



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



LETHÍCIA MARIA DE SOUZA AGUIAR

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA LECTINA DE FRONDE DE *Microgramma
vacciniifolia* (MvFL)**

Recife

2021

LETHÍCIA MARIA DE SOUZA AGUIAR

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA LECTINA DE FRONDE DE *Microgramma
vacciniifolia* (MvFL)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Dra. Leydianne Leite de Siqueira Patriota

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Aguiar, Lethícia Maria de Souza

Atividade leishmanicida da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) /
Lethícia Maria de Souza Aguiar– 2021.

72 f.: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Leydianne Leite de Siqueira Patriota

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Leishmaniose 2. Pteridófitas 3. Lectinas I. Napoleão, Thiago Henrique
(orient.) II. Patriota, Leydianne de Siqueira (coorient.) III. Título

616.9364

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-348

LETHÍCIA MARIA DE SOUZA AGUIAR

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA LECTINA DE FRONDE DE *Microgramma
vacciniifolia* (MvFL)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Mary Angêla Aranda de Souza Gomes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Marília Cavalcanti Coriolano (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, porque Ele é quem sempre me dá forças pra continuar firme e forte na minha caminhada, pra me levantar a cada dia e fazer minhas responsabilidades, enfrentando todas as dificuldades e me incentivando sempre a não desistir. Obrigada, por toda benção, iluminação e proteção!

Agradeço aos meus pais, Edivaldo e Gisleide. São eles também que sempre me incentivam a continuar e não desistir, sempre tentando me mostrar que por mais que existam dificuldades, é com elas que a gente aprende a ser melhor. Agradeço à minha irmã Manu, a pessoinha, minha vida, que me tira um sorriso do rosto quando eu menos espero. Agradeço à minha avó Carminha por toda reza, benção, amor e carinho que me dá sempre.

Agradeço às minhas amigas Catharina e Thaís por todo apoio de sempre, pelos conselhos, por todo amor e carinho.

Agradeço a minha amiga Juliane pelas dicas e por sempre tirar minhas dúvidas quando precisei.

Agradeço a Gleison, por todo carinho, por estar sempre disposto a me ajudar no que for preciso.

Agradeço aos meus amigos Dayane e Ricardo pelo apoio e incentivo de sempre, pela amizade que construímos e seguimos firme.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Thiago Napoleão que me aceitou mesmo na metade do meu Mestrado. Obrigada por se dispor a me orientar nesse projeto, pela confiança, apoio, ensinamentos, por sempre está disponível quando precisei.

Agradeço à minha coorientadora Dra. Leydianne Patriota por todo ensinamento, pelo apoio, por sempre se dispor a me ajudar, tanto na escrita quanto nos experimentos, por compartilhar seus conhecimentos comigo. Obrigada pela simpatia, generosidade, por aceitar e me ajudar a concluir meu Mestrado.

Agradeço a todos que fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (Bioprot) pelo acolhimento e apoio.

Agradeço aos colaboradores desse estudo, pela disponibilidade de realizar os experimentos desse projeto, ao Departamento de Bioquímica da UFPE e ao Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, ao Departamento de Morfofisiologia Veterinária e ao Departamento de Bioquímica e Farmacologia, todos da Universidade Federal

do Piauí, muito obrigada.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e concessão da minha bolsa de Mestrado.

