da reta no programa Excel®Microsoft.

### **5.3. Atividade anti-leishmania *in vitro* em amastigota**

#### **5.3.1 Obtenção, cultivo e criopreservação de macrófagos de linhagem RAW 264.7**

Os macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram cedidos pelo laboratório de Análises Biológicas da Faculdade de Farmácia da UFAM. A manutenção, o cultivo e a análise das células RAW 264.7 foram realizados no Laboratório de Virologia do INPA. As células foram cultivadas em garrafas de 45 mL para cultivo celular com 5 mL de meio RPMI 1640, pH 7, completo suplementado com glicose e 10% de SFBi e mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 25°C. A cada dois dias a garrafa foi observada para verificação de contaminação e crescimento celular. Quando necessário foi realizada a troca de meio e criopreservação de células.

Para a criopreservação o meio foi retirado e descartado, e a garrafa lavada com 5 mL de salina tamponada com fosfato (PBS).Então, foram adicionados 3 mL de tripsina 0,05% (Gibco). Após 3 minutos, foram adicionados 6 mL de meio RPMI 1640 na garrafa para inativação da enzima. O líquido com Tripsina, meio e células que se soltavam da parede da garrafa foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuscitado em 1 mL de RPMI+10% SFBi. Em seguida, retiravam-se 10µL de suspensão para contagem em câmara de Neubauer. O meio de cultura foi acrescentado para

obtenção de volume com 50% de células, 40% de SFBi (400 µL) e 10% de DMSO (100 µL) em um tubo de criogênico. O tubo então era levado ao refrigerador à 4°C por uma hora, em seguida para o freezer -80°C por 48 horas à 72 horas para então ser criopreservado em nitrogênio líquido (-185°C).

### 5.3.2 Ensaios de citotoxicidade *in vitro* com fibroblastos de pulmão (MRC-5)

A linhagem celular utilizada foi MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). As células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de Penicilina (100 U/mL<sup>-1</sup>) - Estreptomicina (100 µg/mL<sup>-1</sup>) (Gibco), mantidas em estufa com atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Os caldos metabólicos fúngicos liofilizados foram solubilizados em água, e, para o ensaio, as amostras *A. calidoustus*, *F. solani*, *P. esclerotiorum*, *P. citrinum* e *P. purpurogenum* foram diluídas seriadamente em meio de cultura nas concentrações de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL.

Com o intuito de analisar a viabilidade celular das células da linhagem MRC-5 na presença de diferentes concentrações das substâncias testadas, o teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed *et al* (1994). As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM alta glicose completo, e transferidas para placas de 96 poços na concentração celular de  $0,5 \times 10^4$  células/ poço. A placa foi então mantida em cultura por 24 h em estufa a 37°C, pH 7, com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, foram adicionados os sobrenadantes fúngicos nas concentrações supramencionadas. O grupo controle negativo recebeu somente meio de cultura, enquanto no controle positivo foi utilizado o fármaco Doxorrubicina na concentração de 20 µM. Decorridas 24 h de tratamento, foram acrescentados dez microlitros da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4%, 1:20 em meio de cultura sem soro fetal bovino) em cada poço da placa. Após 3 h de exposição ao Alamar Blue, retirando-se da estufa meia hora antes do término, foi realizada a leitura em leitor de microplacas de Elisa (marca Beckman e Coulter) na faixa de 540 nm excitação e 585 nm de emissão. Os dados foram analisados em relação ao controle positivo utilizando o Programa de estatística GraphPad Prisma versão 5.0.

### 5.3.3 Infecção dos macrófagos com *Leishmania* spp

Os sobrenadantes de cultura testados foram *A. calidoustus*, *F. solani* e *P. purpurogenum* que obtiveram resultados negativos quanto à citotoxicidade em células de linhagem humana e positivos quanto à atividade contra as formas promastigotas.

Macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio Dmen (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 1% de Penicilina ( $100 \text{ U/mL}^{-1}$ ) - Estreptomicina ( $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e glicose. As células foram mantidas à  $37^\circ\text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  durante o cultivo.  $10^4$  células/mL foram incubados em meio Dmen (Gibco) em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 48 h para adesão das células à lamínulas dispostas em placa de cultivo celular com 12 poços. Após este período, os macrófagos foram infectados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* por mL amostral. Em seguida, os poços foram lavados com tampão fosfato para a remoção dos promastigotas não interiorizados.

#### 5.4.1 Quantificação de nitrito (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi mensurada pela dosagem de seu produto de degradação, nitrito, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a Sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Alemanha) em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com Naftil-1-etilenodiamina (Merck, Alemanha) formando um composto azo estável de coloração púrpura que pode ser quantificado espectrofotometricamente GREEN *et al*, 1982). Para a determinação da produção de óxido nítrico,  $50 \mu\text{L/mL}$  do sobrenadante celular foi submetido à reação com igual volume dos reagentes de Griess (sulfanilamida + naftil).

Para o preparo do reagente de Griess foram utilizadas soluções estoque de naftil-1-etilenodiamina 0,1% em água destilada e de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (CFQ - Química) a 5%. As soluções foram misturadas na proporção 1:1 formando o reagente de Griess.

Após a incubação por 15 minutos das amostras com o reagente de Griess, estas foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Colter) a 560 nm. Esta etapa do experimento foi realizada no Laboratório da Cultura de Célula da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Amazonas-UFAM.

Foram testadas nesta etapa as amostras que apresentaram atividade contra promastigotas de parasitas do gênero *Leishmania*: *A. calidoustus*, *F. solani*, *P. citrinum*, *P. esclerotiorum*, *P. purpurogenum*.

#### 5.4 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) em células de linhagem MRC-5

Fibroblastos da linhagem MRC-5 foram cultivados em placa de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço. Após incubação por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, o meio RPMI (contendo células não aderidas) foi retirado e foi adicionado a cada poço 100 µL de meio RPMI suplementado com 1% de SFB contendo 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich). Aos poços também foram adicionados os sobrenadantes de culturas de *A. calidoustus*, *F. solani*, *P. esclerotiorum*, *P. citrinum* e *P. purpurogenum* nas concentrações de 1,56 a 50 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado meio RPMI 1640 com LPS e como controle negativo meio RPMI 1640 sem LPS. Foi também feita um segundo controle positivo com 20 µM de dexametasona, fármaco com atividade anti-inflamatória reconhecida. Depois do tratamento, as células foram incubadas por 24 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, e o sobrenadante celular foi coletado para dosagem de óxido nítrico (NO).

#### 5.5 Determinação da atividade anti amastigotas de *Leishmania* spp. dos sobrenadantes de cultura– Ensaios *in vitro*

Os macrófagos infectados conforme item 5.3.3 foram incubados na presença dos sobrenadantes das culturas fúngicas que apresentaram maior potencial atividade anti leishmania contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. As amostras utilizadas foram *Aspergillus calidoustus*, *Fusarium solani* e *Penicillium purpurogenum* nas concentrações de 500 µg/mL e 700 µg/mL. No controle negativo foi utilizado meio Dmen (Gibco) e no positivo Glucantime™.

Os sobrenadantes filtrados nas concentrações de 500 µL e 750 µL foram adicionados aos poços. O experimento foi realizado em triplicata. Após duas horas de incubação em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foi realizada uma lavagem com salina tamponada com fosfato (PBS) e foi adicionado um novo meio de cultura, as amostras foram então, incubadas novamente por 24 horas em estufa 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as lamínulas de vidro foram removidas e as células infectadas foram fixadas e coradas utilizando método Panótico adaptado de acordo com Romanowski (1968).

Realizou-se a contagem do número de macrófagos infectados e do número de amastigotas por macrófagos. A avaliação destes parâmetros foi realizada através de observação em microscópio óptico em aumento de 400x.

### **5.5 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania* spp**

Esta etapa do experimento foi realizada no Laboratório da Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Amazonas-UFAM. Os sobrenadantes do ensaio deescrito no item 5.4 foram utilizados para a dosagem de NO após a infecção por amastigotas e tratamento com as amostras de filtrados fúgicos. A produção de óxido nítrico (NO) foi realizada pela dosagem do nitrito utilizando o reagente de Griess adaptado de Green *et al.*(1982).

Para tal, foram recolhidos 50 µL/mL do sobrenadante celular que foram transferidos para uma placa de 96 poços e submetidos à reação com igual volume dos reagentes de Griess (sulfanilamida + naftil). Foram incubados por 15 minutos e as amostras foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman & Colter) à 560 nm. Além das amostras e controles utilizados anteriormente, foram feitos dois brancos, um com meio Dmen (controle negativo para produção de NO) e uma amostra com células RAW 264.7 estimuladas com LPS (controle positivo para produção de óxido nítrico).

### **5.6 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada de acordo com Zar (1999) no programa Biostat 5.0™. Para diferenças estatísticas significativas foi considerado o valor de  $p < 0.05$ . Para análise de normalidade foi utilizado o teste de Lilifors. Para Análise de variância em promastigotas foi realizado teste de ANOVA dois critérios para dados paramétricos e Teste Friedman para dados não paramétricos. Para o número de amastigotas internalizados e macrófagos contaminados foi utilizado ANOVA: um critério para dados paramétricos e Teste de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos. O cálculo de concentração de inibição de 50% (CI50%) das células viáveis foi realizado através do cálculo de regressão da reta.

## **6. Resultados**

### **6.1 Curvas de Crescimento**

Para analisar a dinâmica do crescimento dos parasitos de *Leishmania* spp., foi realizada a curva de crescimento parasitária, adaptada de Brenner (1961). Em nossos experimentos, foi observado um padrão de crescimento distinto entre as espécies de parasitos. A espécie *Leishmania amazonensis* (Figura 7 – A) apresentou fase logarítmica até o quarto dia de cultivo e

início de fase estacionária no quinto dia. Contudo, para *Leishmania guyanensis* foi verificado o final de sua fase logarítmica no segundo dia e início da fase estacionária no terceiro dia (Figura 7 –B).

Deste modo, foi escolhido o terceiro dia para realização dos experimentos, pois, é durante o final da fase de Log e início da fase estacionária quando há maior concentração de promastigotas metacíclicas, que são consideradas as formas mais infectantes (Mendes *et al*, 2018).

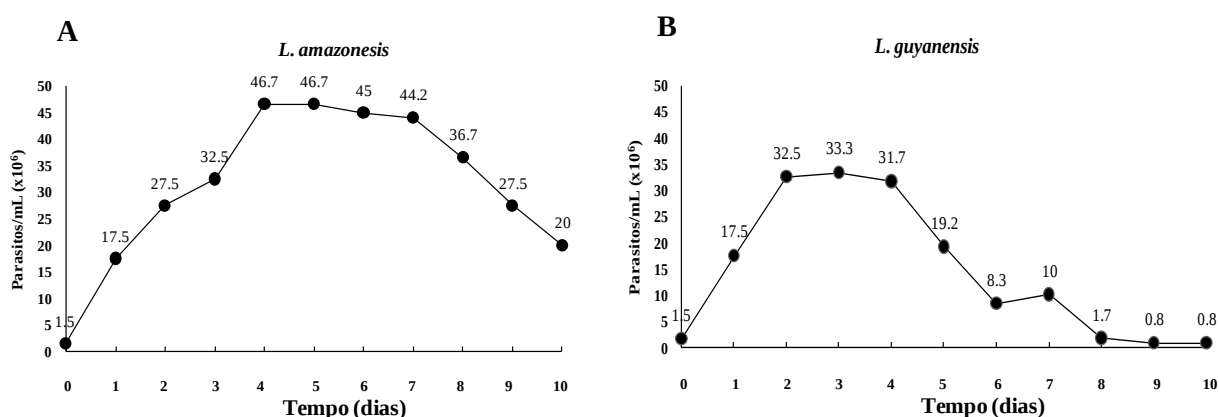


Figura 8 Curvas de crescimento de *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) em 10 dias de cultivo *in vitro*.

## 6.2 Atividade anti leishmania e CI 50 % em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*

Neste trabalho foram testadas diferentes concentrações de sobrenadantes filtrados dos fungos *A. calidoustus*, *A. fumigatus*, *F. solani*, *P. citrinum*, *P. esclerotiorum* e *P. purpurogenum* isoladas do solo amazônico.

O filtrado de cultura de *A. calidoustus* apresentou atividade significativa quanto ao número de indivíduos mortos quando comparado com o controle negativo nas concentrações de 750  $\mu\text{g/mL}$  (48 horas) e 500  $\mu\text{g/mL}$  (72 horas) contra a espécie *L. amazonensis* -  $p=0.013$  (ANOVA) - como visto na figura 8. O CI50% para esta espécie foi de 807,22  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 2). O sobrenadante de cultura também causou um percentual de mortalidade de parasitos semelhante aquele observado com o Glucantime para *L. amazonensis* (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa na eliminação de promastigotas de *L. guyanensis* quando comparado com o controle negativo (Figuras 8 - B).

O sobrenadante de cultura de *A. fumigatus* não apresentou atividade contra *L. amazonensis* (Figura 9-A). Entretanto, este, exibiu maior percentual de indivíduos mortos (60%) em 72 horas que o controle positivo (51,8%) como pode ser observado na Tabela 1, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, este mesmo sobrenadante mostrou potencial leishmanicida contra promastigotas de *L. guyanensis* na concentração de 750 µg/mL em 72 horas, apresentando diferença significativa em relação ao número de parasitos mortos quando comparado ao controle negativo ( $p=0.019$ ; ANOVA) como observado no Gráfico 9- B. Obsevou-se também uma mortalidade superior aquela observada com o controle positivo (Tabela 1). O IC50% foi de 654,6 µg/mL (Tabela 2).

O sobrenadante de cultura de *F. solani*, apresentou atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* em todas as concentrações testadas, porém apenas a concentração de 750 µg/mL mostrou diferença significativa em relação ao controle negativo em 72 horas ( $p=0.0367$ ; ANOVA) – Figura 10/A. Corroborando com nosso resultado, o CI50% deste sobrenadante contra *L. amazonensis* foi de 730,2 µg/mL (Tabela 2). Nas amostras tratadas com 750 µg/mL do sobrenadante de *F. solani* observou-se percentual de mortos de 59,7% em *L. amazonensis* em relação aos 46,4% mortos pelo Glucantime (Tabela 2). Contudo, não foi detectada atividade anti leishmania do sobrenadante contra promastigotas de *L. guyanensis* (Figura 10-B; Tabela 1).

