

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Victor Vaitkevicius Antão de Souza

**Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle  
para a leishmaniose visceral**

Recife  
2021

Victor Vaitkevicius Antão de Souza

**Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para a  
leishmaniose visceral**

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz, como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Milena de Paiva Cavalcanti

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Virginia Maria Barros de Lorena

Recife

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos  
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

---

- S729i Souza, Victor Vaitkevicius Antão de.  
Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para a leishmaniose visceral / Victor Vaitkevicius Antão de Souza. — Recife: [s.n.], 2021.  
122 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.  
Orientadora: Milena de Paiva Cavalcanti;  
coorientadora: Virginia Maria Barros de Lorena.  
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde

1. Antiprotozoários - farmacologia. 2. Ftalimidas - farmacologia. 3. Triazóis - farmacologia. 4. Leishmania - efeitos dos fármacos. 5. Imunomodulação. 6. Cianobactéria. 7. Microalgas. 8. Leishmania infantum - imunologia. 9. Leishmaniose visceral - terapia. 10. Descoberta de Drogas. 11. Técnicas de Cultura de Células. I. Cavalcanti, Milena de Paiva. II. Lorena, Virginia Maria Barros de. III. Título.

---

CDU 595.771

Victor Vaitkevicius Antão de Souza

**Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para a  
leishmaniose visceral**

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Biociências e Biotecnologia em Saúde do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz, como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 21/6/2021

**Banca Examinadora**

---

Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana (Titular – Externo)  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup>. Sheilla Andrade de Oliveira (Titular – Interno)  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup> Milena de Paiva Cavalcanti (Orientadora)  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup>. Virginia Maria Barros de Lorena (Coorientadora)  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

## AGRADECIMENTOS

Um sentimento pode definir esses anos de mestrado, GRATIDÃO:

À minha família, a qual é minha base e fortaleza, porto seguro para acolher em todos os momentos. Em especial, minha mãe (Gragina Vaitkevicius) e meu pai (Eduardo Antão) por ter promovido uma vida cheia de privilégios, com oportunidade de estudos e me auxiliando sempre com todo o amor e carinho. Aos meus irmãos (Renato e Breno), por dividirem comigo tantos momentos. Ao meu querido cachorro (Black), que possui uma importância enorme em minha vida. À minha avó (Edilene Vaitkevicius), alicerce e admiração, cuidou de mim como segunda mãe. Aos meus tios e tias que sempre incentivaram o estudo e me auxiliaram sempre como puderam. Aos primos e primas por toda a parceria.

À minha namorada (Maria Beatriz), por todo o companheirismo e tranquilidade nos momentos difíceis, incentivando-me e me aconselhando com suas palavras. Pelos momentos de compartilhamento e pelos sonhos que ainda estão sendo construídos.

Aos meus amigos, irmãos da vida: Igor Lopes, Gabriel Guedes, Sanserai Cavalcanti, Rafaella Savana, Gustavo Henrique (*In memorian*), obrigado pelos momentos de descontração e alegria. Aos amigos da FAFIRE: Danise Alves, Paula Regina, Ana Maria Ataídes, Fernanda Alexandre, Gisele Lemos e Matheus Dias, que estiveram presentes nessa caminhada acadêmica. Também agradeço a professora Ana Maria Rabelo, por me aceitar e orientar no estágio a docência na disciplina de Parasitologia na FAFIRE. Aos “segundos pais” que tive o prazer de conhecer na vida, e que me apoiaram e ficaram felizes com minhas conquistas: Rosemberg Nascimento (Berg – Paizão) e Gisele Maria Lima (Gi – Mãezona – *In memorian*).

Às minhas orientadoras: Milena Paiva e Virginia Lorena, pelos ensinamentos e por contribuírem de forma significativa na minha formação, meu amadurecimento científico, meu crescimento profissional. Agradeço a oportunidade e confiança de fazer parte das suas equipes.

Aos companheiros e amigos de laboratório: Rayana Carla, Romulo Pessoa, Cintia Nascimento, Gabriella Melo, Isabelle Barreto, Jady Moreira, Michelle Barros, e todos os que fazem parte do Laboratório de Imunoparasitologia, que deixaram esse mestrado um pouco mais fácil, mais leve e menos doloroso. E apesar de não estarem presentes fisicamente mais no cotidiano, ajudaram sempre de alguma forma: Suênia Gonçalves e

Gilsan Oliveira, e em especial: Lays Trajano, que mesmo distante, ajudou com conselhos, conversas e brincadeiras, como sempre uma mãezinha.

Aos colegas que tive o prazer de trabalhar no diagnóstico da COVID-19 durante a pandemia que surgiu durante o mestrado, seja no LACEN-PE ou na FIOCRUZ-PE. Momentos de incertezas, apreensões, estresses, cansaço e muito trabalho, que com certeza me deram uma experiência profissional única, e que vou levar para o resto da vida.

A todos da turma de mestrado de 2019.1, de modo especial: Cícero Costa, Caroline Targino, Karina Baracho, Bruno Lima, Helena Candido, Adrienne Silva, Maiara Menezes e Renata Pessoa. Aos professores e demais membros do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, em especial aos membros da Comissão da SBBS (Semana em Biociências e Biotecnologia em Saúde), o qual tive a felicidade enorme de fazer parte. E a todos os companheiros do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE, que de alguma forma estiveram presentes nessa caminhada, seja nos momentos de descontração no vôlei, nas conversas, nas confraternizações ou nos corredores da instituição.

Enfim...

**OBRIGADO A TODOS!!!**

## RESUMO

SOUZA, Victor Vaitkevicius Antão de. **Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para leishmaniose visceral**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Novas estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas para o desenvolvimento de um imunoterápico eficiente contra a leishmaniose visceral (LV). O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos (FT) e extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes (MFs) quanto ao seu potencial leishmanicida e imunomodulador para LV. Foram avaliados os compostos FTs (RN1, RN2 e RN3), os extratos de MFs (*Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* e *Tetradesmus obliquus*) e as drogas de referência (DRs), Milteforan™ (MTF) e Glucantime® (Sb<sup>V</sup>). Foram determinados os índices de seletividade (IS) de todos os tratamentos em ensaios de concentração inibitória (IC<sub>50</sub>), em células de *Leishmania infantum* e concentrações citotóxicas (CC<sub>50</sub>), em células humanas e caninas. A partir dos melhores candidatos, foi feita a avaliação da resposta imune em células de humanos saudáveis por meio da produção de citocinas, óxido nítrico (NO) e expressão gênica, utilizando as concentrações da CC<sub>50</sub>; ½ CC<sub>50</sub>; ¼ CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> para estimular *in vitro*. Diante dos dados obtidos, foi observado que os compostos FTs e os extratos apresentaram baixa citotoxicidade para as células; sendo o RN2 (IS<sub>Hum</sub>=13,5) e os extratos de *A. platensis* (IS<sub>Hum</sub>=3,8) e *D. tertiolecta* (IS<sub>Hum</sub>=4,7; IS<sub>Can</sub>=11,2) os selecionados para prosseguir com os estudos. O Sb<sup>V</sup> (IS<sub>Hum</sub>=2,1) possuiu o menor IS entre todos os tratamentos, ao contrário da MTF que possuiu o maior IS (IS>100). Ao analisar os resultados de resposta imune, foi observado que a RN2 apresentou um perfil de supressão; já os extratos estimularam a produção das citocinas do perfil Th1 e NO mais do que as DRs. Em relação a expressão gênica, observou-se que os extratos estimularam um equilíbrio entre os perfis imunológicos. Deste modo, os extratos de MFs apresentaram resultados promissores, possuindo atividade leishmanicida, baixa toxicidade e indução da resposta imune, podendo ser potenciais candidatos terapêuticos para a LV.

**Palavras-chave:** Terapêutica; Imunomodulação; Cianobactérias; Microalgas; Ftalimidas; Triazóis; *Leishmania infantum*.

## ABSTRACT

SOUZA, Victor Vaitkevicius Antão de. **Immunology applied to the development of new control strategies for visceral leishmaniasis.** 2021. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology Applied to Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

New therapeutic strategies have been studied for the development of an efficient immunotherapy against visceral leishmaniasis (VL). The aim of this study was to evaluate *in vitro* synthetic phthalimidic-triazole (PTs) compounds and bioactive extracts of photosynthetic microorganisms (PMs) for their leishmanicidal and immunomodulatory potential for VL. The PTs compounds (RN1, RN2 and RN3), the PMs extracts (*Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta* and *Tetradesmus obliquus*) and the reference drugs (RDs), Milteforan<sup>TM</sup> (MTF) and Glucantime<sup>®</sup> (Sb<sup>V</sup>) were evaluated. The selectivity indices (SI) of all treatments were determined in assays of inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in *Leishmania infantum* cells and cytotoxic concentrations (CC<sub>50</sub>) in human and canine cells. From the best candidates, the immune response was evaluated in healthy human cells through the production of cytokines, nitric oxide (NO) and gene expression, using the concentrations of CC<sub>50</sub>; ½ CC<sub>50</sub>; ¼ CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> to stimulate *in vitro*. In view of the data obtained, it was observed that the PTs compounds and extracts showed low cytotoxicity for the cells; RN2 (SI<sub>Hum</sub>=13.5) and extracts of *A. platensis* (SI<sub>Hum</sub>=3.8) and *D. tertiolecta* (SI<sub>Hum</sub>=4.7; SI<sub>Can</sub>=11.2) were selected to proceed with the studies. Sb<sup>V</sup> (SI<sub>Hum</sub>=2.1) had the lowest IS among all treatments, unlike MTF, which had the highest SI (SI>100). When analyzing the immune response results, it was observed that RN2 presented a suppression profile and the extracts stimulated the production of Th1 and NO cytokines more than the RDs. Regarding gene expression, it was observed that the extracts stimulated a balance between the immunological profiles. Thus, PMs extracts showed promising results, with leishmanicidal activity, low toxicity, and induction of the immune response, which could be potential therapeutic candidates for VL.

**Keywords:** Therapeutics; Immunomodulation; Cyanobacteria; Microalgae; Phthalimides; Triazoles; *Leishmania infantum*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Mapa das leishmanioses em países de alta endemicidade: uma atualização epidemiológica com base em dados relatados em 2014.	21
<b>Figura 2 -</b>	Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo, 2018.	22
<b>Figura 3 -</b>	Ciclo biológico de <i>L. infantum</i> .	23
<b>Figura 4 -</b>	Diferenciação de células T <i>naive</i> , em fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg.	26
<b>Figura 5 -</b>	Perfil imunológico na leishmaniose visceral.	28
<b>Figura 6 -</b>	Estrutura química dos compostos ftalimídicos-triazólicos RN1, RN2 e RN3.	38
<b>Figura 7 -</b>	Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) tratadas com os compostos RN1, RN2 e RN3 em diferentes concentrações.	48
<b>Figura 8 -</b>	Taxa de sobrevivência das células humanas, caninas e de <i>Leishmania infantum</i> (promastigotas), tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.	50
<b>Figura 9 -</b>	Comparação da concentração citotóxica (CC <sub>50</sub> ) e inibitória de 50% (IC <sub>50</sub> ) entre os compostos sintéticos, os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e as drogas de referência.	51
<b>Figura 10 -</b>	Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.	54
<b>Figura 11 -</b>	Medição do nitrito após os estímulos das células com o composto ftalimídico-triazólico RN2.	59
<b>Figura 12 -</b>	Medição do nitrito após os estímulos das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes	59
<b>Figura 13 -</b>	Medição do nitrito após os estímulos das células com as drogas de referência.	59
<b>Figura 14 -</b>	Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.	61
<b>Figura 15 -</b>	Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência	64

**Quadro 1** - Avaliação geral das análises de resposta imune realizadas após a estimulação de células mononucleares do sangue periférico com diferentes candidatos terapêuticos e drogas de referência.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Atividade leishmanicida (IC <sub>50</sub> ) em promastigotas e efeito citotóxico (CC <sub>50</sub> ) em células humanas e caninas tratadas com os compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos.	47
<b>Tabela 2</b> - Atividade leishmanicida (IC <sub>50</sub> ) em promastigotas e efeito citotóxico (CC <sub>50</sub> ) em células humanas e caninas tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.	49
<b>Tabela 3</b> - Atividade leishmanicida (IC <sub>50</sub> ) em promastigotas e efeito citotóxico (CC <sub>50</sub> ) em células humanas e caninas tratadas com as drogas de referência para a leishmaniose visceral.	51
<b>Tabela 4</b> - Índices de Seletividade (IS) dos compostos sintéticos, extratos naturais e drogas de referências para leishmaniose visceral.	52
<b>Tabela 5</b> - Média das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o composto ftalimídico-triazólico RN2.	52
<b>Tabela 6</b> - Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações do composto ftalimídico-triazólico RN2.	53
<b>Tabela 7</b> - Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com os extratos de <i>Arthrospira platensis</i> e <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	55
<b>Tabela 8</b> - Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de <i>Arthrospira platensis</i> .	55
<b>Tabela 9</b> - Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	56
<b>Tabela 10</b> - Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com as drogas de referência.	57
<b>Tabela 11</b> - Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações da droga de referência Antimonial de n-Metilglucamina.	57
<b>Tabela 12</b> - Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações da droga de referência Miltefosina.	58

<b>Tabela 13</b> -	Quantificação relativa da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.	62
<b>Tabela 14</b> -	Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de <i>Arthrospira platensis</i> .	62
<b>Tabela 15</b> -	Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	63
<b>Tabela 16</b> -	Quantificação relativa da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência.	65
<b>Tabela 17</b> -	Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações da droga de referência Antimonial de n-Metilglucamina.	65
<b>Tabela 18</b> -	Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações da droga de referência Miltefosina	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ap</b>	<i>Arthrospira platensis</i>
<b>CC</b>	Concentração Citotóxica
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética para Uso Animal
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbônico
<b>Ct</b>	Ciclo <i>threshold</i>
<b>DAT</b>	Teste de Aglutinação Direta
<b>DEPC</b>	Pirocarbonato de Dietila
<b>DMSO</b>	Dimetilsufóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
<b>Dt</b>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoadsorção ligado à enzima
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
<b>GP63</b>	Glicoproteína 63
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>IAM</b>	Instituto Aggeu Magalhães
<b>IC</b>	Concentração Inibitória
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase Induzível
<b>IS</b>	Índice de Seletividade
<b>kDNA</b>	DNA do Cinetoplasto
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>LSA</b>	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania intanum</i>
<b>LT</b>	Leishmaniose Tegumentar
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LVC</b>	Leishmaniose Visceral Canina
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MFs</b>	Microrganismos Fotossintetizantes

<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>MTF</b>	Miltefosina
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>PAMPs</b>	Proteínas Moleculares Associadas ao Patógeno
<b>PBMC</b>	Células Mononucleares do Sangue Periférico
<b>PBS</b>	Salina Tamponada
<b>PCR</b>	Reação da Cadeia de Polimerase
<b>PE</b>	Pernambuco
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
<b>RIFI</b>	Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>rpm</b>	Rotação por Minuto
<b>RPMI</b>	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RQ</b>	Quantificação Relativa
<b>RRPs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>RT-qPCR</b>	PCR Quantitativa com Transcrição Reversa
<b>Sb<sup>V</sup></b>	Antimonial Pentavalente
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio
<b>TRAT</b>	Tratamento
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TGF-β</b>	Fator de Transformação do Crescimento –β
<b>Th</b>	<i>T helper</i>
<b>TLRs</b>	Receptores <i>Toll-Like</i>
<b>TM</b>	Marca Registrada
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>Treg</b>	T reguladoras

<b>TR-DPP</b>	Teste rápido - <i>Dual path platform</i>
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>UFRPE</b>	Universidade Federal Rural de Pernambuco
<b>x g</b>	Unidade de força gravitacional
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitros
<b>µM</b>	Micromolar
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL</b>	21
<b>2.1 Aspectos gerais sobre as leishmanioses</b>	21
<b>2.2 Ciclo biológico de <i>L. infantum</i></b>	22
<b>2.3 Métodos de diagnóstico da LV</b>	24
<b>2.4 Resposta imunológica e manifestações clínicas da LV</b>	24
<b>2.5 Métodos de prevenção para LV</b>	29
<b>2.6 Terapêutica para LV</b>	30
<b>2.8 Novos candidatos terapêuticos</b>	31
2.8.1 Compostos sintéticos	32
2.8.2 Compostos naturais	32
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	34
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	36
<b>5 HIPÓTESE</b>	36
<b>6 OBJETIVO</b>	37
<b>6.1 Geral</b>	37
<b>6.2 Específicos</b>	37
<b>7 MATERIAL E MÉTODOS</b>	38
<b>7.1 Obtenção dos compostos sintéticos e extratos naturais</b>	38
7.1.1 Descrição e obtenção dos compostos químicos sintéticos	38
7.1.2 Extração de bioativos de microrganismos fotossintetizantes	39
<b>7.2 Cultivo de <i>L. infantum</i></b>	39
<b>7.3 Coleta de material biológico</b>	40
<b>7.4 Diagnóstico para LV</b>	40
<b>7.5 Obtenção de PBMC e cultivo celular</b>	40
<b>7.6 Determinação do Índice de Seletividade</b>	41
7.6.1 Viabilidade celular	41
7.6.2 Efeito leishmanicida/leishmanioestático	42
<b>7.7 Análise da resposta imune</b>	42
7.7.1 Avaliação da produção e secreção de citocinas	43

7.7.2 Avaliação da produção de Óxido Nítrico	43
7.7.3 Avaliação da expressão de RNA mensageiro	43
<b>7.8 Análise de dados</b>	<b>44</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>	<b>46</b>
<b>9 RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>9.1 Determinação do Índice de seletividade</b>	<b>47</b>
9.1.1 Compostos sintéticos	47
9.1.2 Extratos naturais	49
9.1.3 Drogas de referência	51
9.1.4 Análise comparativa	51
<b>9.2 Análise da resposta imune</b>	<b>52</b>
9.2.1 Produção de citocinas	52
9.2.2 Produção do Óxido Nítrico	58
9.2.3 Expressão gênica	60
9.2.4 Avaliação comparativa geral	66
<b>10 DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
<b>11 CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>12 PERSPECTIVAS</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE A – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA ANIMAL</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE B – TCLE PARA OS PROPRIETÁRIOS DOS ANIMAIS</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICE C – TCLE PARA OS INDIVÍDUOS HUMANOS</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE D – ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO – 1</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE F – ARTIGO PUBLICADO – 2</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE G – ARTIGO PUBLICADO – 3</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE H – ARTIGO REFERENTE A DISSERTAÇÃO</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Entende-se como doença negligenciada (DN) aquelas causadas por agentes infecciosos ou parasitários endêmicas em populações predominantemente de países subdesenvolvidos e que não possui atrativos econômicos para o desenvolvimento de fármacos, pesquisas e controle epidemiológico (HOTEZ; PECOUL, 2010; YAMEY et al., 2018). Apesar das DN serem responsáveis por 11% das enfermidades no mundo, o desenvolvimento de fármacos é muito inferior. Entre os anos de 2012 e 2018, um total de 256 produtos terapêuticos foram licenciados, todavia, somente oito (3,1%) foram direcionados para DNs (PEDRIQUE et al., 2013; YAMEY et al., 2018). Esse dado mostra o quão necessário se faz o estudo de desenvolvimento de novos terapêuticos para tratamento das DNs.

No ano de 2012, em uma reunião no *Royal College of Physicians* em Londres, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou a aprovação da Declaração de Londres sobre Doenças Negligenciadas, com o intuito de erradicar, eliminar e intensificar o controle das principais DNs até o final de 2020. No entanto, não foi obtido sucesso até o momento. Apesar dos avanços em diagnóstico e tratamento nas últimas décadas, ainda há muito a se progredir para o controle dessas enfermidades. A necessidade contínua de novos tratamentos que sejam eficazes, seguros e, idealmente administrados por via oral, permanece como a base para pesquisa estratégica e desenvolvimento a longo prazo da Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi – *Drugs Neglected Disease initiative*).

Entre as doenças negligenciadas, a leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade potencialmente fatal que está distribuída em 76 países, sendo relatados 65.934 casos humanos apenas nas Américas no período de 2001-2019, com uma média de 3.470 casos anualmente. No Brasil, foram registrados 4.114 casos humanos no ano 2017, destes, 44,5% ocorreram no Nordeste, levando cerca de 8,8% ao óbito (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020).

Dentro do cenário da LV, o cão doméstico é considerado o reservatório de maior importância epidemiológica, sendo uma recomendação do Ministério da Saúde (MS) Brasileiro a eutanásia dos animais infectados, no entanto, essa estratégia de controle não tem demonstrado eficácia na redução de casos humanos (CAMPINO; MAIA, 2018; NUNES et al., 2008; NUNES et al., 2018). Desta forma, para o real enfrentamento desta enfermidade, velhos paradigmas precisam ser rompidos.

Entre os obstáculos a serem superados para o controle da LV, está a carência de alternativas terapêuticas. A droga de primeira escolha para o tratamento de humanos com LV é

o Antimoniato de n-Metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e para cães com LV é a Miltefosina (Milteforan<sup>TM</sup>), as quais possuem uma alta toxicidade para o hospedeiro e vêm apresentado falhas no tratamento, além de haver relatos de resistência do parasito (PONTE-SUCRE et al., 2017).

Para o sucesso terapêutico da LV, acredita-se que haja uma dependência, ao menos em parte, das alterações na resposta imune do hospedeiro frente ao parasito; neste contexto, o uso de drogas imunomoduladoras que consigam reverter o perfil imunológico do hospedeiro, estimulando um perfil de resistência ao parasito, pode ser importante na complementação do tratamento convencional, ajudando na melhora clínica do paciente (PROVERBIO et al., 2014). Para se investigar uma resposta imune protetora estimulada por um candidato terapêutico, a compreensão dos mecanismos imunológicos nas leishmanioses é essencial, uma vez que esses parasitos desenvolveram, ao longo da evolução, vários mecanismos de evasão para sobreviver ao sistema imunológico do hospedeiro (SUKUMARA; MADUBALA, 2004).

A resposta imune celular do hospedeiro é mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> que, de forma simplificada, podem apresentar dois tipos principais de perfis e bastante explorados na LV: o de resistência (Th1) e o de susceptibilidade (Th2). No perfil Th1 ocorre a produção de citocinas como Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral (*tumor necrosis factor* - TNF) e Interleucina 2 (IL-2), que estão associados ao controle da infecção pela ativação dos macrófagos, produção de óxido nítrico (NO – *Nitric Oxide*) e consequente destruição dos parasitos intracelulares. Por outro lado, o perfil Th2 tem como característica a síntese de citocinas como Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10) e Fator de Crescimento Tumoral Beta (*tumor growth factor beta* - TGF- $\beta$ ), as quais favorecem o surgimento da doença e seus sintomas, com inibição de NO sintetizado por macrófagos ativados, propiciando assim a sobrevivência dos parasitos (ALEXANDER; BROMACHER, 2012; BHOWMICK, RAVINDRAN, ALI, 2014; MORENO et al., 2014; RESENDE et al., 2013).

Outros subtipos celulares como as células T reguladoras (Treg) e Th17, também podem apresentar um papel importante na susceptibilidade e resistência contra as leishmanioses (NYLÉN; GAUTAM, 2010; ZHU et al., 2010). No entanto, apesar de o paradigma Th1/Th2 (resistência/susceptibilidade) ser um modelo simplificado, vários estudos têm demonstrado sua fundamentação (COSTA-PEREIRA et al., 2015; SHAHBAZI et al., 2015; SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

A partir desse conhecimento sobre o perfil imunológico, pode-se realizar estudos que busquem investigar novas moléculas com potencial contra a leishmaniose visceral. Dentre os possíveis candidatos à terapia, estão os compostos sintéticos contendo na sua estrutura química

os grupamentos farmacofóricos ftalimida e 1,2,3-triazol, os quais vêm sendo muito explorados nos estudos de atividades leishmanicidas, principalmente contra espécies causadoras da LTA. Além das moléculas de origem sintética, bioativos provenientes de organismos marinhos, como os dos microrganismos fotossintetizantes, podem ser promissores para os estudos de investigação terapêutica, uma vez que possuem uma diversidade de metabólitos que podem apresentar atividades biológicas ainda não exploradas (LAURITANO et al., 2016; YAMTHE et al., 2017).

Deste modo, com uma visão mais ampla para o controle das leishmanioses, este estudo objetivou avaliar *in vitro* o potencial terapêutico para LV de compostos sintéticos ftalimida e 1,2,3-triazol, e extratos bioativos de algumas espécies de microrganismos fotossintetizantes em células humanas e caninas.

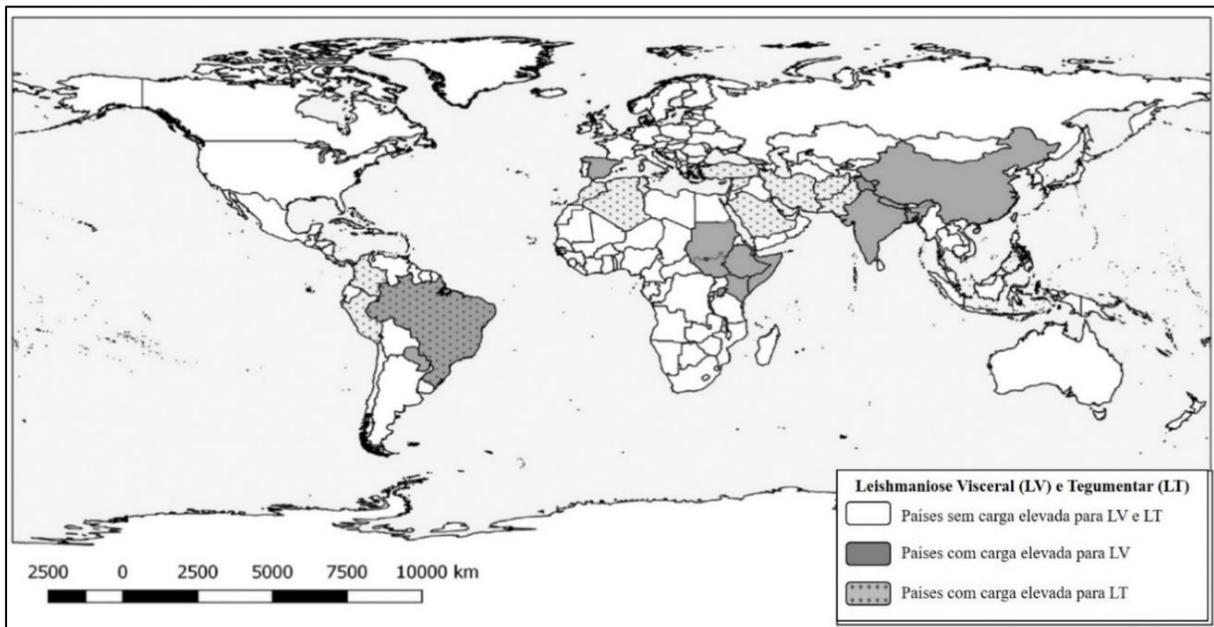
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Aspectos gerais sobre as leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias, que possuem os protozoários (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) do gênero *Leishmania* como causadores da doença. Esses protozoários podem acometer animais domésticos e silvestres, além dos seres humanos. Sua transmissão ocorre de forma vetorial, durante o repasto sanguíneo de insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), principalmente dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (ELMAHALLAWY et al., 2014).

Essa doença é classificada como negligenciada, estando presente em todos continentes, exceto na Oceania, sendo o Brasil o único país com alta endemicidade para as duas formas principais de leishmaniose, visceral (LV) e tegumentar (LT), conforme apresentado na Figura 1 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Além de fatores socioeconômicos estarem relacionados com o aumento da prevalência das leishmanioses, fatores ambientais influenciam diretamente a prevalência dessa doença (ORYAN, AKHABARI, 2016). Estudos já demonstraram que a destruição da cobertura vegetal e as mudanças climáticas, tem deixado o inseto vetor mais próximo à população e desta forma, aumentando o número de casos da parasitose (ORYAN; AKBARI, 2016; READY, 2008; YAZDANPANA, ROSTAMIANPUR, 2013).

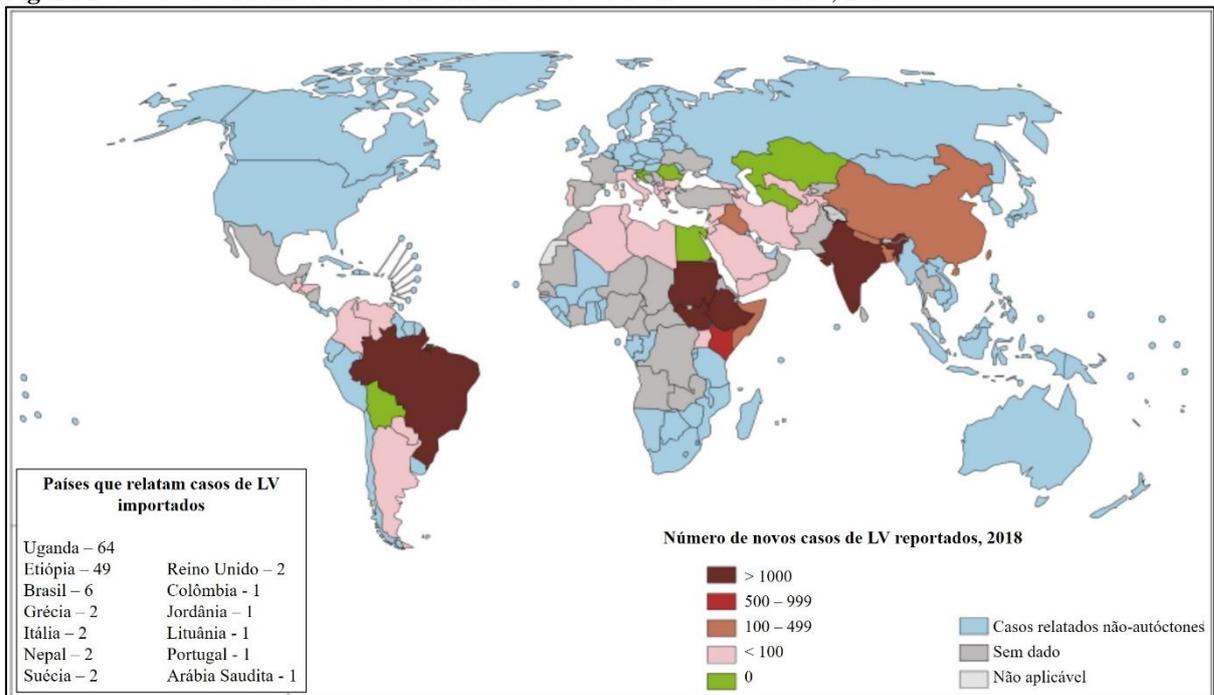
**Figura 1.** Mapa das leishmanioses em países de alta endemicidade: uma atualização epidemiológica com base em dados relatados em 2014.



**Fonte:** Organização Mundial da Saúde (2016, tradução nossa).

A LV, também conhecida como calazar, é a mais grave forma clínica das leishmanioses, podendo levar os hospedeiros (humanos e caninos) à morte se não tratados, sendo considerada a segunda principal causa de mortes por doença parasitária, estando atrás apenas da malária (DEN BOER et al., 2011). A LV afeta principalmente as populações de renda econômica baixa, sendo endêmica em 12 países da América Latina, tendo como agente etiológico no continente americano a espécie *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) (ALVAR et al., 2012). O Brasil, além de estar entre os países mais afetados no mundo, reporta cerca de 95% (57.582) dos casos humanos registrados na América Latina (Figura 2) (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019). Por sua vez, a LV canina (LVC) acomete cerca de 2,5 milhões de cães em mais de 70 países (KASZAK; PLANELLAS; DWORECKA-KASZAK, 2015).

**Figura 2.** Status de endemicidade da leishmaniose visceral em todo o mundo, 2018.



**Fonte:** Organização Mundial da Saúde (2018, tradução nossa).

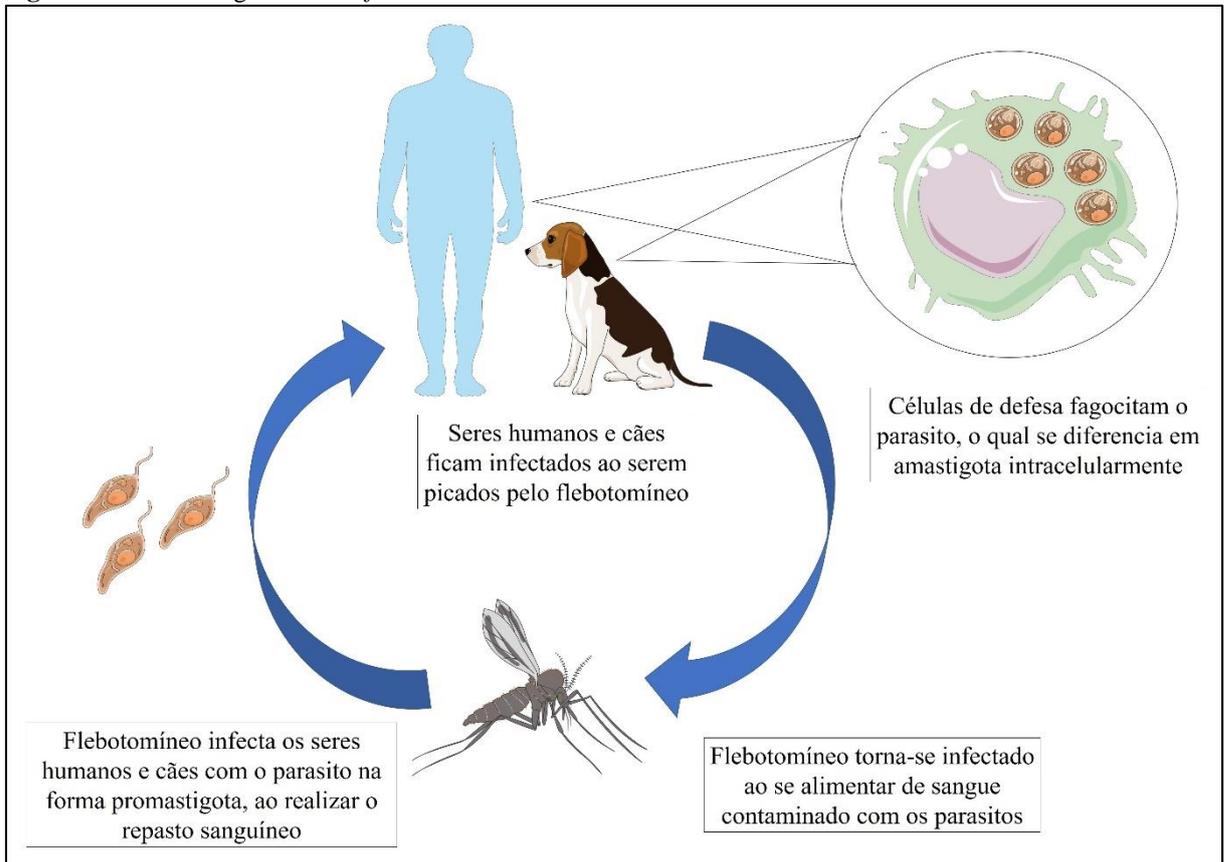
## 2.2 Ciclo biológico de *L. infantum*

O parasito apresenta um ciclo biológico digenético, ou seja, necessitando de dois hospedeiros, sendo um invertebrado (o flebotomíneo) e outro vertebrado. No inseto, o protozoário está localizado nas glândulas salivares na forma promastigota (infectante), que durante o repasto sanguíneo da fêmea é transmitido para o hospedeiro vertebrado. Logo após a entrada do patógeno, as células de defesa do sistema inato (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) se apresentam para combater o patógeno, fagocitando o parasito. No entanto, o tripanossomatídeo possui mecanismos que o favorecem intracelularmente, diferenciando-se na

forma amastigota, o qual se multiplica, rompendo a célula hospedeira e infectando outras células, continuando a proliferação do parasito no hospedeiro. Ocasionalmente, outro flebotomo pode se alimentar do sangue contaminado com o parasito, podendo transmitir para outro hospedeiro durante um repasto sanguíneo posterior, reiniciando o ciclo do patógeno (Figura 3) (KUMAR; ENGWERDA, 2014; MCGWIRE; SATOTSKAR, 2014).