RESUMO

Leishmaniose é uma doença negligenciada, considerada uma zoonose, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Os fármacos utilizados para seu tratamento são de uso limitado devido a fatores como toxicidade e alto custo, o que estimula a busca por novos medicamentos. As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e apresentam diversas atividades biológicas, incluindo antiparasitária. Este estudo avaliou a atividade anti-*Leishmania* da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) sobre amastigotas intramacrofágicas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*, bem como alterações nos níveis celulares de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoneais murinos infectados. Foram avaliadas também as atividades lisossomal e fagocítica de macrófagos não infectados tratados com MvFL e a atividade hemolítica sobre eritrócitos de camundongo e humanos (tipos A⁺, B⁺, AB⁺, e O⁺). Após 24 h, MvFL, nas concentrações testadas de 6,25-100 µg/mL, inibiu de forma dose-dependente, o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* com CI₅₀ (concentração necessária para inibir em 50%) de 88 µg/mL. MvFL também inibiu a sobrevivência da amastigotas dentro dos macrófagos, nas concentrações de 22,5-90 µg/mL com CI₅₀ de 52 µg/mL, incubados durante 48 h, reduzindo o número de amastigotas internalizadas por macrófago infectado em 68,9±0,53% na concentração de 90 µg/mL. Não houve indução da produção de NO em nenhuma das concentrações testadas. Macrófagos não infectados incubados durante 72 h com MvFL a 25 µg/mL apresentaram atividade lisossomal estimulada, enquanto não houve diferença na atividade fagocitária de macrófagos tratados ou não com a lectina. Por fim, MvFL não apresentou atividade hemolítica relevante sobre nenhum dos tipos de eritrócitos testados, apresentando CH₅₀ (concentração capaz de causar 50% de hemólise) > 200 µg/mL. Em conclusão, MvFL é um potencial agente leishmanicida para investigação em modelos *in vivo* contra leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose; *Leishmania amazonensis*; promastigotas; amastigotas; pteridófitas; atividade antiparasitária.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease, considered a zoonosis, caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania*. The drugs used for its treatment are of limited use due to factors such as toxicity and high cost, which encourages the seeking for new drugs. Lectins are carbohydrate-binding proteins and have several biological activities, including antiparasitic action. This study evaluated the anti-*Leishmania* activity of the *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL) on *Leishmania amazonensis* promastigotes and intramacrophagic amastigotes, as well as changes in cellular levels of nitric oxide (NO) in infected murine peritoneal macrophages. Lysosomal and phagocytic activities of uninfected macrophages treated with MvFL and hemolytic activity on mouse and human erythrocytes (types A+, B+, AB+, and O+) were also evaluated. After 24 h, MvFL, at the tested concentrations of 6.25-100 µg/mL, dose-dependently inhibited the growth of *L. amazonensis* promastigotes with an IC₅₀ (concentration needed to inhibit by 50%) of 88 µg/mL. MvFL also inhibited amastigote survival within macrophages, at concentrations of 22.5-90 µg/mL with an IC₅₀ of 52 µg/mL, incubated for 48 h, reducing the number of amastigotes internalized by infected macrophage in 68.9±0.53% at a concentration of 90 µg/mL. It did not induce NO production at any of the concentrations tested. Uninfected macrophages incubated for 72 h with MvFL at 25 µg/mL showed stimulated lysosomal activity, while there was no difference in the phagocytic activity of macrophages treated or not with the lectin. Finally, MvFL did not show relevant hemolytic activity on any erythrocyte types tested, with a HC₅₀ (concentration capable of causing 50% of hemolysis) > 200 µg/mL. In conclusion, MvFL is a potential leishmanicidal agent for investigation in in vivo models against leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*; promastigotes; amastigotes; pteridophytes; antiparasitic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1** - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. na leishmaniose humana..... 19
- Figura 2** - (A) Ilustração da forma promastigota de *L. amazonensis*; (B) Ilustração da forma amastigota de *L. amazonensis*. 18
- Figura 3** - (A) Lesão Cutânea Localizada - LCL; (B) Lesão Cutânea Difusa - LCD; (C) Lesão Mucocutânea - LMC..... 22
- Figura 4** - (A) Ensaio de atividade hemaglutinante; (B) Inibição de ensaio hemaglutinante..... 26
- Figura 5** - Fronde de *M. vacciniifolia*..... 30