Entre os sobrenadantes de cultura obtidos a partir de espécies do gênero *Penicillium*, apenas *P. purpurogenum* apresentou potencial anti-promastigotas de *L. amazonensis* nas concentrações de 750 µg/mL e 500 µg/mL após incubação por 72 horas ( $p=0.0119$ , ANOVA), como pode ser observado na Figura 11-A. Observou-se percentual de 83.3% de parasitos mortos na concentração de 750 µg/mL, percentual bastante superior aquele observado no controle positivo (55,6% de parasitas) (Tabela 1). O CI50% do extrato de *P. purpurogenum* para *L. amazonensis* foi de 503,67 µg/mL (Tabela 2).

Tanto os extratos de *P. citrinum*, quanto os de *P. esclerotiorum* não apresentaram diferença significativa em suas atividades quando comparados ao controle negativo para as duas espécies de *Leishmania* testadas neste trabalho (Figuras 12 –A/B e 13- A/B).

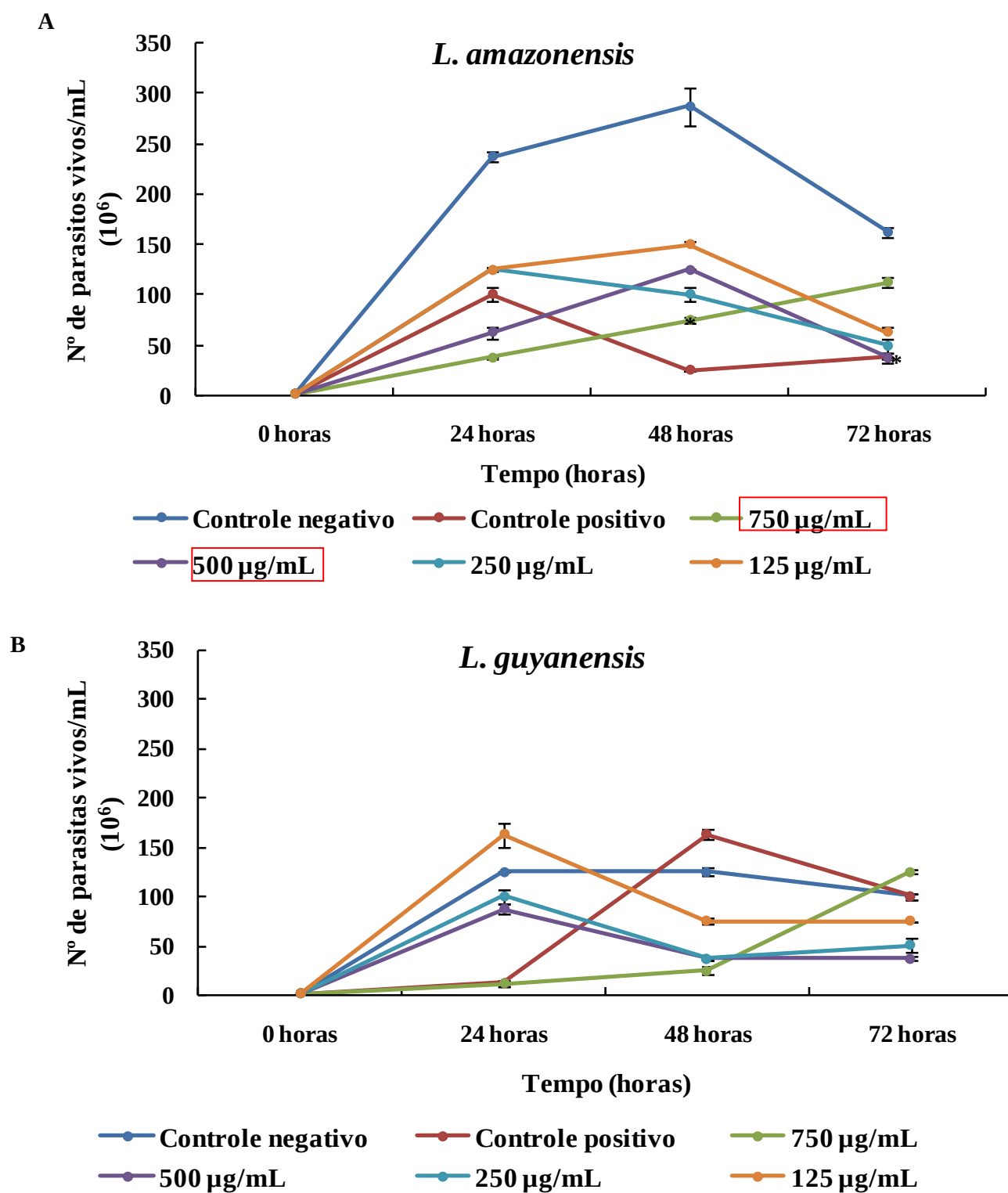
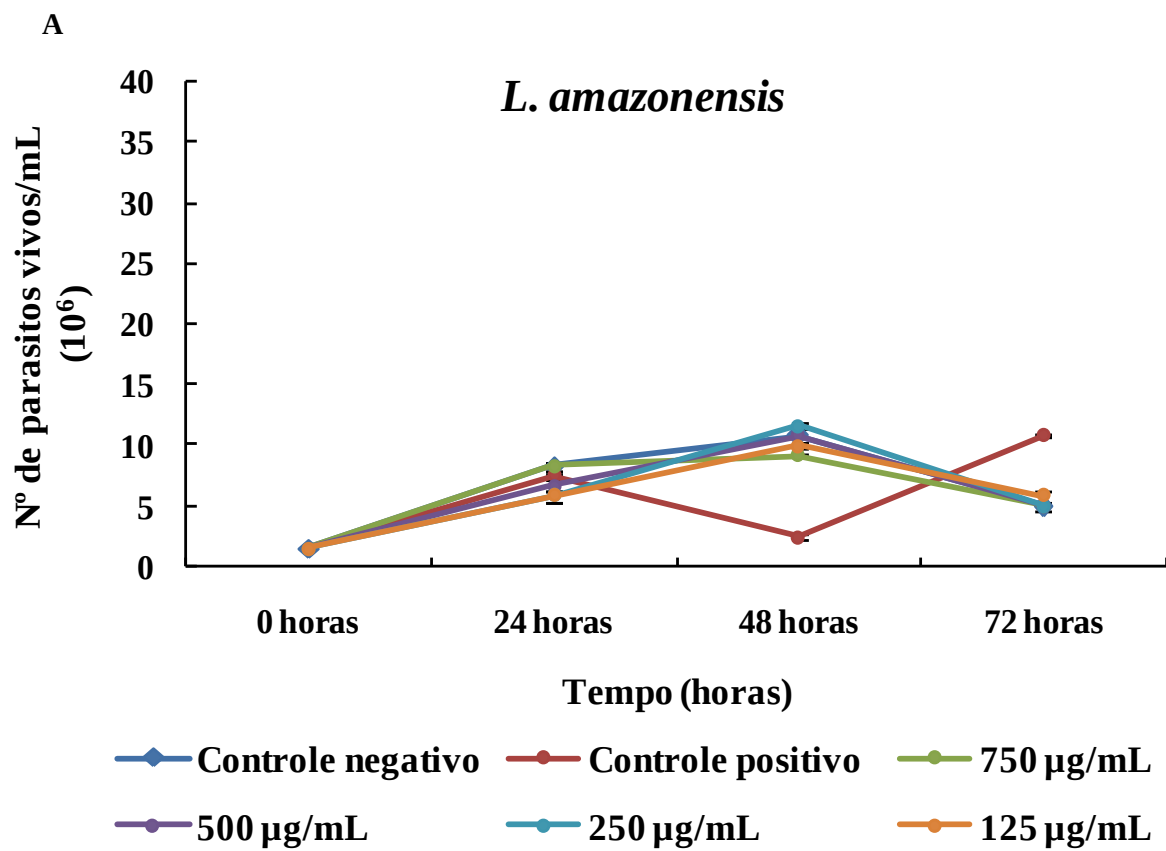


Figura 9 Número de parasitos vivos em controles e concentração de extrato de *A. calidoustus* em *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B). \* Indica diferença entre a concentração e o controle negativo ( $p < 0.05$ , teste de Tukey).



**B**

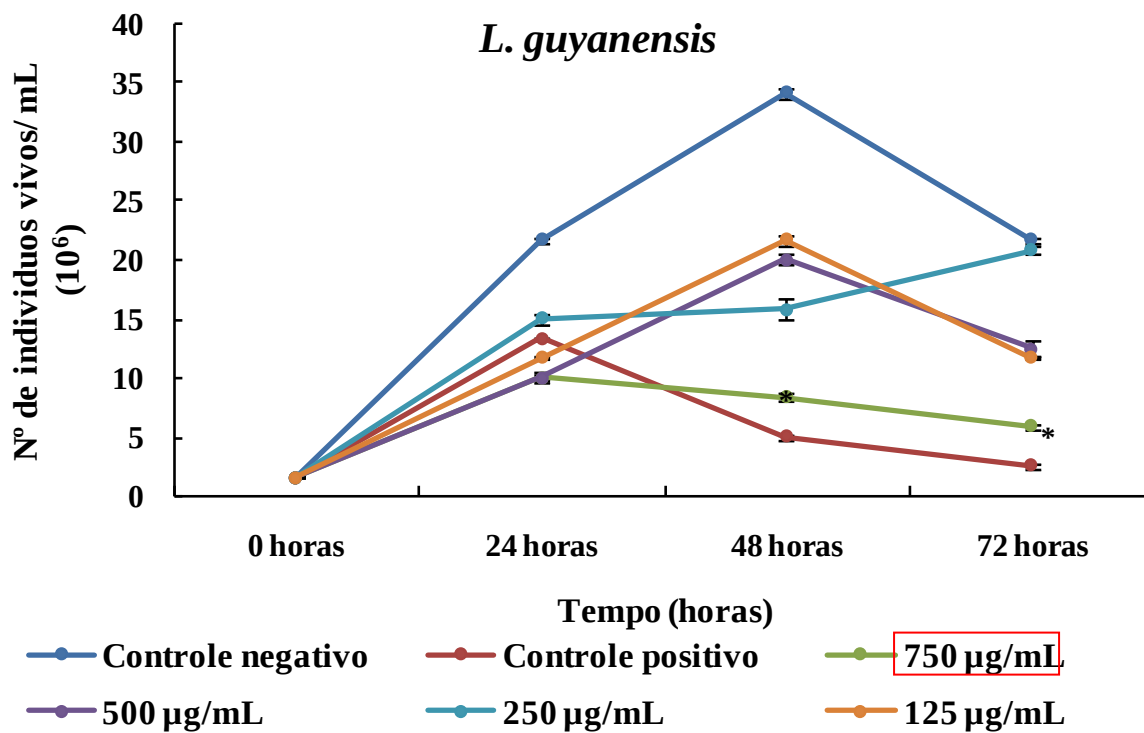


Figura 10 Número de parasitos vivos em controles e concentração de extrato de *A. fumigatus* em *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B). \* Indica diferença entre a concentração e o controle negativo ( $p < 0.05$ , ANOVA; Tukey).

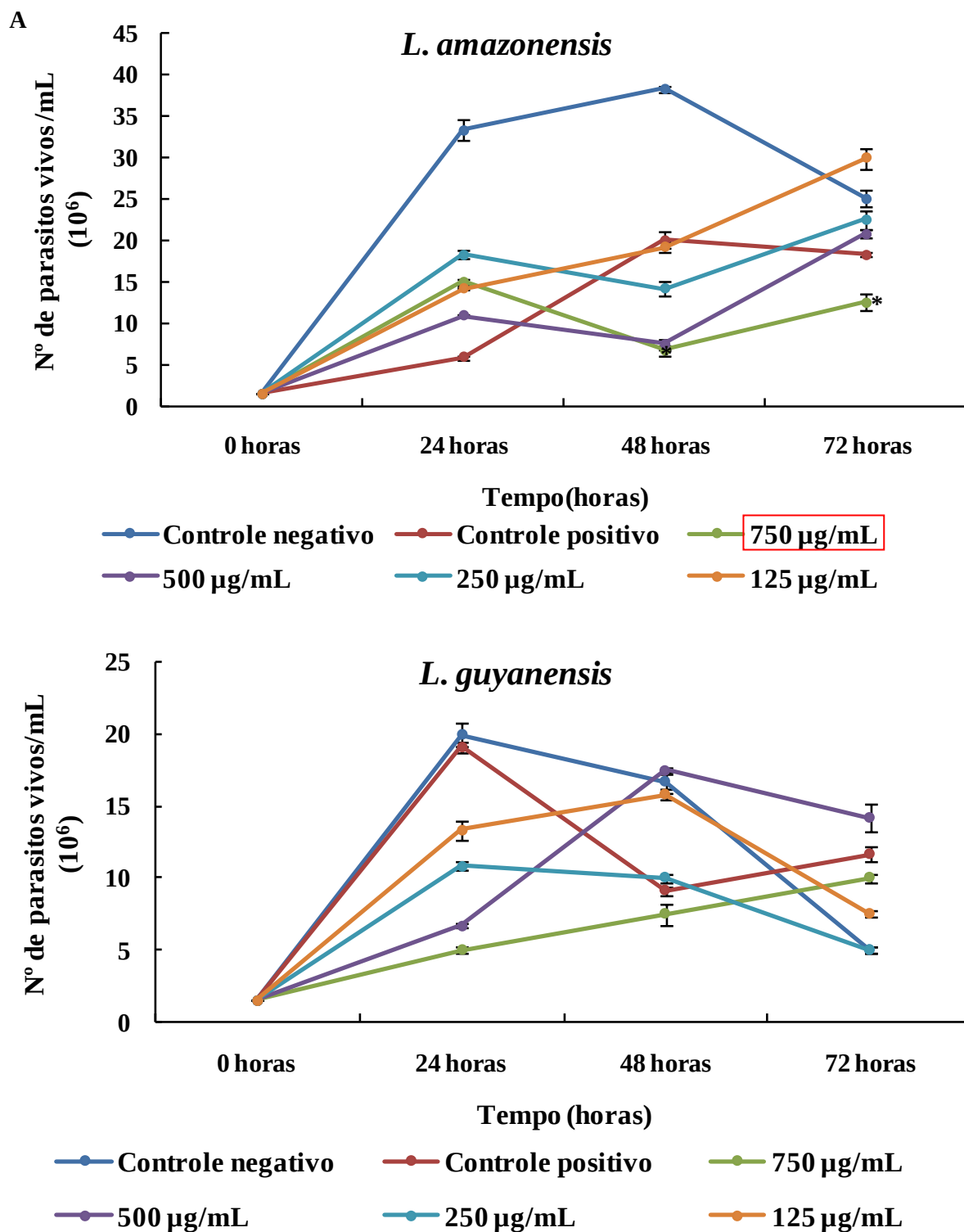


Figura 11. Número de indivíduos vivos durante as 72 em *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) em diferentes concentrações de extrato de *F. solani*. \*denotam diferença significativa entre a concentração e controle negativo ( $p < 0.05$ ; teste de Tukey).