No contexto da LV, o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é considerado o principal reservatório de importância epidemiológica, pois além de estar próximo ao ser humano, quando infectado, apresenta uma alta carga de parasitos na pele, favorecendo que o flebotomíneo se contamine durante o repasto sanguíneo e continue o ciclo de transmissão, permitindo a infecção de outros animais e/ou humanos (NUNES et al., 2016).

**Figura 3.** Ciclo biológico de *L. infantum*.



**Fonte:** o autor

**Legenda:** Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo infecta os hospedeiros vertebrados com o parasito na forma promastigota. As células de defesa desses hospedeiros vertebrados, fagocitam o parasito, o qual se diferencia, intracelularmente, nas formas amastigotas. Quando um novo flebotomíneo se alimenta do sangue desses hospedeiros infectados, contamina-se com os parasitos e dá continuidade ao ciclo de transmissão.

### 2.3 Métodos de diagnóstico da LV

Atualmente, o diagnóstico da LV é feito a partir de um conjunto de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Os exames laboratoriais são baseados na detecção do protozoário, de anticorpos anti-*Leishmania* ou do DNA do parasito; testes parasitológicos, sorológicos e moleculares, respectivamente (ARONSON et al., 2016).

As técnicas sorológicas como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta (DAT) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são ferramentas fundamentais na determinação do diagnóstico (ANVERSA et al., 2017). No entanto, o MS brasileiro recomenda, para o diagnóstico de casos humanos, a utilização do teste rápido imunocromatográfico com o antígeno recombinante rk39, o qual possui uma boa sensibilidade (EJAZI; ALI, 2013). Da mesma forma, para a LVC os testes sorológicos (teste rápido imunocromatográfico TR-DPP® LVC, com a confirmação pelo ELISA- *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) são ferramentas empregadas pelo MS para determinar a positividade dos cães (NOTA TÉCNICA CONJUNTA, Nº 01/2011). Apesar desses testes sorológicos não terem um custo tão elevado, serem pouco laboriosos e possuírem alta sensibilidade, apresentam algumas limitações, como possibilidade de reatividade cruzada com alguns outros protozoários, podem não diferenciar animais vacinados e naturalmente infectados, além de apresentarem uma redução na acurácia quando utilizados em indivíduos imunossuprimidos (FRAGA et al., 2016; PESSOA-SILVA et al., 2019; ZANETTE et al., 2014).

Superando os obstáculos dos testes imunológicos, os testes moleculares possuem uma alta sensibilidade e especificidade, além de grande possibilidade analítica, especialmente a PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Porém não são viáveis para as buscas ativas, inquéritos epidemiológicos, ou triagem de pacientes, devido ao custo e às necessidades estruturais (FERREIRA et al., 2013; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2012; MOHAMMADIHA et al., 2013). Por sua vez, o exame parasitológico por pesquisa direta é realizado a partir de lâminas de aspirado da punção medular e dos linfonodos, sendo considerado uma técnica padrão-ouro para LV com especificidade de 100%, porém uma sensibilidade que varia de acordo com o grau de parasitismo do hospedeiro infectado e da habilidade do microscopista (MOREIRA et al., 2007; SOUSA et al., 2017).

### 2.4 Resposta imunológica e manifestações clínicas da LV

Ao longo do tempo, o parasito desenvolveu diversos mecanismos para obter sucesso durante a invasão do sistema imune do hospedeiro, hospedando-se no interior das células de defesa, conseguindo resistir à resposta protetora (HANDMAN, 2005; SUKUMARAN;

MADHUBALA, 2004). Um dos mecanismos utilizados por *Leishmania* sp. é a síntese de fatores de virulência que auxiliam na sobrevivência desses parasitos, como por exemplo glicoconjugados de superfície: a glicoproteína GP63 e o lipofosfoglicano LPG, que junto com a variedade antigênica, desencadeia uma série de diferentes sinalizações e ativações celulares da resposta imune inata e adaptativa (BATTACHARYA; ALI, 2013; FREITAS; PINHEIRO, 2010).

A primeira barreira que o sistema imunológico do hospedeiro possui é o sistema complemento, no entanto, devido à presença do LPG e GP63 na superfície da membrana do parasito, ocorre a inibição da formação do complexo lítico de membrana, que tem como função a destruição do parasito. Posteriormente, a internalização da forma promastigota é realizada através da interação entre as moléculas C3b e C3bi, que ligam a superfície do parasito a receptores do macrófago, como o CR3. Através desse receptor, o parasito consegue desempenhar um mecanismo de escape, o qual faz com que a produção de IL-12 seja inibida (ANVERSA et al., 2017; DOS-SANTOS et al., 2016).

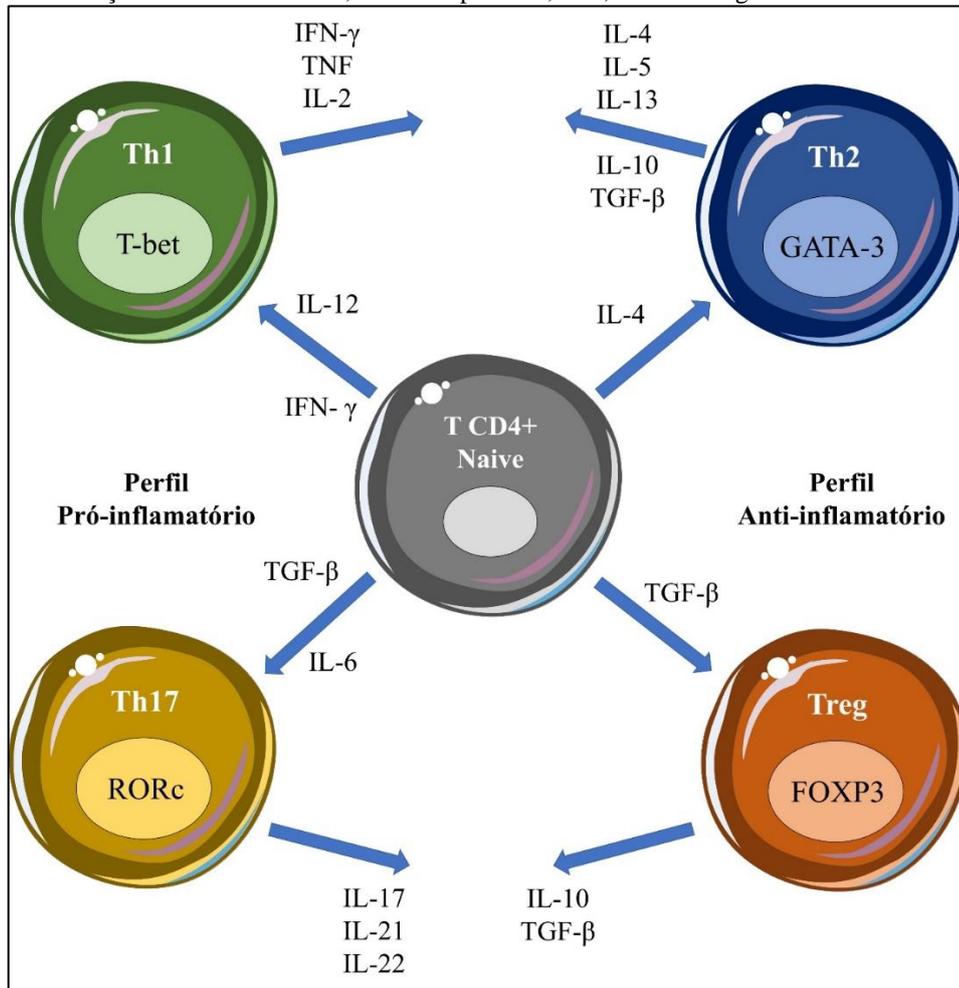
Ao ser fagocitado, o parasito retarda a formação do fagolisossomo, através do LPG, o qual inibe a quelação do cálcio e também a ação da proteína quinase C, deste modo, não sofrendo a morte pela acidez e por enzimas hidrolíticas do endossomo. Assim, o parasito diferencia-se em amastigota, tornando-se mais resistente às ações enzimáticas do macrófago, além de inibir a produção de óxido nítrico (NO) e interferir na expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II). Também atua na indução de prostaglandina E2 (PGE2), IL-10 e Fator de Crescimento Tumoral beta (*tumor growth factor beta* - TGF- $\beta$ ), que são moléculas imunossupressoras, e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (CUNNIGHAM, 2002; LIU; UZONNA, 2012).

A ativação da resposta imune ocorre através de receptores de reconhecimento padrão (RRPs), como por exemplo os receptores Toll-Like (TLRs) que detectam proteínas moleculares associadas ao patógeno (PAMPs), levando à intensificação da sinalização celular do sistema imunológico (FREITAS; PINHEIRO, 2010; KHADEM; UZONNA, 2014). Diversos estudos mostram que os TLRs contribuem para o reconhecimento de *Leishmania* sp., por células do sistema imune, principalmente TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 (FARIA et al., 2011; FLADIN et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2013).

A resposta imune adaptativa celular é ativada através das células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (CD) e macrófagos, as quais induzem a ativação e diferenciação de células T *naive* CD4<sup>+</sup>, para células T auxiliares (T *helper*). O início da diferenciação das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> dependem também da indução de fatores

transcricionais específicos, como os reguladores principais. São eles: Tbet (Tbx21) para Th1, GATA3 para Th2, RORc para Th17 e FOXP3 para Treg (FANG; ZHU, 2017; ZHU, 2010) (Figura 4), entre outros.

**Figura 4.** Diferenciação de células T *naive*, em fenótipos Th1, Th2, Th17 e Treg.



**Fonte:** o autor (adaptado de FIGUEIREDO; SCHUMACHER, 2016).

**Nota:** O linfócito T CD4+ *naive* pode se diferenciar em quatro subtipos celulares: T auxiliar (*helper*) 1, 2 ou 17 e T regulador. Essa diferenciação vai ocorrer com o estímulo de genes reguladores devido à sinalização de diferentes citocinas. Cada subpopulação de células T pode sintetizar diversas citocinas que sinalizam para as demais células um comando metabólico específico. Células Th1 e Th17 são consideradas do perfil pró-inflamatório, pois induzem a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), e por outro lado, as células Th2 e Treg são pertencentes ao perfil anti-inflamatório, pois favorecem a inibição da produção de NO e ROS.

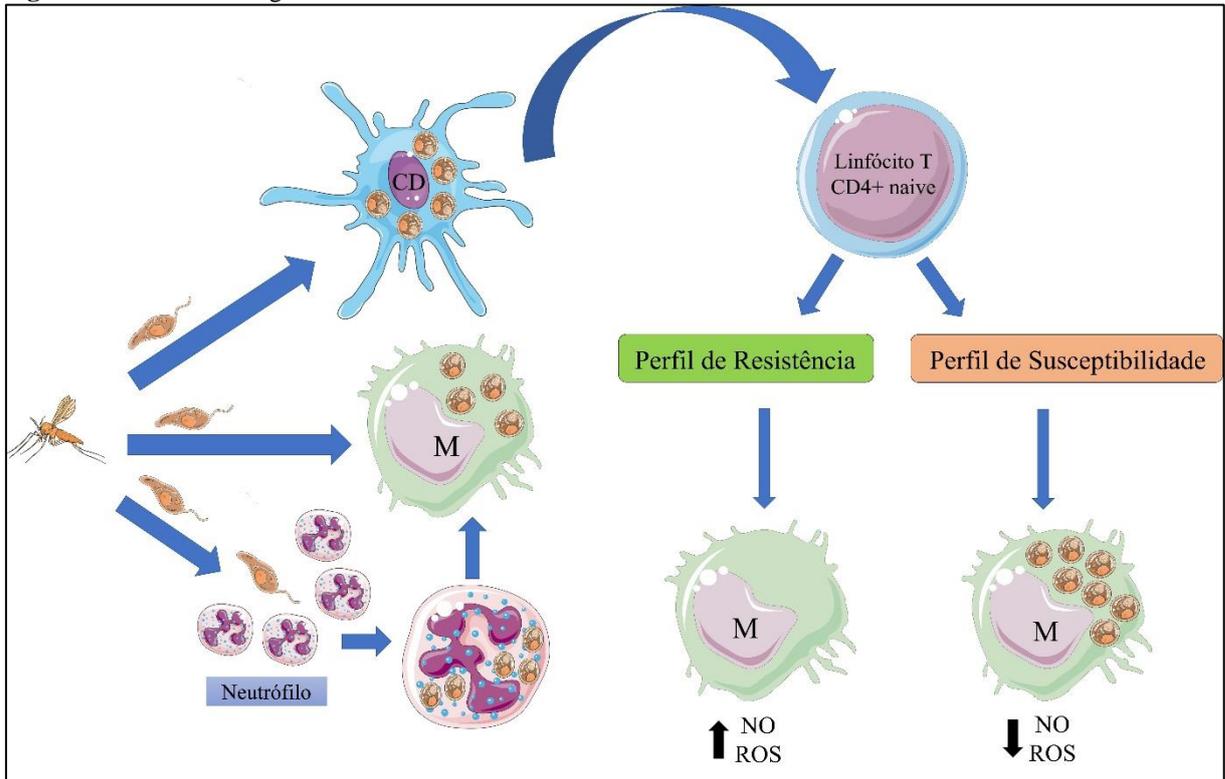
A resposta imune pode ser de um perfil de resistência ou de susceptibilidade (Figura 5). A resposta protetora ocorre através da síntese de IL-12 por CD, sinalizando para linfócitos T se diferenciarem em linfócitos Th1, e junto com células Natural Killer (NK), produzam IFN- $\gamma$ . A síntese de IFN- $\gamma$  juntamente com o Fator de Necrose Tumoral (TNF- *tumor necrosis factor*), atua ativando a enzima iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) para a produção de NO pelo macrófago, promovendo a morte do parasito intracelularmente e o possível controle da infecção

(BOGDAN et al., 2000; CARNEIRO et al., 2016; LIEW et al., 1990). A citocina IL-2, juntamente com IL-12, atua na reestimulação dessas citocinas responsáveis pela síntese do NO, proporcionando uma inibição da proliferação do parasito, e também proporcionam a diferenciação de células T reguladoras (OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016).

As vias que induzem a diferenciação de células Th2, resultando no perfil de suscetibilidade, não estão muito bem definidas, embora sabe-se que a síntese de IL-4 contribua para esse processo (KHANDEM; UZONNA, 2014). As citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  favorecem a proliferação parasitária, através da inibição da produção de IFN- $\gamma$  e TNF, além de serem responsáveis pela proliferação e diferenciação das células B, possibilitando uma maior ativação do perfil Th2 (FREITAS; NUNES-PINHEIRO, 2013; SRIVASTAVA et al., 2016).

No entanto, as citocinas IL-10 e TGF-  $\beta$  possuem um papel dicotômico, pois apesar de serem citocinas envolvidas na imunossupressão e sobrevivência do parasito, também tem papéis em outros processos na resposta imunológica. A IL-10 atua como um regulador do *feedback* do processo anti-inflamatório causado pelo parasito, limitando o dano tecidual (GUIZANI-TABBANE et al., 2004; MESQUITA et al., 2018; SARAIVA et al., 2010). Por sua vez, o TGF- $\beta$  atua também na ativação da diferenciação das subpopulações de Th17, juntamente com IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 e IL-22, além de estar presente também na ativação de células Treg (GONÇALVES-ALBUQUERQUE et al., 2017; ZHU et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016).

**Figura 5.** Perfil imunológico na leishmaniose visceral.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** M: Macrófago; CD: Célula Dendrítica; NO: Óxido Nítrico; ROS: espécies reativas de oxigênio.

**Nota:** A imagem apresenta os tipos celulares (neutrófilo, macrófago e célula dendrítica) que fagocitam as formas promastigotas do parasito do gênero *Leishmania*. Ao ser endocitado, o parasito se diferencia na forma amastigota, começando a sua multiplicação intracelularmente. Em alguns casos, o neutrófilo possui um papel de “cavalo de tróia”, pois pode ser fagocitado pelo macrófago, o qual internaliza também as formas amastigotas que estavam dentro do neutrófilo. A CD, como célula apresentadora de antígeno, sinaliza para o Linfócito T CD4+ naíve se diferenciar em algum subtipo celular. Dependendo da diferenciação do Linfócito T, a resposta imunológica pode tender para um perfil de resistência, ocorrendo um aumento de NO e ROS, favorecendo a destruição do parasito, ou então, pode ocorrer um perfil de susceptibilidade, que favorece a multiplicação parasitária, devido a inibição da produção de NO e ROS.

A resposta imune humoral promovida pelo perfil Th2, induz a diferenciação de células B em plasmócitos para a produção exacerbada de imunoglobulinas, favorecendo a formação de imunocomplexos, os quais se depositarão nos órgãos do hospedeiro, além da ativação de células como o mastócito, o qual sintetiza mediadores inflamatórios, resultando em alterações teciduais e na sintomatologia da LV (FREITAS; NUNES-PINHEIRO; 2013). Os sinais clínicos mais frequentes em humanos são febre, hepatoesplenomegalia, linfonomegalia, pancitopenia e caquexia (KARIMI et al., 2015). Em cães, além desses sinais, também é possível observar alopecia, onicogribose e ceratoconjuntivite (RIBEIRO et al., 2018; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Diversos fatores influenciam na resposta imunológica contra o parasito, tais como o estado nutricional e as variações genéticas do hospedeiro, além da virulência do parasito e o meio de transmissão. Esses fatores vão interferir na carga parasitária presente no hospedeiro,

assim como no status clínicos (sintomático ou assintomático) (HOSEIN et al., 2017; SRIVASTAVA et al., 2016).

## 2.5 Métodos de prevenção e controle para LV

Atualmente, como forma de controle da LV, o MS Brasileiro determina que os reservatórios caninos sorologicamente positivos devem ser encaminhados à eutanásia (BRASIL, 2014). No entanto, estudos já demonstram que menos da metade dos cães infectados tornam-se infecciosos (JANSEN; ROQUE, 2010) e que essa estratégia não leva à redução dos casos de LV humana (COSTA, 2011; ROMERO; BOELAERT, 2010; MIRÓ et al., 2017). Além disso, proprietários de animais eutanasiados, adquirem novos cães, renovando a população canina, desencadeando implicações epidemiológicas, uma vez que cães mais jovens possuem maior susceptibilidade a diferentes doenças (ANDRADE, 2006).

Outra estratégia é a interrupção da transmissão vetorial, impedindo a proliferação do vetor ou a picada através de barreiras físicas ou químicas (RIBEIRO et al., 2018). Muitos inseticidas são administrados diretamente no ambiente para reduzir a população vetorial e alguns são utilizados em coleiras com intuito de repelir o flebotômíneo (MIRÓ et al., 2017). A formulação desses inseticidas é baseada em piretróides semi-sintéticos administrados sozinhos ou em combinações com outras substâncias (REGUERA et al., 2016). O uso de colares impregnados com deltametrina em cães, o qual impede o contato com o flebotômíneo, vem sendo bastante adotado como medida de proteção (SEVÁ et al., 2016; WYLIE et al., 2014a).

O desenvolvimento e o emprego de imunoprolifáticos (vacinas) que possam prevenir o desenvolvimento da infecção e quebrar o ciclo de transmissão do parasito, são também de grande importância para o controle de uma doença vetorial (FOROUGH-PARVAR; HATAM, 2014; JAIN; JAIN, 2015). Vários antígenos vêm sendo estudados para o desenvolvimento de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas para a LVC, e algumas vacinas já foram desenvolvidas e são administradas fora do Brasil, como por exemplo: o antígeno total de *L. major*, constituído por parasitos atenuados associado ao Hidróxido de Alumínio; a Letifend®, baseada na proteína recombinante Q de *L. infantum* e a CaniLeish®, composta por proteínas excretadas e secretadas de *L. infantum* (LiESP) (REGUEIRA et al., 2016; WYLIE et al., 2014b).

Até o momento, duas vacinas foram licenciadas no Brasil (Leishmune® e Leishtec®), mas apenas a Leishtec®, constituída pela proteína recombinante A2 de *L. donovani*, está sendo comercializada, apresentando uma eficácia estatística vacinal de 71% (JAIN; JAIN, 2015; LEISHTEC, 2017). Porém, o MS não recomenda essa vacina em campanhas de saúde pública, impedindo assim a profilaxia em larga escala como estratégia de controle, uma vez que a

população canina mais afetada pela LV são cães errantes e/ou semi-domiciliados (BRASIL, 2014; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Além disso, o alto custo (em média R\$: 130,00 a dose) desta vacina dificulta a aquisição pelos proprietários.

## 2.6 Terapêutica para LV

O primeiro fármaco utilizado para o tratamento das leishmanioses foi o Tartarato Emético (tartarato duplo de antimônio e potássio -  $C_4H_4O_7Sb$ ) desenvolvido por Gaspar Vianna, e que posteriormente, devido a sua toxicidade, foi substituído pelo antimonial pentavalente ( $Sb^V$ ) (MATRANGOLO, 2013; VIANNA, 1912). Em diversos países, os antimoniais pentavalentes são a droga de primeira escolha, sendo estibogluconato sódico (Pentostam®) administrado em países de língua inglesa, e o Antimoniato de n-Metilglucamina (Glucantime®), utilizado em países de língua latina, como o Brasil (RATH et al., 2003; ROBERTS et al., 1998).

Os  $Sb^V$  são pró-fármacos que sofrem uma biotransformação para a forma trivalente ( $Sb^{III}$ ) tornando-se ativos contra o parasito, inibindo a síntese proteica e do material genético, além de alterar o metabolismo energético (BERMAN et al., 1985; OUTLETTE et al., 2004; WYLLIE et al., 2004). No entanto, essa droga possui diversos efeitos colaterais, como mialgia, artralgia, distúrbios gastrointestinais, cefaleia, anorexia e reações cutâneas, além de alterações renais, cardiorrespiratórias, pancreáticas e hepáticas (OLIVEIRA et al., 2011; SALDANHA et al., 2000). Com o passar do tempo, o parasito vem demonstrando mecanismos de resistência contra o  $Sb^V$ , já tendo se tornado obsoleto na Índia, porém ainda utilizado no Brasil para o tratamento das leishmanioses em humanos (CROFT et al., 2006; HEFNAWY et al., 2017; SUNDAR, 2001).

Uma alternativa terapêutica para substituir o uso dos antimoniais é a formulação lipossomal de anfotericina B (AmBisome®), um poderoso antifúngico, o qual atua na desestabilização da carga iônica da membrana plasmática de *Leishmania*, alterando sua permeabilidade e levando o parasito à morte (RAMOS et al., 1996). Apesar de apresentar maior eficácia no tratamento da LV, o grande problema do uso da AmBisome® é o seu alto custo, associado com alguns efeitos colaterais, principalmente nefrotoxicidade, além de não ter apresentado ainda uma comprovação da cura parasitológica (NOLI, AUXILIA, 2005; REGUERA et al., 2016; SOLOMON et al., 2007).

Uma droga que é bastante utilizada pelos veterinários, tanto de forma isolada como também associada a outras drogas, é o Alopurinol, o qual inibe a síntese proteica de *Leishmania*, diminuindo a carga parasitária, e é pouco tóxico para o hospedeiro (NELSON et al., 1979;

TORRES et al., 2011; YANSUR-LANDAU et al., 2017). Também vem sendo bastante utilizado como imunomodulador o Domperidona (Leisguard<sup>®</sup>), uma droga que é utilizada fora do Brasil como uma medicação curativa e preventiva para a LVC, promovendo o estímulo e a ativação da resposta imune Th1, além de conseguir reduzir os sinais clínicos dos animais (GOMÉZ-OCHOA et al., 2012; PASSOS et al., 2014; SABATÉ et al., 2014).

No Brasil, não é permitido o tratamento de cães com drogas que são utilizadas para humanos (Portaria Interministerial 1.426, de 11 de julho de 2008), existindo apenas um único medicamento disponível para o uso em cães com LV, aprovado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo MS (Nota técnica Nº 11/ 2016/ CPV/ DFIP/ SDA/ GM/ MAPA) para comercialização no Brasil: o Milteforan<sup>™</sup> (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda), que tem como princípio ativo a miltefosina. A droga possui um efeito leishmanicida, e apesar de o mecanismo de ação ainda não estar totalmente elucidado, acredita-se que esteja baseado na inibição da proteína quinase B, a qual desempenha papel fundamental em diversos processos celulares (REGUERA et al., 2016; VERMA; DEY, 2004).

A miltefosina é capaz de promover uma melhora clínica no animal através do aumento da resposta pró-inflamatória Th1, com estímulo da síntese de IFN- $\gamma$  e IL-2. Porém, não é capaz de promover cura parasitológica (DUJARDIN; DECUYPERE, 2013; REGUERA et al., 2016; WOERLY et al., 2009). Alguns estudos já demonstram a falha do tratamento da miltefosina contra *L. infantum* (OSTYN et al., 2014; PROVÉRPIO et al., 2014; SRIVSTAVA et al., 2017). Além disso, trata-se de uma droga bastante onerosa (em média R\$: 1.400,00 o frasco com 90 mL), impossibilitando sua utilização em larga escala.

## **2.8 Novos candidatos terapêuticos**

A leishmaniose é considerada multifacetada, ou seja, as respostas aos tratamentos variam de acordo com diversos fatores como a espécie do parasito, a imunidade do hospedeiro e a presença de coinfeções, tornando difícil o combate à doença. Apesar dos avanços na área da saúde, os tratamentos atuais permanecem tóxicos, longos e onerosos, ficando fora do contexto de vida da população afetada (INICIATIVA MEDICAMENTOS PARA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, 2019).

Deste modo, o desenvolvimento de um novo fármaco que seja efetivo ou que faça associação com fármacos existentes é altamente importante. É indispensável que o novo composto possua alta seletividade para o parasito, ou seja, um índice de seletividade maior que 10,0 (SHARIFI et al., 2018; WENIGER et al., 2001), e que seu mecanismo de ação seja definido. Assim, para direcionar a síntese dos compostos, é necessário que a caracterização

esteja bem determinada, como parâmetros estereoquímicos e fisicoquímicos, além da relação entre a estrutura do composto e a sua atividade biológica (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

### 2.8.1 Compostos sintéticos

Através dos avanços dos estudos químicos e farmacológicos, têm-se obtido resultados promissores de novas drogas para o tratamento de doenças infecciosas. A síntese orientada pela diversidade estrutural química vêm sendo uma das melhores estratégias para a triagem de compostos candidatos à terapia (SANGI, 2016).

Nesse contexto, destacam-se os derivados de imidas cíclicas e azóis, como importantes compostos obtidos através de síntese orgânica e com ampla variedade de atividades biológicas investigadas (ALANAZI et al., 2015). Dentre as imidas cíclicas, estudos com compostos contendo o grupamento ftalimídico vêm apresentando atividades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e leishmanicida (LIMA et al., 2002; SANTOS, 2015).

Já entre os azóis, grupamentos tiazólicos têm apresentado diversas atividades biológicas, dentre elas, um potencial efeito antiparasitário (AYATI et al., 2015; SANTIAGO et al., 2014). Além dos tiazóis, derivados triazólicos também vêm apresentando promissores resultados, inclusive atividade leishmanicida (GAZOLLA, 2015; RODRIGUES, 2015).

A combinação de compostos que possuem na sua estrutura química as classes ftalimida e tiazol tem proporcionado a inibição de tripanosomatídeos (ALIANÇA et al., 2017; GOMES et al., 2016), assim como compostos contendo os grupamentos ftalimídicos e triazólicos (HOLANDA, 2018). Assim, esses trabalhos mostram a eficácia dos derivados ftalimídicos ligados a grupos nitrogenados sobre espécies de *Leishmania* sp.

### 2.8.2 Compostos naturais

Ao longo da história, produtos naturais foram e são fontes de novos compostos para tratar as mais diversas doenças, devido a sua diversidade de metabólitos (DIAS; URBAN; ROESSNER., 2012; WATERS et al., 2010). Apesar de intensos estudos de produtos naturais, acredita-se que apenas menos de 10% da biodiversidade vegetal foi investigada quanto ao seu potencial biológico, além dos metabólitos de bactérias, protozoários e fungos que ainda são pouco explorados (CRAGG; NEWMAN, 2013). Diversos estudos com produtos naturais, frequentemente plantas e fungos, relatam atividades biológicas antiparasitárias (NEWMAN; CRAGG, 2016), incluindo contra leishmaniose (BAXARIAS et al., 2019; TOGHUEO, 2019).

Além dos seres vivos terrestres, o ecossistema marinho demonstra ser uma grande fonte de organismos potencialmente candidatos a compostos terapêuticos (HAEFNER, 2003;

KANG; SEO; PARK, 2015). Desse modo, nos últimos anos, estudos com fitobentos e fitoplanctons têm se tornado de grande interesse, apresentando atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antifúngicas, antivirais e imunomodulatórias (ANAND et al., 2016; BLUNT et al., 2018; MAYER et al., 2013; TORRES et al., 2014), além de atividades leishmanicidas (FELÍCIO et al., 2010; RANGEL et al., 2019; SOARES et al., 2016; SOUSA et al., 2017).

O grupo dos fitoplanctons é caracterizado por serem microrganismos presentes nos habitats de água dulcícola e marinha, possuindo importância na produtividade primária desses ecossistemas por estarem presentes na base da cadeia trófica (CARDOZO et al., 2007; YAMTHE et al., 2017). Dentro do fitoplâncton encontram-se os microrganismos fotossintetizantes, como as cianobactérias (Cyanobacteria) e as microalgas, sendo estas classificadas principalmente em: clorófitas (Chlorophyta), diatomáceas (Bacillariophyta), dinoflagelados (Dinophyta) e euglenofíceas (Euglenophyta) (RAVEN, 2014).

Esses microrganismos vêm se tornando um amplo objeto de estudo na área da biotecnologia e são bastante produzidos para complementar dietas alimentares, tanto para humanos, quanto para animais (DERNER et al., 2006; SPOLAORE et al., 2006). Como resultado da adaptação e sobrevivência em variados habitats ao longo da evolução, os microrganismos fotossintetizantes têm a capacidade de sintetizar inúmeros complexos metabólitos, tais como: proteínas, lipídios, carotenoides, polissacarídeos, vitaminas, e entre diversos outros. Essas moléculas vêm atraindo pesquisadores a estudarem novas substâncias para o emprego em indústrias farmacêuticas e biotecnológicas (CALDWELL, 2009; SINGH et al., 2005; SUGANYA et al., 2016).

Alguns estudos já demonstraram que as cianobactérias e as microalgas apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas: anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, imunossupressoras e antiparasitárias (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; GAMAL, 2010; LAURITANO et al., 2016). No entanto, poucas espécies desses microrganismos fotossintetizantes foram exploradas para os fins terapêuticos, havendo pouco conhecimento sobre as atividades biológicas de diferentes espécies (LAURITANO et al., 2016; YAMTHE et al., 2017), sendo necessário mais estudos que avaliem a capacidade desses microrganismos em se tornarem potenciais alvos terapêuticos.

### 3 JUSTIFICATIVA

Devido ao baixo número de drogas disponíveis para o tratamento da LV, demonstrando quão negligenciada é essa doença, faz-se necessário constantes estudos para o desenvolvimento de novos compostos com potencial terapêutico, sem ou com poucos efeitos colaterais e que não induzam facilmente a resistência, aumentando o arsenal terapêutico contra as leishmanioses (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; HEFNAWY et al., 2017).

A estratégia mais eficiente para o desenvolvimento de novos fármacos é realizar um planejamento racional que se baseie no mecanismo de ação do composto e sua estrutura, seja de origem sintética ou natural. Porém, estudos de novos medicamentos para as leishmanioses possuem falta de padronização experimental (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

No contexto da busca por novos compostos para o tratamento das leishmanioses, foi investigado o potencial leishmanicida de um novo híbrido derivado de ftalimida e triazol, o 4-(fenil)-1-(4 ftalimidobutill)-1,2,3-triazol (PT4), obtido pelo método de *click chemistry*. Resultados iniciais já obtidos pela equipe da Dra. Vera Lúcia (UFPE), Dra. Regina Bressan (FIOCRUZ-PE) e Dr. Ronaldo Nascimento (UFRPE) mostram que o composto PT4, apresentou inibição das formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, e em ambos os casos, manteve a toxicidade seletiva aos parasitos, sendo favoráveis à realização de estudos mais aprofundados e investigação dos mecanismos envolvidos.

Alvos terapêuticos de origem natural também vêm sendo investigados, dentre eles, os microrganismos fotossintetizantes, pois apresentam uma ampla diversidade química e metabólica, e dessa forma, podem ser considerados fontes de substâncias bioativas que podem ser utilizadas no tratamento de várias doenças. Algumas espécies desses microrganismos já foram observadas com atividade leishmanicida (FREILE-PELEGRIN et al., 2008; TEMPONE; MARTINS-DE-OLIVEIRA; BERLINK, 2011; YAMTHE et al., 2017), além de um potencial imunomodulador, estimulando um aumento da atividade de células NK e macrófagos, além de aumentar a síntese de citocinas do perfil Th1 (KWAK et al., 2012).

As microalgas e cianobactérias possuem várias vantagens em comparação aos demais microrganismos na produção de bioativos de interesse industrial devido aos seus requisitos nutricionais mínimos, reduzindo o custo de produção. Para cada diferentes condições de cultivo, os mesmos microrganismos podem sintetizar diferentes metabólitos bioativos, podendo ser amplamente explorados (BODE et al., 2002; MATOS et al., 2018). Estudos com extratos de Chlorophytas vêm demonstrando a capacidade anti-inflamatória e antiparasitária, podendo

também serem considerados candidatos ao desenvolvimento de formulações terapêuticas para a LV (LAURITANO et al., 2016; MELO et al., 2019; PEREIRA et al., 2015).

O desenvolvimento de um tratamento, que não atue diretamente no parasito, mas sim module a resposta do sistema imunológico do hospedeiro, pode ser também uma alternativa para o combate à doença. Portanto, novos protocolos terapêuticos devem ser adotados visando melhorar a resposta imune do paciente para um perfil de resistência, com redução da carga parasitária e, deste modo, podendo interferir na dinâmica da transmissão da doença (GONÇALVES et al., 2019; SINGH; SUNDAR, 2014).

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos e/ou extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes possuem atividade leishmanicida/leishmanioestático e imunomodulatória em células obtidas de cães e humanos com leishmaniose visceral?

#### **5 HIPÓTESE**

Os compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos e os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes possuem atividade leishmanicida/leishmanioestático e imunomodulatória protetora sobre células de cães e humanos com leishmaniose visceral.