ARTIGO

- Figura 1** - Efeito da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) na replicação de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Culturas de parasitas em fase logarítmica (1×10^6) foram incubadas a 26 °C durante 24 h com diferentes concentrações da lectina. As barras representam a inibição percentual média do crescimento (%) \pm desvio padrão (DP) para três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o grupo controle como 0% de inibição. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações da lectina..... 42
- Figura 2** - Eficácia da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) no percentual de macrófagos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e no número de amastigotas internalizadas em macrófagos (B). Os resultados representam a média \pm DP (***) $p < 0,001$ versus controle. Anf B: Anfotericina B..... 43

Figura 3 - Avaliação de alterações na atividade de macrófagos após incubação com MvFL. (A) Atividade lisossomal, determinada pela quantificação do aumento na captação de vermelho neutro. (B) Atividade fagocítica, determinada pela quantificação da incorporação de zimosan corado com vermelho neutro. Os macrófagos foram tratados por 72 h. Os resultados representam a média \pm DP. (***) $p < 0,001$ versus controle.....43

Figura 4 - Níveis de óxido nítrico produzidos por macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratados com MvFL durante 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Os resultados representam a média \pm desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) $p < 0,05$ versus controle.....44

Figura 5 - Efeito da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) na atividade hemolítica sobre eritrócitos de camundongo (A) e humanos do tipo A+ (B), B+ (C), AB+ (D) e O+ (E). Os resultados representam a média \pm desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o grupo controle como 0% de inibição; (*) $p < 0,05$ versus controle; (**) $p < 0,01$ versus controle; (***) $p < 0,001$ versus controle. O controle representa 1% de Triton X-100 em PBS.....45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Geral.....	14
2.2	Específicos.....	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1	LEISHMANIOSE.....	15
2.1.2.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	21
2.2	LECTINAS.....	23
2.2.1	Lectinas de plantas.....	25
2.2.2	Atividade antiparasitária de lectinas.....	27
2.3	<i>Microgramma vacciniifolia</i>	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1	Introdução.....	33
2	Metodologia.....	35
2.1	Purificação de MvFL.....	35
2.2	Atividade leishmanicida em promastigotas.....	36
2.3	Efeito sobre a infecção de macrófagos por amastigotas.....	36
2.4	Investigação da modulação da atividade de macrófagos.....	37
2.4.1	Atividade lisossomal.....	37
2.4.2	Atividade fagocitária.....	37
2.4.3	Produção de óxido nítrico (NO).....	38
2.5	Atividade hemolítica.....	38
2.6	Análise estatística.....	39
3	Resultados.....	39
4	Discussão.....	43

4 Conclusão.....	46
5 CONCLUSÕES.....	54
6 SÚMULA CURRICULAR.....	55
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, sendo um grande problema de saúde pública em países de clima tropical, como o Brasil, devido ao ambiente propício para o desenvolvimento do parasita causador e seus vetores (MORAIS et al., 2015; OPAS, 2020). A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae, que são transmitidos a mamíferos por insetos flebotomíneos (SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2015; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). No Brasil, os vetores de transmissão são insetos do gênero *Lutzomyia*, que são conhecidos popularmente como “mosquito palha” (FARIA; LUZ; BETIN, 2019). Existem dois tipos mais comuns de leishmaniose: leishmaniose cutânea (LC), também conhecida como leishmaniose tegumentar (LT), e a leishmaniose visceral (LV), que é a forma mais grave das leishmanioses em geral, conhecida também como Calazar (FRANÇA-COSTA et al., 2012; SILVA JUNIOR; BARROS; DAHER, 2014; VAN DER AUWERA & DUJARDINA, 2015).

Leishmania amazonensis é uma das espécies do gênero mais frequentes no Brasil, sendo responsável por causar dois subtipos de LC: leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BARROSO et al., 2018; CHRISTENSEN et al., 2019). A infecção causada por essa espécie altera mecanismos imunológicos a partir da interação com proteínas de membrana, podendo induzir uma resposta imune do tipo Th1, no caso do parasita ser morto pelo macrófago, ou resposta Th2, no caso do parasita se estabelecer dentro do macrófago (PODINOVSKAIA & DESCOTEAUX, 2015; MUXEL et al., 2018).