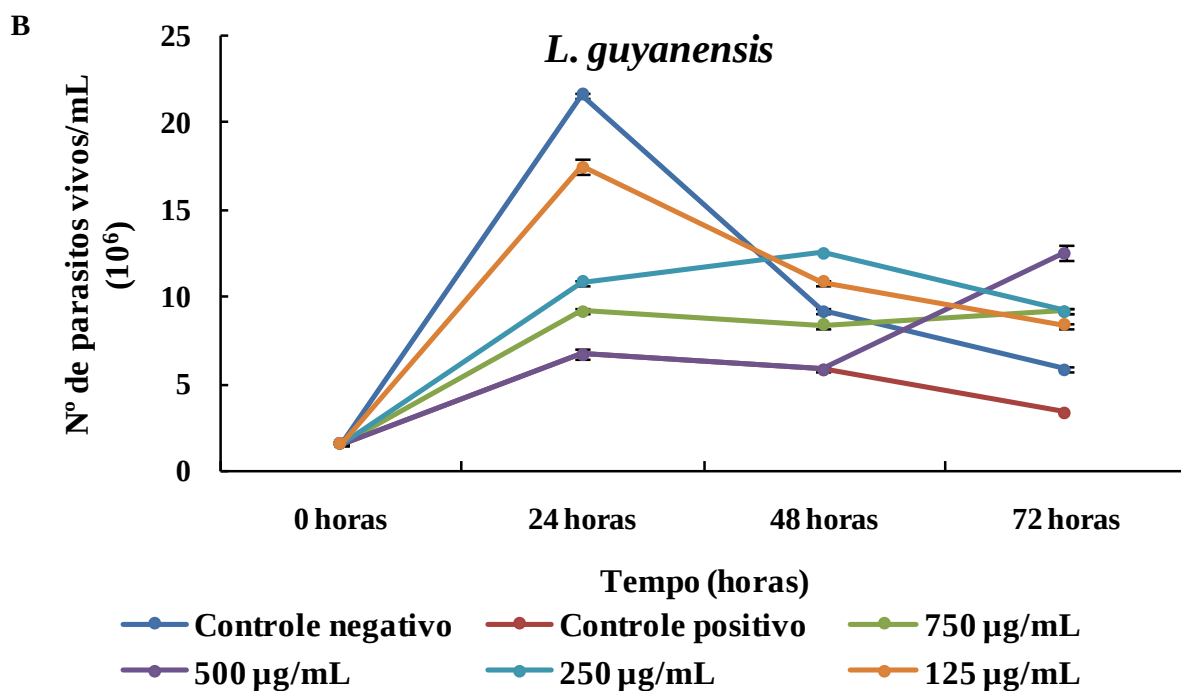
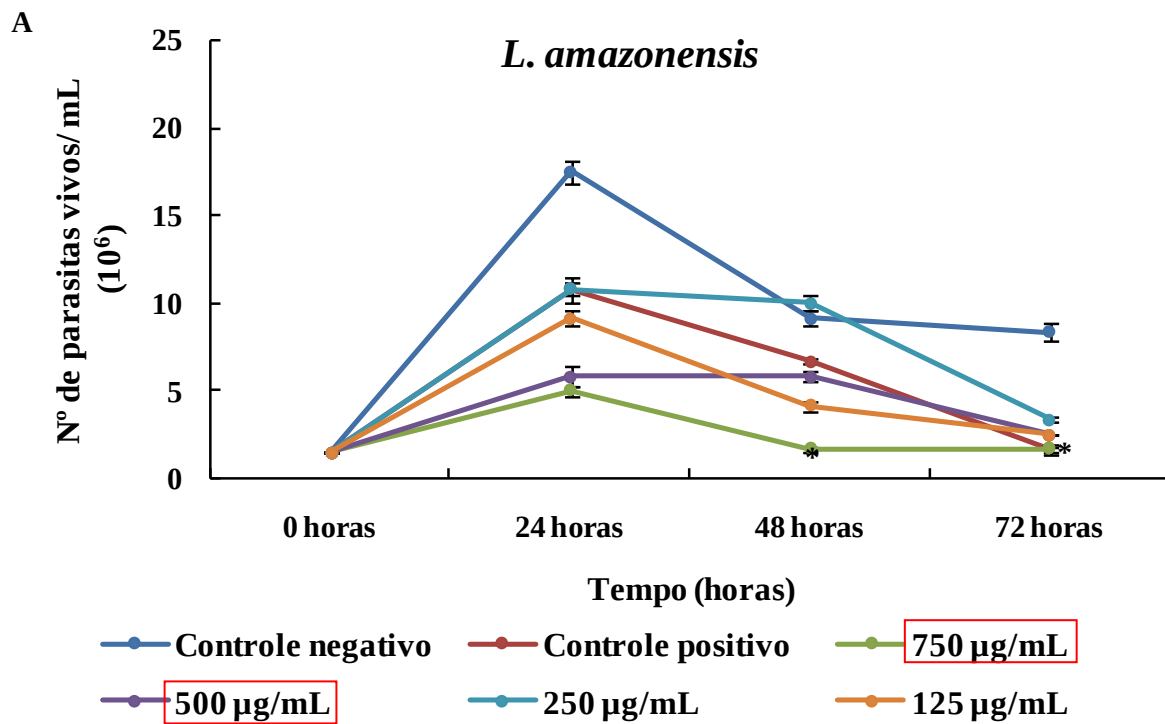


Figura 12 Número de indivíduos vivos durante 72 horas em *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) em diferentes concentrações de extrato de *P. purpureogenum*.

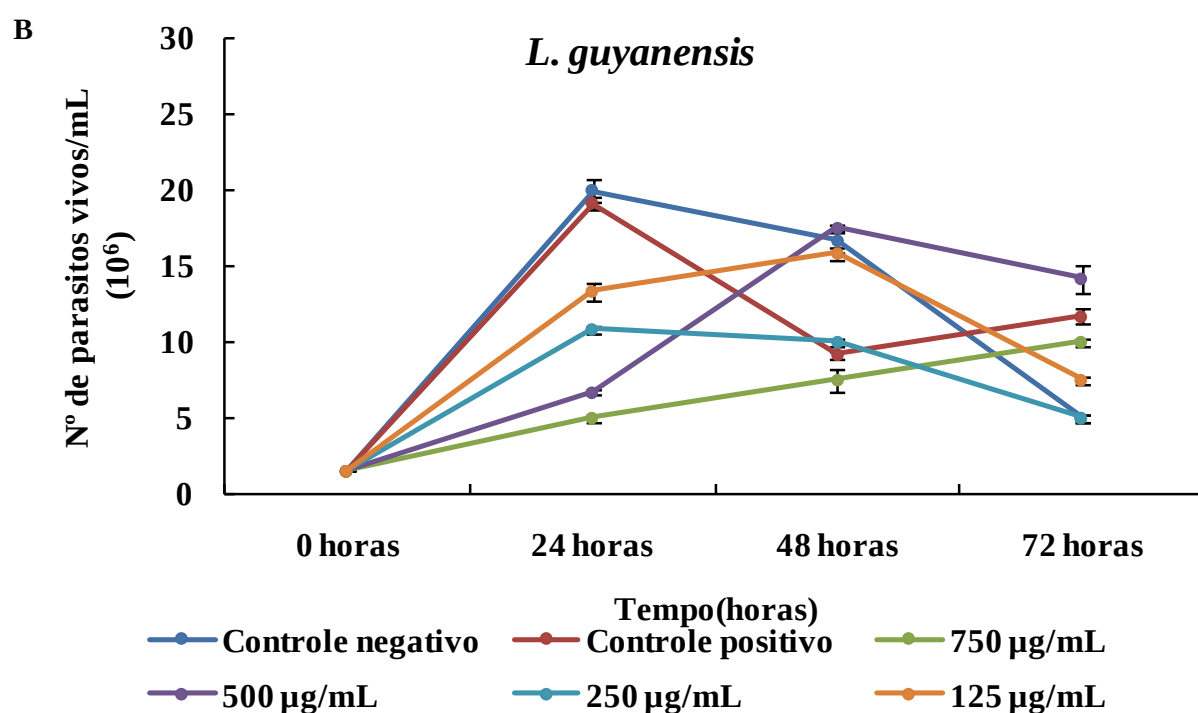
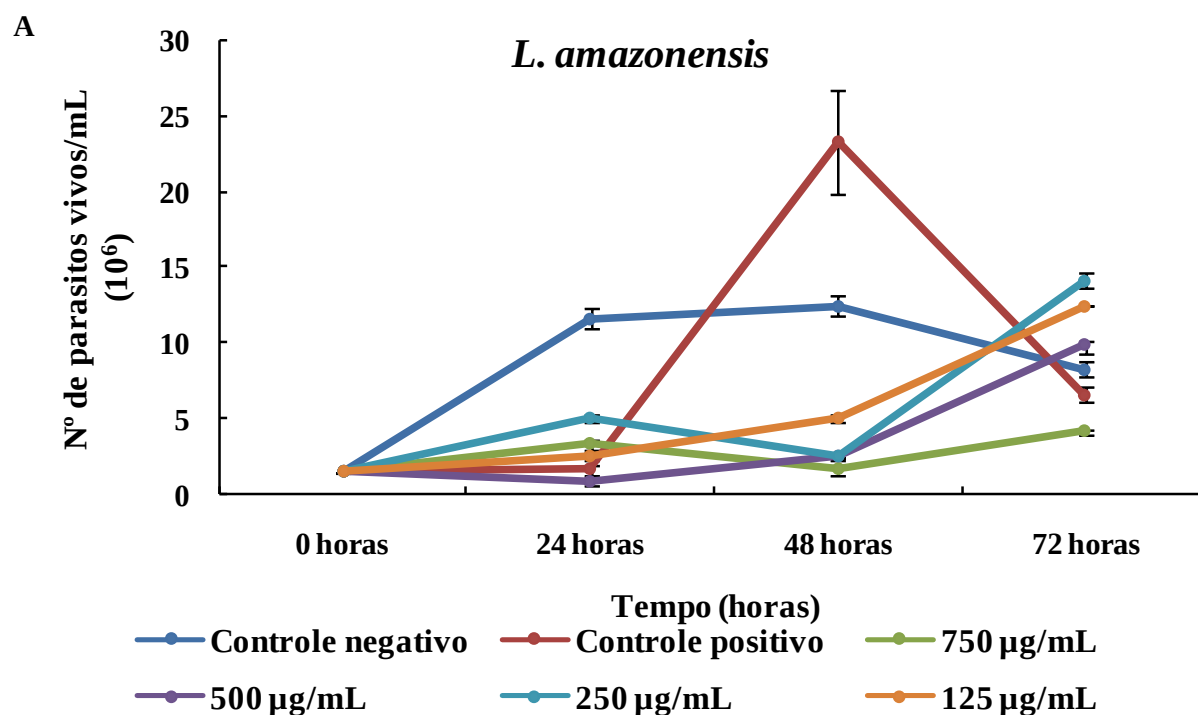


Figura 13 Número de indivíduos vivos durante as 72 em *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) em diferentes concentrações de extrato de *P. citrinum*.

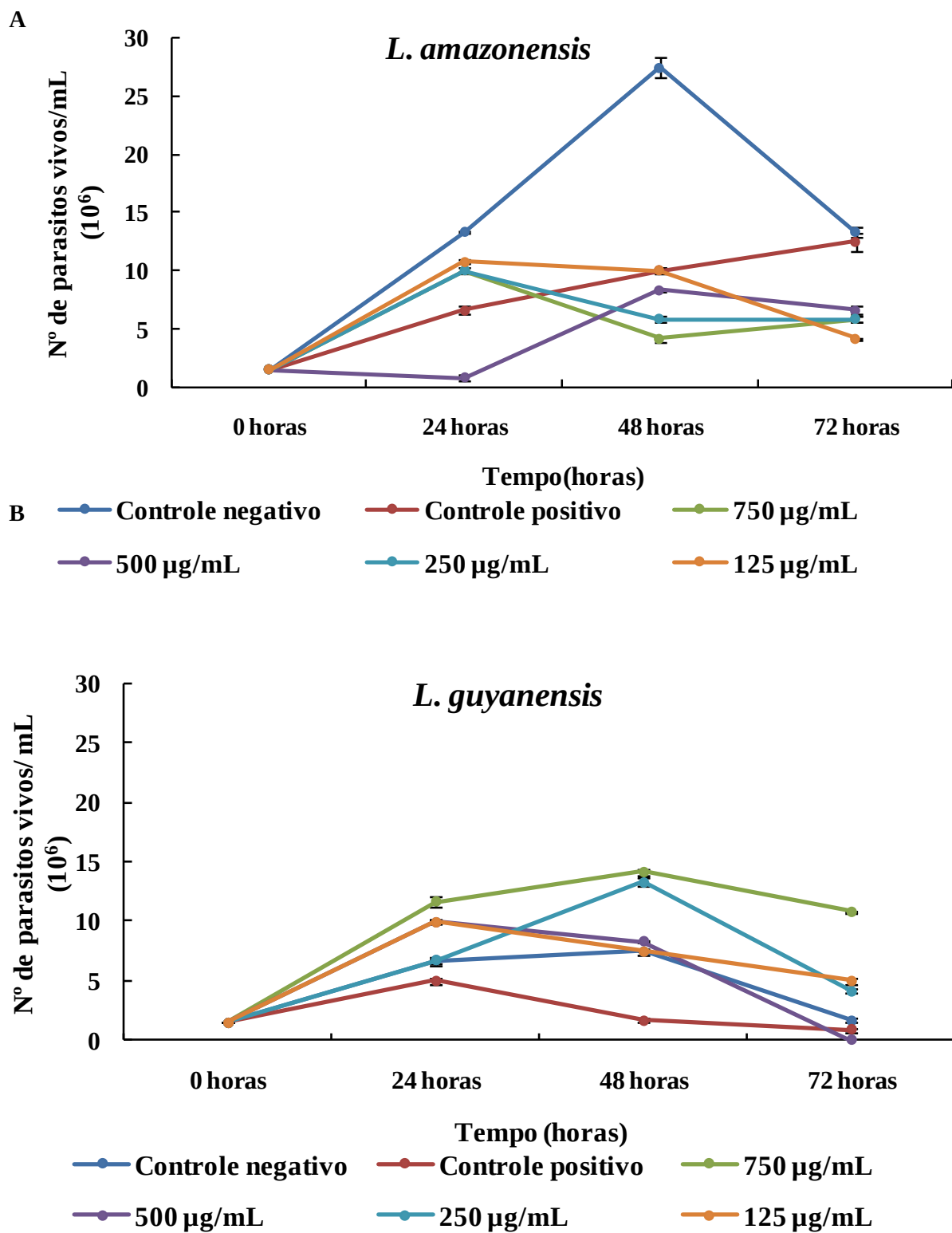


Figura 14 Número de indivíduos vivos durante as 72 em *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) em diferentes concentrações de extrato de *P. esclerotiorum*.