## **6 OBJETIVO**

### **6.1 Geral**

Avaliar compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos e extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes quanto ao seu potencial leishmanicida e imunomodulador para leishmaniose visceral.

### **6.2 Específicos**

- a) determinar o índice de seletividade para o parasito em comparação com células de cães e humanos dos compostos sintéticos ftalimídico-triazólicos e extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes;
- b) analisar o perfil de resposta imune estimulada por compostos sintéticos ftalimídico-triazólicos e extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes em PBMC humano;
- c) correlacionar a produção do fator leishmanicida (Óxido Nítrico) com a síntese de citocinas dos perfis de resposta imune celular;
- d) comparar as respostas obtidas pelos compostos sintéticos ftalimídico-triazólicos e pelos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes analisadas com as drogas de referência.

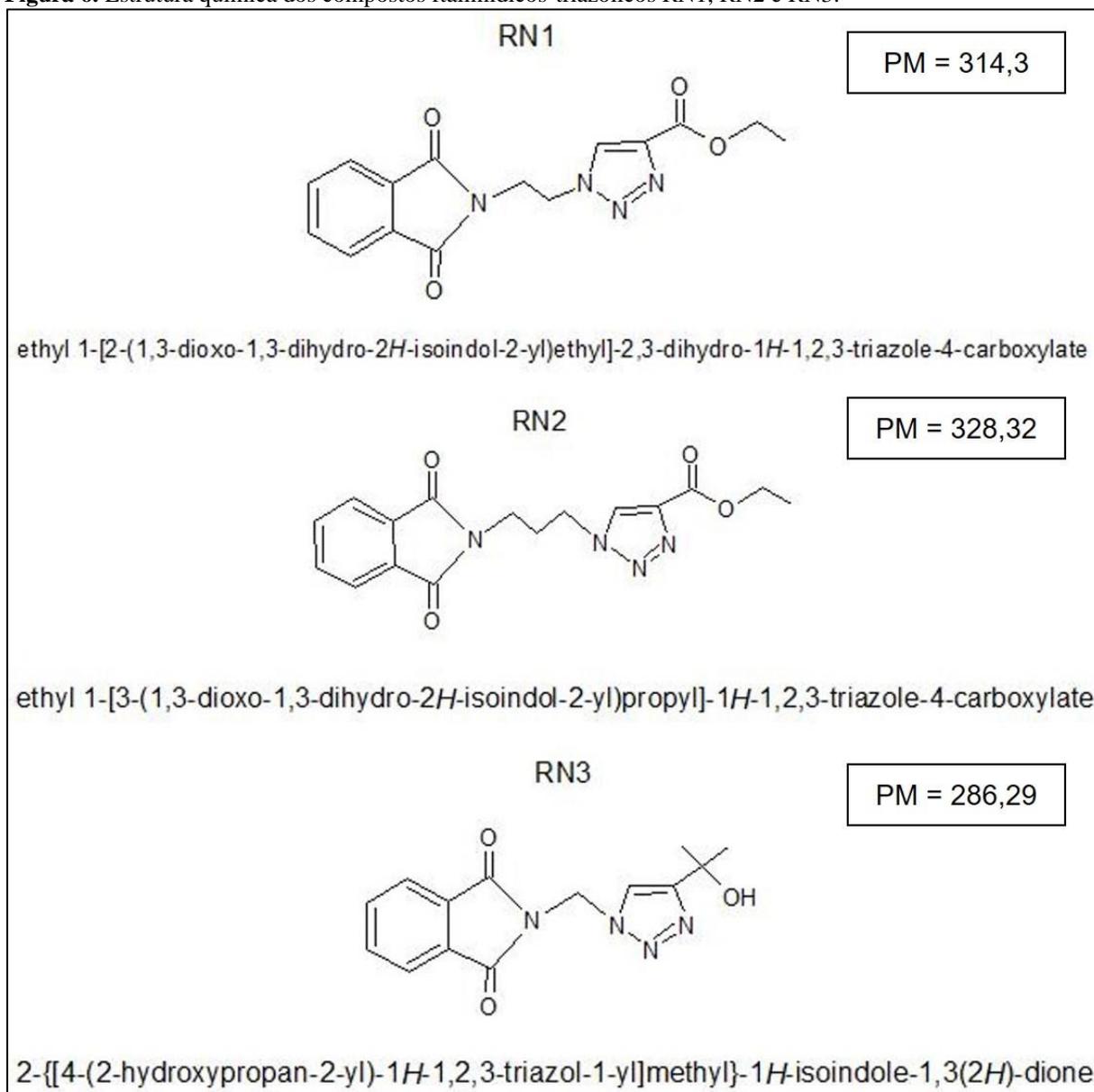
## 7 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 Obtenção dos compostos sintéticos e extratos naturais

#### 7.1.1 Descrição e obtenção dos compostos químicos sintéticos

Novos compostos químicos contendo os grupos farmacofóricos ftalimida e 1,2,3-triazol foram cedidos pela equipe da Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima (UFPE), do Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira (UFRPE) e da Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo (IAM/FIOCRUZ). Esses compostos foram sintetizados a partir da técnica de *Click Chemistry*. Suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 6.

**Figura 6.** Estrutura química dos compostos ftalimídicos-triazólicos RN1, RN2 e RN3.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** PM = Peso Molecular.

### 7.1.2 Extração de metabólitos bioativos de microrganismos fotossintetizantes

Foram cultivados quatro microrganismos fotossintetizantes (MFs), nos quais três foram selecionados a partir da coleção de cultura da Universidade do Texas (Utex, 2010): a cianobactéria *Arthrospira platensis* (Utex, 1926), além das clorófitas *Chlorella vulgaris* (Utex, 1803) e *Dunaliella tertiolecta* (Utex, 1644). O outro MF cultivado foi também do Filo Chlorophyta, o qual foi isolado do açude de Apipucos- Recife- PE, *Tetrademus obliquus* (SISGEN A5F5402).

Os cultivos das clorófitas foram realizados em frascos de Erlenmeyer com volume de cultivo de 400 mL de seus respectivos meios de cultura, com uma concentração celular inicial de 50 mg/mL, a uma temperatura de aproximadamente 28 °C e iluminância de 24  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para a cianobact\u00e9ria os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer com volume de cultivo de 200 mL em mesa agitadora, com uma concentra\u00e7\u00e3o celular inicial de 50 mg/mL, temperatura de aproximadamente 28°C e ilumin\u00e2ncia de 24  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Ap\u00f3s a finaliza\u00e7\u00e3o do cultivo, a biomassa foi liofilizada, ressuspendida em um tamp\u00e3o de Tris HCl 0,1M e ent\u00e3o as c\u00e9lulas foram lisadas pelo m\u00e9todo de sonica\u00e7\u00e3o (20 pulsos de 60 segundos, com intervalos de 60 segundos). Logo ap\u00f3s a obten\u00e7\u00e3o dos sobrenadantes do extrato, foi realizada a determina\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o proteica, sendo realizada a dosagem pelo kit BCA (BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit, Thermo-Scientific). Os extratos obtidos foram submetidos \u00e0 filtra\u00e7\u00e3o em filtro de 0,22 $\mu\text{M}$ , os quais foram utilizados para a avalia\u00e7\u00e3o da atividade biol\u00f3gica.

## **7.2 Cultivo de *L. infantum***

Formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1972/BH46) foram expandidas em cultura em meio Schneider's (Sigma-Aldrich) de pH 7,2 contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibi\u00f3tico (penicilina 200U/mL). Os repiques foram realizados entre o terceiro e quarto dia de cultivo, e incubados em uma estufa de demanda bioqu\u00edmica de oxig\u00eanio (B.O.D.) at\u00e9 a fase de crescimento exponencial, para serem utilizados nos ensaios de efeito leishmanicida/leishmanioest\u00e1tico.

Para a obten\u00e7\u00e3o das fra\u00e7\u00f5es antig\u00eanicas, a massa parasit\u00e1ria foi submetida a tr\u00eas lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) atrav\u00e9s de centrifuga\u00e7\u00f5es \u00e0 1000 x g, por 10 minutos, \u00e0 4°C. O sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C. O *pellet* resultante foi ressuspendido utilizando 1mL de PBS, para cada  $1 \times 10^9$  parasitos. Em seguida, acrescentou-se o inibidor de proteases PMSF (*Phenylmethyl-Sulfonyl Floride*) (10mg/mL) para cada 1mL da solu\u00e7\u00e3o. Posteriormente, as c\u00e9lulas foram submetidas a r\u00e1pidos congelamentos (-197°C) no Nitrog\u00eanio L\u00edquido, seguidos de descongelamento (40°C) em Banho-Maria. Logo depois, a

suspensão celular foi submetida ao processo de ultrassonicação (60 segundos/ 40W), por três vezes, sendo centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C.

O sobrenadante resultante foi a fração antigênica solúvel (*L. infantum soluble antigen*: LSA). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), e a fração estocada à -80°C. O LSA foi utilizado nos ensaios de cultura celular.

### 7.3 Coleta de material biológico

Após antissepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%, com auxílio de agulhas 25x0,7 mm, foram coletados de dois a quatro mL de sangue total de humanos e cães (APÊNDICE A), acondicionados em tubos de coleta a vácuo com anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (Vacutainer®), para o diagnóstico por qPCR da LV e LT, como descrito no item 7.4. Para a avaliação da resposta imune e realização das culturas de células, foram coletados 20 mL de sangue divididos em 2 tubos Vacutainer® com anticoagulante heparina (2 x 10 mL).

### 7.4 Diagnóstico para LV

- Exame molecular: para extração de DNA foi utilizado o QIAamp® DNA Minikit (QIAGEN®), seguindo as instruções do fabricante. Para a detecção de *L. (L.) infantum*, foi realizada uma qPCR usando o sistema LINF 1B (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009), além da utilização do sistema kDNA1 (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013) para exclusão de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana.

### 7.5 Obtenção de PBMC e cultivo celular

Ao sangue heparinizado foi adicionado PBS (pH 7,2) na proporção de 1:1. Essa mistura foi adicionada ao Ficoll-hypaque na proporção de 1:3 para obtenção do anel de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) após centrifugação à 900 x g por 30 minutos sem freio. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação (400g por 15 minutos) em PBS, sendo posteriormente ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com SBF à 10% e 1% de penicilina/estreptomicina (200 U/mL). As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan, um corante de viabilidade celular medido pela integridade da membrana celular. O valor obtido de células foi ajustado para a concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL através da adição de meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10%, para a utilização nos ensaios.

## 7.6 Determinação do Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado através da razão entre a concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) e a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub> – *inhibitory concentration*). A determinação da CC<sub>50</sub> foi feita a partir de experimentos realizados com células humanas e caninas (item 7.6.1), por sua vez a IC<sub>50</sub> foi determinada em células promastigotas de *L.infantum* (item 7.6.2). Todas as células foram tratadas com os compostos ftalimídicos-triazólicos, os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e drogas de referência.

Como drogas de referências, foram utilizados Glucantime® (Antimoniato de n-Metilglucamina - Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.), e Milteforan™ (Miltefosina - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda.), por meio do princípio ativo sintetizado e adquirido comercialmente. Os parâmetros adotados para determinar se os compostos sintéticos e os extratos naturais eram promissores e conseqüentemente seguirem com as análises: 1) apresentar baixa toxicidade para as células dos hospedeiros e alta toxicidade para o parasito; 2) apresentar desempenho melhor quando comparado com as drogas de referência, sendo ideal aqueles que apresentassem IS superior a 10 (SHARIFI et al., 2018; WENIGER et al., 2001).

### 7.6.1 Viabilidade celular

PBMC de humanos e cães saudáveis foram cultivados em placas de 96 poços e tratados com os compostos sintéticos e os extratos naturais para a realização dos ensaios de avaliação da concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>). O tratamento das células foi realizado em triplicata para cada estímulo, incubando por 24 horas, contendo 1x10<sup>6</sup> células/mL em 200µL, (BASAK et al., 2017). Após o tempo de cultivo, foi realizada uma centrifugação à 2500 x g durante 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante e adicionado o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide) na concentração de 1 mg/mL, solubilizado em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol, deixando incubado na estufa à 37°C durante 3 horas. Nas células viáveis, o MTT passa por um processo de redução de sais de tetrazólio pela enzima *Succinato desidrogenase*, formando cristais de Formazan, que posteriormente foram solubilizados com DMSO (Dimetilsulfóxido) e então a absorbância foi medida em espectrofotômetro à 540nm (MOSMANN, 1983).

Para determinação da CC<sub>50</sub> de PBMC humano e canino, os extratos naturais assim como as drogas de referência foram diluídos em meio RPMI 1640 e utilizadas as concentrações de 62,5 a 1000µg/mL para realizar os tratamentos (CORREIA et al., 2016; SHEELA-DEVI; JOSEPH; BHUVANESHWARI, 2018). Já para os compostos sintéticos, devido a problemas

de saturação ao realizar a diluição em meio RPMI 1640, foram testadas as concentrações de 25 a 400µg/mL.

#### 7.6.2 Efeito leishmanicida/leishmaoestático

Células de *L. infantum* na forma promastigota foram cultivadas para a avaliação da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub> – *inhibitory concentration*) dos compostos sintéticos e dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes. Para compostos sintéticos foram utilizadas as concentrações de 6,25 a 100µg/mL (ALIANÇA, 2016). Para os extratos naturais utilizou-se concentrações proteicas de 15,63 a 500µg/mL (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017). Para o Antimoniato de N-metilglucamina e a Miltefosina, a curva de concentração foi de 15,63 a 250µg/mL e 0,1 a 4µg/mL, respectivamente (MORAIS-TEIXEIRA et al., 2008; 2011).

O tratamento das células foi realizado em triplicata para cada estímulo, incubando por 48 horas numa placa de 96 poços, contendo 1x10<sup>6</sup> células/mL (KHADEM VATAN et al., 2017). Após o tempo de cultivo, as células foram contadas e avaliadas quanto a sua morfologia em microscópio óptico. Para a contagem das células de *L. infantum* foi levada em consideração aquelas que apresentam motilidade à microscopia óptica a 400x.

### **7.7 Análise de resposta imune**

Uma amostragem de conveniência (REIS, 2003) foi adotada, sendo coletado o sangue de seis indivíduos humanos saudáveis (VIANA et al., 2018). Portanto, indivíduos humanos sem sinais clínicos, que não receberam transfusão sanguínea e que foram negativos nos testes moleculares realizados para as leishmanioses, foram enquadrados na pesquisa.

As culturas de PBMC foram realizadas em placas de 48 poços de poliestireno, contendo 5x10<sup>5</sup> células/poço, foram estimuladas com o mitógeno Fitohemaglutinina (PHA) (10 µg/mL) (controle positivo do cultivo), o antígeno solúvel de *L. infantum* (LSA) (25 µg/mL), Antimoniato de n-Metilglucamina; Miltefosina; o composto ftalimídico-triazólico e os extratos naturais. As concentrações das drogas de referência, compostos sintéticos e extratos naturais utilizadas foram os valores da CC<sub>50</sub>; ½ da CC<sub>50</sub>; ¼ da CC<sub>50</sub> e da IC<sub>50</sub>. Poços contendo células sem estímulo serviram como o controle negativo.

As células foram tratadas e incubadas por 48 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. Após o tempo de cultivo, foi realizada uma centrifugação de 1.800 x g por 10 minutos, 300µL dos sobrenadantes foram coletados e estocados à -20°C para a dosagem de citocinas e óxido nítrico. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de PBS para remoção da

suspensão celular, a qual foi centrifugada à 300 x g por 5 minutos à 4°C. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 750µL de TRIzol® (Invitrogen) e estocado à -80°C para posterior extração do RNA.

#### 7.7.1 Avaliação da produção de citocinas

A partir dos sobrenadantes de culturas de PBMC humano foi realizada a dosagem da secreção de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) utilizando o kit *BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine* (Becton Dickinson). Inicialmente, uma curva padrão foi preparada com diluição até 1:256. As *beads* de captura foram misturadas e adicionadas nos tubos de ensaio, sendo posteriormente colocada cada amostra, e depois o reagente de detecção em todos os tubos, sendo incubado durante três horas à temperatura ambiente, protegido de luz.

Logo após a incubação, foi realizado um processo de lavagem com tampão de lavagem, sendo descartado, cuidadosamente, o sobrenadante, e por fim realizada a ressuspensão do *pellet* de beads em 300µL de tampão. A aquisição de 1800 eventos foi realizada no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson), presente no Núcleo de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ-PE, conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram analisados utilizando o *software* FCAP Array 3.0 (Becton Dickinson), e expressos pela subtração obtida entre as culturas com tratamento e o controle negativo (células sem estímulo).

#### 7.7.2 Avaliação da produção de Óxido Nítrico

A quantificação dos níveis de NO foi realizada indiretamente pela medição do nitrito nos sobrenadantes das culturas, pela reação de Griess, de acordo com Resende et al. (2013). Os estímulos (LSA, Antimoniato de n-Metilglucamina; Miltefosina; composto ftalimídico-triazólico e os extratos naturais) foram comparados ao controle negativo (PBMC sem estímulo).

#### 7.7.3 Avaliação da expressão de RNA mensageiro

Foi realizada a avaliação da expressão relativa de RNA mensageiro (mRNA) dos fatores transcricionais específicos (T-bet; GATA3; RORc e FOXP3), a partir do cultivo de PBMC humano saudável.

#### Extração de RNA por TRIzol®

Ao descongelar as células estocadas, foi adicionado 200µL de clorofórmio, após 15 minutos à temperatura ambiente e foram centrifugadas à 10.840 x g à 4°C por 15 minutos. A fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo e feita a adição de Álcool Isopropílico

(Isopropanol), na mesma quantidade, incubando por 10 minutos à  $-20^{\circ}\text{C}$ , e realizando uma centrifugação novamente. Em seguida, foi removido o sobrenadante, adicionando 1mL de Etanol à 75%, centrifugando à  $3.670 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante, deixando o tubo secar totalmente, e ao final foi ressuspensionado o RNA em  $30\mu\text{L}$  de água contendo *Diethylpyrocarbonate* (DEPC) na concentração de 0,2%, realizando a dosagem da concentração de mRNA em espectrofotômetro e armazenando à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Transcrição reversa para cDNA

Após a obtenção do mRNA, foi realizada uma transcrição reversa para DNA complementar (cDNA) através do kit comercial *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems), o qual contém a enzima *Multiscribe reverse transcriptase* ( $50\text{U}/\mu\text{L}$ ), inibidor de RNase ( $20 \text{U}/\mu\text{L}$ ), mix de dNTPs ( $10\text{mM}$ ), *primers* randômicos ( $50\mu\text{M}$ ), tampão de reação (10X RT Buffer) e solução de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2 - 25\text{mM}$ ). As condições de ciclagem utilizadas seguiram as instruções do fabricante ( $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos;  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos;  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos;  $4^{\circ}\text{C}$  até retirar). Após a dosagem da concentração das amostras em espectrofotômetro, foi realizada a RT-PCR.

#### Quantificação da expressão gênica por qPCR

A partir do cDNA foi realizada uma qPCR em tempo real (Sistema *TaqMan*®) através do sistema de detecção de sequências QuantStudio 5 e usando o kit *TaqMan*® *Gene Expression PCR Master Mix* (Applied Biosystems) para os genes reguladores principais T-bet/Tbx21 (ID: Hs00894392\_m1), GATA3 (ID: Hs00231122\_m1), RORc (ID: Hs01076112\_m1) e FOXP3 (ID: Hs01085834\_m1). Como controle endógeno da reação será utilizado o GAPDH (ID: Hs02786624\_g1).

A expressão relativa (*Relative quantitation - RQ*) do mRNA foi calculada após normalização das amostras com o controle endógeno; pelo método do *Ct* (*Cycle threshold*) comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ). Este método consiste na subtração do  $\Delta Ct$  (variação entre a média do *Ct* do gene de interesse pelo *Ct* do controle endógeno) do estímulo pelo  $\Delta Ct$  do calibrador, a ser definido de acordo com a análise a ser realizada. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e expressas como a média  $\pm$  desvio-padrão.

### **7.8 Análise dos dados**

Para determinar o valor da  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$  foram realizados os cálculos de sobrevivência (concentração de tratamento – controle sem tratamento) e inibição ( $100 -$  valor da

sobrevivência). A partir do valor de inibição, foi realizada uma análise de Regressão por Probit, através do *software* IBM SPSS Statistic 25, no qual selecionou a concentração que inibiu de 50% da população celular, tanto células dos hospedeiros humanos e caninos como células de *L. infantum*.

Foram realizadas também análises comparativas por técnicas de estatística descritiva por meio de distribuições absolutas e percentuais. Foi empregado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e de acordo com a análise, foi realizado o teste T de Student (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico), para comparações entre duas categorias; ou a análise de variância ANOVA One-way com Pós Teste de Tukey (paramétrico) ou Kruskal-Wallis com Pós-Teste de Dunns (não-paramétrico), para comparação entre mais de duas categorias.

Análises de correlação também foram realizadas através do teste de Pearson (paramétrico) e teste de Spearman (não-paramétrico) (MUKAKA, 2012). Todos os testes foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. 2007, San Diego, CA, USA), sendo considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Antes dos procedimentos de coleta do material biológico em cães, os proprietários dos animais foram convidados a participar da pesquisa e a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE B), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos. Para a captação dos animais, este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) do IAM/FIOCRUZ-PE sob o parecer n° 138/2018 (ANEXO A).

Indivíduos humanos inclusos no estudo foram convidados a participar e assinar um TCLE (APÊNDICE C), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos. Este estudo está inserido no projeto “Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para as leishmanioses.” que possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-IAM): parecer 4.077.060 (FIOCRUZ/PE), conforme parecer em anexo (ANEXO B).

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Determinação do Índice de seletividade

#### 9.1.1 Compostos sintéticos

Foram obtidos 50 mg dos compostos ftalimídicos-triazólicos RN1, RN2 e RN3 na forma liofilizada, sendo solubilizados em DMSO e diluídos no meio de cultura. Dentre as concentrações avaliadas, foi possível observar que para as células de cães, os compostos não apresentaram citotoxicidade (Figura 7), não havendo diferenças estatísticas significativas entre o controle negativo e a maior concentração dos compostos. Ao tentar aumentar a concentração dos compostos, ocorreu a saturação dos mesmos, dessa forma, não sendo possível determinar a  $CC_{50}$  e podendo considerar o valor superior a  $400\mu\text{g/mL}$ .

Já para as células de humanos, embora tenha ocorrido a extrapolação dos valores na curva, foi possível determinar a  $CC_{50}$  pelo *software*, observando-se uma diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre a concentração de  $400\mu\text{g/mL}$  e as demais concentrações com o tratamento da RN2 e RN3, e entre a concentração de  $400\mu\text{g/mL}$  e as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores do IS, bem como os de  $IC_{50}$  e  $CC_{50}$ , estão presentes na Tabela 1.

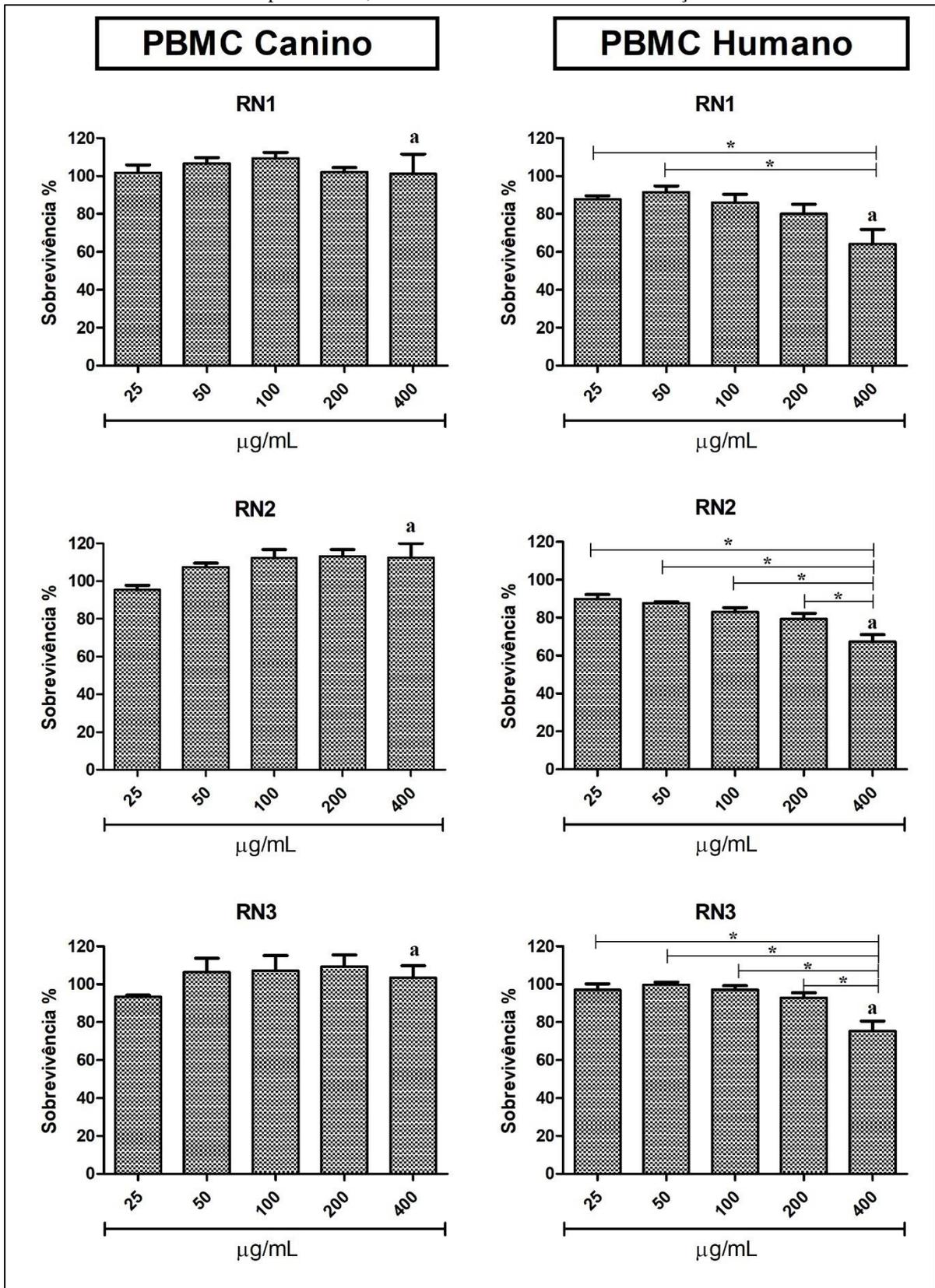
**Tabela 1.** Atividade leishmanicida ( $IC_{50}$ ) em promastigotas e efeito citotóxico ( $CC_{50}$ ) em células humanas e caninas tratadas com os compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos.

Compostos	$IC_{50}$		$CC_{50}$				IS	
	<i>L. infantum</i>		PBMC Canino		PBMC Humano		Cão	Humano
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{M}$		
<b>RN1</b>	38,6	122,8	> 400	>1.272,7	499,6	1.589,6	ND	12,9
<b>RN2</b>	41,6	126,7	> 400	>1.218,3	559,4	1.703,8	ND	13,5
<b>RN3</b>	93,8	327,6	> 400	>1.397,2	560,0	1.956,1	ND	6,0

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** ND: não determinado. IS: índice de seletividade. PBMC: células mononucleares do sangue periférico

**Figura 7.** Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidos de cães e seres humanos e tratadas com os compostos RN1, RN2 e RN3 em diferentes concentrações.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** PBMC (células mononucleares do sangue periférico). \* (Diferença estatística significativa entre concentrações). a (Diferença estatística entre PBMC Canino e Humano). Taxa de sobrevivência = concentração de tratamento – controle sem tratamento.

Comparando a taxa de sobrevivência entre o PBMC canino e o humano na concentração de 400µg/mL, foi visto que para os três compostos demonstraram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Considerando que a RN2 apresentou o maior valor de IS, escolheu-se esse composto para prosseguir com os ensaios dos grupos de estudo.

### 9.1.2 Extratos naturais

Os ensaios de determinação da  $CC_{50}$  mostraram que os extratos de *A. platensis* e *C. vulgaris* possuem pouca toxicidade para o PBMC humano, enquanto que *D. tertiolecta* e *T. obliquus* possuem maior toxicidade celular (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados quando a determinação da  $CC_{50}$  foi realizada em PBMC canino (Figura 8).

Por sua vez, a *D. tertiolecta* apresentou uma maior toxicidade para *L. infantum*, com uma menor  $IC_{50}$ , quando comparado aos demais extratos. A partir desses resultados e da disponibilidade de obtenção, os extratos que foram selecionados para prosseguir com os ensaios de resposta imune foram os das espécies *A. platensis* e *D. tertiolecta*, os quais obtiveram alto valor da  $CC_{50}$  e baixo valor da  $IC_{50}$ , respectivamente. Essa escolha não impossibilita que os extratos de *C. vulgaris* e *T. obliquus* sejam futuramente avaliados.

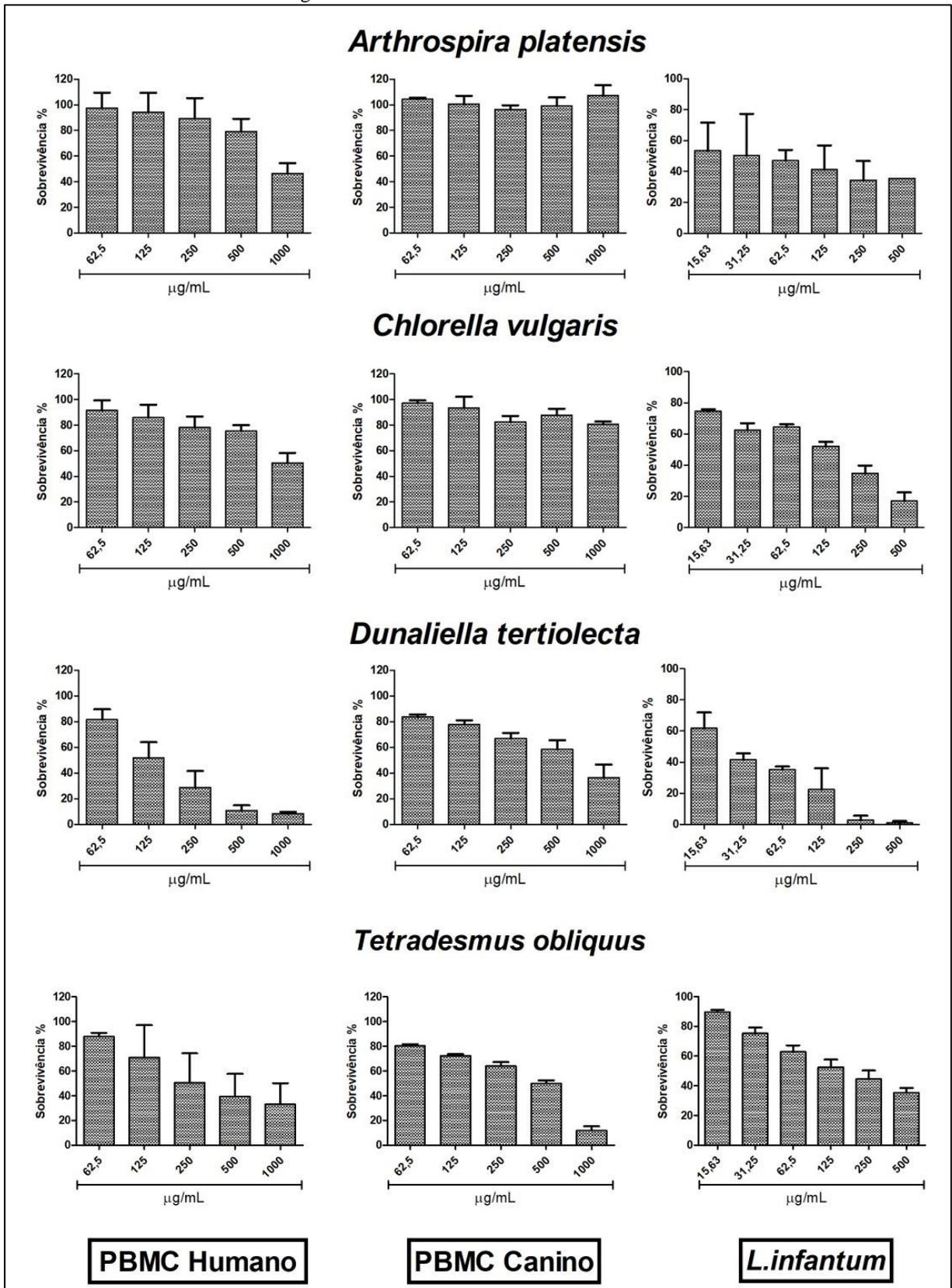
**Tabela 2.** Atividade leishmanicida ( $IC_{50}$ ) em promastigotas e efeito citotóxico ( $CC_{50}$ ) em células humanas e caninas tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.

Extratos	$IC_{50}$	$CC_{50}$		IS	
	<i>L. infantum</i> (µg/mL)	PBMC Canino (µg/mL)	PBMC Humano (µg/mL)	Cão	Humano
<i>A. platensis</i>	259,20	> 1000	986,11	ND	3,80
<i>C. vulgaris</i>	192,12	> 1000	999,66	ND	5,20
<i>D. tertiolecta</i>	53,75	600,36	252,55	11,17	4,70
<i>T. obliquus</i>	224,42	476,78	659,57	2,13	2,94

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** IS (índice de seletividade). PBMC (células mononucleares do sangue periférico). ND (não determinado).

**Figura 8.** Taxa de sobrevivência das células humanas, caninas e de *Leishmania infantum* (promastigotas), tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.



Fonte: o autor.

Legenda: PBMC (células mononucleares do sangue periférico). Taxa de sobrevivência = concentração do tratamento – controle sem tratamento.

### 9.1.3 Drogas de referência

Ao analisar as drogas de referência, Antimoniato de n-Metilglucamina (Peso Molecular = 365,98 g/mol) e Miltefosina (Peso Molecular = 407,568 g/mol), pode-se observar que Miltefosina (MTF) é mais tóxica para as células de *L. infantum* como também para PBMC humano e canino, comparando com o Antimoniato de n-Metilglucamina (Sb<sup>V</sup>). Apesar da alta toxicidade para as células dos hospedeiros, o IS humano para MTF é mais de 100 vezes maior do que o Sb<sup>V</sup>. Os valores de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>, bem como o IS, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Atividade leishmanicida (IC<sub>50</sub>) em promastigotas e efeito citotóxico (CC<sub>50</sub>) em células humanas e caninas tratadas com as drogas de referência para a leishmaniose visceral.