Espécies de *Leishmania* têm apresentado resistência a medicamentos desenvolvidos para seu combate, principalmente aos antimoniais pentavalentes (SILVA et al., 2016), como estibogluconato de sódio (SSG) e antimoniato de meglumina (MA) (CHOI et al., 2021). Por exemplo, Monte-Neto et al. (2011) mostraram que uma cepa de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1989/Ba199) é resistente ao medicamento antimonial. Assim, é importante a busca por novas drogas que sejam eficazes para tratar a leishmaniose, especialmente os produtos naturais, que apresentam diversas propriedades biológicas no tratamento de algumas doenças infecciosas, câncer, doenças cardiovasculares, entre outros (ATANASOV et al., 2021), sendo importante avaliar a toxicidade antes de aplicá-los no tratamento

(RAMOS et al., 2019).

As lectinas são proteínas que tem a capacidade de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados (NAPOLEÃO et al., 2019). Essas proteínas podem ser encontradas em microrganismos, animais e plantas (CHEUNG et al., 2015; LARGADA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020). Lectinas de plantas apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas atividade anti-parasitária, inclusive leishmanicida (COELHO et al., 2017). Uma lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*, denominada Concanavalina A (Con A), aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estimulou a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) por células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano que foram infectadas com as promastigotas de *L. amazonensis*, bem como aumentou a capacidade fagocítica e promoveu a eliminação do parasita (THOMAZELLI et al., 2018). Lectina do látex de *Synadenium carinatum* (ScLL) foi avaliada em cultura de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1 e TNF- α), reduzindo o crescimento de *L. amazonensis* (AFONSO-CARDOSO et al., 2011).

Microgramma vacciniifolia, conhecida popularmente por cipó-peludo, erva-silvina, erva-de-lagarto ou erva-terezinha (VILLELA et al., 2019; FERREIRA et al., 2020a), pertence à família Polypodiaceae e ao gênero *Microgramma* (TERCEIRO et al., 2012). A lectina isolada da fronde de *M. vacciniifolia* (MvFL) é uma glicoproteína de 54 kDa, termoestável e resistente a variações de pH. MvFL apresentou atividade imunomoduladora, estimulando a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e óxido nítrico (NO) por PBMCs humanas, além de estimular a ativação e diferenciação de células T CD8⁺ (PATRIOTA et al., 2017). MvFL também apresentou atividade antitumoral em camundongos portadores de sarcoma 180 (PATRIOTA et al., 2021). A presente dissertação investigou um possível potencial leishmanicida de MvFL frente a formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade leishmanicida da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) e mecanismos envolvidos na modulação da atividade de macrófagos.

2.2 Específicos

- Determinar o potencial leishmanicida de MvFL frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.
- Avaliar a atividade leishmanicida de MvFL sobre formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.
- Investigar se MvFL influencia a atividade lisossomal e atividade fagocitária de macrófagos peritoneais murinos não infectados.
- Avaliar os níveis de produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais murinos infectados por promastigotas de *L. amazonensis*, tratados com MvFL.
- Avaliar a atividade hemolítica de MvFL em eritrócitos de camundongo e humanos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 LEISHMANIOSE

Leishmaniose é uma doença causada por protozoários parasitas intracelulares do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae, que são transmitidos a mamíferos, por vetores, geralmente insetos fêmeas flebotomíneos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; SADLOVA et al., 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Os principais vetores de transmissão pertencem ao gênero *Phlebotomus*, característico do Velho Mundo (África, Ásia e Europa), e ao gênero *Lutzomyia*, mais comum no Novo Mundo (América) (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). Ambos pertencem a ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (MIKERY et al., 2019). No Brasil, os vetores de transmissão são insetos do gênero *Lutzomyia*, que são conhecidos popularmente como “mosquito palha” (FARIA; LUZ; BETIN, 2019), sendo as principais espécies: *Lutzomyia longipalpis*, *Lu. whitmani*, *Lu. wellcomei*, *Lu. intermedia*, *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca* (ROCHA; PETRONI, 2017).