Tabela 1 Percentual de parasitos mortos às 72 horas de cultivo durante tratamento com extratos filtrados.

| Extratos fúngicos       | Controle (+)* |       | 750µg/mL |       | 500µg/mL |       |
|-------------------------|---------------|-------|----------|-------|----------|-------|
|                         | La            | Lg    | La       | Lg    | La       | Lg    |
| <i>A. calidoustus</i>   | 69.8%         | 46.8% | 46.9%    | 68.3% | 69.8%    | 28,3% |
| <i>A. fumigatus</i>     | 51.85%        | 78.3% | 60%      | 61.2% | 58.3%    | 36.6% |
| <i>F. solani</i>        | 43.4%         | 44.9% | 59.8%    | 53.8% | 21.2%    | 49.8% |
| <i>P. citrinum</i>      | 51.2%         | 44.8% | 65%      | 53.9% | 52.6%    | 49.8% |
| <i>P. esclerotiorum</i> | 47.3%         | 88.9% | 68.3%    | 12.2% | 64.4%    | 100%  |
| <i>P. purpurogenum</i>  | 55.6%         | 0%    | 83.3%    | 26.7% | 63.9%    | 14%   |

\*Glucantime®(  $3 \times 10^4$  µg/mL). La corresponde à *L. amazonensis* e Lg à *L. guyanensis*, respectivamente.

Tabela 2 Valores de Concentração Inibitória de 50 % de promastigotas de *Leishmania* spp após 72 horas de exposição a sobrenadantes de cultura fúngica. CI 50 >1000 g/mL foram considerados sem atividade anti-promastigota relevante para o desenvolvimento do estudo.

| Sobrenadantes de cultura | Promastigotas          |                      |
|--------------------------|------------------------|----------------------|
|                          | CI <sub>50</sub> µg/mL |                      |
|                          | <i>L. amazonensis</i>  | <i>L. guyanensis</i> |
| <i>A. calidoustus</i>    | 807,2                  | >1000                |
| <i>A. fumigatus</i>      | >1000                  | 654,6                |
| <i>F. solani</i>         | 730,2                  | >1000                |
| <i>P. purpurogenum</i>   | 503,6                  | >1000                |
| <i>P. citrinum</i>       | >1000                  | >1000                |
| <i>P. esclerotiorum</i>  | >1000                  | >1000                |

### 6.3 Citotoxicidade dos sobrenadantes fúngicos contra fibroblastos humanos de linhagem MRC-5.

Depois da avaliação da atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania* dos sobrenadantes das culturas fúngicas, foram realizados os ensaios para avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos sobrenadantes de *A. calidoustus*, *A. fumigatus*, *F. solani*, *P. citrinum*, *P. purporogenum* e *P. esclerotiorum* contra células de mamíferos (fibroblastos humanos da linhagem MRC-5). Apenas *A. fumigatus* apresentou atividade citotóxica contra os este tipo celular na concentração de 20 µg/mL (Tabela 3).

Nenhuma das outras amostras fúngicas apresentou toxicidade nas concentrações testadas, somente o fármaco de morte Doxorrubicina testado na concentração de 20 µg/mL apresentou valor de CI<sub>50</sub> de 0.3401µM (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de viabilidade celular das substâncias na linhagem MRC-5, após 24 horas de exposição. Os dados estão representados como CI<sub>50</sub> (intervalo de confiança de 95%).

| Amostras               | CI <sub>50</sub> µg/mL<br>(Intervalo de Confiança)* |
|------------------------|-----------------------------------------------------|
| <i>A. calidoustus</i>  | >100                                                |
| <i>F. solani</i>       | >100                                                |
| <i>P.citrinum</i>      | >100                                                |
| <i>P.esclerotiorum</i> | >100                                                |
| <i>P.purpurogenum</i>  | >100                                                |
| Doxorrubicina          | 0.3401 (0.2662 – 0.4345)* µM                        |

#### 6.4- Atividade anti-inflamatória em macrófagos RAW 264.7

Também foi investigada a atividade dos sobrenadantes de culturas de fungos sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos da linhagem RAW 264.7 pré-estimulados com LPS. Observou-se que macrófagos dessa linhagem quando estimulados com LPS produzem uma concentração maior de óxido nítrico quando comparada ao controle negativo (não estimulado) conforme revisto por Schumann (1992).

Quando baixas concentrações de extratos fúngicos (*Aspergillus calidoustus*, *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium esclerotiorum*, *Penicillium purpurogenum*) foram adicionadas aos macrófagos tratados com LPS observou-se um aumento significativo (p<0.01; ANOVA) na produção de óxido nítrico por estes. Em concentrações mais altas, este efeito deixa de ser observado, pode-se até mesmo notar uma tendência a inibição da produção de óxido nítrico (Figura14 A-E).

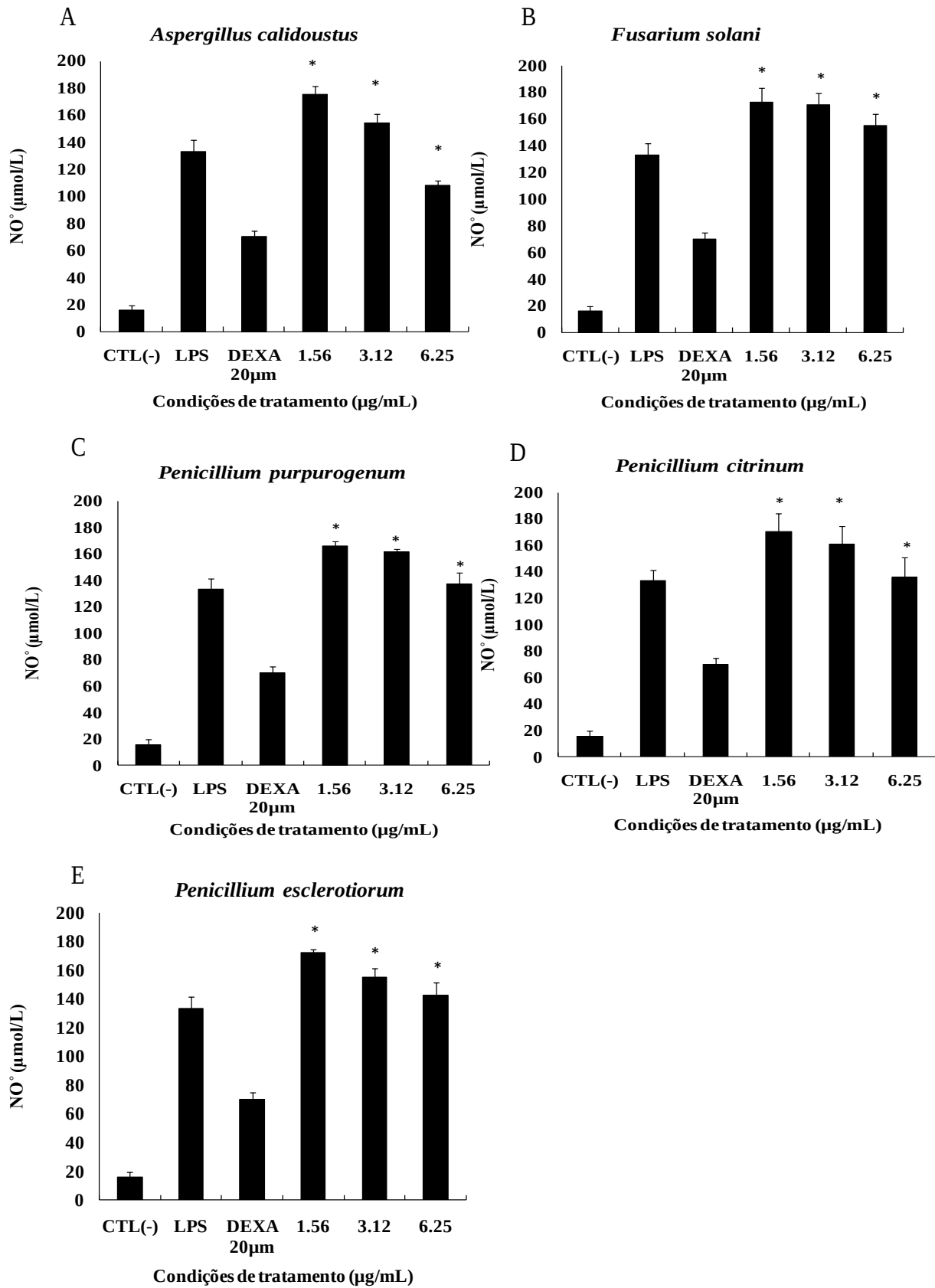


Figura 15 Quantificação do NO nos extratos de *A. calidoustus* (A), *F. solani* (B), *P. purpurogenum* (C), *P. citrinum* (D) e *P. esclerotiorum* (E). \* Denota diferença estatística significativa entre controle com LPS/meio RPMI  $P < 0.01$  (ANOVA).

#### 6.4 Atividade de dos sobrenadantes de culturas fúngicas contra amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*

Não houve diferença estatística entre as atividades do controle negativo e das diferentes concentrações testadas de sobrenadantes de cultura de *A. calidoustus* (Figura 15- A) ou *F. solani* (Figura 16- A) *L. amazonensis* tanto quanto à porcentagem de macrófagos infectados quanto ao número de amastigotas de *L. amazonensis* internalizados (Figura 15- C e 16 - C).

Observou-se atividade de *A. calidoustus* e *F. solani* contra amastigotas de *L. guyanensis* na concentração de 750 µg/mL após 24 horas de exposição aos sobrenadantes. Houve diferença significativa entre o controle negativo e as concentrações testadas de *A. calidoustus* e *F. solani* contra amastigotas de *L. guyanensis* (Figura 15 B-D e 16 B-D) quanto à porcentagem de macrófagos infectados ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis) e quanto ao número de amastigotas internalizados ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis).

Não foi observada diferença estatística entre o controle negativo e o tratamento com *P. purpurogenum* quanto à porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas internalizados para de *L. amazonensis* ou para *L. guyanensis* (Figura 17 A-B-C-D).

Após o tratamento dos macrófagos RAW 264.7 infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* com os sobrenadantes fúngicos nas concentrações de 500 e 750 µg/mL, foi realizada a dosagem de NO produzido pelos macrófagos nos sobrenadantes de cultura. Também foi realizada dosagem de NO em macrófagos infectados não tratados com os sobrenadantes fúngicos (controle negativo), macrófagos infectados tratados com Glucantime (controle positivo) e macrófagos não-infectados estimulados com LPS.

Nesse ensaio, foi observada inibição significativa da produção de NO apenas pelo sobrenadante de cultura de *A. calidoustus* na concentração de 750 µg/mL em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figura 18- A). Este resultado sugere que quando utilizado na concentração mais alta, o sobrenadante de *A. calidoustus* pode ter atividade antiinflamatória em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Por outro lado sobrenadantes de cultura de *F. solani* e *P. purpurogenum* não apresentaram efeito na produção de NO quando comparado ao controle negativo em todas as concentrações testadas em macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. guyanensis* (Figura 18 A-B).