Compostos	IC <sub>50</sub>		CC <sub>50</sub>				IS	
	<i>L. infantum</i>		PBMC Canino		PBMC Humano		Cão	Humano
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM		
Sb <sup>V</sup>	195,15	533,2	ND	ND	412,46	1.127	ND	2,11
Miltefosina	1,23	3,02	285,81	701,2	159,49	391,3	232,2	129,6

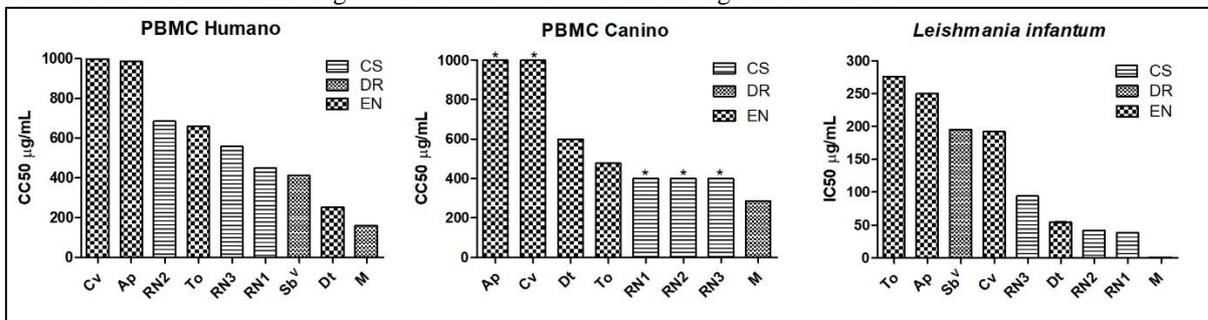
**Fonte:** o autor.

**Legenda:** IS (índice de seletividade). PBMC (células mononucleares do sangue periférico). Sb<sup>V</sup> (Antimoniato de n-Metilglucamina). ND (não determinado).

### 9.1.4 Análise comparativa

Comparando as drogas de referências com as diferentes estratégias terapêuticas (compostos ftalimídicos-triazólicos e extratos bioativos dos microrganismos fotossintetizantes) (Figura 9) pode-se observar que a MTF apresentou um valor de CC<sub>50</sub> baixo, podendo ser considerado tóxico para células humanas e caninas, no entanto, apresentou a maior atividade leishmanicida/leishmanioestática.

**Figura 9:** Comparação da concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) e inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) entre os compostos sintéticos, os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e as drogas de referência.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** Ap (*Arthrospira platensis*); Cv (*Chlorella vulgaris*); Dt (*Dunaliella tertiolecta*); To (*Tetrademus obliquus*); Sb<sup>V</sup> (Antimoniato de n-Metilglucamina); M (Miltefosina). CS (composto sintético); EN (extrato natural); DR (droga de referência). PBMC (células mononucleares do sangue periférico). \* (Concentração maior do que a determinada).

Deste modo, analisando o desempenho de todas as estratégias terapêuticas (Tabela 4), pode-se perceber que a MTF possuiu o maior valor de IS, sendo mais de 100 vezes seletivo para o parasito do que para as células humanas e caninas, sendo uma escolha terapêutica para o tratamento da LV e LVC. O Sb<sup>V</sup> possui o menor valor de IS (2,11), confirmando a toxicidade da droga em pacientes humanos que fazem uso para o tratamento da LV.

**Tabela 4.** Índices de Seletividade (IS) dos compostos sintéticos, extratos naturais e drogas de referências para leishmaniose visceral.

IS	Composto Sintético			Extratos Naturais				DR	
	RN1	RN2	RN3	Ap	Cv	Dt	To	Sb <sup>V</sup>	M
Humano	12,9	13,5	6,0	3,80	5,20	4,70	2,94	2,11	129,6
Canino	ND	ND	ND	ND	ND	11,17	2,13	ND	232,2

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** Ap (*Arthrospira platensis*); Cv (*Chlorella vulgaris*); Dt (*Dunaliella tertiolecta*); To (*Tetrademus obliquus*); Sb<sup>V</sup> (Antimoniato de n-Metilglucamina); M (Miltefosina). DR (droga de referência). IS = CC<sub>50</sub> de PBMC/IC<sub>50</sub> de *Leishmania infantum*.

## 9.2 Análise da resposta imune

### 9.2.1 Produção de citocinas

A partir dos sobrenadantes das culturas de PBMCs estimuladas, foi realizada a dosagem das citocinas. Ao analisar o composto sintético ftalimídico-triazólico RN2, foi possível observar uma supressão da resposta imunológica, uma vez que, todas as citocinas apresentaram produção inferior às células sem estímulo. A Tabela 5 mostra os valores médios das concentrações usadas para RN2. Na Tabela 6, podemos observar as correlações das citocinas produzidas, sendo verificado uma correlação positiva “muito forte” e estatisticamente significativa entre TNF e IL-10 nas concentrações de ½ CC<sub>50</sub> (*p-value*=0,04) e da IC<sub>50</sub> (*p-value*=0,04), além de uma correlação negativa “muito forte” e estatisticamente significativa entre IFN-γ x IL-4 (*p-value*=0,04) e IL-10 x IL-4 (*p-value*=0,03), na concentração da IC<sub>50</sub>.

**Tabela 5.** Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o composto ftalimídico-triazólico RN2.

Citocinas	RN2			
	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
IFN-γ	-3,886	-3,180	-3,548	-2,716
TNF	-10,57	-6,384	-10,46	-6,116
IL-10	-38,62	-30,01	-38,49	-28,85
IL-4	-0,116	0,104	-0,156	0,112
IL-2	-1,552	-1,322	-1,464	-1,098
IL-6	-6942,73	-6377,0	-6918,46	-6048,75

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%).

**Tabela 6.** Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações do composto ftalimídico-triazólico RN2.

	A x B	A x C	A x D	A x E	B x C	B x D	B x E	C x D	C x E	D x E
CC <sub>50</sub>										
<i>rs</i>	-0,20	0,70	-0,10	0,60	0,50	-0,10	-0,50	-0,40	0,00	0,30
<i>p-value</i>	0,78	0,23	0,95	0,35	0,45	0,95	0,45	0,52		0,68
1/2 CC <sub>50</sub>										
<i>r</i>	0,38	0,67	-0,86	0,78	<b>0,89</b>	-0,66	-0,14	-0,92	0,29	-0,64
<i>p-value</i>	0,53	0,21	0,06	0,12	<b>0,04*</b>	0,23	0,82	0,03	0,64	0,24
1/4 CC <sub>50</sub>										
<i>rs</i>	-0,10	0,60	-0,90	0,70	0,50	0,30	-0,60	-0,30	0,10	-0,60
<i>p-value</i>	0,95	0,35	0,08	0,23	0,45	0,68	0,35	0,68	0,95	0,35
IC <sub>50</sub>										
<i>rs</i>	0,36	0,67	<b>-0,90</b>	0,43	<b>0,90</b>	-0,66	-0,65	<b>-0,92</b>	-0,37	-0,01
<i>p-value</i>	0,55	0,22	<b>0,04*</b>	0,47	<b>0,04*</b>	0,22	0,24	<b>0,03*</b>	0,54	0,98

**Fonte:** o autor.

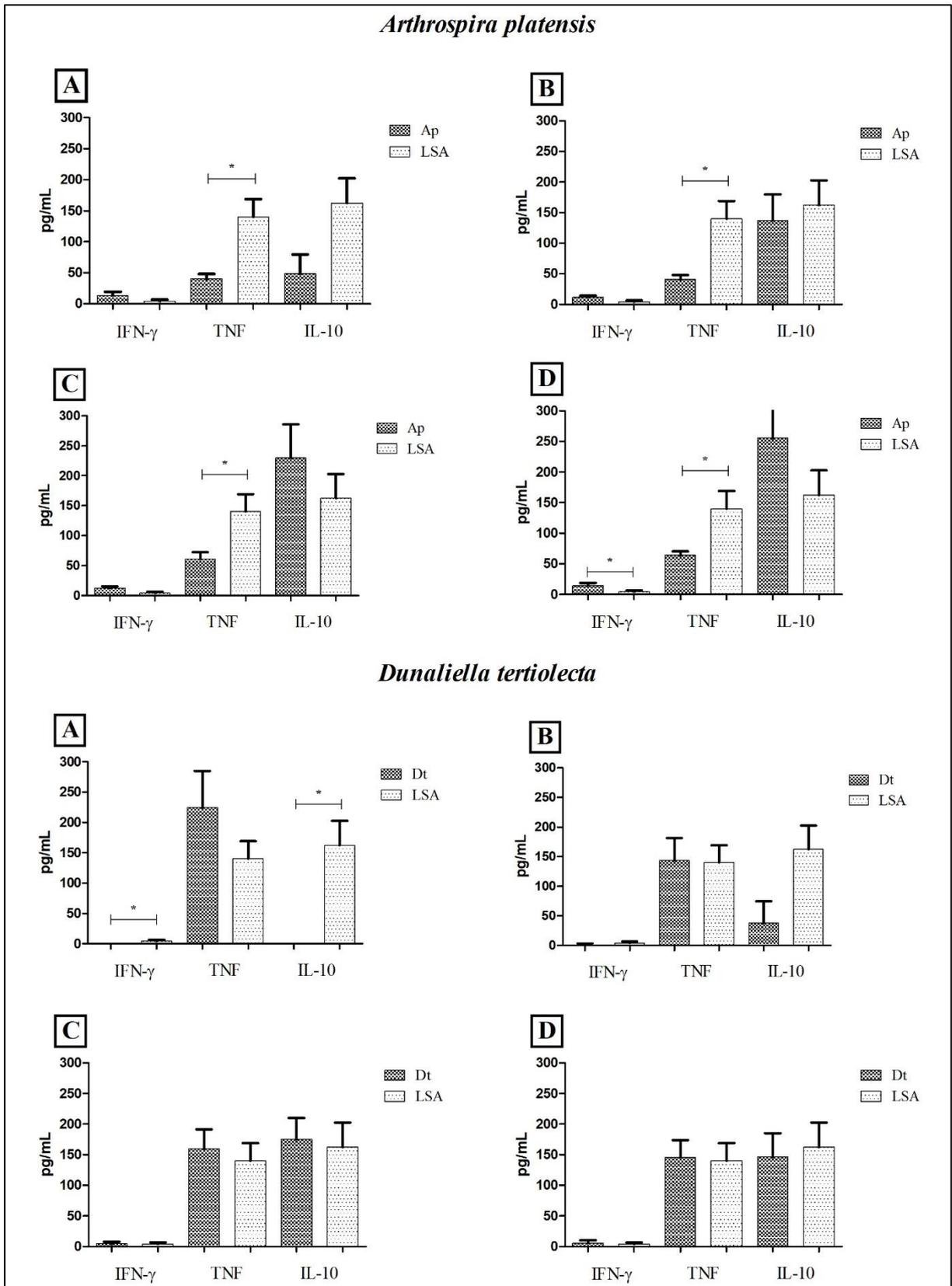
**Legenda:** A (IFN- $\gamma$ ); B (TNF); C (IL-10); D (IL-4); E (IL-2); r (Coeficiente de correlação de Pearson); rs (Coeficiente de correlação de Spearman); CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05); - (não determinado). Valores em negrito demonstram uma correlação muito forte.

Para os extratos, observamos que tanto a espécie *A. platensis* como *D. tertiolecta* induzem a produção de citocinas do perfil Th1, em todas as concentrações avaliadas, demonstrando um estímulo positivo contra a LV (Figura 10). Um destaque para a citocina do perfil Th2 (IL-10), a qual apresenta diminuição gradativamente de acordo com o aumento da concentração dos extratos, havendo uma diferença estatística significativa entre as concentrações, tanto para o extrato de *A. platensis* (*p-value*=0,031) como *D. tertiolecta* (*p-value*=0,007).

Comparando os resultados obtidos do extrato de *A. platensis* com o LSA, observa-se que, para todas as concentrações, houve uma resposta protetora Th1, com estímulo à produção de IFN- $\gamma$  superior a observada pelo LSA, havendo diferença estatística significativa para a concentração da IC<sub>50</sub> (*p-value*=0,032). Quanto à produção de TNF, o LSA induz maiores níveis estatisticamente significativos desta citocina quando comparado a todas as concentrações do extrato.

Já o extrato de *D. tertiolecta* em comparação com o LSA, observa-se que, para todas as concentrações, houve uma resposta protetora Th1, com estímulo de TNF semelhante a observada com o LSA. Além disso, na concentração de CC<sub>50</sub>, o extrato induziu produção de IL-10 (*p-value*=0,002) e IFN- $\gamma$  (*p-value*=0,008) inferior ao LSA. A Tabela 7 apresenta os valores médios da produção das citocinas, em pg/mL, após o estímulo celular com as quatro concentrações de cada extrato.

**Figura 10.** Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (valor da CC<sub>50</sub>); B (metade do valor da CC<sub>50</sub>); C (um quarto do valor da CC<sub>50</sub>); D (valor da IC<sub>50</sub>); LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum*); Ap (*Arthrospira platensis*) e Dt (*Dunaliella tertiolecta*). \* (*p*-value < 0,05).

**Tabela 7.** Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com os extratos de *Arthrospira platensis* e *Dunaliella tertiolecta*.

<i>A. platensis</i>					
Citocinas	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	p-value
IFN-γ	13,63	11,90	12,54	14,78	0,92
TNF	40,71	41,27	61,19	64,18	0,63
<b>IL-10</b>	<b>48,77</b>	<b>137,2</b>	<b>229,9</b>	<b>255,7</b>	<b>0,031*</b>
IL-4	0,21	0,33	-0,03	0,18	0,21
IL-2	-1,03	-0,46	-1,20	-0,72	0,48
IL-6	72365,50	80169,25	78747,92	82594,58	0,95
<i>D. tertiolecta</i>					
Citocinas	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	p-value
IFN-γ	-3,502	0,674	4,542	5,504	0,20
TNF	225,0	143,3	160,2	146,0	0,48
<b>IL-10</b>	<b>-21,48</b>	<b>37,85</b>	<b>175,1</b>	<b>146,3</b>	<b>0,007*</b>
IL-4	-0,038	0,20	-0,148	0,142	0,51
IL-2	-0,942	-0,43	-0,704	-1,074	0,43
IL-6	54561,87	51763,90	75698,25	70804,39	0,57

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05).

Ao analisar a correlação das citocinas para os extratos, foi observado que entre TNF e IL-4 nas concentrações da CC<sub>50</sub> e ½ da CC<sub>50</sub> do extrato de *A. platensis* (Tabela 8), houve uma correlação negativa “muito forte” estatisticamente significativa (*p-value*=0,02) e positiva (*p-value*=0,01), respectivamente. Para o extrato de *D. tertiolecta*, houve correlações muito forte, porém nenhuma significativa (Tabela 9).

**Tabela 8.** Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de *Arthrospira platensis*.

	A x B	A x C	A x D	A x E	B x C	B x D	B x E	C x D	C x E	D x E
CC <sub>50</sub>										
r	0,65	0,57	-0,50	-0,18	0,40	<b>-0,92</b>	0,10	-0,41	-0,83	0,05
p-value	0,24	0,32	0,39	0,77	0,50	<b>0,02*</b>	0,87	0,50	0,08	0,93
1/2 CC <sub>50</sub>										
r	0,64	0,38	0,46	-0,14	0,47	<b>0,97</b>	0,52	0,50	0,11	0,71
p-value	0,25	0,53	0,43	0,83	0,42	<b>0,01*</b>	0,37	0,39	0,86	0,18
1/4 CC <sub>50</sub>										
r	0,23	0,12	0,46	-0,59	0,38	0,30	0,13	0,86	-0,41	-0,37
p-value	0,71	0,85	0,44	0,30	0,53	0,63	0,84	0,06	0,49	0,54
IC <sub>50</sub>										
rs	0,10	0,20	0,70	-0,40	-0,40	0,00	-0,20	0,70	-0,60	<b>-0,90</b>
p-value	0,95	0,78	0,23	0,52	0,52	-	0,78	0,23	0,35	<b>0,08</b>

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (IFN-γ); B (TNF); C (IL-10); D (IL-4); E (IL-2); r (Coeficiente de correlação de Pearson); rs (Coeficiente de correlação de Spearman); CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05); - (não determinado). Valores em negrito demonstram uma correlação muito forte.

**Tabela 9.** Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de *Dunaliella tertiolecta*.

	A x B	A x C	A x D	A x E	B x C	B x D	B x E	C x D	C x E	D x E
CC50										
<i>rs</i>	0,70	0,30	0,50	0,60	0,30	0,30	<b>0,90</b>	0,70	0,10	0,40
<i>p-value</i>	0,23	0,68	0,45	0,35	0,68	0,68	<b>0,08</b>	0,23	0,95	0,52
1/2 CC50										
<i>rs</i>	0,00	-0,30	-0,30	0,30	0,20	0,20	-0,70	-0,20	-0,70	0,30
<i>p-value</i>	-	0,68	0,68	0,68	0,78	0,78	0,23	0,78	0,23	0,68
1/4 CC50										
<i>rs</i>	-0,60	-0,20	0,30	0,40	-0,60	-0,50	-0,50	0,30	-0,10	0,00
<i>p-value</i>	0,35	0,78	0,68	0,52	0,35	0,45	0,45	0,68	0,95	-
IC50										
<i>rs</i>	0,40	<b>-0,90</b>	-0,60	0,30	-0,70	-0,30	-0,10	0,70	-0,10	0,50
<i>p-value</i>	0,52	<b>0,08</b>	0,35	0,68	0,23	0,68	0,95	0,23	0,95	0,45

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (IFN- $\gamma$ ); B (TNF); C (IL-10); D (IL-4); E (IL-2); r (Coeficiente de correlação de Pearson); rs (Coeficiente de correlação de Spearman); CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05); - (não determinado). Valores em negrito demonstram uma correlação muito forte.

Da mesma forma que a RN2, as drogas de referência apresentaram uma supressão imunológica, com exceção da citocina TNF, que teve uma produção maior pelas células estimuladas com 1/4 da CC<sub>50</sub> da MTF; e a IL-10, que foi produzida pelas células estimuladas com todas as concentrações do Sb<sup>V</sup>, e da concentração de IC<sub>50</sub> da MTF. A Tabela 10 apresenta os valores médios da produção das citocinas a partir das concentrações de cada droga. Em relação a correlação entre as citocinas, para o Sb<sup>V</sup>, houveram correlações muito forte, mas não estatisticamente significativas (Tabela 11), por sua vez, para a MTF (Tabela 12) foi possível observar correlações negativas muito fortes estatisticamente significativas entre IL-4 e IL-2 na concentração da CC<sub>50</sub> (p-value=0,03), e entre TNF e IL-10 na concentração da IC<sub>50</sub> (p-value=0,01).

**Tabela 10.** Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com as drogas de referência.

Antimonial de n-Metilglucamina				
Citocinas	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
IFN- $\gamma$	-2,853	-3,743	-1,335	2,000
TNF	-2,603	-0,300	-0,418	0,900
IL-10	8,112	2,213	4,268	11,82
IL-4	-0,398	-0,403	-0,288	0,298
IL-2	-1,138	-1,395	-0,720	-0,640
IL-6	3224,69	642,72	2057,69	3797,36
Miltefosina				
Citocinas	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
IFN- $\gamma$	-4,660	-4,635	-3,998	1,538
TNF	-8,105	-4,945	0,635	-2,138
IL-10	-35,08	-35,16	-34,54	0,128
IL-4	-0,263	-0,39	-0,185	-0,273
IL-2	-1,670	-1,748	-1,508	-1,138
IL-6	-6926,96	-6857,52	-6755,01	676,79

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%).

**Tabela 11.** Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações da droga de referência Antimonial de n-Metilglucamina.

	A x B	A x C	A x D	A x E	B x C	B x D	B x E	C x D	C x E	D x E
CC <sub>50</sub>										
<i>rs</i>	0,00	0,40	-	0,80	-0,20	0,00	-0,40	-0,40	0,00	-0,80
<i>p-value</i>	-	0,75	-	0,33	0,92	-	0,75	0,75	-	0,33
1/2 CC <sub>50</sub>										
<i>r</i>	-0,50	0,69	-0,54	0,74	0,22	0,88	-0,11	0,23	<b>0,90</b>	0,09
<i>p-value</i>	0,50	0,31	0,46	0,26	0,78	0,12	0,89	0,77	<b>0,10</b>	0,91
1/4 CC <sub>50</sub>										
<i>r</i>	-0,81	0,62	-0,64	0,01	-0,89	<b>0,91</b>	0,52	-1,00	-0,41	0,43
<i>p-value</i>	0,19	0,38	0,36	0,99	0,11	<b>0,09</b>	0,48	0,001	0,59	0,57
IC <sub>50</sub>										
<i>rs</i>	-0,80	0,80	-	0,20	-	0,80	-0,40	-0,80	0,40	-0,20
<i>p-value</i>	0,33	0,33	-	0,92	-	0,33	0,75	0,33	0,75	0,92

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (IFN- $\gamma$ ); B (TNF); C (IL-10); D (IL-4); E (IL-2); r (Coeficiente de correlação de Pearson); rs (Coeficiente de correlação de Spearman); CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05); - (não determinado: *software* não foi possível calcular). Valores em negrito demonstram uma correlação muito forte.

**Tabela 12.** Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações da droga de referência Miltefosina.

	A x B	A x C	A x D	A x E	B x C	B x D	B x E	C x D	C x E	D x E
CC <sub>50</sub>										
<i>r</i>	0,05	0,72	-0,22	0,46	0,71	0,22	-0,18	-0,14	0,32	<b>-0,97</b>
<i>p-value</i>	0,95	0,28	0,78	0,54	0,29	0,78	0,82	0,86	0,68	<b>0,03*</b>
1/2 CC <sub>50</sub>										
<i>rs</i>	0,00	0,80	0,00	<b>1,00</b>	0,60	<b>1,00</b>	0,00	0,60	0,80	0,00
<i>p-value</i>	-	0,33	-	<b>0,08</b>	0,42	<b>0,08</b>	-	0,42	0,33	-
1/4 CC <sub>50</sub>										
<i>rs</i>	0,40	0,70	-0,43	0,53	0,93	0,50	-0,08	0,23	0,13	-0,88
<i>p-value</i>	0,60	0,30	0,57	0,47	0,07	0,50	0,92	0,77	0,87	0,12
IC <sub>50</sub>										
<i>r</i>	-0,59	0,64	0,15	0,61	<b>-0,99</b>	0,54	-0,78	-0,44	0,74	-0,68
<i>p-value</i>	0,41	0,36	0,85	0,39	<b>0,01*</b>	0,46	0,22	0,56	0,26	0,32

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (IFN- $\gamma$ ); B (TNF); C (IL-10); D (IL-4); E (IL-2); *r* (Coeficiente de correlação de Pearson); *rs* (Coeficiente de correlação de Spearman); CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (*p-value* < 0,05); - (não determinado: *software* não foi possível calcular). Valores em negrito demonstram uma correlação muito forte.

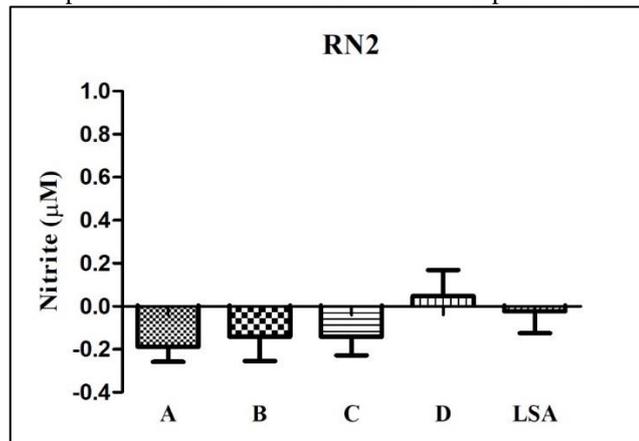
### 9.2.2 Produção do Óxido Nítrico

A dosagem do nitrito para a avaliação da produção indireta de NO foi realizada em sobrenadantes das culturas de PBMC. Ao analisar a RN2, observa-se que esse composto obteve uma produção menor quando comparado as células sem estímulo (Figura 11).

Para os extratos, foi observado que há uma produção de NO um pouco maior quando comparado às células sem estímulo e estimuladas com o LSA (o qual demonstra uma redução na produção de NO, quando comparado às células sem estímulos). É observado também que a dosagem do nitrito está diretamente proporcional à concentração do estímulo (Figura 12). Diferenças estatísticas significativas são observadas entre a maior concentração (CC<sub>50</sub>) de cada extrato e o LSA (*A. platensis*: *p-value*= 0,017; *D. tertiolecta*: *p-value*= 0,005).

Por sua vez, as DRs também obtiveram uma medição de nitrito um pouco maior do que quando comparado as células sem estímulo e estimuladas com o LSA, porém não havendo a proporcionalidade entre dosagem e concentração (Figura 13). Para o Sb<sup>V</sup>, ocorreu diferença estatística significativa entre as concentrações de 1/2 da CC<sub>50</sub> (*p-value*=0,028) e 1/4 da CC<sub>50</sub> (*p-value*=0,023) com o LSA, e já para a MTF, uma diferença estatística significativa entre a CC<sub>50</sub> e LSA (*p-value*=0,041).

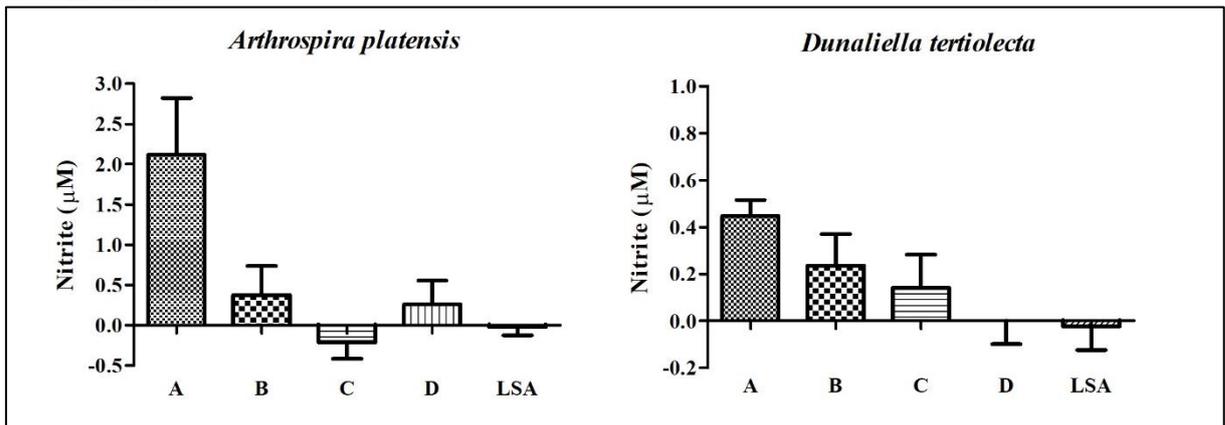
**Figura 11.** Medição do nitrito após os estímulos das células com o composto ftalimídico-triazólico RN2.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (valor da  $CC_{50}$ ); B (metade do valor da  $CC_{50}$ ); C (um quarto do valor da  $CC_{50}$ ); D (valor da  $IC_{50}$ ) e LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* – 25µg/mL).

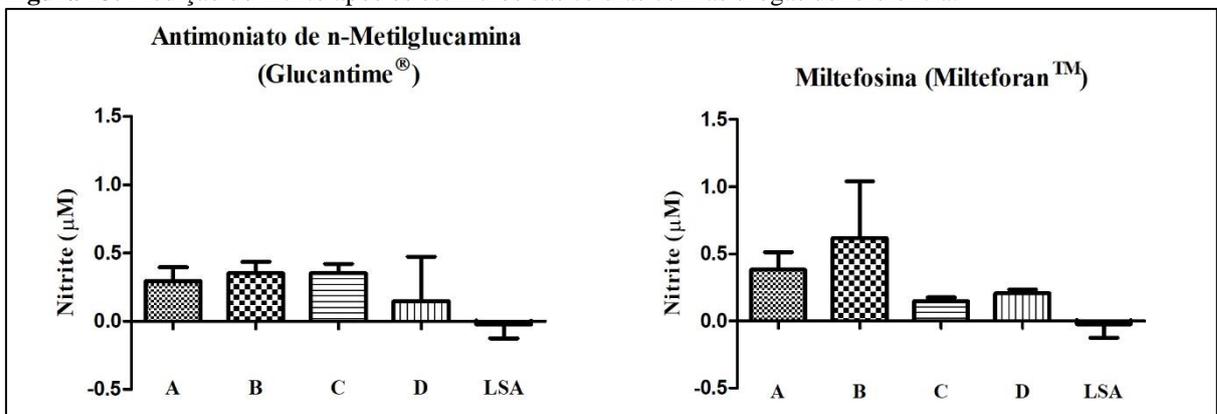
**Figura 12.** Medição do nitrito após os estímulos das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (valor da  $CC_{50}$ ); B (metade do valor da  $CC_{50}$ ); C (um quarto do valor da  $CC_{50}$ ), D (valor da  $IC_{50}$ ) e LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* – 25µg/mL).

**Figura 13.** Medição do nitrito após os estímulos das células com as drogas de referência.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (valor da  $CC_{50}$ ); B (metade do valor da  $CC_{50}$ ); C (um quarto do valor da  $CC_{50}$ ), D (valor da  $IC_{50}$ ) e LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* – 25µg/mL).

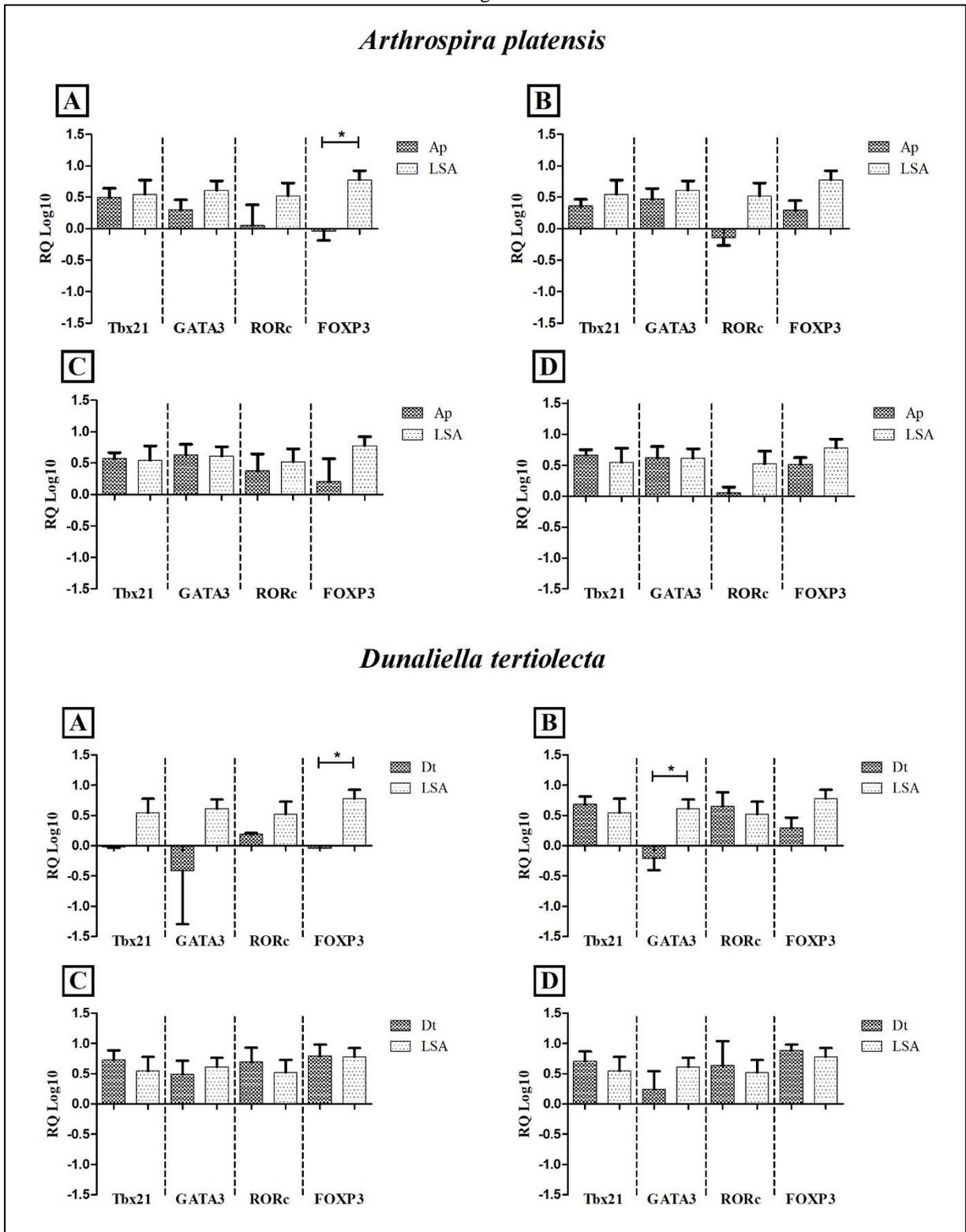
### 9.2.3 Expressão gênica

Em virtude dos resultados da produção de citocinas e do óxido nítrico, foi realizada a avaliação da expressão gênica apenas para os extratos naturais e drogas de referência, excluindo o composto RN2. A partir das PBMCs humanas estimuladas e/ou tratadas *in vitro*, foi realizado a extração do RNA e feita a transcrição reversa para cDNA para a quantificação dos genes Tbx21, GATA3, RORc e FOXP3, os quais estão relacionados com a indução da diferenciação das células T para os perfis Th1, Th2, Th17 e Treg, respectivamente.

Ao analisarmos os resultados da expressão gênica estimulada com os extratos naturais (Figura 14), observa-se que em todas as concentrações do extrato de *A. platensis* existe um equilíbrio entre o perfil Th1/Th2, com a média da expressão do gene Tbx21 maior do que a do GATA3 na maior concentração de estímulo, resultados semelhantes ao LSA. Por sua vez, o gene FOXP3, somente na maior concentração, apresentou uma expressão negativa, e tendo o gene RORc variando bastante de concentração para concentração, apresentando uma maior expressão na concentração de  $\frac{1}{4}$  da  $CC_{50}$  (Tabela 13).

Já para o extrato de *D. tertiolecta*, pode-se observar que nas menores concentrações ocorreu um equilíbrio entre todos os genes indutores, com a média de expressão do gene GATA3 inferior aos demais. Como melhor resultado apresentado, a concentração de  $\frac{1}{2}$  da  $CC_{50}$  estimulou uma expressão positiva equilibrada entre os perfis Th1xTh17xTreg, com expressão negativa de GATA3, o qual induz o perfil Th2, e diferença estatística significativa quando comparado ao LSA ( $p\text{-value}=0,009$ ). Na maior concentração (Figura 14.A), houve apenas a expressão positiva do gene RORc.

**Figura 14.** Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcripcionais específicos após o estímulo das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (valor da  $CC_{50}$ ); B (metade do valor da  $CC_{50}$ ); C (um quarto do valor da  $CC_{50}$ ); D (valor da  $IC_{50}$ ); LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* – 25µg/mL); Ap (*Arthrospira platensis*) e Dt (*Dunaliella tertiolecta*). Calibrador usado foi o PHA. \* (Diferença estatística =  $p$ -value < 0,05).

**Tabela 13.** Quantificação relativa da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.

<i>Arthrospira platensis</i>				
Genes	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
Tbx21	0,49	0,36	0,57	0,67
GATA3	0,30	0,47	0,64	0,62
RORc	0,05	-0,14	0,38	0,05
FOXP3	-0,04	0,29	0,21	0,51
<i>Dunaliella tertiolecta</i>				
Genes	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
Tbx21	-0,02	0,69	0,73	0,71
GATA3	-0,41	-0,20	0,49	0,24
RORc	0,19	0,65	0,69	0,64
FOXP3	-0,05	0,29	0,79	0,88

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%).

Analisando a correlação entre os genes, para a *A. platensis* foi observado uma correlação positiva muito forte significativa entre Tbx21 e RORc na concentração de ½ da CC<sub>50</sub> ( $p$ -value=0,047) (Tabela 14). Em relação a análise de correlação do extrato de *D. tertiolecta*, na maior concentração, não foi possível ser realizado o cálculo pelo *software* e nas demais concentrações não foram observadas correlações estatisticamente significativas (Tabela 15).

**Tabela 14.** Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de *Arthrospira platensis*.

	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
CC <sub>50</sub>						
r	-0,18	0,50	-0,43	0,76	<b>-0,97</b>	<b>-0,90</b>
p-value	0,89	0,67	0,57	0,45	<b>0,16</b>	<b>0,29</b>
1/2 CC <sub>50</sub>						
r	-0,22	<b>0,95</b>	0,87	-0,28	0,24	0,84
p-value	0,78	<b>0,047*</b>	0,054	0,72	0,76	0,16
1/4 CC <sub>50</sub>						
r	-0,48	-0,85	0,72	<b>0,97</b>	0,28	-0,21
p-value	0,52	0,35	0,17	<b>0,17</b>	0,72	0,87
IC <sub>50</sub>						
r	-0,41	-0,23	0,59	0,88	0,14	0,55
p-value	0,59	0,77	0,29	0,12	0,86	0,45

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (Tbx21); B (GATA3); C (RORc); D (FOXP3); r (Coeficiente de correlação de Pearson); CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* ( $p$ -value < 0,05). Valores em negrito indicam uma correlação muito forte.

**Tabela 15.** Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de *Dunaliella tertiolecta*.

	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
1/2 CC <sub>50</sub>						
r	0,35	-	<b>0,94</b>	-	0,02	0,45
p-value	0,77	-	<b>0,21</b>	-	0,99	
1/4 CC <sub>50</sub>						
r	-0,87	-	-0,96	-	<b>0,97</b>	-
p-value	0,32	-	0,17	-	<b>0,16</b>	-
IC <sub>50</sub>						
r	-0,68	<b>0,95</b>	-0,76	-0,81	<b>0,91</b>	<b>-0,91</b>
p-value	0,32	<b>0,20</b>	0,24	0,40	<b>0,09</b>	<b>0,27</b>

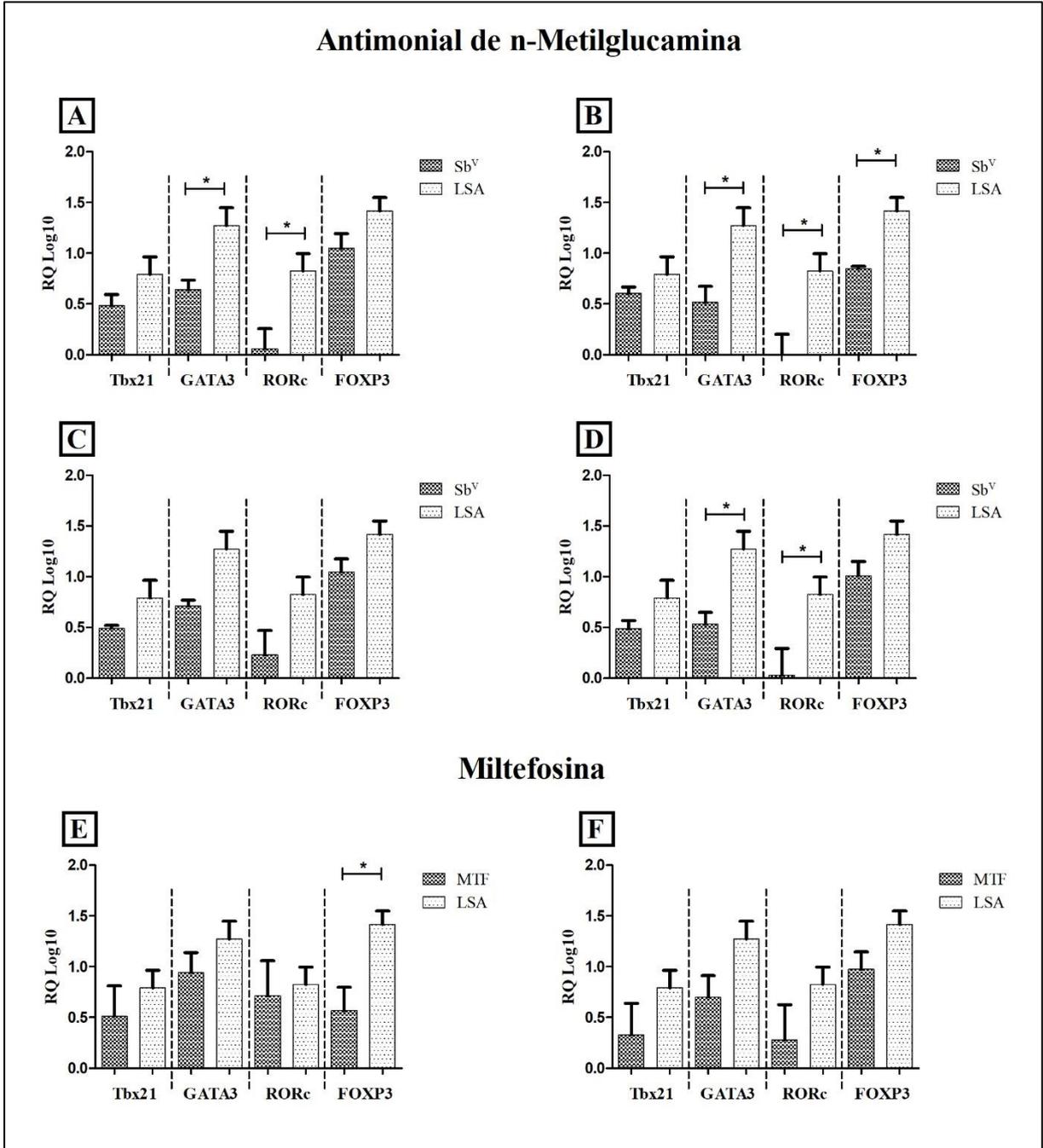
**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (Tbx21); B (GATA3); C (RORc); D (FOXP3); r (Coeficiente de correlação de Pearson); CC<sub>50</sub> (Concentração Citolóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05). Valores em negrito indicam uma correlação muito forte. - (não determinado: *software* não foi possível calcular).

Para o Sb<sup>V</sup>, foi observada a expressão do gene FOXP3, o qual apresentou uma média de quantificação relativa superior aos demais genes, em todas as concentrações (Figura 15). Por outro lado, o gene RORc apresentou as menores médias, quando comparado aos demais genes, também para todas as concentrações. Os genes GATA3 e RORc, em todas as concentrações, obtiveram expressão inferior ao LSA, havendo diferenças estatísticas significativas para todas as concentrações, exceto a de ¼ da CC<sub>50</sub>. Níveis elevados de expressão do gene FOXP3 na concentração de ½ da CC<sub>50</sub> foram observados quando comparado com o LSA (*p-value*=0,033).

Por sua vez, para a MTF, observou-se expressão gênica apenas para as concentrações de ¼ da CC<sub>50</sub> e a IC<sub>50</sub>. Os fatores transcricionais foram expressos de forma semelhante ao LSA, com uma diferença significativa apenas para o gene FOXP3 na concentração de ¼ da CC<sub>50</sub> (*p-value*=0,006). As médias das quantificações relativas dos genes encontram-se na Tabela 16.

**Figura 15.** Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcripcionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência.



**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (valor da CC<sub>50</sub>); B (metade do valor da CC<sub>50</sub>); C, E (um quarto do valor da CC<sub>50</sub>); D, F (valor da IC<sub>50</sub>); LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* – 25µg/mL); Sb<sup>V</sup> (Antimonial pentavalente) e MTF (Miltefosina). Calibrado usado foi o PHA. \* (Diferença estatística = *p*-value < 0,05).

**Tabela 16.** Quantificação relativa da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência.

Antimonial de n-Metilglucamina				
Genes	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
Tbx21	0,48	0,61	0,49	0,49
GATA3	0,64	0,52	0,71	0,53
RORc	0,06	0,0001	0,23	0,03
FOXP3	1,05	0,83	1,05	1,01
Miltefosina				
Genes	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
Tbx21	-	-	0,51	0,33
GATA3	-	-	0,94	0,70
RORc	-	-	0,71	0,28
FOXP3	-	-	0,57	0,97

Fonte: o autor.

Legenda: CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); - (não determinado).

Analisando a correlação dos genes, para o Sb<sup>V</sup> diversas correlações positivas muito fortes foram observadas, sendo somente estatisticamente significativa a correlação entre os genes GATA3 e RORc (Tabela 17). Por sua vez, para a MTF foi observada apenas uma correlação positiva muito forte, mas não significativa (Tabela 18).

**Tabela 17.** Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações da droga de referência Antimonial de n-Metilglucamina.

	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
CC <sub>50</sub>						
r	<b>0,93</b>	-0,81	<b>0,90</b>	-1,00	0,71	-0,66
p-value	<b>0,07</b>	0,40	<b>0,10</b>	0,02	0,29	0,54
1/2 CC <sub>50</sub>						
r	-0,69	-0,32	<b>-0,94</b>	<b>0,90</b>	0,40	-0,03
p-value	0,52	0,80	<b>0,22</b>	<b>0,28</b>	0,74	0,98
1/4 CC <sub>50</sub>						
r	0,62	0,72	-0,80	<b>0,97</b>	-0,05	-0,22
p-value	0,38	0,28	0,20	<b>0,03*</b>	0,95	0,78
IC <sub>50</sub>						
r	<b>0,91</b>	0,20	-0,85	0,56	-0,79	-0,02
p-value	<b>0,09</b>	0,80	0,15	0,44	0,21	0,98

Fonte: o autor.

Legenda: A (Tbx21); B (GATA3); C (RORc); D (FOXP3); r (Coeficiente de correlação de Pearson); CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05). Valores em negrito indicam uma correlação muito forte.

**Tabela 18.** Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações da droga de referência Miltefosina.

	A x B	A x C	A x D	B x C	B x D	C x D
1/4 CC <sub>50</sub>						
r	0,76	-0,06	-0,22	0,27	-0,32	0,72
p-value	0,24	0,94	0,78	0,73	0,68	0,28
IC <sub>50</sub>						
r	<b>0,93</b>	0,18	-0,12	0,32	-0,25	0,63
p-value	<b>0,07</b>	0,82	0,88	0,68	0,75	0,37

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** A (Tbx21); B (GATA3); C (RORc); D (FOXP3); r (Coeficiente de correlação de Pearson); CC<sub>50</sub> (Concentração Citolóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05). Valores em negrito indicam uma correlação muito forte.

#### 9.2.4 Avaliação comparativa geral

A partir de todas as análises, foi realizado uma comparação com todos os resultados relevantes encontrados (Quadro 1). Diante das análises, foi possível observar que o composto ftalimídico-triazólico RN2 obteve uma resposta de supressão imunológica, reduzindo a síntese de citocinas, tanto do perfil Th1 como Th2, e da mesma forma, a produção de NO foi suprimida. Deste modo, o RN2 não foi considerado um candidato terapêutico promissor pois não foi capaz de induzir uma resposta imune protetora para a LV.

Por outro lado, os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes demonstraram um potencial terapêutico para a LV, ambos extratos sugerindo uma indução de resposta imune de perfil protetor. O extrato de *A. platensis* demonstrou uma produção de IFN- $\gamma$  superior ao do LSA, além de síntese de NO também superior. Também, a expressão gênica dos fatores transcricionais indicou um equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2, com a média da expressão do gene Tbx21 maior do que a do GATA3 na maior concentração (CC<sub>50</sub>) de estímulo. Por sua vez, o extrato de *D. tertiolecta* apresentou uma reduzida produção de IL-10, quando comparado ao LSA e uma elevada produção de TNF quando comparado com o sem estímulo. Além disso, apresentou uma síntese de NO superior ao LSA, e uma expressão gênica de GATA3 e FOXP3 inferior.

Os resultados obtidos pelos extratos, se mostraram melhores até do que os das drogas de referência, as quais indicaram um perfil de susceptibilidade. O Sb<sup>V</sup> uma IL-10 elevada, e supressão das citocinas de perfil Th1, atrelada a uma alta expressão de GATA3 e FOXP3. Já para a MTF, ocorreu uma supressão imunológica, tanto de citocinas do perfil Th1 como Th2.

**Quadro 1.** Avaliação geral das análises de resposta imune realizadas após a estimulação de células mononucleares do sangue periférico com diferentes candidatos terapêuticos e drogas de referência.

TRAT	Produção de Citocinas		Óxido Nítrico	Expressão Gênica		Interpretação Final
	Comparação TRAT x LSA	Correlação Muito Forte (Valor de p < 0,05)	Valor de p < 0,05	Comparação TRAT x LSA	Correlação Muito Forte (Valor de p < 0,05)	
RN2	IFN- $\gamma$ : RN2 < LSA TNF: RN2 < LSA IL-10: RN2 < LSA	$\frac{1}{2}$ CC <sub>50</sub> : TNF x IL-10 (POS) IC <sub>50</sub> : IFN- $\gamma$ x IL-4 (NEG) IC <sub>50</sub> : TNF x IL-10 (POS) IC <sub>50</sub> : IL-10 x IL-4 (NEG)	•	•	•	Supressão imunológica
Ap	IFN- $\gamma$ : Ap > LSA (+) TNF: Ap < LSA IL-10: Ap < LSA / Ap > LSA	CC <sub>50</sub> : TNF x IL-4 (NEG) $\frac{1}{2}$ CC <sub>50</sub> : TNF x IL-4 (POS)	CC <sub>50</sub> : Ap > LSA	CC <sub>50</sub> : FOXP3	$\frac{1}{2}$ CC <sub>50</sub> : Tbx21 x RORc (POS)	Perfil Protetor
Dt	IFN- $\gamma$ : Dt < LSA TNF: Dt > LSA (+) IL-10: Dt < LSA (+)	•	CC <sub>50</sub> : Dt > LSA	CC <sub>50</sub> : FOXP3 $\frac{1}{2}$ CC <sub>50</sub> : GATA3	•	Perfil Protetor
Sb <sup>V</sup>	IFN- $\gamma$ : Sb <sup>V</sup> < LSA TNF: Sb <sup>V</sup> < LSA IL-10: Sb <sup>V</sup> < LSA	•	$\frac{1}{2}$ CC <sub>50</sub> : Sb <sup>V</sup> > LSA $\frac{1}{4}$ CC <sub>50</sub> : Sb <sup>V</sup> > LSA	CC <sub>50</sub> : GATA3; RORc $\frac{1}{2}$ CC <sub>50</sub> : GATA; RORc; FOXP3 IC <sub>50</sub> : GATA; RORc	$\frac{1}{4}$ CC <sub>50</sub> : GATA3 x RORx (POS)	Perfil Susceptabilidade
MTF	IFN- $\gamma$ : MTF < LSA TNF: MTF < LSA IL-10: MTF < LSA	CC <sub>50</sub> : IL-4 x IL-2 (NEG) IC <sub>50</sub> : TNF x IL-10 (NEG)	CC <sub>50</sub> : MTF > LSA	$\frac{1}{4}$ CC <sub>50</sub> : FOXP3	•	Perfil Susceptabilidade

**Fonte:** o autor.

**Legenda:** TRAT (Tratamentos); Ap (Extrato de *Arthrospira platensis*); Dt (Extrato de *Dunaliella tertiolecta*); Sb<sup>V</sup> (Antimonial pentavalente); MTF (Miltefosina); LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum*); CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); NEG (Correlação Negativa); POS (Correlação Positiva); • (Não houve um indicativo significativo na análise). + (indicativo de perfil de resposta imune positiva contra Leishmaniose Visceral).

## 10 DISCUSSÃO

Na busca pela identificação de novas estratégias terapêuticas, a baixa toxicidade às células do hospedeiro é um dos principais fatores para ser considerado como um bom candidato terapêutico (BHARGAVA; SINGH, 2012). Deste modo, tanto os compostos sintéticos como a maioria dos extratos naturais avaliados neste estudo, demonstraram um valor de  $CC_{50}$  mais elevado do que os princípios ativos das drogas atualmente utilizadas para o tratamento de LV e LVC (Glucantime® e Milteforan™, respectivamente), com destaque para os extratos naturais de *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris*, os quais possuíram um valor de  $CC_{50}$  próximo a 1mg/mL tanto para células humanas como caninas, demonstrando que são pouco tóxicos.

Em relação a atividade leishmanicida/leishmanioestática dos compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos aqui estudados, ao analisar o efeito contra formas promastigotas foi possível observar que valores de  $IC_{50}$  são menores do que os encontrados por Santos e Albuquerque (2015), que avaliaram compostos contendo o grupamento ftalimida (aminometilftalimida) estudados contra *Leishmania braziliensis* (menor  $IC_{50}$  = 121 $\mu$ g/mL). Além disso, os valores de  $IC_{50}$  dos compostos RN1, RN2 e RN3 também foram promissores quando comparados com alguns compostos derivados de Eugenol contendo o grupamento 1,2,3-triazol contra *L. amazonensis*, apresentados por Teixeira et al (2018), os quais obtiveram uma  $IC_{50}$  variando entre 7,4 a 2013 $\mu$ M.

Além do mais, os compostos ftalimídicos-triazólicos RN1 e RN2 apresentaram um IS para humanos acima de 10 (RN1= 12,9 e RN2= 13,5), mostrando um valor de IS mais elevado do que alguns compostos ftalimídicos com núcleo tiazol avaliados por Aliança et al. (2017), os quais obtiveram um IS variando entre 1,7 a 17,7 contra formas promastigotas de *L. infantum*. Apesar do composto RN3 possuir um IS inferior a 10, ainda assim, apresentou neste estudo uma seletividade melhor do que o Antimoniato de n-Metilglucamina, droga de referência. Diante desses resultados prévios, foi escolhido a RN2 para a avaliação da resposta imune, sendo realizado o estímulo de células (PBMCs) de indivíduos saudáveis para a dosagem da produção de citocinas e Óxido Nítrico.

Com os resultados obtidos, o composto ftalimídico-triazólico RN2 apresentou supressão da resposta celular, uma vez que, reduziu a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 quando comparado com as células sem estímulo. O estudo de Coelho et al. (2014) corrobora com os achados, pois também observaram que alguns derivados ftalimídicos inibiram a produção de TNF e IL-1 $\beta$  em macrófagos de murinos. Compostos contendo grupo triazol demonstraram a redução dos níveis de TNF e IL-6 em células RAW264,7 (ZHANG et al., 2017). Além da redução da produção de citocinas promovida pela RN2, foi observado também uma redução da

síntese de NO, o que é de se esperar, pois as citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF, que apresentaram uma redução pelo estímulo da RN2, são responsáveis por ativar a iNOS e consequentemente produção de NO. Essa redução de NO a partir do estímulo de derivados ftalimídicos pode estar relacionada com o tamanho da cadeia de carbono, pois como descrito por Bach et al. (2017), a atividade inibitória de NO por ftalimidas é dependente do tamanho da cadeia de carbono. Diante destes resultados, os compostos ftalimídicos-triazólicos não demonstram ser uma boa alternativa para o tratamento da LV.

Como candidatos alternativos ao desenvolvimento de terapêuticos, os organismos fotossintetizantes vêm sendo estudados quanto sua atividade anti-*Leishmania*. No entanto, estudos avaliando fitoplânctons quanto a seu efeito contra espécies de *Leishmania* sp. são bem escassos, sendo somente relatado por Pereira et al. (2015), o qual avaliou a atividade leishmanicida de extratos metanólicos de quatro espécies de Chlorophytas, de três gêneros diferentes (*Nannochloris*, *Picochlorum* e *Desmochloris*). Assim, faz necessário mais estudos sobre os efeitos leishmanicidas de microrganismos marinhos fotossintetizantes, demonstrando a importância do presente trabalho. Então, ao comparar com os resultados obtidos pelos extratos das espécies de Chlorophytas por Pereira et al. (2015), é possível notar que os extratos das espécies de *C. vulgaris* e *Dunaliella tertiolecta* apresentam um valor menor de IC<sub>50</sub>, ou seja, mostrando uma maior atividade leishmanicida com concentrações menores.

Ao observar a atividade leishmanicida/leishmanioestático dos extratos naturais, é importante salientar que os valores de IC<sub>50</sub> foram inferiores quando comparados com os alguns extratos orgânicos de origem vegetal avaliados por Bouyahya et al. (2017), o qual tiveram uma variação de IC<sub>50</sub> entre 82,39 até 500 $\mu$ g/mL sendo mais tóxicos para *L. infantum*. Fazendo uma nova comparação, sendo que dessa vez, com isolados de meroditerpenóides provenientes de uma macroalga marrom (*Cystoseira baccata*) avaliados por Sousa et al. (2017), é possível observar que o IS dos extratos de *C. vulgaris* e *D. tertiolecta* são maiores, uma vez que, o IS obtido pelo autor foi menor que 10, usando macrófagos peritoneais de murinos, demonstrando que os extratos aqui estudados podem ser considerados possíveis promissores.

Para os cães, o extrato de *D. tertiolecta* foi o único que apresentou um IS acima de 10 (IS<sub>canino</sub> = 11,17), indicando ser um candidato muito potencial para os futuros ensaios. Por outro lado, apesar dos extratos de todas as espécies aqui estudadas não apresentarem IS maior que 10 nos ensaios com células humanas, não exclui a possibilidade desses extratos possuírem um potencial imunomodulador. Pois, como observado nos estudos de Costa-Silva et al. (2019), isolados provenientes de produtos naturais possuíram atividade imunomodulatória contra *L. infantum*, tendo a capacidade de reduzir a produção de citocinas do perfil Th2, além de

estimular quimiocinas associadas a diminuição da carga parasitária, mesmo seus isolados apresentando IS menor que 10.

Ao avaliar a resposta imune induzida pelos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes das espécies *A. platensis* e *D. tertiolecta*, é observado um estímulo imunológico positivo das células. Diferentes concentrações foram estudadas, porém todas mantêm o mesmo padrão geral de resposta imunológica, equilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, com algumas concentrações tendo um destaque um pouco maior das citocinas de perfil Th1.

A *A. platensis* é uma cianobactéria que possui algumas atividades biológicas já conhecidas há alguns anos pela comunidade científica. O potencial imunomodulador que esse microrganismo possui é algo já observado na literatura, o qual tem demonstrado estimular a produção de IFN- $\gamma$  e TNF, reduzindo a produção de IL-10, tanto em camundongos (SHOKRI et al., 2014), como em PBMC humano (MAO et al., 2000). Além do extrato em si, uma proteína isolada de *A. platensis*, a ficocianina (pigmento fotossintético), estudada por Sheikh et al. (2014) realizando o tratamento de PBMC, demonstrou também um aumento de IFN- $\gamma$ . Esses achados corroboram com o encontrado no presente trabalho, o qual observou uma produção de IFN- $\gamma$  e TNF maior quando comparado às células sem estímulo, e com destaque especial para o IFN- $\gamma$  que apresentou ainda uma síntese maior quando comparado ao LSA, havendo uma diferença estatística na menor concentração.

Além da produção de citocinas do perfil Th1, o extrato de *A. platensis* também induziu a síntese do fator leishmanicida, NO, o que fortalece a hipótese desse extrato ser um promissor candidato terapêutico para a LV. A expressão dos genes dos fatores transcricionais específicos demonstrou um equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2, não havendo diferenças estatísticas significativas, porém fortalecendo a hipótese que esse extrato estimula a expressão do gene Tbx21, responsável por ativar a diferenciação dos linfócitos Th1.

Por sua vez, a *D. tertiolecta* é uma microalga halófila, já conhecida também pela comunidade científica. Poucos estudos relatam a atividade imunológica dessa espécie, havendo mais estudos relacionados com suplementação alimentar animal. Desses estudos escassos relacionados a resposta imune, a atividade imunológica dessa espécie foi observada *in vitro* em PBMC apenas de ovinos, o qual foi visto a capacidade de fitosteróis dessa espécie estimular uma resposta imunológica. Dentre esses fitoesteróis, o 7-dehidroporiferasterol e ergosterol induziram a produção da citocina IL-10 e redução de IL-6 e TNF, demonstrando um papel anti-inflamatório (CILIBERTI et al., 2017). Da mesma forma, no trabalho de Caroprese et al. (2012) foi observado aumento da síntese de IL-10, com redução de citocinas pro-inflamatórias, além

de identificar uma dose-dependente com a IL-10, o que também foi encontrado em nosso estudo, no entanto, em nossos resultados foi observado que com o aumento da concentração ocorre uma redução da IL-10.

Em nosso estudo o extrato de *D. tertiolecta* apresentou alta produção de TNF, superando o LSA, e baixa síntese de IL-10, menor que o LSA, principalmente nas maiores concentrações testadas. A divergência dos resultados apresentados nesse trabalho com os encontrados na literatura, pode ser devido a diferença das moléculas, uma vez que o extrato estudado no presente estudo foi de constituição proteica e nos trabalhos de Caroprese et al. (2012) e Ciliberti et al. (2017) foram provenientes de isolados de fitosteróis. Além disso, sabe-se que diferentes métodos de extração podem expor distintas moléculas do extrato, e desta forma apresentando atividades biológicas também diferente. Este fato ressalta a importância de se estudar as espécies de organismos fotossintetizantes obtidos por diferentes métodos de extração.

As citocinas produzidas por linfócitos do perfil Th1 estão diretamente relacionadas com a produção do fator leishmanicida, e esse perfil foi apresentado pelos extratos aqui estudados, os quais estimularam a síntese de IFN- $\gamma$  e TNF, além da produção do NO. Esses resultados também corroboram com os dados encontrados na análise da expressão gênica dos fatores transcricionais, que demonstrou o gene Tbx21 mais expresso que o GATA3 ou FOXP3, dependendo da concentração utilizada.

As correlações (positiva ou negativa) muito forte encontradas pelo estímulo com os extratos, tanto para as citocinas como os genes dos fatores transcricionais, são bastante interessantes. A correlação negativa muito forte, apesar de não ser estatisticamente significativa, encontrada entre TNF e IL-10 para o extrato de *D. tertiolecta*, é observada nos gráficos e corrobora com a hipótese de que a produção da IL-10 foi dose-dependente. Para a *A. platensis*, foi possível observar também correlações negativas muito fortes, porém não significativas, entre a correlação entre TNF e as citocinas do perfil Th2, pode sugerir um potencial imunomodulador. A correlação positiva muito forte, embora não tenha apresentado diferença estatística significativa, entre as citocinas TNF e IL-4 vale também o destaque, uma vez que o aumento de uma citocina do perfil Th1 juntamente com citocinas anti-inflamatórias, podem combater o parasito, pois um equilíbrio entre os dois perfis (mas com predominância de Th1) é importante para alcançar o controle da morbidade da infecção (RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2016).

Em relação a correlação entre os genes estimulados pelo extrato de *A. platensis*, a correlação positiva estatisticamente significativa encontrada entre Tbx21 e RORc, fatores transcricionais responsáveis pela indução dos perfis Th1 e Th17, respectivamente, demonstra o

potencial em estimular citocinas pró-inflamatórias, o que é importante para a resposta imune contra o parasito causador da LV.

E por fim, ao comparar os resultados dos extratos com os das drogas de referência, foi possível observar que a MTF possuiu uma seletividade de mais de 100 vezes para o parasito do que para as células dos hospedeiros humanos e caninos, sendo a molécula com a maior seletividade dentre todos os estímulos. Por outro lado, o  $Sb^V$  apresentou o menor valor de IS, sendo todos os candidatos terapêuticos mais seletivos para o parasito. Além disso, pode-se observar um estímulo imunológico de perfil de susceptibilidade, diferentemente dos extratos, que demonstraram a indução de um perfil protetor. Esses dados sugerem e demonstram a atividade leishmanicida/leishmanioestática associada à atividade imunomodulatória, consideradas requisitos fundamentais para que os extratos se tornem candidatos terapêuticos para a LV.

Diante de todo o exposto, é demonstrado que os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes apresentados neste trabalho, bem como outros produtos naturais, precisam ser mais investigados, pois possuem uma diversidade metabólica elevada, podendo ser fonte de diversos possíveis tratamentos. Os candidatos terapêuticos naturais aqui apresentados demonstraram atividade leishmanicida/leishmanioestática, além de estimular a resposta imunológica para um perfil Th1, através da produção de citocinas e óxido nítrico, e da indução de fatores transcricionais responsáveis pela diferenciação das células T.

Esses extratos continuarão sendo avaliados quanto ao potencial imunomodulador em cães, além de observar a resposta em células de paciente com LV. É necessário avaliar também se a combinação dos extratos com as drogas de referência pode aumentar a efetividade terapêutica dos pacientes. Deste modo, podendo ter uma noção mais ampla da capacidade desses extratos tanto nos hospedeiros humanos, como caninos.

## 11 CONCLUSÕES

O índice de seletividade dos compostos ftalimídicos-triazólicos e dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes foram maiores do que os apresentados pelo antimonial de n-metilglucamina. No entanto, a Miltefosina foi o tratamento que apresentou a maior seletividade. O composto RN2 e os extratos das espécies *Arthrospira platensis* e *Dunaliella tertiolecta* foram os escolhidos para seguirem com os estudos de resposta imune.

A resposta obtida pela RN2 foi de supressão imunológica, ao suprimir a produção de todas as citocinas (Th1 e Th2) e do Óxido Nítrico (NO). Assim, esse composto não apresentou um perfil de resposta imune que justifique estudos complementares.

Por outro lado, os extratos dos microrganismos fotossintetizantes apresentaram a indução de uma resposta imunológica de perfil protetor, com produção de NO e indução da resposta de perfil Th1. Ao contrário dos extratos, as drogas de referências apresentaram um perfil de susceptibilidade, indicando que os extratos demonstraram os melhores resultados relacionados ao estímulo da resposta imunológica.

Finalmente, este trabalho forneceu subsídios científicos capazes de ampliar o conhecimento sobre atividades biológicas, exclusivamente atividade leishmanicida e imunológica, de microrganismos fotossintetizantes, os quais possui uma alta escassez. Desta forma, os resultados obtidos aqui sugerem os extratos bioativos das espécies *A. platensis* e *D. tertiolecta* um potencial terapêutico promissor para a LV.

## 12 PERSPECTIVAS

Após apresentar bons resultados, mostrando serem promissores, os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes das espécies *Arthrospira platensis* e *Dunaliella tertiolecta* serão avaliados em ensaios pré-clínicos, em camundongos BALB/c. Serão avaliados os extratos como futuros tratamentos e comparados com as drogas de referência (Antimonial pentavalente e Miltefosina), sendo realizadas análises de carga parasitária e resposta imunológica, a partir do baço dos animais, e histopatologia do fígado e rins, com o intuito de avaliar a atividade imunomodulatória e leishmanicida, além de verificar a eficácia e segurança dos candidatos terapêuticos naturais para a leishmaniose visceral.

## REFERÊNCIAS

- ATHBI, A., M; AL- MAYAH; S., H; KHALAF, S., H. Antiparasitic activity of the microalgae *Cladophora crispata* against the Protoscolices of hydatid cysts compared with albendazole drug. **African Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 13, n. 30, p.3068-3080, 2014. doi:10.5897/ajb2013.13550.
- ALANAZI, A. M. et al. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: anti-inflammatory and analgesic activities, **Eur. J. Med. Chem.**, [s.l.], v. 92, n. 1, p. 115–123, 2015. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.12.039.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. Thelper1/Thelper2 Cells and Resistance/ Susceptibility to *Leishmania* Infection: Is This Paradigm Still Relevant? **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, p. 1-13, 2012. doi: 10.3389/fimmu.2012.00080
- ALIANÇA, A. S. S. Atividade biológico de compostos ftalimido-Tiazóis sobre *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908). 2016. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Recife, 2016.
- ALIANÇA, A. S. S. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazoles derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 105, p. 1-10, 2017. doi: 10.1016/j.ejps.2017.05.005
- ALVAR, J. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 1–12, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- AMARO, H.M.; GUEDES, A.C.; MALCATA, F.X. Antimicrobial activities of microalgae: An invited review. **In Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, v. 3, p. 1272–1284, 2011.
- ANAND, N. et al. Potential of marine algae (sea weeds) as source of medicinally important compounds. **Plant Genetic Resources**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 303-313, 2016. doi: 10.1017/S1479262116000381
- ANDRADE, A. M. et al. Estudo descritivo da estrutura populacional canina da área urbana de Araçatuba, São Paulo, Brasil, no período de 1994 a 2004. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 927-932, 2008. doi: 10.1590/s0102-311x2008000400024.
- ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.281-289, 2018. doi: 10.1590/1806-9282.64.03.281.
- ARONSON, N. et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 63, n. 12, p. 202-264, 2016. doi: 10.1093/cid/ciw670.
- AYATI, A. et al. Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v.

97, p.699-718, 2015.

doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.015.

BACH, D.H. et al. Synthesis and biological activity of new phthalimides as potential anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 13, p. 3396-3405, 2017.

doi: 10.1016/j.bmc.2017.04.027

BASAK, P.; PAUL, S.; MAJUMDER, R. In vitro cytotoxic study of aloe vera whole leaf extract on PBMC and breast cancer cell line. **2nd International Conference for Convergence in Technology (i2ct)**, [s.l.], p. 124-127, 2017.

doi: 10.1109/I2CT.2017.8226106

BAXARIAS, M. et al. Immunotherapy in clinical canine leishmaniosis: a comparative update. **Research in Veterinary Science**, [s.l.], v. 125, p. 218-226, 2019.

doi: 10.1016/j.rvsc.2019.06.009.

BERMAN, J D; WADDELL, D; HANSON, B D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 916-920, 1985.

doi: 10.1128/aac.27.6.916.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 128-134, 2013.

doi: 10.1590/0037-8682-0022-2012.

BHOWMICK, S; RAVINDRAN, R; ALI, N. IL-4 contributes to failure, and colludes with IL-10 to exacerbate *Leishmania donovani* infection following administration of a subcutaneous leishmanial antigen vaccine. **BMC Microbiol.** [s.l.], v 14, n. 8, 2014.

doi:10.1186/1471-2180-14-8

BLUNT, J.W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 8-53, 2018.

doi: 10.1039/c7np00052a.

BODE, H. B et al. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. **Chembiochem**, [s.l.], v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.

doi: 10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9

BOER, M. D. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 17, n. 10, p.1471-1477, 2011.

doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03635.x.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 173, n. 1, p. 17-26, 2000.

doi: 10.1034/j.1600-065x.2000.917307.x.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p. 248-254, 1976.

doi: 10.1006/abio.1976.9999

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. 120p.

CALDWELL, G. The Influence of Bioactive Oxylipins from Marine Diatoms on Invertebrate Reproduction and Development. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 367-400, 2009.  
doi: 10.3390/md7030367

CAMPINO, L.; MAIA, C. The Role of Reservoirs: Canine Leishmaniasis. *In*: PONTE-SUCRE, A; PARDRÓN-NIEVES, M (ed.). **Drug Resistance in Leishmania Parasites**. Second Edition, Cham: Springer International Publishing, p. 59-83, 2018.  
doi: 10.1007/978-3-319-74186-4\_3.

CARDOZO, K.H.M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 146, n. 1-2, p.60-78, 2007.  
doi: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007.

CARNEIRO, P.P et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 2-16, 2016.  
doi: 10.1371/journal.pone.0148084.