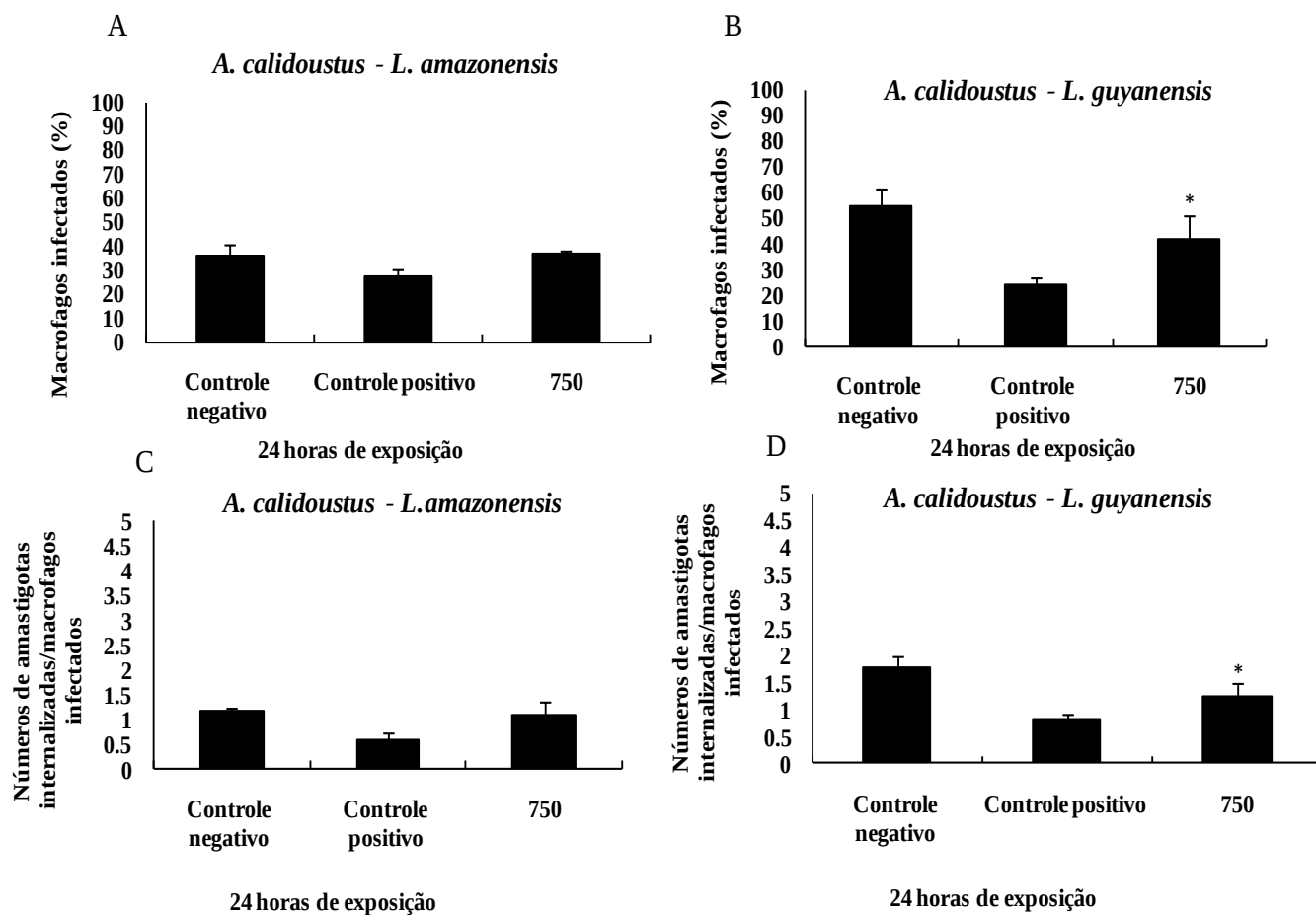


Figura 16. Atividade anti-amastigota em macrófagos de camundongo de linhagem RAW 264.7: Percentual de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) em durante 24 horas de exposição ao sobrenadante de cultura de *A. calidoustus*. Média de número de amastigotas de *L. amazonensis* (C) e *L. guyanensis* (D) internalizadas por macrófagos após 24 horas de exposição aos sobrenadantes de *A. calidoustus*. \* denota diferença estatística significativa entre controle negativo formado por meio de cultura e a concentração 750 µg/mL de amostra.

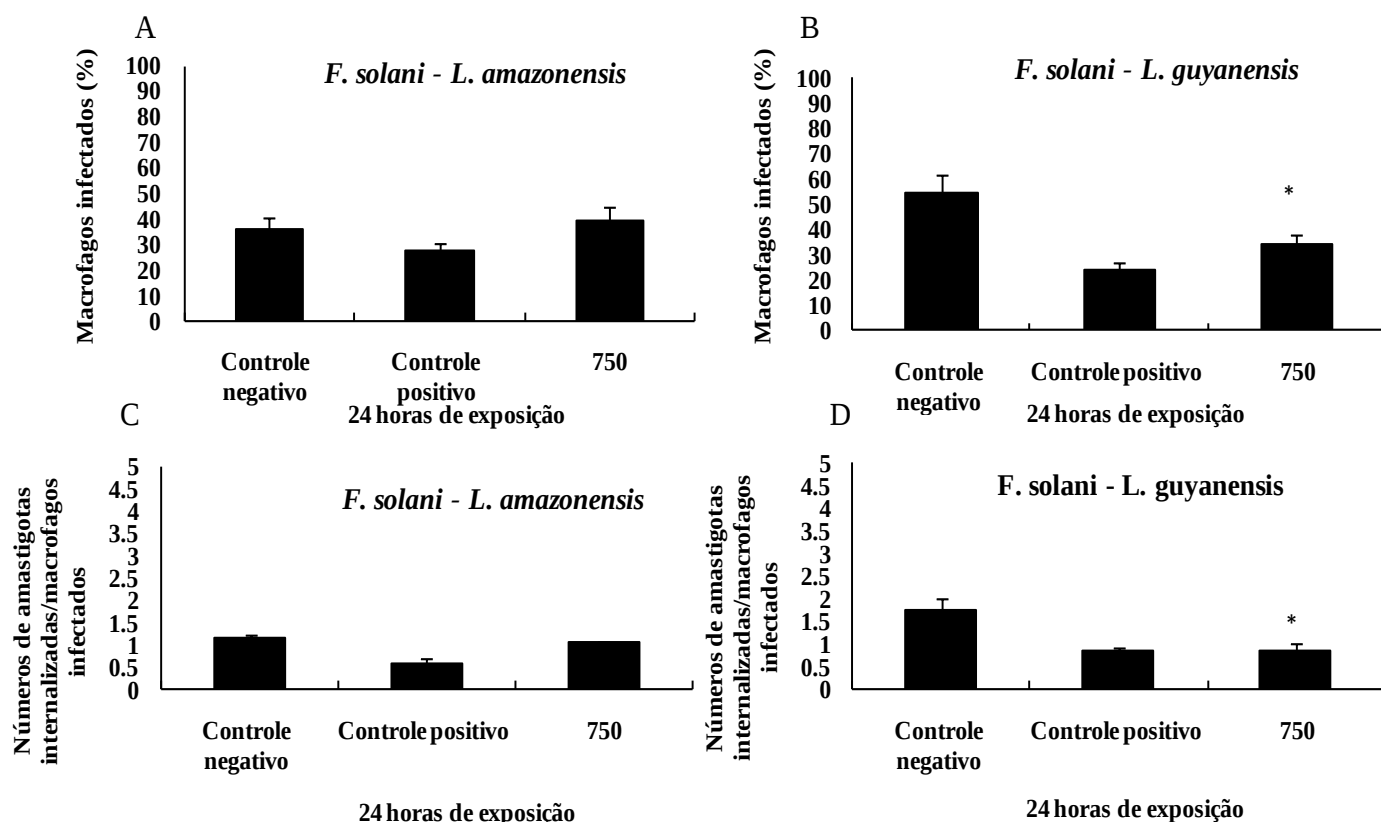


Figura 17 Atividade anti-amastigota em macrófagos de camundongo de linhagem RAW 264.7: Percentual de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) em durante 24 horas de exposição ao sobrenadante de cultura de *F. solani*. Média de número de amastigotas de *L. amazonensis* (C) e *L. guyanensis* (D) internalizadas por macrófagos após 24 horas de exposição aos sobrenadantes de *F. solani*. \* denota diferença estatística significativa entre controle negativo formado por meio de cultura e a concentração 750 µg/mL de amostra.

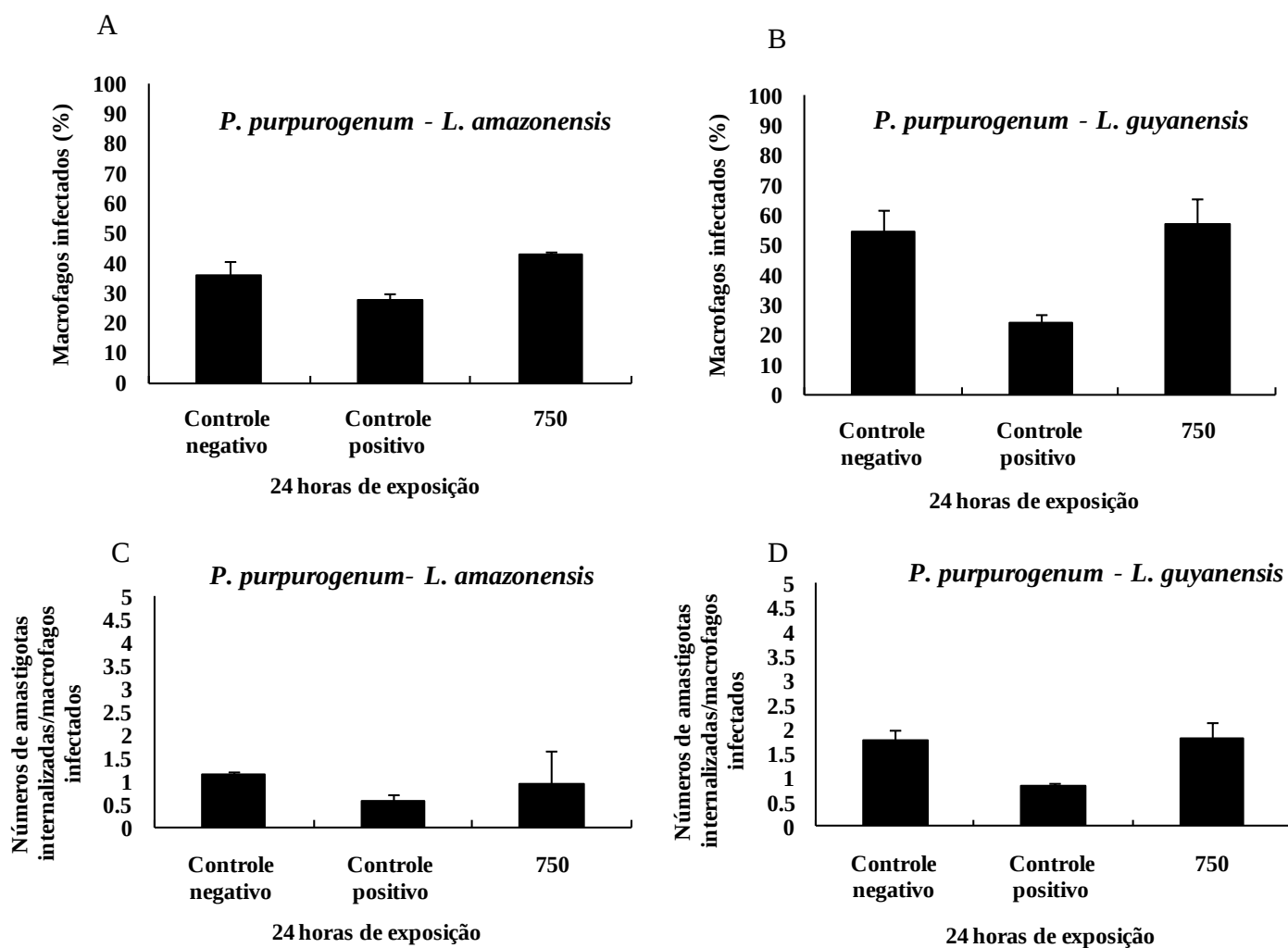


Figura 18. Atividade anti-amastigota em macrófagos de camundongo de linhagem RAW 264.7: Percentual de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) em durante 24 horas de exposição ao sobrenadante de cultura de *P. purpureogenum*. Média de número de amastigotas de *L. amazonensis* (C) e *L. guyanensis* (D) internalizadas por macrófagos após 24 horas de exposição aos sobrenadantes de *P. purpureogenum*.

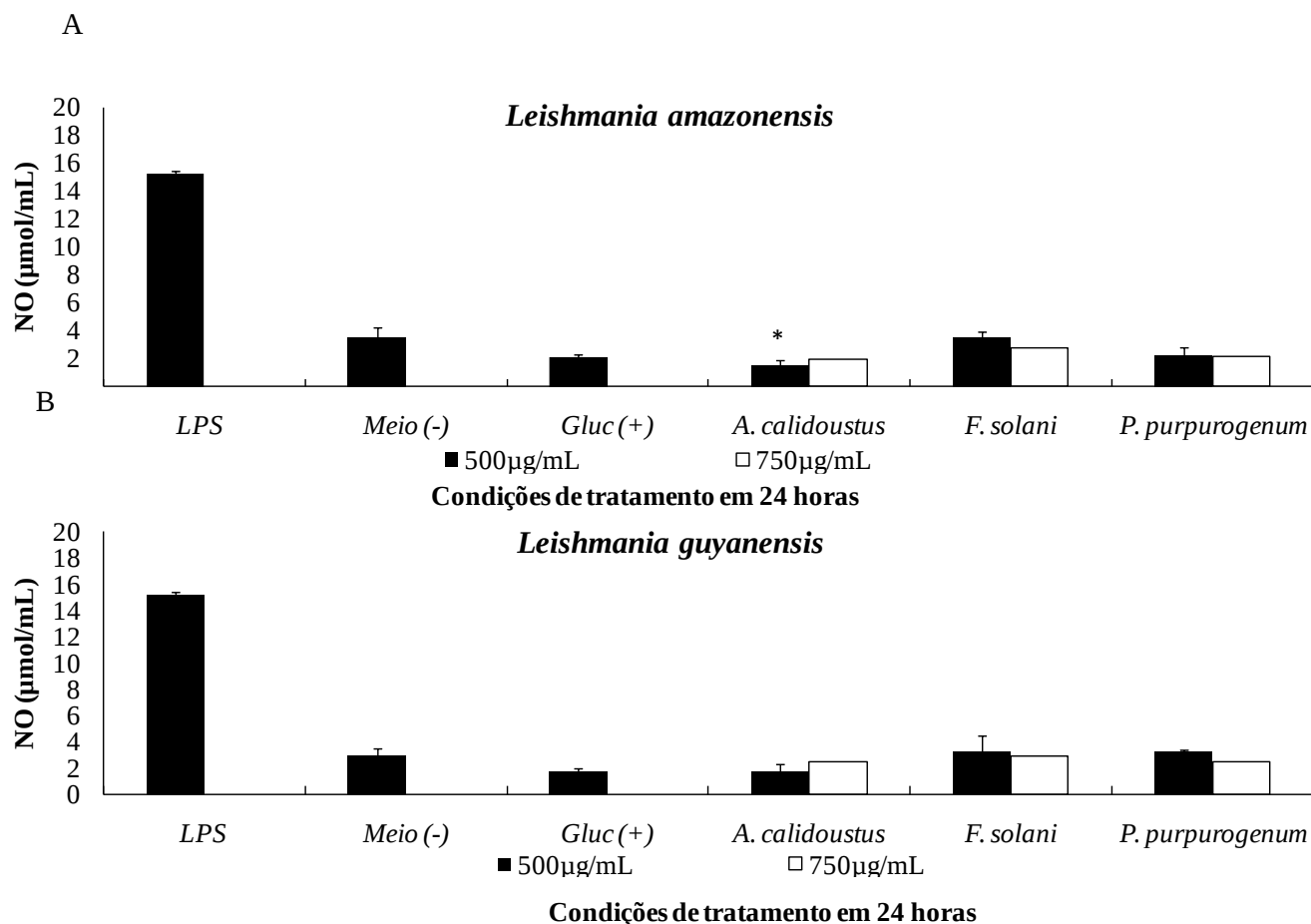


Figura 19. Inibição da produção de NO em macrófagos de linhagem RAW 264.7 infectados com amastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) após 24 horas de exposição aos sobrenadantes de fungos *A. calidoustos*, *F. solani* e *P. purpurogenum* nas concentrações de 500 µg/mL e 750 µg/mL. \* conota diferença estatística significativa ente o tratamento e controle negativo formado por Meio Schneider;  $p < 0.05$  (Kruskall-Wallis).