CAROPRESE, M. et al. A mixture of phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* affects proliferation of peripheral blood mononuclear cells and cytokine production in sheep. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, [s.l.], v. 150, n. 1-2, p. 27-35, 2012.  
doi: 10.1016/j.vetimm.2012.08.002

CILIBERTI, M. et al. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* Reduce Cell Proliferation in Sheep Fed Flaxseed during Post Partum. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 7, p. 216-230, 2017.  
doi: 10.3390/md15070216

COÊLHO, L.C.D. et al. Novel phthalimide derivatives with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression inhibitory and apoptotic inducing properties. **Med. Chem. Commun.**, [s.l.], v. 5, n. 6, p. 758-765, 2014.  
doi: 10.1039/c4md00070f.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. et al. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 47, n. 4, p. 331-340, 2017.  
doi: 10.1590/1809-4392201700871

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 512 p. 2014.

COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.  
doi: 10.1590/s0037-86822011005000014

COSTA-PEREIRA, C. et al. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, London v. 11, p. 92, 2015.  
doi: 10.1186/s12917-015-0397-6

COSTA-SILVA, T.A. et al. Antileishmanial activity and immunomodulatory effect of secosubamolide, a butanolide isolated from *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae). **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, [s.l.], v. 25, p. 1-8, 2019.  
doi: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0008

- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.  
doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.  
doi: 10.1128/cmr.19.1.111-126.2006.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, [s.l.], v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.  
doi: 10.1006/exmp.2002.2418.
- DERNER, R.B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.  
doi: 10.1590/s0103-84782006000600050.
- DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.  
doi: 10.3390/metabo2020303.
- DOS-SANTOS, A.L.A. et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 167, p.67-75, 2016.  
doi: 10.1016/j.exppara.2016.05.005.
- DUJARDIN, JC. Epidemiology of Leishmaniasis in the Time of Drug Resistance (the Miltefosine Era). *In*: PONTE-SUCRE, A; PARDRÓN-NIEVES, M (ed.). **Drug Resistance in Leishmania Parasites**. Second Edition, Cham: Springer International Publishing, p. 85-107, 2018.  
doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74186-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74186-4_4).
- EJAZI, S.A.; ALI, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert Review Of Anti-infective Therapy**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 79-98, 2013.  
doi: 10.1586/eri.12.148.
- ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 8, n. 8, p. 961-972, 2014.  
doi: 10.3855/jidc.4310.
- FANG, D.; ZHU, J. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 214, n. 7, p. 1861-1876, 2017.  
doi: 10.1084/jem.20170494.
- FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-Like Receptors in *Leishmania* Infections: Guardians or Promoters?. **Journal Of Parasitology Research**, [s.l.], v. 2012, p. 1-12, 2012.  
doi: 10.1155/2012/930257.
- FELÍCIO, R. de et al. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 52, n. 5, p. 763-769, 2010.  
doi: 10.1016/j.jpba.2010.02.018.
- FERREIRA, S.A. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS Neglected**

**Tropical Diseases**, San Francisco, n. 7, v. 4, e2150, 2013.  
doi: 10.1371/journal.pntd.0002150.

FLANDIN, J.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- $\gamma$ -primed macrophages. **European Journal of Immunology**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 411-420, 2006.  
doi: 10.1002/eji.200535079.

FOROUGHI-PARVAR, F.; HATAM, G. Vaccines for Canine Leishmaniasis. **Advances in Preventive Medicine**, London, v. 2014, p. 1-9, 2014.  
doi: 10.1155/2014/569193.

FRAGA, D.B.M. et al. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2016.  
doi: 10.1371/journal.pntd.0004333.

FREILE-PELEGRIN, Y., et al. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. **Fitoterapia**, v.79, p. 374-377, 2008.  
doi: 10.1016/j.fitote.2008.02.006.

FREITAS, J.C.C.; NUNES- PINHEIRO, D.C.S. Leishmaniose: uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasilica**, v 7, n 7, p. 193- 204, 2013.  
doi: 10.21708/avb.2013.7.3.3354.

FREITAS; PINHEIRO. Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p. 11-21, 2010.  
GAMAL, A. A. El. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 1-25, jan. 2010.  
doi: 10.1016/j.jsps.2009.12.001.

GOMES, P.A.T.M. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 111, p. 46-57, 2016.  
doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.010.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for the evaluation of Domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s.l.], v. 146, n. 1, p. 97-99, 2012.  
doi: 10.1016/j.vetimm.2012.01.018.

GONÇALVES, A.A.M. et al. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 1-11, 2019.  
doi: 10.3389/fcimb.2019.00427.

GONÇALVES, S. C. et al. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of Leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 8, p. 188–197, 2012.  
doi: 10.1590/S1678-91992012000200009.

- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S.C. et al. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 1-11, 2017.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.01437
- GUIZANI-TABBANE, L. et al. Leishmania major Amastigotes Induce p50/c-Rel NF- B Transcription Factor in Human Macrophages: Involvement in Cytokine Synthesis. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 72, n. 5, p. 2582-2589, 2004.  
doi: 10.1128/iai.72.5.2582-2589.2004.
- HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 8, n. 12, p. 536-544, 2003.  
doi: 10.1016/s1359-6446(03)02713-2.
- HANDMAN, E.; ELSO, C.; FOOTE, S. Genes and Susceptibility to Leishmaniasis. **Advances in Parasitology Volume 59**, [s.l.], p. 1-75, 2005.  
doi: 10.1016/s0065-308x(05)59001-8.
- HEFNAWY, A. et al. Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 162-174, 2017.  
doi: 10.1016/j.pt.2016.11.003.
- HOLANDA, V. N. **Potencial leishmanicida e citotoxicidade de 4-fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol**. 2018. Dissertação (Mestrado - Universidade Federal de Pernambuco). Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia do Centro de Biociências, Recife, 2018.
- HOSEIN, S. et al. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, London, n. 144, p. 95–115, 2017.  
doi: 10.1017/S003118201600055X.
- JAIN, K; JAIN, N.K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 422, p. 1-12, 2015.  
doi: 10.1016/j.jim.2015.03.017.
- JANSEN, A.M. AND ROQUE, A.L.R. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. In: Telleria, J. and Tibayrenc, M., Eds., **American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research**, Elsevier, London, p. 249-276, 2010.  
doi: 10.1016/B978-0-12-384876-5.00011-3.
- KANG, H.; SEO, C.; PARK, Y. Marine Peptides and Their Anti-Infective Activities. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 618-654, 2015.  
doi: 10.3390/md13010618.
- KARIMI, A.; ALBORZI, A.; AMANATI, A. Visceral Leishmaniasis: An Update and Literature Review. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 1-10, 2016.  
doi: 10.5812/pedinfect.31612.
- KASZAK, I.; PLANELLAS, M.; DWORECKA-KASZAK, B. Canine leishmaniosis – an emerging disease. **Annals of Parasitology**, Varsóvia, v. 61, n. 2, p. 69-76, 2015.
- KHADEM, F.; UZONNA, J. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, London, v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014.  
doi: 10.2217/fmb.14.43.
- KHADEM VATAN, S. et al. Cytotoxic Activity of *Holothuria leucospilota* Extract against *Leishmania infantum* In Vitro. **Advances in Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 2016, p. 1-6,

2016.

doi: 10.1155/2016/8195381.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, London, v. 3, n. 3, 2014.

doi:10.1038/cti.2014.4.

LAURITANO, C. et al. Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. **Frontiers In Marine Science**, [s.l.], v. 3, p. 1-12, 2016.

doi:10.3389/fmars.2016.00068.

LEISHTEC. **Portal veterinário**. Dados e resultados dos ensaios clínicos de campo da Vacina Leish-Tec®. Disponível em: < <http://leishtec.com.br/portalveterinario/>>. Acesso em: 25 de Jan. de 2020.

LIMA, L.M. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 3067-3073, 2002.

doi: 10.1016/s0968-0896(02)00152-9.

LIU, D; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 2, p. 1-8, 2012.

doi: 10.3389/fcimb.2012.00083.

MACHADO, C.J.S; SILVA, E.G.; VILANI, R.M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde e Sociedade**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 247-258, 2016.

doi: 10.1590/s0104-12902016146918.

MATOS, Â. P. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in medium supplemented with desalination concentrate grown in a pilot-scale open raceway. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 35, n. 4, p. 1183-1192, 2018.

doi: 10.1590/0104-6632.20180354s20170338.

MAYER, A. et al. Marine Pharmacology in 2012–2013: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 9, p. 273-334, 2017.

doi: 10.3390/md15090273.

MCGWIRE B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **The Quarterly journal of medicine**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 7-14. 2014.

doi: 10.1093/qjmed/hct116.

MELO, R.G. et al. Hydrogel-based *Chlorella vulgaris* extracts: a new topical formulation for wound healing treatment. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 31, p. 3653–3663, 2019.

doi: 10.1007/s10811-019-01837-2.

MESQUITA, I. et al. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. **Cytokine**, [s.l.], v. 112, p. 16-20, 2018.

doi: 10.1016/j.cyto.2018.07.001.

MIRÓ, G. et al. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 33, n. 9, p. 718-730, 2017.

doi: 10.1016/j.pt.2017.05.005.

- MOHAMMADIHA, A. et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, p. 83-90, 2013.  
doi: 10.1016/j.vetpar.2012.10.013.
- MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 103, n. 4, p. 358-362, 2008.  
doi: 10.1590/s0074-02762008000400008.
- MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. The *in vitro* leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 106, n. 4, p. 475-478, 2011.  
doi: 10.1590/s0074-02762011000400015.
- MOREIRA, M.A. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 245-52, 2007.  
doi: 10.1016/j.vetpar.2006.12.012.
- MORENO, J. et al. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 158, n. 3-4, p. 199-207, 2014.  
doi: 10.1016/j.vetimm.2014.01.011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.  
doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- MUKAKA, M.M. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 69-71, 2012.
- MUKHERJEE, A.K. et al. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 565-572, 2012.  
doi: 10.1016/j.intimp.2012.02.002.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.** v. 79, p. 629–661, 2016.  
doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.  
doi: .1111/j.1365-3164.2005.00460.x.
- NUNES, J. B. et al. *Leishmania infantum* infection in dogs from the southern region of Minas Gerais State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 58, n. 75, 2016.  
doi: 10.1590/S1678-9946201658075.
- NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, Philadelphia, v. 2, n. 2, p. 135-146, 2010.  
doi: 10.4103/0974-777X.62876.

OLIVEIRA, C.M.B. et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 2, 255-265, 2011.

doi: 10.1590/S0034-70942011000200014

OLIVEIRA, G. G. et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, p. 1025-1034, 2011.

doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0102.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO). Weekly epidemiological record, 91th. n. 22, p. 285-296, 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/wer/2016/wer9122/en>>. Acesso em: 20 de outubro de 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas: Washington, n. 9, 2020. Disponível em: <[www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis)>. Acesso em: 20 de maio de 2021.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.925-932, 2016.

doi: 1016/j.apjtm.2016.06.021.

OSTYN, B. et al. Failure of Miltefosine Treatment for Visceral Leishmaniasis in Children and Men in South-East Asia. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 1-8, 2014.

doi: 1371/journal.pone.0100220.

OUELLETTE, M; DRUMMELSMITH, J; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, [s.l.], v. 7, n. 4-5, p. 257-266, 2004.

doi: 10.1016/j.drug.2004.07.002.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 27, n. 3-4, p. 122-128, 2013.

doi: 10.1016/j.mcp.2013.01.003.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 189, p. 356-358, 2009.

doi: 10.1016/j.tvjl.2008.05.018.

PASSOS, S.R. et al. Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 44, n. 5, p. 463-465, 2014.

doi: 1016/j.ijantimicag.2014.07.011.

PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 371-379, 2013.

doi: 10.1016/s2214-109x(13)70078-0.

PEREIRA, H. et al. Biological Activities and Chemical Composition of Methanolic Extracts of Selected Autochthonous Microalgae Strains from the Red Sea. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 6, p. 3531-3549, 2015.

doi: 10.3390/md13063531.

PESSOA-E-SILVA, Rômulo; VAITKEVICIUS-ANTÃO, Victor; ANDRADE, Thiago André Santos de; SILVA, Ancy Caroliny de Oliveira; OLIVEIRA, Gilsan Aparecida de;

- TRAJANO-SILVA, Lays Adrienne Mendonça; NAKASONE, Eiji Kevin Nakasone; PAIVA-CAVALCANTI, Milena de. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 199, p. 9-16, 2019. doi: 10.1016/j.exppara.2019.02.012.
- PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 12, p. 1-24, 2017. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052.
- PROVERBIO, D. et al. Failure of Miltefosine Treatment in Two Dogs with Natural *Leishmania infantum* Infection. **Case Reports in Veterinary Medicine**, Cairo, v. 2014, 2014. doi: 10.1155/2014/640151.
- QUINNEL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 183, p. 1421-1424, 2001. doi: 10.1086/319869.
- RANGEL, K. C. et al. Antileishmanial activity of the Antarctic red algae *Iridaea cordata* (Gigartinales; Rhodophyta). **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 825-834, 2018. doi: 10.1007/s10811-018-1592-1.
- RATH, S. et al. Antimonias empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003. doi: .1590/s0100-40422003000400018.
- RAVEN, P.H. et al. **Biologia vegetal**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 876p, 2014.
- READY, P.D. La aparición de leishmaniasis y el cambio climático. **Revue Scientifique Et Technique de L'oise**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 399-412, 2008. doi: 10.20506/rst.27.2.1803.
- REGUERA, R.M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 227, p. 98-114, 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.07.011.
- REIS, J. C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Rio de Janeiro, Ed. Olinda, 2003.
- RESENDE, L.A. et al. Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 198, p. 371-381, 2013. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.09.011.
- RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2018, p. 1-12, 2018. doi: 10.1155/2018/3296893.
- ROBERTS WL, MCMURRAY WJ, RAINEY PM. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime). **Antimicrob Agents Chemother**. [s.l.], v. 42, n. 5, p. 1076-1082, 1998.
- RODRIGUES, I. A. et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, [s.l.], v. 2015, p.1-12, 2015. doi: 1155/2015/835910.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-13, 2016.  
doi: 10.1186/s13071-016-1412-x.

RODRIGUEZ-CORTEZ, A. et al. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 5, 2016.  
doi: 10.1371/journal.pone.0155224

ROMERO, G.A.S; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. 584-600, 2010.  
doi: 10.1371/journal.pntd.0000584.

SABATÉ, D. et al. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. **Preventive Veterinary Medicine**, [s.l.], v. 115, n. 1-2, p. 56-63, 2014.  
doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.03.010.

SALDANHA, A. C.R. et al. Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88® e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.383-388, 2000.  
doi: 10.1590/s0037-86822000000400009.

SANGI, D. P. Estratégias de Síntese na Descoberta de Fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, [s.l.], v. 39, n. 8, 2016.  
doi: 10.5935/0100-4042.20160089

SANTIAGO, E. D. F. et al. Evaluation of the Anti- Schistosoma mansoni Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 352–363, 2014.  
doi: 10.1128/AAC.01900-13.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.  
doi: 10.1038/nri2711.

SEVÁ, A.P. et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. 1-20, 2016.  
doi: 10.1371/journal.pone.0160058.

SHAHBAZI, M. et al. Immunological comparison of DNA vaccination using two delivery systems against canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 212, p. 130–139, 2015.  
doi: 10.1016/j.vetpar.2015.07.005.

SHARIFI, F. et al. Antileishmanial Effect of Coffea arabica, Salvia rhytidea and Bunium persicum against Leishmania major and Leishmania tropica Promastigotes and Their Cytotoxicity and Antioxidant Activities. **European Journal Of Medicinal Plants**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 1-10, 2018.  
doi: 10.9734/ejmp/2018/39364.

SHEELA-DEVI, A.; JOSEPH, J.; BHUVANESHWARI, V. Antioxidant, anticancerous and cytotoxic effects of *Avicennia marina*. **International Journal of Research in**

- Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 996-1001, 2018.  
doi: 10.26452/ijrps.v9i3.1621.
- SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and Targeted Therapies in Treatment of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Future Prospects. **Frontiers In Immunology**, Lausanne, v. 5, p.1-9, 2014.  
doi: 10.3389/fimmu.2014.00296.
- SINGH, S.; KATE, B.N.; BANERJEE, U. C. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 73-95, 2005.  
doi: 10.1080/07388550500248498.
- SOARES, D. et al. The Brown Alga *Styopodium zonale* (Dictyotaceae): A Potential Source of Anti-Leishmania Drugs. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 14, n. 9, p. 163-174, 2016.  
doi: 10.3390/md14090163.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- $\gamma$  and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 317, 2016.  
doi: 10.1186/s13071-016-1598-y.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites Vectors**, [s.l.], v. 4, n. 86, 2011.  
doi: 10.1186/1756-3305-4-86
- SOLOMON, M. et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. **Journal of the American Academy Of Dermatology**, [s.l.], v. 56, n. 4, p. 612-616, 2007.  
doi: 10.1016/j.jaad.2006.06.044.
- SOUSA, M.V.C. et al. Sensibilidade do teste parasitológico em imprints de baço, medula óssea e linfonodo para o diagnóstico da leishmaniose de acordo com o número de avaliadores. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 176-181, 2017a.  
doi: 10.29374/2527-2179.bjvm027417.
- SOUSA, C.B. et al. Antileishmanial activity of meroditerpenoids from the macroalgae *Cystoseira baccata*. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 174, p. 1-9, 2017b.  
doi: 10.1016/j.exppara.2017.01.002.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.  
doi: 10.1263/jbb.101.87.
- SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, n. 9, v. 277, 2016.  
doi: 10.1186/s13071-016-1553-y.
- SRIVASTAVA, S. et al. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. **Clinical & Experimental Immunology**, [s.l.], v. 172, n. 3, p.403-409, 2013.  
doi: 10.1111/cei.12074.
- SRIVASTAVA, S. et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1-11, 2017.  
doi: 10.1186/s13071-017-1969-z.

- SUGANYA, T. et al. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 55, p. 909-941, 2016.  
doi: 10.1016/j.rser.2015.11.026.
- SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. **Current Molecular Medicine**, v. 4, p. 667-679, 2004.  
doi: 10.2174/1566524043360203.
- TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, [s.l.], v. 145, n. 4, p. 497-507, 2016.  
doi: 10.1017/s003118201600216x.
- TEMPONE, A.G., MARTINS DE OLIVEIRA, C., BERLINK, R.G. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Med**, v. 77, p. 572-585, 2011.  
doi: 10.1055/s-0030-1250663.
- TOGHUEO, R.M.K. Anti-leishmanial and Anti-inflammatory Agents from Endophytes: A Review. **Natural Products and Bioprospecting**, [s.l.], v. 9, n. 5, p. 311-328, 2019.  
doi: 10.1007/s13659-019-00220-5.
- TORRES, F.A. et al. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 265-276, 2014.  
doi: 10.1016/j.bjp.2014.07.001.
- UTSNOMIYA, et al. Genome-Wide Scan for Visceral Leishmaniasis in Mixed-Breed Dogs Identifies Candidate Genes Involved in T Helper Cells and Macrophage Signaling. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1-8, 2015.  
doi: 10.1371/journal.pone.0136749.
- VERMA, N.K.; DEY, C.S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.  
doi: 10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004.
- VIANA, A.G. et al. Infection of Human Monocytes with *Leishmania infantum* Strains Induces a Downmodulated Response when Compared with Infection with *Leishmania braziliensis*. **Front. Immunol**, Lausanne, v. 8, n. 1896, p. 1-12, 2018.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.01896
- VIANNA G. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tartaro emético. In: **Annais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia**, [s.l.], v. 4, p. 426-428, 1912.
- WATERS, A. et al. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 780-786, 2010.  
doi: 10.1016/j.copbio.2010.09.013.
- WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 78, n. 2-3, p. 193-200, dez. 2001.  
doi: 10.1016/s0378-8741(01)00346-4.
- WOERLY, V. et al. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n. 2, p. 463-469, 2009.  
doi: 10.1007/s00436-009-1404-2.
- WYLIE, C.E. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: topically applied insecticide treatments and

prophylactic medications. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 117, p. 19–27, 2014b.

doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.06.016.

WYLIE, C. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. **Preventive Veterinary Medicine**, [s.l.], v. 117, n. 1, p. 7-18, 2014a.

doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.06.015.

WYLLIE, S. et al. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 279, n. 38, p. 39925-39932, 2004.

doi: 10.1074/jbc.m405635200.

YAMEY, G. et al. Funding innovation in neglected diseases. **Bmj**, [s.l.], p. 1-3, 20 mar. 2018.

doi: 10.1136/bmj.k1182.

YAMTHE, L. T. et al. Marine Algae as Source of Novel Antileishmanial Drugs: A Review. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 11, p. 323-351, 2017.

doi: 10.3390/md15110323.

YASUR-LANDAU, D. et al. Induction of allopurinol resistance in *Leishmania infantum* isolated from dogs. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 9, p. 1-10, 2017

doi: 10.1371/journal.pntd.0005910.

YAZDANPANAH HA, ROSTAMIANPUR M. Analysis of spatial distribution of leishmaniasis and its relationship with climatic parameters (case study: Ilam province). **Bull Environ Pharmacol Life Sci**, [s.l.], v. 2, n. 12, p. 80-86, 2013

ZANETTE, M.F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

doi: 10.1590/0037-8682-1723-2013.

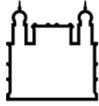
ZHANG, H.J. et al. Design, synthesis, anti-inflammatory activity, and molecular docking studies of perimidine derivatives containing triazole. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 27, n. 18, p. 4409-4414, 2017.

doi: 10.1016/j.bmcl.2017.08.014

ZHU, J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s.l.], v. 10, n. 10, p. 1-23, 2017.

doi: 10.1101/cshperspect.a030338.

## APÊNDICE A – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA ANIMAL



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Aggeu Magalhães

### FICHA CLÍNICA

#### 1. IDENTIFICAÇÃO

Nome do animal:		ID:	
Local de origem:		Destino: ( ) Adoção ( ) Eutanásia ( ) Domiciliado	
Responsável:			
Endereço:		Tel. ( )	
Material colhido:		Data da coleta: ____/____/____	
( ) Punção de medula ____µl ( ) Sangue ____ml ( ) Aspirado de lesão ____µl ( ) Imprint de lesão ( ) raspado de lesão		Data do processamento: ____/____/____	

- Indicação de inclusão no experimento: \_\_\_\_\_

#### 2 DADOS DO ANIMAL

RAÇA: \_\_\_\_\_ IDADE: \_\_\_\_\_ SEXO: M ( ) F ( )

PORTE: ( ) PEQUENO ( ) MÉDIO ( ) GRANDE

COR: ( ) CLARA ( ) ESCURA

PELAGEM: ( ) CURTA ( ) LONGA

#### 3 EXAME FÍSICO GERAL

##### a) Inspeção

Lesão de pele: ( ) sim ( ) não (MARCAR NA RESENHA)

Onicogribose: ( ) sim ( ) não

Escore corporal do cão: ( ) Caquético ( ) Magro ( ) Normal ( ) Gordo ( ) Obeso.

Abdômen: ( ) Normal ( ) Dilatado ( ) Abaulado ( ) Retraído ( ) normal

Desidratação: ( ) 5% ( ) 10% ( ) 15% ( ) 20% ( ) normal

Edema: ( ) ocular ( ) membros ( ) subcutâneo ( ) normal

Secreção: ( ) ocular ( ) vaginal/prepucial

Presença de ectoparasitas: ( ) sim ( ) não

Dermatite: ( ) sim ( ) não / ( ) localizada ( ) generalizada/ ( ) COM prurido ( ) SEM prurido

Alopecia: ( ) sim ( ) não

OUTRAS

 OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

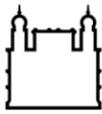
##### b) Parâmetros vitais

Frequência cardíaca: ( ) aumentada ( ) normal(60/160bpm) ( ) baixa Valor: \_\_\_\_\_

Frequência respiratória: ( ) aumentada ( ) normal(18/36mrpm) ( ) baixa Valor: \_\_\_\_\_

Tempo de perfusão capilar: ( ) aumentada ( ) normal(1-2 segundos) ( ) baixa Valor: \_\_\_\_\_

Temperatura retal: ( ) aumentada ( ) normal(37,5 -39,2°C) ( ) baixa



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**
**Instituto Aggeu Magalhães**

Alterações cardiorrespiratórias: ( ) presente ( ) ausente

Descrição da alteração:

*c) Exame de mucosa:*

Cor de mucosa ocular: ( ) pálida (esbranquiçada) ( ) congesta ou hiperêmica (vermelha) ( ) Cianótica (azul) ( ) icterica (amarelada) ( ) normal  
 Cor de mucosa oral: ( ) pálida ( ) congesta ou hiperêmica ( ) Cianótica (azul) ( ) icterica ( ) normal

*d) Palpação de linfonodo*

Hipertrofia de linfonodos: ( ) sim ( ) não (MARCAR NA RESENHA)

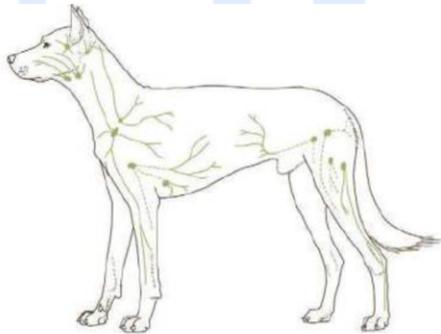
Mandibular ou Maxilar: ( ) Hipertrofiado ( ) normal

Pré-escapulares ou cervicais superficiais: ( ) Hipertrofiado ( ) normal

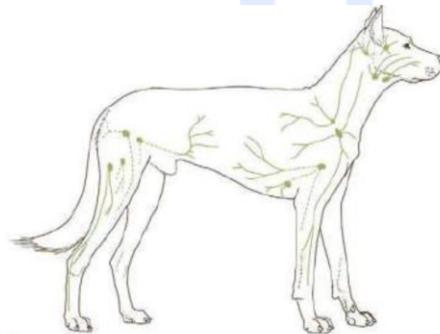
Poplíteo: ( ) Hipertrofiado ( ) normal

Inguinais: ( ) Infartado ( ) normal

*e) Palpação de abdominal*

**Fígado:** ( ) aumentado ( ) normal**Baço:** ( ) aumentado ( ) normal**intestino:** ( ) aumentado ( ) normal**Presença de fezes:** ( ) sim ( ) não**Gestante:** ( ) sim ( ) não

Lado esquerdo

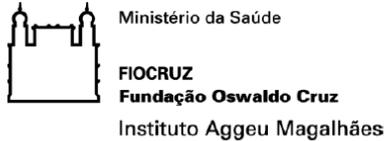


Lado direito

*f) Classificação:*

**Sintomático** ( )**Assintomático** ( )**Controle** ( )

## APÊNDICE B – TCLE PARA OS PROPRIETÁRIOS DOS ANIMAIS



### TERMO DE CONSENTIMENTO

**Título do projeto:** Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para a leishmaniose visceral.

**Nome do pesquisador principal:** Milena de Paiva Cavalcanti.

**Razão social e CIAEP instituição da CEUA que aprovou:** 158/2020.

**Objetivos do estudo:** Avaliar diferentes estratégias terapêuticas (compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos e extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes) quanto ao seu potencial imunomodulador para leishmaniose visceral.

**Procedimentos a serem realizados com os animais:** Punção venosa.

**Potenciais riscos para os animais:** Estresse ou dor (mínima) causada pela coleta.

**Cronograma:** 06/2020 até 05/2024

**Benefícios:** O presente estudo busca uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose visceral, tanto humana como canina, visando o controle da doença através da quebra do ciclo de transmissão.

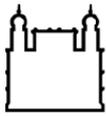
#### Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) Dr(a) \_\_\_\_\_, inscrito(a) no CRMV sob o n o \_\_\_\_\_. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal \_\_\_\_\_ também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

**Telefone de emergência:** (81) 2101-2660

**Equipe:** Milena de Paiva Cavalcanti e Victor Vaitkevicius Antão de Souza

**Endereço:** Campus da UFPE - Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ****Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Aggeu Magalhães

**Declaração de consentimento**

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Recife-PE, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

 Assinatura do Responsável

---

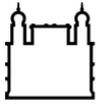
 Assinatura do Pesquisador
**Responsável**

- Nome:
- Documento de Identidade:

**Identificação do(s) animal(is)**

- Nome:
- Espécie:
- Número de identificação:
- Raça:

## APÊNDICE C – TCLE PARA INDIVÍDUOS HUMANOS



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Aggeu Magalhães

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controle Maior de idade

#### INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a.) para participar da Pesquisa '**Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para as leishmanioses. Abordagens terapêuticas e em vacinologia**', que será desenvolvido no Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ), sob a responsabilidade da pesquisadora **Milena de Paiva Cavalcanti**, e cujo objetivo é estudar o potencial de novas moléculas para o desenvolvimento futuro de vacinas e/ou novos remédios que ajudem na redução do número de pessoas com leishmaniose visceral (calazar) e leishmaniose tegumentar (ferida brava), bem como ajudem a aumentar a eficácia do tratamento de quem já está com alguma dessas doenças.

Se o (a) Sr. (a) concordar em participar deste estudo, será realizada uma coleta de 30 mL (equivalente a 2 colheres de sopa) de sangue na veia para identificar substâncias que o corpo humano produz contra o micróbio e para pesquisar o DNA do micróbio do calazar ou da ferida brava. O exame na veia não causa nenhum desconforto além da “picada” da agulha que pode algumas vezes causar uma pequena mancha roxa (hematoma) que desaparece em alguns dias sem qualquer tratamento. Para minimizar esse risco de ter a mancha roxa, o profissional que vai coletar o seu sangue tem muita experiência e a formação em biomedicina, curso superior que ensina a fazer esse procedimento. Os resultados dos testes moleculares (pesquisa de DNA) feitos nesse estudo serão entregues ao Sr. (a.) e ao seu médico assistente.

Garantimos que a privacidade do (da) Sr. (a) será preservada e os dados pessoais serão confidenciais e mantidos sob sigilo, não sendo divulgados em nenhuma hipótese. Antes da participação no referido projeto, o senhor tem a total liberdade de pedir qualquer esclarecimento adicional que julgue necessário, que será esclarecido por um participante do estudo. O (A) Sr. (a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo ao acompanhamento clínico e terapêutico. O (a) Sr. (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Se você tiver algum mal ou custo que tenha sido causado, de forma comprovada, por sua participação nesta pesquisa, você poderá solicitar ressarcimento ou indenização por via legal.

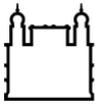
O IAM/FIOCRUZ irá conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de DNA até que esta pesquisa seja concluída. Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz possa utilizar as informações obtidas neste estudo em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir desta pesquisa poderão ser utilizados nas pesquisas futuras. Neste caso, o (a) senhor (a) será consultado (a) antes da utilização de sua amostra em outra pesquisa.

Em caso de dúvidas ou outras informações posteriores o (a) Sr.(a) poderá entrar em contato com a equipe responsável, através dos telefones abaixo e caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética do Instituto Aggeu Magalhães, através do telefone (81) 2101-2639, o qual tomará as medidas cabíveis. Este termo deverá ser rubricado por mim, Milena de Paiva Cavalcanti, e por você, em todas as páginas.

#### Consentimento pós-informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo com a minha participação no projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pela pesquisadora, ficando uma via com cada um de nós.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ****Fundação Oswaldo Cruz****Instituto Aggeu Magalhães**

\_\_\_\_\_. de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Nome do Membro da Equipe de Pesquisa: \_\_\_\_\_

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa: \_\_\_\_\_

Nome da Testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura da Testemunha: \_\_\_\_\_

Endereço - Rua (participante) e telefone

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Contatos:

Pesquisadora responsável: Milena de Paiva Cavalcanti

E-mail: mp@cpqam.fiocruz.br

Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

Impressão do dedo polegar  
do paciente (caso não saiba  
assinar).

## APÊNDICE D – ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO

Revista “Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases”

### Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases Cases of dogs with reagent serology for visceral leishmaniasis and infected with filarial worms: a clinical and diagnostic evaluation --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	CIMID-D-21-00160
<b>Article Type:</b>	Full Length Article
<b>Keywords:</b>	Laboratory diagnosis; Canine filariasis; Co-infection; <i>Dirofilaria</i> spp; <i>Acanthocheilonema</i> sp; <i>Leishmania infantum</i>
<b>Corresponding Author:</b>	Milena de Paiva Cavalcanti, PhD FIOCRUZ: Fundacao Oswaldo Cruz Recife, PE BRAZIL
<b>First Author:</b>	Victor Vaitkevicius-Antão
<b>Order of Authors:</b>	Victor Vaitkevicius-Antão Rômulo Pessoa-e-Silva Janilene de Oliveira Nascimento Eiji Kevin Nakasone Nakasone Fábio Lopes de Melo Milena de Paiva Cavalcanti
<b>Abstract:</b>	Visceral leishmaniasis (VL) and heartworm disease are important parasitic infections to affect domestic animals. Hindrances on diagnosis and the clinical outcomes determined by the coexistence of these diseases are still poorly investigated. Thus, this study aimed to analyze the possibility of cross-reactivity in serological tests for canine VL performed in dogs co-infected with filariids, as well as to evaluate the frequency of different clinical findings in these animals. Serologically positive dogs for VL were included, being 35.85% co-infected. Morphological diversity of filarial worms from different animals suggested more than one species, being <i>D. immitis</i> identified by PCR. The possibility of a false-positive result for VL was verified in some animals. Dermatitis/alopecia and cardiorespiratory alterations were more frequent in co-infected animals. Finally, this study reinforces the importance to discuss about therapeutic implications in coinfection and about changes in the diagnostic protocol adopted for the control of the VL in Brazil.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Beatriz Brener Federal Fluminense University: Universidade Federal Fluminense brener@vm.uff.br Experience in the area of parasitology, acting in the veterinary medical importance  Flavya Mendes-de-Almeida Federal Fluminense University: Universidade Federal Fluminense flavyama@id.uff.br Experience in the field of infectious and parasitic diseases of interspecific transmission, working in communicable diseases of domestic animals.  Jorge Guerrero University of Pennsylvania jorgegu1@hotmail.com Experience with Canine Dirofilariasis.  Lais Kelly Amâncio Ribeiro Berenguer Federal Rural University of Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco lais.kelly@hotmail.com Experience with Veterinary Medical, Molecular diagnosis and Leishmaniasis

## APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO - 1

## Revista “Frontiers in Immunology”



ORIGINAL RESEARCH  
published: 08 January 2021  
doi: 10.3389/fimmu.2020.605044



# Immunoprophylactic Potential of a New Recombinant *Leishmania infantum* Antigen for Canine Visceral Leishmaniasis: An *In Vitro* Finding

Rômulo Pessoa-e-Silva<sup>1</sup>, Lays Adrienne Mendonça Trajano-Silva<sup>1</sup>, Victor Vaitkevicius-Antão<sup>1</sup>, Wagner José Tenório dos Santos<sup>1</sup>, Franklin Barbalho Magalhães<sup>2</sup>, Danielle Maria Nascimento Moura<sup>1</sup>, Eiji Kevin Nakasone Nakasone<sup>3</sup>, Virgínia Maria Barros de Lorena<sup>1</sup> and Milena de Paiva-Cavalcanti<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Clarisa B. Palatnik-de-Sousa,  
Federal University of Rio de Janeiro,  
Brazil

### Reviewed by:

Gabriel M. Gutierrez,  
Leidos, United States  
Ana Victoria Ibarra-Meneses,  
Instituto de Salud Carlos III (ISCIII),  
Spain

### \*Correspondence:

Milena de Paiva-Cavalcanti  
milena.cavalcanti@fiocruz.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Vaccines and Molecular Therapeutics,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 11 September 2020

**Accepted:** 23 November 2020

**Published:** 08 January 2021

### Citation:

Pessoa-e-Silva R,  
Trajano-Silva LAM, Vaitkevicius-  
Antão V, Santos WJT,  
Magalhães FB, Moura DMN,  
Nakasone EKN, de Lorena VMB and  
Paiva-Cavalcanti M (2021)  
Immunoprophylactic Potential of a  
New Recombinant *Leishmania*  
*infantum* Antigen for Canine Visceral  
Leishmaniasis: An *In Vitro* Finding.  
*Front. Immunol.* 11:605044.  
doi: 10.3389/fimmu.2020.605044

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Institute, Recife, Brazil, <sup>2</sup> Tabosa de Almeida University Center, Caruaru, Brazil, <sup>3</sup> Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

The development and application of safe and effective immunoprophylactic/immunotherapeutic agents against canine visceral leishmaniasis (CanL) have been pointed out as the only means for the real control of the disease. Thus, this study aimed to evaluate the *in vitro* cellular immune response of dogs, elicited by the new recombinant proteins of *Leishmania infantum*, Lci10 and Lci13, in order to investigate their potential for vaccinology. Twenty-four dogs were submitted to clinical, parasitological, serological and molecular tests, and then separated into two study groups: 12 infected (InD) and 12 non-infected dogs (NInD), and six of each group were directed for Lci10 and Lci13 evaluation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured and stimulated with Lci10 (10 µg/ml) or Lci13 (5 µg/ml), and with *L. infantum* soluble antigen (LSA) (25 µg/ml) or no stimulus (NS) as controls. Afterwards, the mRNA levels of different cytokines were quantified through qPCR, and Nitric Oxide (NO) production was assessed in the culture supernatants. Significant differences were considered when  $p \leq 0.05$ . The comparative analysis revealed that, in the NInD group, Lci13 promoted a significant increase in the expression of IFN- $\gamma$  in relation to LSA ( $p = 0.0362$ ), and the expression of this cytokine in NInD was significantly higher than that presented in the InD ( $p = 0.0028$ ). A negative expression for TGF- $\beta$  was obtained in both groups. Lci13 also induced a greater production of NO in relation to the NS sample in the NInD group. No significant differences were observed after stimulation with Lci10. In conclusion, the results suggest a protective role of Lci13 for uninfected animals, thus with a potential for immunoprophylaxis. The results will help to direct the antigen Lci13 for further studies (pre-clinical trials), in order to determine its immunogenicity and reactogenicity effects, as a way to consolidate its real applicability for vaccinology against CanL.