## 7 Discussão

Existem poucos trabalhos investigando a atividade de produtos fúngicos contra parasitos do gênero *Leishmania*, tornando nosso trabalho pioneiro ao trabalhar com fungos isolados do solo amazônico, considerando-se que adaptações aos aspectos ecológicos deste ambiente podem afetar a produção de metabólitos secundários (FERRARA, 2006).

Neste trabalho também foi analisado o efeito destes sobrenadantes fúngicos sobre células de linhagem humana, verificando-se sua citotoxicidade para estas células e sua capacidade de interferir na produção de Óxido Nítrico.

Inicialmente foi realizada uma curva de crescimento parasitário que é de grande importância para caracterizar e identificar os diferentes estágios de desenvolvimento das espécies

de *Leishmania* quando estas são cultivadas *in vitro* (CAMPOS, 2008). Existem 3 estágios de maior importância durante o ciclo de vida do parasito: amastigota (forma arredondada, sem flagelo aparente, encontrada no interior de células do sistema mononuclear fagocítico), promastigotas pró-cíclicas e promastigotas metacíclica (ambas formas alongadas, com flagelo aparente, encontradas no trato digestório do inseto vetor).

Durante seu desenvolvimento os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas formas: amastigota e promastigota (Shaw, 1990), no entanto a forma promastigota se subdivide em duas as promastigotas procíclicas (não-infectiva) e metacíclicas (infectiva). De acordo com Mendes (2018) em experimentos *in vitro* cada fase é alcançada de acordo com os dias de cultura. Por exemplo, para *L. amazonensis* apresenta promastigotas em forma infectiva durante a fase estacionária e final da fase de log entre o terceiro e sétimo dia cultivo (ACUÑA *et al*, 2017). Já *L. guyanensis* entraria na fase estacionária no quarto dia de cultivo, apresentando maiores concentrações de promastigotas procíclicas até o sétimo dia de cultivo (MENDES *et al*, 2018).

Durante a realização da curva de crescimento foi possível observar diferenças morfológicas entre os parasitos de acordo com a descrição de Sacks e Perkins (1989). Sacks e Perkins (1989) descrevem a forma promastigota infectiva (metacíclica) com um corpo alongado e um flagelo aumentado que o diferencia da forma não-infectiva. Destaca-se que pelos resultados obtidos na curva de crescimento e pela observação morfológica das promastigotas determinou-se os dias mais favoráveis para a realização dos experimentos, favorecendo a utilização da forma mais infectiva do parasita (final de fase logarítmica ou início de fase estacionária). A partir das curvas realizadas (Figura 7 - A/B) conseguimos verificar diferenças claras no perfil de crescimento das cepas estudadas: *Leishmania amazonensis* (PH8) e *Leishmania guyanensis* (M4147).

A fase de log de *L. amazonensis* ocorreu entre o primeiro e terceiro dia. No quinto dia foi observado o final da fase estacionária e o início da fase de declínio (Figura 7 - A). A curva de *L. amazonensis* apresentou resultados condizentes com aqueles encontrados na literatura (CAMPOS 2008; ALMEIDA, 2012; CUNHA, 2017) nos quais o parasito entrou na fase estacionária no quarto dia e declínio ao sétimo dia.

A curva de *L. guyanensis* mostrou um crescimento exponencial acelerado onde no segundo dia de contagem onde foi alcançada a fase estacionária. (Figura 7 - B). Nossos resultados foram similares àqueles descritos por Falcão *et al* (2010), nos quais a fase logarítmica ocorreu entre o primeiro e terceiro dia de cultivo de promastigotas.

O padrão de diferenciação do parasito na fase de metaciclogênese pode variar por fatores intrínsecos à espécie e cepa de *Leishmania*. E também, por fatores externos como o tipo de meio de cultura utilizado, pH, suplementação e temperatura ambiente também podem influenciar no processo levando a fase estacionária de crescimento a ocorrer mais rápida ou tardiamente (SACKS e PERKINS, 1989; BIFELFD e CLOS, 2015; MENDES *et al* , 2018).

Considerando todos estes aspectos o terceiro dia de cultivo foi escolhido para realização dos ensaios tanto com *L. amazonensis* quanto de *L. guyanensis*. Os parasitos coletados neste dia foram utilizados nos ensaios *in vitro* para avaliação da ação leishmanicida dos sobrenadantes fúngicos.

Como visto no Item 6.2, constatamos que dentre as seis espécies de fungos testados: *A. calidoustus*, *A. fumigatus*, *F. solani*, *P. purpurogenum*, *P.citrinum* e *P. esclerotiorum*, apenas os quatro primeiros citados apresentaram atividade anti-promastigotas. *A. calidoustus* (Figura 8 - A), *F. solani* (Figura 10 - A) e *P. purpurogenum* (Figura 11 - A) apresentaram atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* e *A. fumigatus* apresentou atividade contra promastigotas de *L. guyanensis* (Figura 9 - B). O tempo de ação contra os promastigotas também variou de acordo com a espécie de fungo do sobrenadante utilizado e a espécie de parasito.

Essas diferenças nas respostas dos parasitos para os sobrenadantes confirmam as diferenças entre as espécies de *Leishmania* já descritas na literatura: diferenças metabólicas (ESPILAU *et al*, 2013), quanto a sua resistência a resposta imunológica do hospedeiro (SCOTT E NOVAIS, 2016) e quanto a sua virulência (BIFELD e CLOS, 2015).

Observamos também que *L. amazonensis* respondeu pouco ao Glucantime®, droga de primeira escolha utilizada no tratamento da LTA. É descrito que *L. amazonensis* é uma espécie com maior resistência ao Glucantime (BIFELD e CLOS, 2015) de modo que se sugere o uso de pentamidina, a terapia de segunda escolha no Brasil durante o tratamento de LTA causada por *L. amazonensis* (BRASIL, 2019). No entanto devemos resaltar que a identificação da espécie causadora da patologia não é feita rotineiramente durante o diagnóstico, assim a adoção do regime de tratamento mais adequado só ocorre tardiamente, caso não haja resposta do paciente a droga de primeira escolha. Embora existam poucos estudos caracterizando molecularmente a espécie *Leishmania guyanensis*, sabe-se que esta espécie também apresenta grande resistência as terapias utilizadas para leishmaniose (MENDES, 2018).

Em nossos resultados observamos que os sobrenadantes que apresentaram maior efetividade estavam em suas maiores concentrações tanto contra promastigotas quanto em amastigotas. Esse uso de altas concentrações também pode remeter à pouca atividade anti-leishmania pelos sobrenadantes de cultura utilizados no experimento.

Tanto *P. citrinum* quanto *P. esclerotiorum* apresentaram percentual de mortalidade maior que o controle positivo formado pela concentração comercial da droga de primeira escolha. Contudo, não houve diferença estatística significativa quanto ao número de parasitos vivos para com o controle negativo (Figuras 11- A/B e 12 /B). Entretanto, também não houve diferença significativa quanto ao número de vivos entre os controles: positivo e negativo, sugerindo que as cepas de *Leishmania* utilizadas poderiam ser resistentes ao fármaco de primeira escolha.

*A. fumigatus* é reconhecido por seu potencial patogênico, sendo o responsável pela Aspergillose (BEN-AMI *et al*, 2010). Em literatura *A. fumigatus* é descrito como oportunista e causa infecções dermatológicas (VAN BURIK, 1998) e sistêmicas (BRIEGEL, 2005). Apesar de sua patogenicidade, *A. fumigatus* também apresentou atividade inibitória *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* (SILVA *et al*, 2018). Em ensaios realizados por Nascimento, 2018, sobrenadantes deste fungo também apresentaram atividade anti-promastigota para *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, o que corrobora nossos dados (Item 6.2). Também já foi observado em literatura ação leishmanicida contra *L. amazonensis* por um metabólito proveniente de uma biotransformação realizada pelo *A. fumigatus* o derivado-1-da 2-fenilquinolina - DFQ1 (MISCHIATTI, 2016).

Os valores de IC<sub>50</sub> (Tabela 2- Item 6.2.) confirmam a ação leishmanicida dos sobrenadantes de *A. calidoustus* (CI<sub>50</sub>= 638,2 µg/mL), *A. fumigatus* (CI<sub>50</sub>= 654,6 µg/mL), *F. Solani* (CI<sub>50</sub>= 730,2 µg/mL) e *P. purpurogenum* (CI<sub>50</sub>= 503,67 µg/mL) por apresentarem atividade em concentrações entre 500 e 750 µg/mL.

Dentre os quatro sobrenadantes, o que apresentou menor IC<sub>50</sub> em 72 horas foi *P. purpurogenum*. A concentração de inibição de 50 % dos parasitos é um dado importante para melhor entendimento da efetividade das substâncias analisadas (OSÓRIO *et al*, 2007). O CI 50% é um valor estimado para a concentração da substância capaz de matar ou inibir o crescimento de 50% de uma população celular, é um valor que pode ser absoluto ou relativo, dependendo do número de réplicas feitas e intervalo de erro ou desvio (SEBAUGH, 2011). Com base neste aspecto, quanto menor o CI50% maior sua atividade anti-leishmania. Em nossos resultados vistos na tabela 2- Item 6.2, percebemos que nos extratos de *P. esclerotiorum* e *P. citrinum* o CI50%

estava acima de 1000 µg/mL nos levando a acreditar que não há atividade anti leishmania contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Enquanto isso *A. calidoustus*, *A. fumigatus* e *F. solani* apresentaram CI50% com valores próximos as concentrações mais altas estudadas apontando que houve atividade anti-leishmania nas concentrações estudadas.

Em seguida, foram realizados os ensaios de citotoxicidade em células humana. Por se tratar de um trabalho que visa a bioprospecção de um possível fármaco para tratamento de uma doença que acomete humanos, é fundamental que se teste *in vitro* a toxicidade dos sobrenadantes em células humanas antes de se dar continuidade aos experimentos (CAMPOS, 2008). Assim, a citotoxicidade dos sobrenadantes foi testada em fibroblastos humanos (células MRC-5) seguindo o protocolo de Green *et al*, 1982 para verificar a viabilidade celular. A linhagem de células utilizadas no ensaio são provenientes de uma linhagem de fibroblasto humanos normais com grande utilização em teste para análise de produção de reativos de oxigênio e óxido nítrico (ZUCHOWSKA *et al*, 2015).

Em nossos resultados, foi utilizado um intervalo de confiança de 95% de sobrevivência celular para que a toxicidade fosse descartada. Dentre os nossos sobrenadantes apenas *A. fumigatus* foi citotóxico aos fibroblastos humanos de linhagem MRC-5, matando 100% das células na concentração de 20 µg/mL. Por outro lado, nenhuma das amostras restantes apresentou citotoxicidade contra as células MRC-5. O fármaco de morte celular utilizado como controle positivo neste experimento apresentou IC50% de 0.3401 (0.2662 – 0.4345) µM.

A forma amastigota é de difícil estabelecimento em cultura uma vez que apresenta facilidade para contaminação e necessita de cuidados diferenciados durante sua cultura, necessitando de equipamentos próprios para seu cultivo e manutenção. Assim, nossa triagem inicial da atividade dos sobrenadantes fúngicos foi realizada com promastigotas, por apresentar estabelecimento de cultura mais fácil, além de ser a forma que dá início à infecção causadora da doença. Apenas os sobrenadantes com atividade contra promastigotas foram utilizados nos ensaios com amastigotas.

Com relação à sensibilidade das formas amastigotas, foram testados apenas os sobrenadantes de *A. calidoustus*, *F. solani* e *P. purpurogenum* que foram ao mesmo tempo, ativos contra promastigotas e não apresentam citotoxicidade contra células humanas. Destes sobrenadantes testados, apenas os de *A. calidoustus* e *F. solani* apresentaram atividade anti-amastigotas contra *L. guyanensis* com diferença significativa em relação ao controle negativo.

Como relatado anteriormente, o gênero *Aspergillus* é reconhecido por sua patogenicidade (VAN BURICK, 1998). Porém não foi constatada atividade citotóxica contra células humanas por sobrenadantes de cultura de *A. calidoustus* no presente trabalho, sugerindo que é seguro trabalhar com este sobrenadante para uso farmacêutico. No entanto, ensaios mais detalhados devem ser feitos para averiguar a patogenicidade da linhagem, como, por exemplo, o teste em outros tipos celulares humanos.

Vários sobrenadantes de cultura e substâncias isoladas de fungos do gênero *Aspergillus* já foram testados quanto a sua atividade anti-leishmania. Elkhayat *et al* (2015), testaram compostos butenolídeos isolados do fungo *A. terreus* isolado das raízes de *Carthamus lanatus* (Asteraceae), que inibiram o crescimento de *Leishmania donovani*. Silva *et al* (2017) mostrou que outra linhagem de *A. terreus* – F7 – possui 3 compostos, chamados terreína, butirolactona I e butirolactona V, que apresentaram atividade moderada contra *L. amazonensis*. Martínez-Luis *et al* (2012) também encontrou atividade contra *L. donovani*, *T. cruzi* e *P. falciparum* em testes *in vitro* com *Aspergillus* sp. cepa F1544 isolada da folha de *Guapira standleyana* (Nyctaginaceae).

Dentro do gênero *Fusarium*, a espécie *Fusarium oxysporum* apresentou ação contra *L. amazonensis* tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota (FANTI *et al*, 2018). Essa atividade deu-se em função de partículas de prata biogênicas produzidas por *F. oxysporum*. Quando comparamos esta atividade anti-leishmania com aquela obtida em nossos ensaios, observamos uma efetividade muito menor de nosso sobrenadante de cultura. Faz-se necessária a investigação de qual tipo de molécula está relacionada a esta atividade.

A atividade do sobrenadante de cultura de *F. solani* foi maior que a observada no controle positivo (isotionato de metilglutamina em dose comercial) (tabela 2), ou seja, sua efetividade na eliminação tanto de formas promastigotas quanto de amastigotas é mais alta que a vista na droga de primeira escolha. Estudos posteriores serão realizados para investigar a natureza das moléculas envolvidas nessa atividade biológica.

O sobrenadante de *Penicillium purpurogenum* apresentou ação contra promastigotas de *L. amazonensis*, porém não observamos atividade contra amastigotas. Este sobrenadante também não apresentou citotoxicidade contra células humanas. *P. purpurogenum* apresenta grande potencial farmacológico possuindo muitos representantes bioativos (MARINHO *et al*, 2007). Por exemplo, foram isolados vários policetídeos bioativos do fungo *Penicillium janthinellum*, a citrinina, que mostrou ação na inibição de crescimento de *Leishmania mexicana* (MARINHO *et al*, 2007).

Em literatura, é descrita uma grande quantidade de metabólitos secundários por espécies do gênero *Penicillium* apresentam atividade antimicrobiana. Como *P. brevicompactum*, *P. carneus*, *P. citrinum*, *P. crhysogenum*, *P. dipodomyis*, *P. expansum*, *P. flavigenum*, *P. funiculosum*, *P. griseofulvum*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P. persicinum* (FRISVAD e SAMSOM, 2004; COELHO *et al*, 2012).

Foi realizado teste colorimétrico com MTT *in vitro* para avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264-7 não estimulados, estimulados apenas com LPS ou estimulados com LPS e com os sobrenadantes fúngicos. O teste colorimétrico com MTT também foi realizado com macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. guyanensis* e tratados com os sobrenadantes de cultura.

O LPS é um lipopolissacarídeo altamente tóxico derivado de membrana celular externa de bactérias Gram-negativas que pode se ligar à receptores do tipo Toll-like (TLR4) de macrófagos e estimular a produção de NO (SILVA, 2016). Pudemos observar que quando os macrófagos foram tratados com baixas concentrações dos sobrenadantes de cultura houve aumento da produção de NO quando comparado com o controle, sugerindo uma possível atividade pró-inflamatória em pequenas concentrações (Figura 14). O sobrenadante de *A. calidoustus* nas concentrações de 500 e 750 µg/mL causou uma diminuição significativa na produção de NO quando comparado ao controle negativo ( $P < 0.05$ ; Kruskal-Wallis) (Figura 18 – A sugerindo uma possível atividade anti-inflamatória).

A produção de NO é essencial para que resposta imunológica contra a infecção causada por *Leishmanias* seja bem-sucedida (HORTA *et al*, 2012). O NO é liberado em consequência da infiltração celular, sendo produto da catálise de L-arginina em NO e citrulina pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no macrófago. A presença do NO durante a resposta imunológica pode determinar o desfecho da infecção causada pelo parasito (COOKE, 2002; SILVA, 2016) pois, o NO é um importante mediador para a morte de parasitos do gênero *Leishmania* no interior do vacúolo parasitóforo (OLEKHNOVITCH *et al*, 2014).

Neste contexto, dentre os sobrenadantes fúngicos testados nesse trabalho, *A. calidoustus* parece ser o mais promissor para isolamento de substâncias que comprovem sua atividade anti-leishmania nas duas formas. Contudo *F. solani* e *P. purpureogenum* também apresentam potencial para diferentes fármacos, visto que ambos apresentaram atividade contra promastigotas e ausência de citotoxicidade.

No caso de *F. solani* também foi possível verificar atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis* e contra amastigotas de *L. guyanensis*. *P. purpurogenum* por sua vez só apresentou ação contra promastigotas de *L. amazonensis*, porém foi o que apresentou menor CI50% para essa forma, mostrando-se o sobrenadante mais efetivo contra os promastigotas de *L. amazonensis*. Infelizmente *A. fumigatus* mostrou-se citotóxico a células humanas, revalidando seu potencial tóxico a humanos.

## 8 Considerações finais

Os sobrenadantes de filtrados fúngicos *P. esclerotiorum* e *P. citrinum* não apresentaram atividade leishmanicida contra nenhuma espécie de *Leishmania* na forma promastigota. Entretanto, *A. calidoustus*, *F. solani* e *P. purpurogenum* apresentaram ação de caráter espécie-específica contra promastigotas de *L. amazonensis* e *A. fumigatus* contra promastigotas de *L. guyanensis*.

Nenhum sobrenadante nas concentrações testadas com atividade anti-promastigotas de *L. amazonensis* foi citotóxico contra fibroblastos humanos – MRC-5, por outro lado *A. fumigatus* apresentou alta citotoxicidade contra promastigotas de *L. guyanensis* e células humanas. Somente *A. calidoustus* e *F. solani* apresentaram atividade leishmanicida fraca contra amastigotas de *L. guyanensis*. *A. calidoustus* apresentou indícios de atividade anti-inflamatória na concentração de 750 µg/mL em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

## 9. Referências

- Abdossomadi Z, et al. 2016. Mammalian host defense peptides and their implication on combating *Leishmania* infection. *Cellular Immunology*, 309: 23-31.
- Abreu J A S, et al. 2015. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Uningá Review*, 21(1): 55-59.
- Braz P H, et al. 2014. Comparação da sensibilidade do teste parasito lógico em linfonodo, medula óssea e mucosa conjuntival para o diagnóstico de leishmaniose em cães. *Acta Veterinária Brasilica*, 8(4): 274-276.
- Acuña S M, et al. 2017. Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS ONE*, 12(11): e0187186.
- Ahmed S A, et al. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 170 (2): 211-224.
- Alexeieff A. 1917. Mitochondries et corps parabasal chez les flagellés. *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 80: 358-361.

Al-Hatmi A M S, *et al.* 2018. *Fusarium metavorans* sp. nov.: The frequent opportunist 'FSSC6'. *Medical mycology*, 56(1): 144-152.

Almeida, G G. 2012. Complexo anfifílico de antimônio: atividade leishmanicida *in vitro* e eficácia de uma formulação tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea. Dissertação (Mestrado em parasitologia)- Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 81p.

Almeida-Campos F R, *et al.* 2013. Activation of *Leishmania* spp. leishporin: evidence that dissociation of an inhibitor not only improves its lipid-binding efficiency but also endows it with the ability to form pores. *Parasitol Res*, 112(9):3305–3314.

Almeida-Souza F, *et al.* 2016. *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: 51-58.

Andrade M A, *et al.* 2016. Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*,16: 444, 8p.

Andrade-Neto V V, *et al.* 2016. Imipramine alters the sterol profile in *Leishmania amazonensis* and increases its sensitivity to miconazole. *Parasites & Vectors*, 9:183, 8p.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação dos fungos de importância médica - Módulo VII, 2004. Disponível em: Acesso em: 20 mar. 2017.

Aspergillus. 2018. In Encyclopædia Britannica. encontrado em: <<https://academicebbritannica.ez2.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/Aspergillus/9898>> Acesso em 14 de abril de 2018.

Atayde V D, *et al.* 2016. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cellular Immunology*, 309: 7–18.

Atchade E, *et al.* 2017. Fatal invasive aspergillosis caused by *Aspergillus niger* after bilateral lung transplantation. *Medical Mycology Case Reports*, 17: 4–7.

Bailey F, *et al.* 2017. A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(8): e0005739

Bailey M S, Lockwood D N . 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*, 25(2): 203-211.

Bañuls A L, Hide M, Prugnolle F. 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*, 64:1-109.

Basano S A, Camargo, L M A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Bras Epidemiol*, 7(3): 328-337.

Basselin M, *et al.* 1997. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol*, 85: 274-282.

Ben-Ami, R, *et al.* 2010. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *British Journal of Haematology*, 150: 406-417.

Bifeld E, Clos J. 2015. The genetics of *Leishmania* virulence. *Med Microbiol Immunol*, 204(6): 619-34.

Bogdan C, Rölinghoff, M, Diefenbach A. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews* , 173: 17–26.

Bogdan C, Rollinghoff M. 1998. The immune response to leishmania: mechanism of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, 28: 121-134.

Bogdan C. 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends in Immunology*, 36:161-178.

BRASIL, Ministério da Saúde. 2017. *Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana/ Organização: gerência técnica de doenças transmitidas por vetores e antropozoonoses*. - Coordenação de vigilância epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia - Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Brasília, Distrito Federal, Brasil, 62 p.

Bredt D S. 1999. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*., 31:577-596

Brener Z. 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese ( Livre Docência)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, Minas Gerais, Brasil, 90 p.

Briegel J, et al. 1995. Risk factors for systemic fungal infections in liver transplant recipients. *Eur. J. Clin. Microbiol.Infect.Dis.*,14: 375-382.

Brito G, et al. 2014. Clinical and immunological outcome in Cutaneous Leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(4) 2: 617 – 620.

Brittingham A, et al. 1995. *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* , 155(6): 3102–3111.

Brodin T N, et al.1992. Genes selectively expressed in the infectious (metacyclic) stage of *Leishmania major* promastigotes encode a potential basic-zipper structural motif. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 52: 241–250.

Campos, J F F. 2008. Ação leishmanicida in vitro da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo in vivo de sua eficácia no tratamento da Leishmaniose Cutânea experimental. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)- Universidade de Brasília. Brasília, 80p.

Carmo, et al. 2018. Fatores que afetam a sobrevivência de *Aspergillus niger* e sua relação com a podridão vermelha do caule do sisal. *Magistra online*,29(2): 144-153.

Carneiro P P, et al. 2016. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *PLoS ONE* 11(2): e0148084. doi:10.1371/journal.pone.0148084.

Carvalho A K, et al. 2016. Differential recruitment of dendritic cells subsets to lymph nodes correlates with a protective or permissive t-cell response during *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Hindawi publishing corporation: Mediators of Inflammation*, 7068287:12p. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7068287>

Carvalho E M, Bacellar O. 2016. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS ONE* 11(2): e0148084. doi:10.1371/journal.

Castro M M, Cossio A, Velasco C, Osorio L. 2017. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(4):e0005515.

- Cataldo J I, *et al.* 2018. Favorable responses to treatment with 5 mg SbV /kg/day meglumine antimoniate in patients with American tegumentary leishmaniasis acquired in different Brazilian regions. *Rev Soc Bras Med Trop*, 51(6): 769-780.
- Cecílio P, *et al.* 2014. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Frontiers in Immunology*, 5: 1-16.
- Chagas A C, *et al.* 2014. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits XIIa contact activation in human plasma. *PLoS Pathog.* 10: e1003923.
- Chavez R, *et al.* 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, 123: 413-433.
- Coelho L I C, *et al.* 2011. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res*, 108: 671–677
- Coelho R A, *et al.* 2012. Evaluation of potential antagonism in yeasts, seeking biocontrol of spoilage by *Penicillium expansum*. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 32 (1):1879-1892.
- Cooke J P. 2002. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation*, 105(18): 2133- 2135.
- Cunha, B C. 2017. Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato hidroalcoólico da própolis verde. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto- Minas Gerais, 83 p.
- Dantas-Torres F. 2006 Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo, 40 (3): 537-541.
- Diefenbach A, *et al.* 1999. Requirement for type 2 NO-synthase for IL-12 responsiveness in innate immunity. *Science*, 284: 951–955.
- Dorlo T P C, *et al.* 2014. Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. Presented in part: 22nd meeting of the Population Approach Group Europe, Glasgow, United Kingdom, 11–14 June 2013. Abstract 2787: 8p.
- Duarte, *et al.* 2016. Antileishmanial activity and mechanism of action from a purified fraction of *Zingiber officinalis* Roscoe against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, 166: 21-28.
- Elkhayat, E S, *et al.* 2015. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letter*, 31: (94): 1-7.
- Espiau B, *et al.* 2017. Phenotypic diversity and selection maintain *Leishmania amazonensis* infectivity in BALB/c mouse model. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online], 112 (1): 44-52.
- Falcão N M S. 2010. Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *leishmania (viannia) guyanensis* (kinetoplastida: trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de *Caesalpinia ferrea* Martius (fabales: caesalpinaceae). Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 96p.
- Fanti J R, *et al.* 2018. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. *Acta tropica*, 178: 46-54.
- Ferrara M A. 2006. Endophytic fungi. Potential for the production of bioactive substances. *Revista Fitos*, 2 (1): 73-79.

- Figueira, L. P., *et al.* 2017. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. *Acta Amazonica*, 47(1): 47 – 52.
- Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* 10(3): 226–236.
- FMT. Fundação de Medicina Tropical. 2018. In : <  
[http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg\\_2019/Doencas\\_e\\_Agravoslist.asp](http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg_2019/Doencas_e_Agravoslist.asp)> acesso em 3 de abril de 2019.
- Franco F P, *et al.* 2017. Plant–insect–pathogen interactions: a naturally complex ménage à trois. *Current opinion in microbiology*, 37: 54-60.
- Frisvad J C, Samson R A, 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of the food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Stud. Mycol.*, 49: 1–173.
- Fumarola L, *et al.* 2005. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology*, 155(4): 224- 230.
- Gasser R A, *et al.* 1994. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 18(1): 83–90.
- Gontijo B, Carvalho M L R. 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 71-80.
- Green L C, *et al.* 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [N15 nitrates] in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 26: 131-138.
- Green S J, *et al.* 1994. Nitric Oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology Letters*, 43: 87-94.
- Grimaldi G, Tesh R B. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, 6(3): 230-50.
- Gutiérrez-Kobeh L, *et al.* 2013. Inhibition of dendritic cell apoptosis by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Parasitol Res*, 112(4): 1755-62.
- Heinzel, F P, *et al.* 1993. Recombinant interleukin-12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med*, 177: 1505-1509.
- Hendrickx S, *et al.* 2015. In vivo selection of paromomycin and miltefosine resistance in *Leishmaniadonovani* and *L. infantum* in a Syrian hamster model. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 4714–4718.
- Hesse S E, *et al.* 2017. *Penicillium citrinum*: Opportunistic pathogen or idle bystander? A case analysis with demonstration of galactomannan cross-reactivity. *Medical Mycology Case Reports* , 17: 8–10.
- Houbraken, J.; Samson, R.A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*. 70:1-51
- Horta M F, *et al.* 2012. Reactive oxygen species and nitric oxide in Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*, ID: 203818 : 1-11.
- Hurrell B P, *et al.* 2016. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. *Trends Parasitol*, 32: 392–401.