**Keywords:** recombinant antigens, immunoprophylaxis, vaccinology, dog, visceral leishmaniasis

## APÊNDICE F – ARTIGO PUBLICADO - 2

## Revista “Cytokine”

Cytokine 123 (2019) 154784



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytokine](http://www.elsevier.com/locate/cytokine)

## Study of association of the rs2275913 *IL-17A* single nucleotide polymorphism and susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*



Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque<sup>a,c</sup>, Cíntia Nascimento da Costa Oliveira<sup>a</sup>, Victor Vaitkevicius-Antão<sup>a</sup>, Ana Carla Silva<sup>a</sup>, Carlos Feitosa Luna<sup>a</sup>, Virgínia Maria Barros de Lorena<sup>b</sup>, Milena de Paiva-Cavalcanti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Prof. Moraes Rego S/N, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Prof. Moraes Rego S/N, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> Central Laboratory of Public Health Dr Milton Bezerra de Sobral, Rua João Fernandes Vieira S/N, 50050-215 Recife, Pernambuco, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Interleukin 17  
Cutaneous leishmaniasis  
SNP  
Immunopathogenesis  
Th17 cells

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *Leishmania braziliensis* is the most spread clinical form of leishmaniasis in Brazil. However, only a few part of the people infected develop clinically perceptible disease, suggesting the influence of human genetic components in the CL pathogeny. The rs2275913 SNP is the nucleotide variant of the *IL17A* gene. The A allele is associated with a vast number of infectious and non-infectious diseases. Here, we investigated the association of the rs2275913 SNP (G/A) from *IL-17A* and two forms of susceptibility to CL in Brazil by case-control study. Furthermore, we evaluated the functional relevance of this SNP during the immune response of the host and analyzed its impact in the parasite elimination. Weak associations of A allele with susceptibility to *L. braziliensis* infection or to symptomatic CL were observed, and a tendency of A allele carriers to be more susceptible to infection and cutaneous disease. Functional analysis of the Th17 cell phenotypes revealed lower frequencies of CD4+ IL-17+ cells in samples of infected people with AA/AG genotypes. Furthermore, people carrying the A allele maintain higher parasite loads, reinforcing the genetic susceptibility findings. This study adds knowledge about the influence of a significant genetic variation on IL-17 promoter on CL pathogenesis, and may contribute to enhance the knowledge about the role of IL-17 in the *L. braziliensis* infections.

## 1. Background

Cutaneous leishmaniasis (CL) is worldwide the most prevalent clinical form of leishmaniasis which can be caused by many species of *Leishmania*, distributed differently by geographical areas. Around 90% of all CL cases occur in sub-developed or developing countries like Brazil, where *Leishmania braziliensis* is the most spread specie, causing mainly the localized form of CL [1,2]. In Brazil 26,008 cases/year were reported in the last decade [1]. However, seroprevalence studies indicate that only a very few part of the individuals infected with parasites of the *Viannia* subgenus (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, and *L. peruviana*) develop skin lesions that characterize the cutaneous disease [3].

The T CD4+ lymphocytes, also called T-helper (Th) cells, have a central role in the immune responses against *Leishmania* sp. The

differential development of Th1 or Th2-type responses translates directly to the spectrum of clinical presentations of CL in patients infected, which can become asymptomatic or develop disease with different severity grades [4]. A successful immune response, which allows parasite elimination without disease development, requires a balance between the activation of IFN $\gamma$ /TNF-producing Th1 cells, and the secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by Th2 cells [5]. It is well established that clinical outcomes of CL caused by *L. braziliensis* are due to exacerbated Th1 activation, leading to decreased parasite load, but causing severe tissue damage [6].

Studies of Th17 cells participation on CL have shown that these cells perform a crucial role in the establishment of infection and in the outcome of infection to disease. Th17 cells act through granulocyte recruitment [7] and unbalance the Th1/Th2 equilibrium [8]. The T CD4+ IL17+ lymphocytes are characterized by the production of the

\* Corresponding author.

E-mail address: [mp@cpqam.fiocruz.br](mailto:mp@cpqam.fiocruz.br) (M. de Paiva-Cavalcanti).

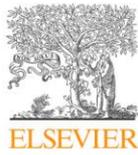
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154784>

Received 22 December 2018; Received in revised form 23 May 2019; Accepted 16 July 2019  
1043-4666/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

## APÊNDICE G – ARTIGO PUBLICADO - 3

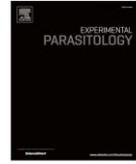
## Revista “Experimental Parasitology”

Experimental Parasitology 199 (2019) 9–16



Contents lists available at ScienceDirect

## Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

## The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems



Rômulo Pessoa-e-Silva<sup>a</sup>, Victor Vaitkevicius-Antão<sup>a</sup>, Thiago André Santos de Andrade<sup>b</sup>, Anny Caroliny de Oliveira Silva<sup>a</sup>, Gilsan Aparecida de Oliveira<sup>c</sup>, Lays Adrienne Mendonça Trajano-Silva<sup>d</sup>, Eiji Kevin Nakasone Nakasone<sup>b</sup>, Milena de Paiva-Cavalcanti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Aggeu Magalhães Institute, Av. Moraes Rego, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife-PE, Brazil

<sup>b</sup> Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), R. Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brazil

<sup>c</sup> CESMAC University Center, R. da Harmônia - Farol, CEP 57081-350, Maceió-AL, Brazil

<sup>d</sup> University of São Paulo (USP), Av. Bandeirantes, CEP 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Visceral leishmaniasis  
Dog  
Diagnosis

## ABSTRACT

In Brazil, the main strategy adopted to contain Visceral Leishmaniasis (VL) is the controversial culling of dogs with reagent serology for Canine VL (CVL). Despite there are studies showing that significant reduction of human cases has not been observed, as well as there are works demonstrating the occurrence of false-positive results in the confirmatory test, the protocol has been maintained. Researches that can reinforce the existence and persistence of this problem, as well as bring concrete alternatives are pivotal. In this context, the aim of this work was to evaluate and compare the serological, molecular and parasitological methods employed for CVL detection in Brazil, in dogs with diverse clinical profiles, from two endemic areas of Pernambuco state. Comparisons among TR-DPP<sup>®</sup>, EIE-LVC and qPCR (animals from Goiana-PE: 91) demonstrated that agreements varied from ‘poor’ to ‘moderate’ ( $kappa = 0.162-0.442$ ), and a triple agreement occurred in 61.36% (54/88) of the samples. The highest percentage of agreement was obtained between TR-DPP<sup>®</sup> and EIE-LVC within the polysymptomatic group (93.33%; 14/15). Of the 34 dogs with reagent serology from Caruaru-PE, 17 (50%) and 29 dogs (85.29%) were positive for qPCR and parasitological exam, respectively. By comparing serology, qPCR and parasitological exam, the lowest percentage of agreements were obtained within the asymptomatic group (40%–72.72%). It was possible to observe that the percentage of agreement tended to decrease according to the absence of clinical manifestations in the dogs. Thus, from the fact that all diagnostic tools evaluated have their limitations, it is very important to be careful before to propose an alternative set of diagnostic criteria. Besides, the answer for better results in the control of CVL may not be in the choose of the best set of diagnostic tools, but it may be in the strategy of culling itself. In this context, it is very important to invest in alternative control measures, such as mass vaccination and treatment of dogs, thus reducing the transmission to the vector and helping to avoid new canine and human cases.

## 1. Introduction

The zoonotic visceral leishmaniasis (VL) is a neglected and severe disease caused by protozoan parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of the genus *Leishmania* (Elmahallawy et al., 2014), and it has been reported in several areas around the world, including South America and Southern Europe (Dujardin, 2006). In Brazil, the

number of infected individuals is higher than in any other country from Latin America, and the victims are normally those with lower incomes from rural and peri-urban areas (Romero and Boelaert, 2010; Brasil, 2014). In the biological cycle of VL, domestic dogs are considered a key element, since the infected animals may harbor in their dermis a high number of macrophages infected with amastigote forms, thereby becoming infective to the vector (Neves, 2016). The proximity to the

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [romulops12@gmail.com](mailto:romulops12@gmail.com) (R. Pessoa-e-Silva), [victorvaitkeantao@gmail.com](mailto:victorvaitkeantao@gmail.com) (V. Vaitkevicius-Antão), [thiago.biovet@gmail.com](mailto:thiago.biovet@gmail.com) (T.A.S. de Andrade), [annycaroliny.os@gmail.com](mailto:annycaroliny.os@gmail.com) (A.C. de Oliveira Silva), [gilsanaraujo@gmail.com](mailto:gilsanaraujo@gmail.com) (G.A. de Oliveira), [laystrajano@gmail.com](mailto:laystrajano@gmail.com) (L.A.M. Trajano-Silva), [eijitus@gmail.com](mailto:eijitus@gmail.com) (E.K.N. Nakasone), [mp@cpqam.fiocruz.br](mailto:mp@cpqam.fiocruz.br) (M. de Paiva-Cavalcanti).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.02.012>

Received 1 November 2018; Received in revised form 1 January 2019; Accepted 19 February 2019

Available online 20 February 2019

0014-4894/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

## APÊNDICE G – ARTIGO REFERENTE A DISSERTAÇÃO

### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE EXTRATOS BIOATIVOS DE MICRORGANISMOS FOTOSSITETIZANTES PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL

*Evaluation of the therapeutic potential of bioactive extracts of photosynthetic microorganisms for visceral leishmaniasis*

Victor Vaitkevicius-Antão<sup>1</sup>; Isabelle Barreto da Silva Moreira Reino<sup>1,2</sup>; Maria Gabriella Nunes de Melo<sup>1</sup>, Jady Moreira da Silva<sup>1,2</sup>, José Noé da Silva Júnior<sup>3</sup>; Raquel Pedrosa Bezerra<sup>3</sup>; Daniella de Araújo Viana Marques<sup>4</sup>; Silvana de Fátima Ferreira da Silva<sup>4</sup>; Virginia Maria Barros de Lorena<sup>1</sup>; Milena de Paiva Cavalcanti<sup>1</sup>.

1. Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE);
2. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);
3. Centro de Apoio a Pesquisa/ Universidade Federal Rural de Pernambuco (CENAPESQ/UFRPE);
4. Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade de Pernambuco (ICB/UPE).

#### Abstract

New therapeutic strategies have been studied for visceral leishmaniasis (VL) and for the development of an immunotherapeutic, it is necessary that the new molecule modulates the host's immune response, being as essential as directly eliminating the parasite. The aim of this study was to evaluate *in vitro* bioactive extracts of photosynthetic microorganisms (PMs) for their leishmanicidal and immunomodulatory potential for VL. Bioactive extracts from PMs (*Arthrospira platensis* and *Dunaliella tertiolecta*) through sonication. Reference drugs, Milteforan<sup>TM</sup> (MTF) and Glucantime<sup>®</sup> (Sb<sup>V</sup>) were also evaluated for comparison. The selectivity indices (SI) of all treatments were determined from assays of inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in *Leishmania infantum* cells and cytotoxic concentrations (CC<sub>50</sub>), in human cells through the MTT method. The immune response was evaluated in healthy human cells through the production of cytokines (Flow Cytometry) and nitric oxide (NO), in addition to gene expression (RT-qPCR), stimulating with four concentrations (CC<sub>50</sub>; ½ of CC<sub>50</sub>; ¼ of CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub>).

#### 1. INTRODUÇÃO

Entre os obstáculos a serem superados para o controle da LV, está a carência de alternativas terapêuticas. A droga de primeira escolha para o tratamento de humanos com LV é o Antimoniato de n-Metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e para cães com LV é a Miltefosina (Miltéforan<sup>TM</sup>), as quais possuem uma alta toxicidade para o hospedeiro e vêm apresentado falhas no tratamento, além de haver relatos de resistência do parasito (PONTE-SUCRE et al., 2017).

Para o sucesso terapêutico da LV, acredita-se que haja uma dependência, ao menos em parte, das alterações na resposta imune do hospedeiro frente ao parasito; neste contexto, o uso

de drogas imunomoduladoras que consigam reverter o perfil imunológico do hospedeiro, estimulando um perfil de resistência ao parasito, pode ser importante na complementação do tratamento convencional, ajudando na melhora clínica do paciente (PROVERBIO et al., 2014). Para se investigar uma resposta imune protetora estimulada por um candidato terapêutico, a compreensão dos mecanismos imunológicos nas leishmanioses é essencial, uma vez que esses parasitos desenvolveram, ao longo da evolução, vários mecanismos de evasão para sobreviver ao sistema imunológico do hospedeiro (SUKUMARA; MADUBALA, 2004).

A resposta imune celular do hospedeiro é mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> que, de forma simplificada, podem apresentar dois tipos de perfis: o de resistência (Th1) e o de susceptibilidade (Th2). No perfil Th1 ocorre a produção de citocinas como Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral (*tumor necrosis factor* - TNF) e Interleucina 2 (IL-2), que estão associados ao controle da infecção pela ativação dos macrófagos, produção de óxido nítrico (NO – *Nitric Oxide*) e consequente destruição dos parasitos intracelulares. Por outro lado, o perfil Th2 tem como característica a síntese de citocinas como Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10) e Fator de Crescimento Tumoral beta (*tumor growth factor beta* - TGF- $\beta$ ), as quais favorecem o surgimento da doença e seus sintomas, com inibição de NO sintetizado por macrófagos ativados, propiciando assim a sobrevivência dos parasitos (ALEXANDER; BROMACHER, 2012; BHOWMICK, RAVINDRAN, ALI, 2014; MORENO et al., 2014; RESENDE et al., 2013).

Outros subtipos celulares como as células T reguladoras (Treg) e Th17, também podem apresentar um papel importante na susceptibilidade e resistência contra as leishmanioses (NYLÉN; GAUTAM, 2010; ZHU et al., 2010). No entanto, apesar de o paradigma Th1/Th2 (resistência/susceptibilidade) ser um modelo simplificado, vários estudos têm demonstrado sua fundamentação (COSTA-PEREIRA et al., 2015; SHAHBAZI et al., 2015; SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

A partir desse conhecimento sobre o perfil imunológico, pode-se realizar estudos que busquem investigar novas moléculas com potencial contra a leishmaniose visceral. Dentre os possíveis candidatos a terapia, estão os bioativos provenientes de organismos marinhos, como os dos microrganismos fotossintetizantes, que podem ser promissores para os estudos de investigação terapêutica, uma vez que, possuem uma diversidade de metabólitos que podem apresentar atividades biológicas ainda não exploradas. Deste modo, com uma visão mais ampla para o controle das leishmanioses, este estudo objetivou avaliar *in vitro* o potencial terapêutico para LV desses compostos sintéticos e extratos bioativos de algumas espécies de microrganismos fotossintetizantes em células humanas e caninas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes

Foram cultivados dois microrganismos fotossintetizantes (MFs), nos quais foram selecionados a partir da coleção de cultura da Universidade do Texas (Utex, 2010): a cianobactéria *Arthrospira platensis* (Utex, 1926), e a clorófita *Dunaliella tertiolecta* (Utex, 1644). Os cultivos dos microrganismos foram realizados em frascos de Erlenmeyer com volume de cultivo de entre 200 e 400 mL de seus respectivos meios de cultura, com uma concentração celular inicial de 50 mg/mL, a uma temperatura de aproximadamente 28 °C e iluminância de 24  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para a cianobact\u00e9ria os cultivos foram realizados em mesa agitadora.

Ap\u00f3s a finaliza\u00e7\u00e3o do cultivo, a biomassa foi liofilizada, ressusp\u00eandida em um tamp\u00e3o de Tris HCl 0,1M e ent\u00e3o as c\u00e9lulas foram lisadas pelo m\u00e9todo de sonica\u00e7\u00e3o (20 pulsos de 60 segundos, com intervalos de 60 segundos). Logo ap\u00f3s a obten\u00e7\u00e3o dos sobrenadantes do extrato, foi realizada a determina\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o proteica, sendo realizada a dosagem pelo kit BCA (BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit, Thermo-Scientific). Os extratos obtidos foram submetidos a filtra\u00e7\u00e3o em filtro de 0,22 $\mu\text{M}$ , os quais foram utilizados para a avalia\u00e7\u00e3o da atividade biol\u00f3gica.

### 2.2. Cultivo de *L. infantum*

Formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/1972/BH46) foram expandidas em cultura em meio Schneider's (Sigma-Aldrich) de pH 7,2 contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibi\u00f3tico (penicilina 200U/mL). Os repiques foram realizados entre o terceiro e quarto dia de cultivo, e incubados em uma estufa de demanda bioqu\u00edmica de oxig\u00eanio (B.O.D.) at\u00e9 a fase de crescimento exponencial, para serem utilizados nos ensaios de efeito leishmanicida.

Para a obten\u00e7\u00e3o das fra\u00e7\u00f5es antig\u00eanicas, a massa parasit\u00e1ria foi submetida a tr\u00eas lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) atrav\u00e9s de centrifuga\u00e7\u00f5es a 1000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C. O *pellet* resultante foi ressusp\u00eandido utilizando 1mL de PBS, para cada  $1 \times 10^9$  parasitos. Em seguida, acrescentou-se o inibidor de proteases PMSF (*Phenylmethyl-Sulfony Floride*) (10mg/mL) para cada 1mL da solu\u00e7\u00e3o. Posteriormente, as c\u00e9lulas foram submetidas a r\u00e1pidos congelamentos (-197°C) no Nitrog\u00eanio L\u00edquido, seguidos de descongelamento (40°C) em Banho-Maria. Logo depois, a suspens\u00e3o celular foi submetida ao processo de ultrassonica\u00e7\u00e3o (60 segundos/ 40W), por tr\u00eas vezes, sendo centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C.

O sobrenadante resultante foi a fração antigênica solúvel (*L. infantum soluble antigen: LSA*). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), e a fração estocada a -80°C. O LSA foi utilizado nos ensaios de cultura celular.

### **2.3. Coleta de material biológico e considerações éticas**

Após antissepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%, com auxílio de agulhas 25x0,7 mm, foram coletados de dois a quatro mL de sangue total de humano, acondicionados em tubos de coleta a vácuo com anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (Vacutainer®), para o diagnóstico por qPCR da LV e LT. Para a avaliação da resposta imune e realização das culturas de células, foram coletados 20 mL de sangue divididos em 2 tubos Vacutainer® com anticoagulante heparina (2 x 10 mL).

Antes dos procedimentos de coleta, indivíduos humanos incluídos no estudo foram convidados a participar e assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a utilização do material coletado para fins científicos. Este estudo está inserido no projeto “Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para as leishmanioses.” que possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-IAM): parecer 4.077.060 (FIOCRUZ/PE).

### **2.4. Diagnóstico para LV**

- Exame molecular: para extração de DNA foi utilizado o QIAamp® DNA Minikit (QIAGEN®), seguindo as instruções do fabricante. Para a detecção de *L. (L.) infantum*, foi realizada uma qPCR usando o sistema LINF 1B (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009), além da utilização do sistema kDNA1 (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013) para exclusão de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana.

### **2.5. Obtenção de PBMC e cultivo celular**

Ao sangue heparinizado foi adicionado PBS (pH 7,2) na proporção de 1:1. Essa mistura foi adicionada ao Ficoll-hypaque na proporção de 1:3 para obtenção do anel de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) após centrifugação a 900 x g por 30 minutos sem freio. As células foram lavadas duas vezes em PBS, sendo posteriormente ressuspendidas em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10% e 1% de penicilina/estreptomicina (200 U/mL). As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan. O valor obtido de células foi ajustado para a

concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL através da adição de meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10%, para a utilização nos ensaios.

## 2.6. Determinação do Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado através da razão entre a concentração citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) e a concentração inibitória de 50% ( $IC_{50}$  – *inhibitory concentration*). A determinação da  $CC_{50}$  foi feita a partir de experimentos realizados com células humanas, por sua vez a  $IC_{50}$  foi determinada em células promastigotas de *L.infantum*. Todas as células foram tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e as drogas de referência. Como drogas de referências, foram utilizados Glucantime® (Antimoniato de n-Metilglucamina - Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.), e Milteforan™ (Miltefosina - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda.), por meio do princípio ativo sintetizado comercialmente.

### 2.7.1. Viabilidade Celular

PBMC de humanos saudáveis foram cultivados em placas de 96 poços e tratados com os extratos naturais para a realização dos ensaios de avaliação da concentração citotóxica de 50% ( $CC_{50}$ ). O tratamento das células foi realizado em triplicata para cada estímulo, incubando por 24 horas, contendo  $1 \times 10^6$  células/mL, utilizadas as concentrações de 62,5 a 1000  $\mu$ g/mL (BASAK et al., 2017; CORREIA et al., 2016). Após o tempo de cultivo, foi descartado o sobrenadante e adicionado o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) na concentração de 1 mg/mL, solubilizado em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol, deixando incubado na estufa a 37°C durante 3 horas. Posteriormente, os cristais de Formazan formados foram solubilizados com DMSO (Dimetilsulfóxido) e então feita a leitura em espectrofotômetro a 540nm (MOSMANN, 1983).

### 2.7.2. Efeito leishmanicida

Células de *L. infantum* na forma promastigota foram cultivadas para a avaliação da concentração inibitória de 50% ( $IC_{50}$  – *inhibitory concentration*) dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes. O tratamento das células foi realizado em triplicata para cada estímulo, incubando por 48 horas numa placa de 96 poços, contendo  $1 \times 10^6$  células/mL (KHADEM VATAN et al., 2017). Após o tempo de cultivo, as células foram contadas e avaliadas quanto a sua morfologia em microscópio óptico. Para os extratos naturais utilizou-se concentrações proteicas de 15,63 a 500  $\mu$ g/mL (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017). Para o Antimoniato de N-metilglucamina e a Miltefosina, a curva de concentração foi

de 15,63 a 250µg/mL e 0,1 a 4µg/mL, respectivamente (MORAIS-TEIXEIRA et al., 2008; 2011).

## **2.8. Análise de resposta imune**

Uma amostragem de conveniência (REIS, 2003) foi adotada, sendo coletado o sangue de seis indivíduos humanos saudáveis (VIANA et al., 2018). Portanto, indivíduos humanos sem sinais clínicos, que não receberam transfusão sanguínea e que foram negativos nos testes moleculares realizados para as leishmanioses, foram enquadrados na pesquisa.

As culturas de PBMC foram realizadas em placas de 48 poços de poliestireno, contendo  $5 \times 10^5$  células/poço, foram estimuladas com o mitógeno Fitohemaglutinina (PHA) (10 µg/mL) (controle positivo do cultivo), o antígeno solúvel de *L. infantum* (LSA) (25 µg/mL), Antimoniato de n-Metilglucamina; Miltefosina e os extratos naturais. As concentrações das drogas de referência e extratos naturais foram os valores da  $CC_{50}$ ;  $\frac{1}{2}$  da  $CC_{50}$ ;  $\frac{1}{4}$  da  $CC_{50}$  e da  $IC_{50}$ . Poços sem estímulo serviram como o controle negativo.

### 2.8.1. Avaliação da produção de citocinas

A partir dos sobrenadantes de culturas de PBMC humano foi realizada a dosagem da secreção de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) utilizando o kit *BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine* (Becton Dickinson). A leitura foi realizada no equipamento de citometria de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson), conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram analisados utilizando o *software* FCAP Array 1.0 (Becton Dickinson), sendo normalizados com os resultados obtidos pelas células sem estímulo.

### 2.8.2. Avaliação da produção de Óxido Nítrico

A quantificação dos níveis de NO foi realizada indiretamente pela medição do nitrito nos sobrenadantes das culturas, pela reação de Griess, de acordo com Resende et al. (2013). Os estímulos (LSA, Antimoniato de n-Metilglucamina; Miltefosina e os extratos naturais) foram comparados ao controle negativo (PBMC sem estímulo).

### 2.8.3. Avaliação da expressão de RNA mensageiro

Foi realizada a avaliação da expressão relativa de RNA mensageiro (mRNA) dos fatores transcricionais específicos (T-bet; GATA3; RORc e FOXP3), a partir do cultivo de PBMC humano saudável. Após o tempo de cultivo, foi realizada a extração do RNA pelo método de

TRIzol<sup>®</sup>(Invitrogen), realizando a dosagem da concentração de mRNA em espectrofotômetro e armazenando a -80°C.

Após a obtenção do mRNA, foi realizada uma transcrição reversa para DNA complementar (cDNA) através do kit comercial *TaqMan Reverse Transcription reagentes* (Applied Biosystems). As condições de ciclagem utilizadas seguiram as instruções do fabricante (25°C por 10 minutos; 37°C por 30 minutos; 95°C por 5 minutos; 4°C até retirar).

A partir do cDNA foi realizada uma qPCR em tempo real (Sistema *TaqMan*<sup>®</sup>) através do sistema de detecção de sequências QuantStudio 5 e usando o kit *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression PCR Master Mix* (Applied Biosystems) para os genes reguladores principais T-bet/Tbx21 (ID: Hs00894392\_m1), GATA3 (ID: Hs00231122\_m1), RORc (ID: Hs01076112\_m1) e FOXP3 (ID: Hs01085834\_m1). Como controle endógeno da reação será utilizado o GAPDH (ID: Hs02786624\_g1). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e expressas como a média  $\pm$  desvio-padrão, tendo como calibrador o mitógeno PHA.

## 2.9 Análise dos dados

Para determinar o valor da CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> foram realizadas análises de Regressão por Probit, através do *software* IBM SPSS Statistic 25. Foram realizadas também análises comparativas por técnicas de estatística descritiva por meio de distribuições absolutas e percentuais. Foi empregado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e de acordo com a análise, foi realizado o teste T de Student (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico), para comparações entre duas categorias, ou a análise de variância ANOVA One-way com Pós Teste de Tukey (paramétrico) ou Kruskal-Wallis com Pós-Teste de Dunns (não-paramétrico), para comparação entre mais de duas categorias. Análises de correlação também foram realizadas através do teste de Pearson (paramétrico) e teste de Spearman (não-paramétrico). Todos os testes foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. 2007, San Diego, CA, USA), sendo considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Determinação do Índice de seletividade

Foram realizados os ensaios de determinação de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>, sendo observado que o extrato de *A. platensis* possui a menor toxicidade para o PBMC humano, apresentando uma

CC<sub>50</sub> de aproximadamente 1000µg/mL. Por sua vez, a *D. tertiolecta* apresentou uma maior toxicidade para *L. infantum*, com uma menor IC<sub>50</sub>.

Ao analisar as drogas de referência, Antimoniato de n-Metilglucamina (Sb<sup>V</sup>) e Miltefosina (MTF), pode-se observar que MTF é mais tóxica para as células de *L. infantum* como também para as células do hospedeiro. Apesar da alta toxicidade, o IS humano para MTF é mais de 100 vezes maior do que os demais tratamentos. Por sua vez, o SbV apresentou o menor IS, demonstrando que os extratos são mais seletivos do que a droga de referência usada atualmente para o tratamento da LV. Os valores de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>, bem como o IS, estão apresentados na Tabela 1.

Tratamentos	IC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub>	IS
	<i>L. infantum</i> (µg/mL)	PBMC Humano (µg/mL)	CC <sub>50</sub> / IC <sub>50</sub>
<i>A. platensis</i>	259,20	986,11	3,80
<i>D. tertiolecta</i>	53,75	252,55	4,70
Sb <sup>V</sup>	195,15	412,46	2,11
Miltefosina	1,23	159,49	129,6

**Tabela 1. Atividade leishmanicida (IC<sub>50</sub>) em promastigotas e efeito citotóxico (CC<sub>50</sub>) em células humanas tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e drogas de referência. IS: índice de seletividade. PBMC: células mononucleares do sangue periférico.**

## 3.2. Análise de resposta imune

### 3.2.1. Quantificação de citocinas

A partir dos sobrenadantes das culturas de PBMCs estimuladas, foi realizada a dosagem das citocinas. Para os extratos, observamos que tanto o da espécie *A. platensis* como *D. tertiolecta* produzem citocinas do perfil Th1, em todas as concentrações avaliadas, demonstrando um estímulo positivo contra a LV (Figura1). Um destaque para a citocina do perfil Th2 (IL-10), a qual diminui sua produção gradativamente de acordo com o aumento da concentração dos extratos, havendo uma diferença estatística significativa entre as concentrações para o extrato de *A. platensis* ( $p$ -value=0,031) e *D. tertiolecta* ( $p$ -value=0,007). A Tabela 2 apresenta os valores médios da produção das citocinas, em pg/mL, após o estímulo celular com as quatro concentrações de cada extrato.

Comparando os resultados obtidos do extrato de *A. platensis* com o LSA, observa-se que, para todas as concentrações, houve uma resposta protetora Th1, com estímulo de IFN-γ superior a observada com a infecção natural mimetizada pelo LSA, havendo diferença estatística significativa para a concentração da IC<sub>50</sub> ( $p$ -value=0,032). Para todas as concentrações, o extrato não possuiu uma produção do TNF superior ao LSA, havendo diferenças estatísticas significativas, porém estimula mais a produção dessa citocina do as

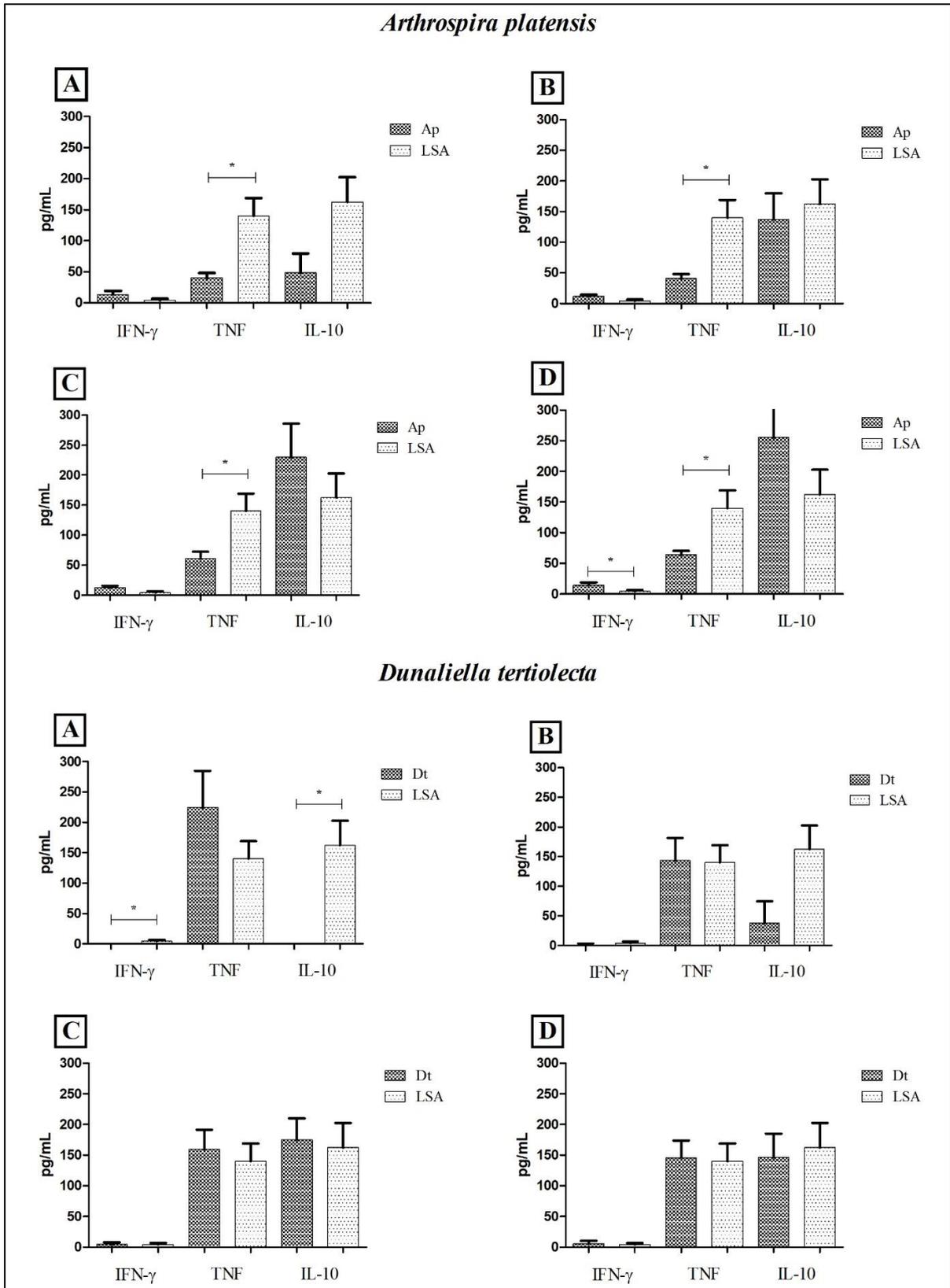
células sem estímulo. Já o extrato de *D. tertioleta* em comparação com o LSA, observa-se que, para todas as concentrações, houve uma resposta protetora Th1, com estímulo de TNF superior a observada com o LSA. Além disso, na concentração de CC<sub>50</sub>, houve produção de IL-10 inferior ao LSA, (*p-value*=0,002), e também para o IFN- $\gamma$  (*p-value*=0,008).