- Ibrahim S R M, *et al.* 2018. Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(3):786-790.
- Inbar E, *et al.* 2017. The transcriptome of *Leishmania major* developmental stages in their natural sand fly vector. *mBio* 8:e00029-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00029-17>.
- Ives A, *et al.* 2014. MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden. *PLoS ONE*, 9(5):e96766.
- Jaffe C L, *et al.* 1984. Production and characterization of species monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immune diagnosis. *J. immunol.*, 133: 440-447.
- Jie Ma J, *et al.* 2017. Aspergivones A and B, two new flavones isolated from a gorgonian derived *Aspergillus candidus* fungus. *Natural Product Research*, 31:1, 32-36, DOI:10.1080/14786419.2016.1207073
- Kamir D, *et al.* 2008. A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J Immunol*, 180 (12): 8250–8261.
- Killick-Kendrick R., *et al.* 1974. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68 (4): 269.
- Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clinics in Dermatology*, 17(3):279-89.
- Kuhad R C, Singh A. 1993. Enhanced production of cellulases by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation of cellulosic residue. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(1): 100–101
- Kulkarni M, *et al.* 2007. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Molecular microbiology*. 62. 1484-97. 10.1111/j.1365-2958.2006.05459.x.
- Kumar K P, *et al.* 2017. Antimicrobial, anti-plasmodial and cytotoxicity properties of bioactive compounds from *Fusarium* sp. USNPF102. *Journal of Microbiology Research*, 7(2): 23-30.
- Kumar S V P, *et al.* 2016. Bioremediation of poly aromatic hydrocarbons (pahs) and crude oil by fungal consortium from west coast of Karnataka, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2016, 5:386.
- Lainson R, Shaw, J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology*, W. Peters, R. Killick Kendrick (Eds.), Academic Press, London, pp. 1-120
- Lainson R, Shaw J J. 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature: Parasitology Supplement*, 273: 595-601.
- Lainson, R.; Shaw, J J. 2005. Leishmaniasis in the New World. In: Collier, L.; Balows, A.; Sussman, M. (Ed.). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology, 5: 313-349.
- Laskay T, *et al.* 2003. Neutrophil granulocytes–Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 11: 210–214.
- Leslie J F, Summerell B A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Willey, USA, 388 p.
- Lessa *et al.* 2007. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Rev Bras otorrinolaringol*, 73(6): 844-847.
- Lima J P S, *et al.* 2012. *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, 4(6): 692-702.

Liu J Y, et al. 2004. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, 114(3) 279-287.

Locatelli F M, et al. 2014. The isolation and molecular characterization of *Leishmania* spp. From patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina. *Acta Tropica*, 131: 16–21.

Luanda P F. 2013 Análise de proteínas do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese bidimensional. 180f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

Ma J, et al. 2017. Aspergivones A and B, two new flavones isolated from a gorgonian derived *Aspergillus candidus* fungus. *Natural Product Research*, 31(1): 32-36.

Malavolta E, et al. 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba: POTAFOS, 201p.

Makhoul, M D H. 2004. Cutaneous Leishmaniasis: recognition and treatment. *American Family Physician*, 69(6): 1455-1460.

Maquiaveli C C, et al. 2017. Antileishmanial activity of verbascoside: Selective arginase inhibition of intracellular amastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* with resistance induced by LPS plus IFN- $\gamma$ . *Biochemical Pharmacology*, 127: 28–33.

Marín M, et al. 2000. The gene encoding the metacyclogenesis-associated transcript Mat-1 is conserved in the genus *Leishmania* and shows a tendency to form dimmers upon protein expression. *Parasitology Research*, 86 : 431–435.

Marinho A R, et al. 2007. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. *Química Nova*, 30(8): 1867-187.

Marletta M A, et al. 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27: 8706-8711.

Martínez-Luis, et al. 2012. Antiparasitic and anticancer constituents of the endophytic fungus *Aspergillus* sp. strain F1544. *Natural Product Communications*, 7(2): 165-168.

Maslov S A, et al. 2001. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 96(3): 397-402.

McGwire B, Chang, K P. 1994. Genetic rescue of surface metalloproteinase (gp63)-deficiency in *Leishmania amazonensis* variants increases their infection of macrophages at the early phase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 66 (2), 345/347.

Mendes B P, et al. 2018. Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*: a purification of metacyclic promastigotes by negative selection with *Bauhinia purpurea* lectin. *Parasitology*, 1: 1–12.

Michereff S J, et al. 2005. Podridões radiculares. In : Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais / eds.. – Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 398 p.

Ministério da Saúde. 2019. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar#distribuicao>

Minodier P, Parola P. 2007. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5: 150–158.

- Mischiatti, K L. 2018. Biotransformação e avaliação das atividades leishmanicida e anti-inflamatórias de alcaloides quinolíticos e derivados. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil, 158p.
- Mistro S O, *et al.* 2010. Cost-effectiveness of liposomal amphotericin B in hospitalized patients with mucocutaneous leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, 22 :1569–1578
- Mitropoulos P, *et al.* 2010. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*, 63(2):309-322.
- Mosser D M, Edelson P J. 1984. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J Immunol*, 132: 1501-1505.
- Mosser DM, *et al.* 1986. *Leishmania* species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. *Exp Parasitol* ; 62: 394-404.
- Mukherjee P, *et al.* 2006. Lymph node cells from BALB/c mice with chronic visceral leishmaniasis exhibiting cellular anergy and apoptosis: involvement of Ser/Thr phosphatase. *Apoptosis* 11: 2013-2029.
- Müller, 2017. *Qualidade fisiológica e associação de Fusarium spp. a sementes de sorgo sacarina*. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. (P.h.d. Tese. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS). 97 p.
- Munkvold G P. 2017. *Fusarium* species and Their associated mycotoxins. *Methods Mol. Biol.*, 1542:51-106.
- Murray H W. 1982. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Immunol*; 129: 351-357.
- Nascimento A M, *et al.* 2015. 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*, 31:1793-1800.
- Nathan C, Xie Q W. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem*, 269: 13725-13728.
- Noazin S, *et al.* 2008. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine*, 26: 6759–6767.
- Odonne G, *et al.* 2017. Treating leishmaniasis in Amazonia: A review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies. *Journal of Ethnopharmacology*, 199: 211-230.
- Olekhnovitch R, *et al.* 2014. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. *J. Clin. Invest.*, 124: 1711–1722.
- Oliveira L F, *et al.* 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118(2):87-96.
- Oliveira R M, *et al.* 2018. Alternative treatment for Leishmaniasis. *IntechOpen*, 145-161.
- OMS (Organização Mundial de Saúde. 2019. In: <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y> > acesso em 03 de Abril de 2019.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. Essential leishmaniasis maps. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html), Acesso em: 09 dez. 2017.

Osório E, *et al.* 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 630-635.

Organização Pan-Americana de Saúde / Organização Mundial de Saúde – OPAS/OMS. 2017. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas: Washington: Organização Pan-Americana de Saúde. Disponível em :<[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754) > Acesso em 19 de Junho de 2017.

Passos C L A, *et al.* 2017. Anti-*Leishmania amazonensis* activity of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. *Parasitol Int.*, 66(1):940-947.

Pires A M S, *et al.* 2012. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. *Rev. Ciênc. Saúde*, 14(1) : 30-39.

Pizetta M. 2017. *Caracterização de Fusarium decemcellulare, F. oxysporum e F. incarnatum em seringueira no estado de São Paulo, resistência clonal e sensibilidade a fungicidas*. Botucatu, São Paulo, Brasil. (M.sc. Dissertação. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp, SP). 33p.

Ponte-Sucre A, *et al.* 2017) Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(12): e0006052.

Rahman R, *et al.* 2017. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(5): e0005635.

Rath S, *et al.* . 2003 Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím. Nova*, 26(4): 550-555.

Reckling S, *et al.* (2008). Proapoptotic Bcl-2 Family Member Bim Promotes Persistent Infection and Limits Protective Immunity. *Infect. Immun.* 76: 1179–1185.

Saccaro Junior N L. 2013. A regulação do acesso a recursos genéticos no Brasil: sugestões para um novo cenário. *Sustentabilidade em Debate – Brasília*, 4(2): 194-214.

Sacks D L, *et al.* 1990. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*, 42: 225-234.

Sacks D L. 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, 69(1): 100-103.

Sacks D L; Perkins P V. 1984. Identification of an infective state of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223: 1417-1420.

Sampaio R N R, *et al.* 2009. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(6): 686-690.

Samson R A, *et al.* 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 78: 142-173.

Saraiva N G L, *et al.* 1989. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 159(4):725-735.

Schelstraete W, *et al.* 2017. Impact of *Fusarium* mycotoxins on *in vitro* activity of major hepatic cytochrome P450 biotransformation enzymes in pigs. 1st MycoKey International Conference: 11-14 Set. 2017. Abstracts, p.83.

- Schumann R R. 1992. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res Immunol*, 143(1):11-5.
- Scott P, Novais F O. 2016. Cutaneous Leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, 16 (9):581-92.
- Sebaugh J L. 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2): 128-134.
- Silva I P. 2017. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*—F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *World J Microbiol Biotechnol*, 33:62.
- Silva T F, Oliveira, A B. 2016. Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão. *Revista Fitos*, 10(3): 220-372.
- Silva M F, *et al.* 2012. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. *PLoS One*, 7(3): e34022.
- Silva S T P, *et al.* 2017. Leishmaniose visceral humana: reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil. *Cabrera Rev Bio Der*, 39: 135-151
- Silva T, Oliveira A B . 2016. Leishmanicidal plants from Brazilian Amazonia: a review. *Rev. Fitos*, 10(3): 220-372.
- Silva Jr. I A, *et al.* 2015. *In vitro* metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. *Biomed Research International*, 2015: 393049, 15 p. In : <http://dx.doi.org/10.1155/2015/393049> acesso em 12 de Março de 2019.
- Silva-López R E. 2010. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova*, 33(7): 1541-1548.
- Silveira F T, *et al.* 2008 Immunopathogenic competences of *Leishmania. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31(8) : 423-31.
- Sinagra Á, *et al.* 2007 A atividade da azitromicina contra a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no modelo golden hamster. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 40(6): 627-630.
- SINAN, Sistema Nacional de Atendimento Médico. In < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltaam.def> > acesso em 3 de Abril de 2019.
- Singh A, *et al.* 1988 Evaluation of chemical pre-treatment for biodegradation of agricultural lignocellulosic wastes by *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 4: 473–479.
- Singh S, Sivakumar R. 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*, 49: 55-60.
- Soto J, *et al.* 2001. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin Infect Dis* 33: 57-61.
- Soto J, *et al.* 2004. Miltefosine for new world Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 38 (9): 1266–72.
- Srivastava S, *et al.* 2014. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clin Exp Immunol*, 172 (3):403–9.

- Srivastava S, *et al.* 2017. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasit Vectors*, 10(1):49. PMID:28137296
- Stenger S, *et al.* 1996. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*, 183:1501–1514.
- Sundar S, *et al.* 2006. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl, 1: 26-33.
- Sundar S, *et al.* 2014. Efficacy and safety of amphotericin B emulsion versus liposomal formulation in Indian patients with visceral leishmaniasis: a randomized, open-label study. *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e3169.
- Teles C B G, *et al.* 2017. *Trichophoromyia auraensis* is a putative vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112(7): 517-519.
- Thom C, Raper K B, 1945. A Manual of the Aspergilli. *Williams & Wilkins*, Baltimore.
- Tiuman TS, *et al.* 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of infectious disease*, 15:525-532.
- Ueda Y, *et al.* 2014. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 447: 341–345.
- Urdapilleta A A A. 2006. *Atividade de substâncias isoladas de liquens sobre formas promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis e Leishmania (V.) braziliensis*. Brasília, Distrito Federal, Brasil. (M.sc. Dissertação. Universidade de Brasília, DF).
- Valdés-Reyes, L *et al.* 2009. *Leishmania mexicana*: Inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental Parasitology*, 121:199–207
- Van-Burik J A, *et al.* 1998. Cutaneous Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (11): 3115-3121.
- Vasconcelos J M, *et al.* 2018. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. *RBAC*, 50(3):221-7.
- Ventin F, Cincurá C, Machado P R L. 2018. Safety and efficacy of Miltefosine monotherapy and Pentoxifylline associated with Pentavalent Antimony in treating Mucosal Leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, DOI:10.1080/14787210.2018.1436967.
- Visagie C M, *et al.* 2014. Identification and nomenclature of genus *Penicillium*. *Studies in Micology*, 78: 343-371.
- Von Stebut, E. 2007. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp. Dermatol*, 16: 340–346.
- Wei, X. Q. *et al.* 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 375: 408–411.
- Weigle K A, *et al.* 1987. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg*, 36(3):489 - 96.
- Wright S D, Silverstein S C. 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med*, 159:2016-2022.
- Zar J. 1999. *Biostatistical Analyses*. Printice Hall, New Jersey.

Zabka M, Pavela R. 2018. Review Chapter: *Fusarium* genus and essential oils. In: Mérillon JM, Riviere C. (eds) Natural Antimicrobial Agents. Sustainable Development and Biodiversity. *Springer cham*, 19(1): 95-120.

Zuanazzi J A S, Mayorga P. 2010. Fitopeodutos e desenvolvimento econômico. *Química Nova*, 33(6):1421-1428.

Zuchowska A, *et al.* 2016. Adhesion of MRC-5 and A549 cells on poly (dimethylsiloxane) surface modified by proteins. *Electrophoresis*, 37(3): 536-544.