Ao analisar a correlação das citocinas para os extratos, foi observado que entre TNF e IL-4 nas concentrações da CC<sub>50</sub> e ½ da CC<sub>50</sub> do extrato de *A. platensis*, houve uma correlação muito forte significativa negativa (*r*= -0,92; *p-value*= 0,02) e positiva (*r*= 0,97; *p-value*= 0,01), respectivamente. Para o extrato de *D. tertiolecta*, houve correlações muito forte, porém nenhuma significativa.

<i>A. platensis</i>					
Citocinas	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	<i>p-value</i>
IFN- $\gamma$	13,63	11,90	12,54	14,78	0,92
TNF	40,71	41,27	61,19	64,18	0,63
IL-10	<b>48,77</b>	<b>137,2</b>	<b>229,9</b>	<b>255,7</b>	<b>0,031*</b>
IL-4	0,21	0,33	-0,03	0,18	0,21
IL-2	-1,03	-0,46	-1,20	-0,72	0,48
<i>D. tertiolecta</i>					
Citocinas	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	<i>p-value</i>
IFN- $\gamma$	-3,502	0,674	4,542	5,504	0,20
TNF	225,0	143,3	160,2	146,0	0,48
IL-10	<b>-21,48</b>	<b>37,85</b>	<b>175,1</b>	<b>146,3</b>	<b>0,007*</b>
IL-4	-0,038	0,20	-0,148	0,142	0,51
IL-2	-0,942	-0,43	-0,704	-1,074	0,43

**Tabela 2.** Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com os extratos de *Arthrospira platensis* e *Dunaliella tertiolecta*. CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (*p-value* < 0,05).

As drogas de referência apresentaram uma supressão imunológica, com exceção da citocina TNF, que teve uma produção maior pelas células estimuladas com ¼ da CC<sub>50</sub> da MTF; e a IL-10, que foi produzida pelas células estimuladas com todas as concentrações do Sb<sup>V</sup>, além da concentração de IC<sub>50</sub> da MTF. A Tabela 3 apresenta os valores médios da produção das citocinas a partir das concentrações de cada droga. Em relação a correlação entre as citocinas, para o Sb<sup>V</sup>, houveram correlações muito forte, mas não significativa, por sua vez, para a MTF foi possível observar correlações negativas muito fortes e significativas entre IL-4 e IL-2 na concentração da CC<sub>50</sub> (*r*= 0,90; *p-value*=0,03), e entre TNF e IL-10 na concentração da IC<sub>50</sub> (*r*= 0,91; *p-value*=0,01).



**Figura 1. Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes. A (valor da  $CC_{50}$ ); B (metade do valor da  $CC_{50}$ ); C (um quarto do valor da  $CC_{50}$ ); D (valor da  $IC_{50}$ ); LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum*); Ap (*Arthrospira platensis*) e Dt (*Dunaliella tertiolecta*). \* ( $p$ -value < 0,05).**

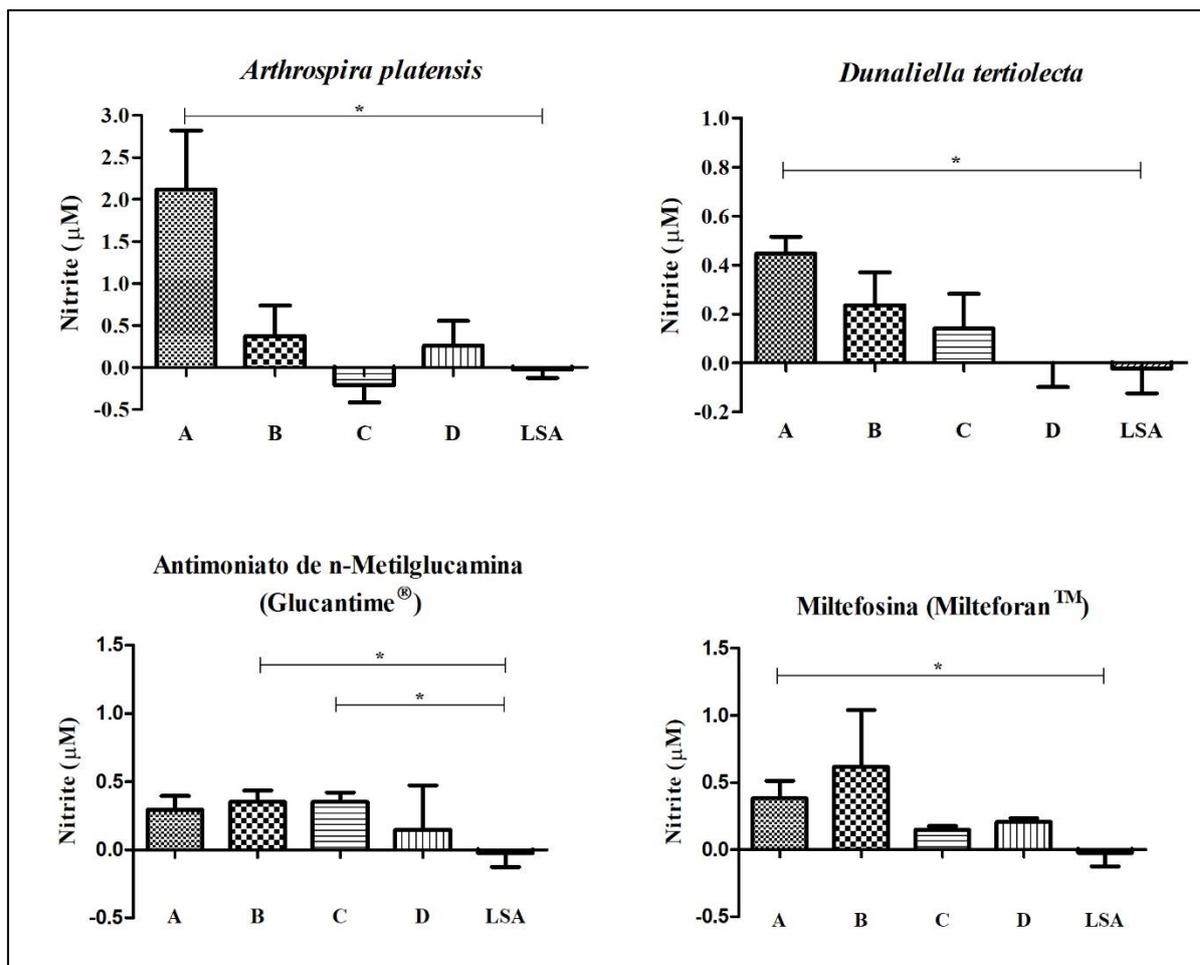
Antimonial de n-Metilglucamina				
Citocinas	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
IFN- $\gamma$	-2,853	-3,743	-1,335	2,000
TNF	-2,603	-0,300	-0,418	0,900
IL-10	8,112	2,213	4,268	11,82
IL-4	-0,398	-0,403	-0,288	0,298
IL-2	-1,138	-1,395	-0,720	-0,640
Miltefosina				
Citocinas	CC <sub>50</sub>	½ CC <sub>50</sub>	¼ CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
IFN- $\gamma$	-4,660	-4,635	-3,998	1,538
TNF	-8,105	-4,945	0,635	-2,138
IL-10	-35,08	-35,16	-34,54	0,128
IL-4	-0,263	-0,39	-0,185	-0,273
IL-2	-1,670	-1,748	-1,508	-1,138

**Tabela 10. Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com as drogas de referência.** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%).

### 3.2.2. Quantificação de Óxido Nítrico

Para os extratos, foi observado que há uma produção do NO um pouco maior quando comparado as células sem estímulo e estimuladas com o LSA (o qual demonstra uma redução na produção de NO, quando comparado as células sem estímulos). É observado também que a dosagem do nitrito está diretamente proporcional com a concentração do estímulo (Figura 2). Diferenças estatísticas significativas são observadas entre a maior concentração (CC<sub>50</sub>) de cada extrato com o LSA (*A. platensis*: *p-value*= 0,017; *D. tertiolecta*: *p-value*= 0,005).

Por sua vez, as DRs também obtiveram uma medição de nitrito um pouco maior do que quando comparado as células sem estímulo e estimuladas com o LSA, porém não havendo a proporcionalidade entre dosagem e concentração. Para o Sb<sup>V</sup>, ocorreu diferença estatística significativa entre as concentrações de ½ da CC<sub>50</sub> (*p-value*=0,028) e ¼ da CC<sub>50</sub> (*p-value*=0,023) com o LSA, e já para a MTF, uma diferença estatística significativa entre a CC<sub>50</sub> e LSA (*p-value*=0,041).



**Figura 2. Medição do nitrito após os estímulos das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.** A (valor da  $CC_{50}$ ); B (metade do valor da  $CC_{50}$ ); C (um quarto do valor da  $CC_{50}$ ); D (valor da  $IC_{50}$ ) e LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* –  $25\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.2.3. Expressão gênica

A partir dos resultados da produção de citocinas e do óxido nítrico, foi realizada a avaliação da expressão gênica apenas para os extratos naturais e drogas de referência. A partir das células estimuladas, foi realizado a extração do RNA mensageiro e feita a transcrição reversa para cDNA para a quantificação, tendo como alvos os genes *Tbx21*, *GATA3*, *RORc* e *FOXP3*, os quais estão relacionados com a indução da diferenciação das células T para os perfis Th1, Th2, Th17 e Treg, respectivamente.

Ao analisarmos os resultados da expressão gênica estimulada com os extratos naturais (Figura 3), observa-se que em todas as concentrações do extrato de *A. platensis* existe um equilíbrio entre o perfil Th1/Th2, com a média da expressão do gene *Tbx21* maior do que a do *GATA3* na maior concentração de estímulo, resultados semelhantes ao LSA. Por sua vez, o gene *FOXP3*, somente na maior concentração, apresentou uma expressão negativa, e tendo o

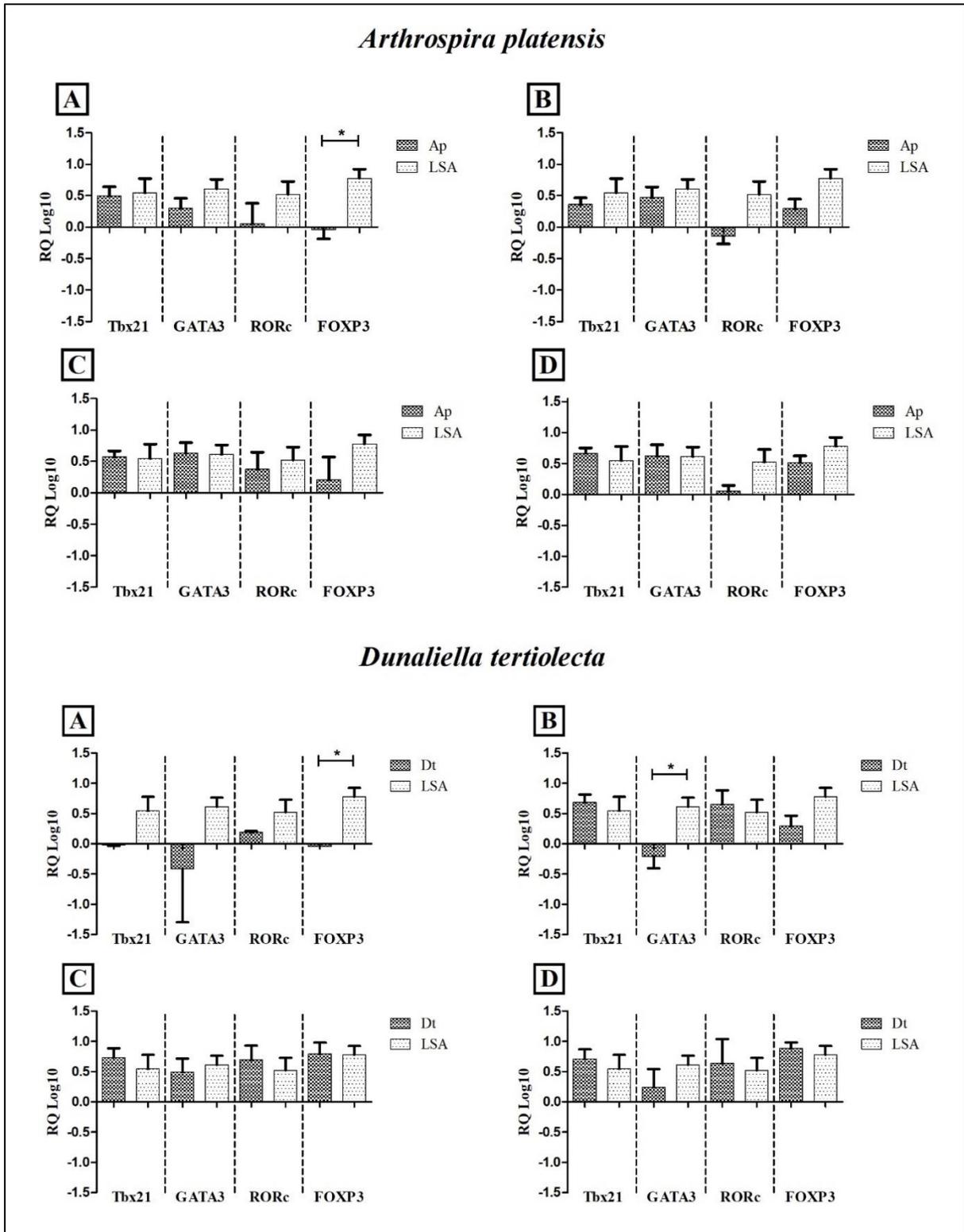
gene RORc variando bastante de concentração para concentração, apresentando uma maior expressão na concentração de  $\frac{1}{4}$  da  $CC_{50}$  (Tabela 3).

Já para o extrato de *D. tertiolecta*, pode-se observar que nas menores concentrações ocorreu um equilíbrio entre todos os genes indutores, com a média de expressão do gene GATA3 inferior aos demais. Como melhor resultado apresentado, a concentração de  $\frac{1}{2}$  da  $CC_{50}$  estimulou uma expressão positiva equilibrada entre os perfis Th1xTh17xTreg, com expressão negativa de GATA3, o qual induz o perfil Th2, e diferença estatística significativa quando comparado ao LSA ( $p$ -value=0,009). Na maior concentração, houve apenas a expressão positiva do gene RORc.

Analisando a correlação entre os genes, para a *A. platensis* foi observado uma correlação positiva muito forte significativa entre Tbx21 e RORc na concentração de  $\frac{1}{2}$  da  $CC_{50}$  ( $r= 0,95$ ;  $p$ -value=0,047). Em relação a análise de correlação do extrato de *D. tertiolecta*, nas concentrações testadas não foram observadas correlações significativas.

<i>Arthrospira platensis</i>				
Genes	$CC_{50}$	$\frac{1}{2} CC_{50}$	$\frac{1}{4} CC_{50}$	$IC_{50}$
Tbx21	0,49	0,36	0,57	0,67
GATA3	0,30	0,47	0,64	0,62
RORc	0,05	-0,14	0,38	0,05
FOXP3	-0,04	0,29	0,21	0,51
<i>Dunaliella tertiolecta</i>				
Genes	$CC_{50}$	$\frac{1}{2} CC_{50}$	$\frac{1}{4} CC_{50}$	$IC_{50}$
Tbx21	-0,02	0,69	0,73	0,71
GATA3	-0,41	-0,20	0,49	0,24
RORc	0,19	0,65	0,69	0,64
FOXP3	-0,05	0,29	0,79	0,88

**Tabela 3. Quantificação relativa da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes.**  $CC_{50}$  (Concentração Citotóxica de 50%);  $IC_{50}$  (Concentração Inibitória de 50%).



**Figura 3. Quantificação relativa (RQ Log<sub>10</sub>) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes. A (valor da CC<sub>50</sub>); B (metade do valor da CC<sub>50</sub>); C (um quarto do valor da CC<sub>50</sub>); D (valor da IC<sub>50</sub>); LSA (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* – 25µg/mL); Ap (*Arthrospira platensis*) e Dt (*Dunaliella tertiolecta*). Calibrador usado foi o PHA. \* (Diferença estatística = *p*-value < 0,05).**

#### 4. DISCUSSÃO

Na pesquisa de identificação de novas estratégias terapêuticas, a baixa toxicidade às células do hospedeiro é um dos fatores importantes para ser considerado como um bom candidato terapêutico (BHARGAVA; SINGH, 2012). Deste modo, o extrato de *Arthrospira platensis* demonstrou um valor de  $CC_{50}$  mais elevado do que os princípios ativos das drogas atualmente utilizadas para o tratamento de LV e LVC (Glucantime<sup>®</sup> e Milteforan<sup>™</sup>, respectivamente).

Como candidatos alternativos ao desenvolvimento de terapêuticos, os organismos marinhos fotossintetizantes vêm sendo estudados quanto sua capacidade anti-*Leishmania*, no entanto, estudos avaliando fitoplanctons quanto seu efeito contra espécies de *Leishmania* sp. são bem escassos, sendo somente relatado por Pereira et al. (2015), o qual avaliou a atividade leishmanicida de extratos metanólicos de quatro espécies de Chlorophytas, de três gêneros diferentes (*Nannochloris*, *Picochlorum* e *Desmochloris*). Assim, faz necessário mais estudos sobre os efeitos leishmanicidas de microrganismos marinhos fotossintetizantes, demonstrando a importância do presente trabalho. Então, ao comparar com os resultados obtidos pelos extratos das espécies de Chlorophytas por Pereira et al. (2015), é possível notar que os extratos de *Dunaliella tertiolecta* apresentou um valor menor de  $IC_{50}$ , ou seja, mostrando uma maior atividade leishmanicida, uma vez que, a concentração de 250 $\mu$ g/mL utilizada de *Nannochloris* sp. reduziu apenas 38% a viabilidade de *L. infantum*.

Ao observar a atividade leishmanicida dos extratos naturais deste estudo, nota-se que os valores de  $IC_{50}$  são inferiores quando comparados com os alguns extratos orgânicos de origem vegetal avaliados por Bouyahya et al. (2017), o qual tiveram uma variação de  $IC_{50}$  entre 82,39 até 500 $\mu$ g/mL sendo mais tóxicos para *L. infantum*. Fazendo uma nova comparação, sendo que dessa vez, com isolados de meroditerpenóides provenientes de uma macroalga marrom (*Cystoseira baccata*) avaliados por Sousa et al. (2017), é possível observar que o IS do extrato de *D. tertiolecta* é maior, uma vez que, o IS obtido pelo autor foi menor que 10, usando macrófagos peritoneais de murinos, demonstrando que os extratos aqui estudados podem ser considerados possíveis promissores.

Apesar dos extratos de todas as espécies aqui estudadas não apresentarem um IS maior que 10 nos ensaios com células humanas, não exclui a possibilidade desses extratos possuírem um potencial imunomodulador. Pois, como observado nos estudos de Costa-Silva et al. (2019), isolados provenientes de produtos naturais possuíram atividade imunomodulatória contra *L. infantum*, tendo a capacidade de reduzir a produção de citocinas do perfil Th2, além de

estimular quimiocinas associadas a diminuição da carga parasitária, mesmo seus isolados apresentando IS menor que 10.

Ao avaliar a resposta imune induzida pelos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes das espécies *A. platensis* e *D. tertiolecta*, é observado um estímulo imunológico positivo das células. Diferentes concentrações foram estudadas, porém todas mantêm o mesmo padrão geral de resposta imunológica, equilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, com algumas concentrações tendo um destaque um pouco maior das citocinas de perfil Th1.

A *A. platensis* é uma cianobactéria que possui algumas atividades biológicas já conhecidas há alguns anos pela comunidade científica. O potencial imunomodulador que esse microrganismo possui é algo já observado na literatura, o qual tem demonstrado estimular a produção de IFN- $\gamma$  e TNF, reduzindo a produção de IL-10, tanto em camundongos (SHOKRI et al., 2014), como em PBMC humano (MAO et al., 2000). Além do extrato em si, uma proteína isolada de *A. platensis*, a ficocianina (pigmento fotossintético), estudada por Sheikh et al. (2014) realizando o tratamento de PBMC, demonstrou também um aumento de IFN- $\gamma$ . Esses achados corroboram com o encontrado no presente trabalho, o qual observou uma produção de IFN- $\gamma$  e TNF maior quando comparado as células sem estímulo, e com destaque especial para o IFN- $\gamma$  que possuiu ainda uma síntese maior quando comparado ao LSA, havendo uma diferença estatística na menor concentração.

Além da produção de citocinas do perfil Th1, o extrato de *A. platensis* também induziu a síntese do fator leishmanicida, NO, o que fortalece a hipótese desse extrato ser um bom candidato terapêutico para a LV. A expressão dos genes dos fatores transcricionais específicos demonstrou um equilíbrio, não havendo diferenças estatísticas significativas, porém fortalecendo a hipótese que esse extrato estimula a modulação da resposta imunológica ao expressar o gene Tbx21, responsável por ativar a diferenciação dos linfócitos Th1.

Por sua vez, a *D. tertiolecta* é uma microalga halófila, já conhecida também pela comunidade científica. Poucos estudos relatam a atividade imunológica dessa espécie, havendo mais estudos relacionados com suplementação alimentar animal. Desses estudos escassos relacionados a resposta imune, a atividade imunológica dessa espécie foi observada *in vitro* em PBMC apenas de ovinos, o qual foi visto a capacidade de fitosteróis dessa espécie estimular uma resposta imunológica. Dentre esses fitoesteróis, o 7-dehidroporiferasterol e ergosterol induziram a produção da citocina IL-10 e redução de IL-6 e TNF, demonstrando um papel anti-inflamatório (CILIBERTI et al., 2017). Da mesma forma, no trabalho de Caroprese et al. (2012) foi observado aumento da síntese de IL-10, com redução de citocinas pro-inflamatórias, além

de identificar uma dose-dependente com a IL-10, o que também foi encontrado em nosso estudo, no entanto, em nossos resultados foi observado que com o aumento da concentração ocorre uma redução da IL-10.

Em nosso estudo o extrato de *D. tertiolecta* apresentou uma alta produção de TNF, superando o LSA, e baixa síntese de IL-10, menor que o LSA, principalmente nas maiores concentrações testadas. A divergência dos resultados apresentados nesse trabalho com os encontrados na literatura, pode ser devido a diferença das moléculas, uma vez que o extrato estudado no presente estudo foi de constituição proteica e nos trabalhos de Caroprese et al. (2012) e Ciliberti et al. (2017) foram provenientes de isolados de fitosteróis.

As citocinas produzidas pelo perfil Th1 estão diretamente relacionadas com a produção do fator leishmanicida, e esse perfil foi apresentado pelos extratos aqui estudados, os quais estimularam a síntese de IFN- $\gamma$  e TNF, além da produção do NO. Esses resultados também corroboram com os dados encontrados na análise da expressão gênica dos fatores transcricionais, que demonstrou o gene Tbx21 um pouco mais expresso que o GATA3 ou FOXP3, dependendo da concentração utilizada.

As correlações (positiva ou negativa) muito forte encontradas pelo estímulo com os extratos, tanto para as citocinas como os genes dos fatores transcricionais, são bastante interessantes. A correlação negativa muito forte, apesar de não significativa, encontrada entre TNF e IL-10 para o extrato de *D. tertiolecta*, é observada nos gráficos e corrobora com a hipótese de que a produção da IL-10 foi dose-dependente. Para a *A. platensis*, foi possível observar também correlações negativas muito fortes, porém não significativas, entre a correlação entre TNF e as citocinas do perfil Th2, pode sugerir um potencial imunomodulador. A correlação positiva muito forte, mas não significativa, entre as citocinas TNF e IL-4 vale também o destaque, uma vez que o aumento de uma citocina do perfil Th1 juntamente com citocinas anti-inflamatórias, podem combater o parasito, pois um equilíbrio entre os dois perfis (mas com predominância de Th1) é importante para alcançar o controle da doença (RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2016).

Em relação a correlação entre os genes estimulados pelo extrato de *A. platensis*, a correlação positiva significativa encontrada entre Tbx21 e RORc, fatores transcricionais responsáveis pela indução dos perfis Th1 e Th17, respectivamente, demonstra o potencial em estimular citocinas pró-inflamatórias, o que é importante para a resposta imune contra o parasito causador da LV.

E por fim, ao comparar os resultados dos extratos com os das drogas de referência, foi possível observar que a MTF possuiu uma seletividade de mais de 100 vezes para o parasito do

que para as células dos hospedeiros humanos e caninos, sendo o terápico com a maior seletividade dentre todos os estímulos. Por outro lado, o Sb<sup>V</sup> apresentou o menor valor de IS, sendo todos os candidatos terapêuticos mais seletivos para o parasito. Além disso, pode-se observar um estímulo imunológico de perfil de susceptibilidade, diferentemente dos extratos, que demonstraram a indução de um perfil protetor. Esses dados sugerem e demonstram a capacidade promissora dos extratos em se tornarem candidatos terapêuticos para a LV.

## 5. CONCLUSÕES

Diante de todo o exposto, é demonstrado que os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes apresentados neste trabalho, bem como outros produtos naturais, precisam ser mais investigados, pois possuem uma diversidade metabólica elevada, podendo ser fonte de diversos possíveis tratamentos. Os candidatos terapêuticos naturais aqui apresentados demonstraram atividade leishmanicida, além de estimular a resposta imunológica para um perfil Th1, através da produção de citocinas e óxido nítrico, e da indução de fatores transcricionais responsáveis pela diferenciação das células T.

Esses extratos continuarão sendo avaliados quanto ao potencial imunomodulador em cães, além de observar a resposta em células de paciente com LV. É necessário avaliar também se a combinação dos extratos com as drogas de referência pode aumentar a efetividade terapêutica dos pacientes. Deste modo, podendo ter uma noção mais ampla da capacidade desses extratos tanto nos hospedeiros humanos, como caninos.

## ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### Certificado de Aprovação

CERTIFICAMOS QUE O PROJETO INTITULADO “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE NOVOS COMPOSTOS FTALIMÍDICOS-TRIAZÓLICOS CANDIDATOS À TERAPIA CONTRA AS LEISHMANIOSES: UMA ABORDAGEM EM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA” protocolado sob nº 138/2018 pelo (a) pesquisador (a) **Milena de Paiva Cavalcanti** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 06 de fevereiro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais serão advindos das Unidades de Controle de Zoonoses dos municípios de Caruaru-PE e Camaragibe-PE. É responsabilidade da coordenadora do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. A coordenadora concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Canis lupus familiaris	30-40 (idades variadas/ambos sexos)
<b>Total</b>	<b>40</b>

Recife (PE, Brasil), 06 de fevereiro de 2019

  
M<sup>a</sup> Edileuza Felinto de Brito  
Vice Coordenadora CEUA/IAM

Maria Edileuza Felinto de Brito  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no  
Uso de Animais do IAM/Fiocruz-PE  
Mat. Sape: 0464741  
E-mail: britomef@cpqam.fiocruz.br

## ANEXO B – Parecer de Aprovação do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para as leishmanioses. Abordagens terapêuticas e em vacinologia.

**Pesquisador:** Milena de Paiva Cavalcanti

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 89972718.8.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.077.060

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda que visa modificar o título do projeto para a abrangência de análise de compostos naturais, inclusão dos novos compostos as objetivos e métodos, acrescentar membros à equipe. A participação humana não foi modificada, mantendo-se o n inicial, a abordagem, coleta e processamento das amostras.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Avaliar o potencial de novos antígenos e compostos naturais e/ou sintéticos como candidatos ao desenvolvimento de vacinas e terapias contra as leishmanioses.

Objetivos secundários:

- Caracterizar a população estudada (cães e humanos) quanto ao status clínico e à infecção por *Leishmania* spp.; determinar o tempo de cultivo e a concentração mais adequada para o estímulo in vitro de células mononucleares do sangue periférico de cães (LV) e de pacientes humanos (LV e/ou LT), com os novos antígenos e diferentes compostos naturais e sintéticos;
- Avaliar a expressão gênica de citocinas dos perfis Th1, Th2, Treg e Th17 em diferentes grupos de estudo (cães), após o estímulo com os antígenos recombinantes, e comparar com os resultados obtidos após o estímulo com o antígeno bruto solúvel de *L. (L.) infantum* (LiSA);

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

- Avaliar a expressão gênica de citocinas dos perfis Th1, Th2, Treg e Th17 em diferentes grupos de estudo (humanos) positivos para LT e/ou LV, após o estímulo com diferentes antígenos e compostos naturais e/ou sintéticos;
- Avaliar a produção das citocinas dos perfis Th1, Th2, Treg e Th17 no ambiente intracelular dos diferentes grupos em análise, após o estímulo com os antígenos recombinantes e compostos naturais e sintéticos; e avaliar a produção de NO a partir do sobrenadante das culturas dos diferentes grupos em análise, frente aos antígenos recombinantes e compostos naturais e sintéticos;
- Caracterizar, estatisticamente, o potencial dos antígenos e dos compostos naturais e sintéticos para a aplicação em estudos de imunoprevenção e/ou imunoterapia para cães (LV) e humanos (LV e/ou LT).

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

As coletas de sangue serão realizadas com uso de agulha e seringa estéreis e descartáveis e o paciente poderá sentir um desconforto no momento em que a agulha for introduzida na sua pele, este processo também poderá causar uma mancha roxa no local que, desaparecerá com o tempo de, aproximadamente, sete dias.

##### **Benefícios:**

A coleta de sangue dos pacientes irá propiciar o diagnóstico das leishmanioses por meio de um conjunto de critérios, desta forma poderemos fornecer ao paciente um laudo de pesquisa, com o diagnóstico que foi estabelecido no projeto. Se for de interesse do médico assistente, o paciente poderá ser acompanhado durante o seu tratamento, para acompanhamento da carga parasitária e monitoramento da terapia.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O protocolo de pesquisa foi modificado como recomendado nas pendências do parecer n. 3.952.105 para atender a eticidade para aprovação da emenda.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

#### **Recomendações:**

Entregas de relatórios parciais e final devem ser feitas via notificação. Os relatórios parciais devem ser apresentados, pelo menos, semestralmente. Qualquer alteração no protocolo no decorrer da

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

pesquisa, como também mudança de equipe, devem ser informados via emenda. Todas as ações deve ser realizadas via Plataforma Brasil.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

1. Relatório parcial

Conforme declaração de compromisso da pesquisadora entregue, é necessário que periodicamente, relatórios parciais sejam apresentados ao CEP pra acompanhamento da pesquisa. Porém, a pesquisadora ainda não enviou relatórios, considerando que o projeto deve estar no seu segundo ano de vigência (Itens II.16 e XI.d da Res. 466/2012 do CNS). A emenda apresentada só será ATENDIDA

2. Orçamento

a) O projeto apresenta considerável valor de orçamento e indica nas informações básicas, financiamento via PROEP. Essas informações devem estar descritas na folha de rosto, no campo PATROCINADOR, apresentando assinatura do responsável pelo órgão de fomento. Caso não seja viável, deve ser anexada a Plataforma Brasil (PB) documento que comprove o fomento. ATENDIDA.

b) Descrever detalhadamente nas informações básicas o orçamento, assim como está no projeto detalhado. ATENDIDA

3. Projeto detalhado:

Descrever no método do projeto a quantidade de participantes nos grupos como feito nas informações básicas do projeto na PB. ATENDIDA

4. Folha de rosto

Foi informado pela pesquisadora em carta explicativa ao CEP a alteração do título da pesquisa. O mesmo precisa ser alterado na folha de rosto. ATENDIDA

5. TCLE/TALE:

a) Conforme Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS, deve-se garantir que as folhas que não possuem assinaturas do TCLE/TALE, sejam rubricadas pelo pesquisador e participante/responsável. Assim, é necessário informar que o TCLE/TALE deve ser rubricado em todas as suas páginas e assinado nas duas vias, devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha.

ATENDIDA.

<b>Endereço:</b> Av. Prof. Moraes Rego, s/nº	
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária	<b>CEP:</b> 50.670-420
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE
<b>Telefone:</b> (81)2101-2639	<b>Fax:</b> (81)2101-2639
	<b>E-mail:</b> comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

b) A paginação do TCLE/TALE deverá apresentar o número da página seguido do número de páginas total que possui o documento. Exemplo “Página 1 de 10”.

ATENDIDA.

c) Acrescentar previsão de indenização por via legal caso o participante sofra danos pela pesquisa e de ressarcimento caso o participante venha a ter gastos oriundos da sua participação na pesquisa (Res. 466/2012 do CNS, item IV.3)

ATENDIDA.

d) Acrescentar no TCLE/TALE formas de minimizar o risco ao participante.

ATENDIDA.

f) Retirar do documento TA o texto: - Autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão do estudo e caso haja interesse da amostra ser utilizada em outra pesquisa autorizo que me contatem novamente. - Não autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão deste estudo. Tal opção é condizente apenas para amostras depositados em biobanco. No caso de biorrepositórios, os termos devem informar o armazenamento para pesquisas futuras e que a cada novo uso, deverá ser obtido novo consentimento (Res. 441/2011 do CNS).

ATENDIDA.

g) É necessário a confecção de TCLE/TALE destinados aos controles saudáveis.

ATENDIDA.

6. Formulário da Plataforma Brasil:

Atualizar o objetivo primário condizente com o projeto principal modificado.

ATENDIDA.

**CONCLUSÃO:** O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares. O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Vale ressaltar que, em relação ao protocolo de pesquisa, é previsto na Resolução 466/2012 no item XI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, que o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios

<b>Endereço:</b> Av. Prof. Moraes Rego, s/nº	
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária	<b>CEP:</b> 50.670-420
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE
<b>Telefone:</b> (81)2101-2639	<b>Fax:</b> (81)2101-2639
	<b>E-mail:</b> comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

parciais e finais (subitem: d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final). Pede-se que o pesquisador entregue os relatórios como previsto no texto da resolução. Informamos que a entrega dos relatórios parciais precisam ser feitas a cada semestre, conforme cronograma de execução da pesquisa, via Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1414824_E1.pdf	27/05/2020 10:06:28		Aceito
Outros	CartaRespostaaspendencias.pdf	27/05/2020 10:03:51	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
Declaração do Patrocinador	termosDeConcessao.pdf	27/05/2020 10:02:22	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoassinada.pdf	27/05/2020 10:01:41	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	13/05/2020 10:01:37	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacientemenor.pdf	13/05/2020 10:00:03	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacientemaior.pdf	13/05/2020 09:59:47	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcontrolemenor.pdf	13/05/2020 09:59:19	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcontrolemaior.pdf	13/05/2020 09:59:04	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALÉpaciente.pdf	13/05/2020 09:58:52	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALÉcontrole.pdf	13/05/2020 09:58:26	Milena de Paiva Cavalcanti	Aceito

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 08 de Junho de 2020

---

**Assinado por:**

**Maria Almerice Lopes da Silva**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br