Dentre os mamíferos (hospedeiros) propícios a serem infectados por *Leishmania* temos os roedores, cães, marsupiais, como também, os seres humanos (SILVA-ALMEIDA et al., 2012; STEVERDING, 2017). Com isso, a leishmaniose é considerada uma zoonose, doença infecciosa transmissível entre animais e humanos (SUNTER; GULL, 2017). Essa doença pode ser classificada em duas principais formas: Leishmaniose Cutânea (LC), também conhecida como Leishmaniose Tegumentar (LT), e Leishmaniose Visceral (LV) (OZBILGIN et al., 2017). A LC é uma das formas mais comum da Leishmaniose e pode ser classificada em mais três formas: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC), sendo essas duas últimas consideradas as formas mais graves (FRANÇA-COSTA et al., 2012; STEVERDING, 2017). A LV, conhecida também como Calazar ou Kal-azar, trata-se como a mais grave dentre todas as formas de leishmanioses (CAVALCANTE; VALE, 2014; VAN DER AUWERA; DUJARDINA, 2015; RODRIGUES et al., 2016).

Doenças negligenciadas causadas por parasitas são um grande problema de

saúde pública, geralmente ocorrendo em países de clima tropical, ambiente propício para o desenvolvimento de parasitas e seus vetores (MORAIS et al., 2015). A leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que afeta cerca de 98 países distribuídos em quatro continentes (África, América, Ásia e Europa) no mundo (STEVERDING, 2017). Dados registrados em 2019 pela OMS mostram que, em média, 90% dos novos casos decorrentes de LV e aproximadamente 87% dos novos casos de LC foram descritos em dez países, dentre eles o Brasil (OMS, 2020).

Os sintomas da leishmaniose dependem de alguns fatores como a espécie do vetor, do parasita infectante, o sistema imunológico do hospedeiro, o local que o inseto injetou o parasita e a quantidade inoculada (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Nesse sentido, cada forma de leishmaniose apresenta características que as definem e diferenciam umas das outras; a LCL, por exemplo, apresenta lesões e úlceras na pele, com lesões mais localizadas, enquanto que a LCD apresenta diversos nódulos que abrangem o corpo inteiro; já a LMC caracteriza-se pela disseminação da LC nas mucosas da região facial (nariz, boca e garganta) (STEVERDING, 2017). No caso da LV, as infecções atingem regiões mais profundas como os órgãos internos, o que geralmente causa aumento do fígado, do baço e redução dos componentes do sangue, causando anemia (SILVA JUNIOR; BARROS; DAHER, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Existem alguns medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose, porém, muitos deles não são considerados tão seguros devido a sua toxicidade não só ao parasita, mas também ao indivíduo. Antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (SSG) e antimoniato de meglumina (MA) (CHOI et al., 2021) são os mais utilizados, porém, também há anfotericina B, pentamidina, paromomicina, rifampicina, tamoxifeno, doxiciclina, monomicina, trimetiprim e nifurtimox, todos com seus respectivos teores de toxicidade (MENEZES; PETERSEN; VERAS, 2015). A resistência de *Leishmania* spp. para esses medicamentos é outro fator preocupante no tratamento da doença. Por exemplo, foi observado que uma cepa de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1989/Ba199) adquiriu resistência ao SbIII, forma trivalente do antiomonal pentavalente e biologicamente ativa (MONTE-NETO et al., 2011). Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) testadas frente a pentamidina (segundo medicamento mais utilizado no tratamento de leishmaniose) apresentaram resistência ao medicamento

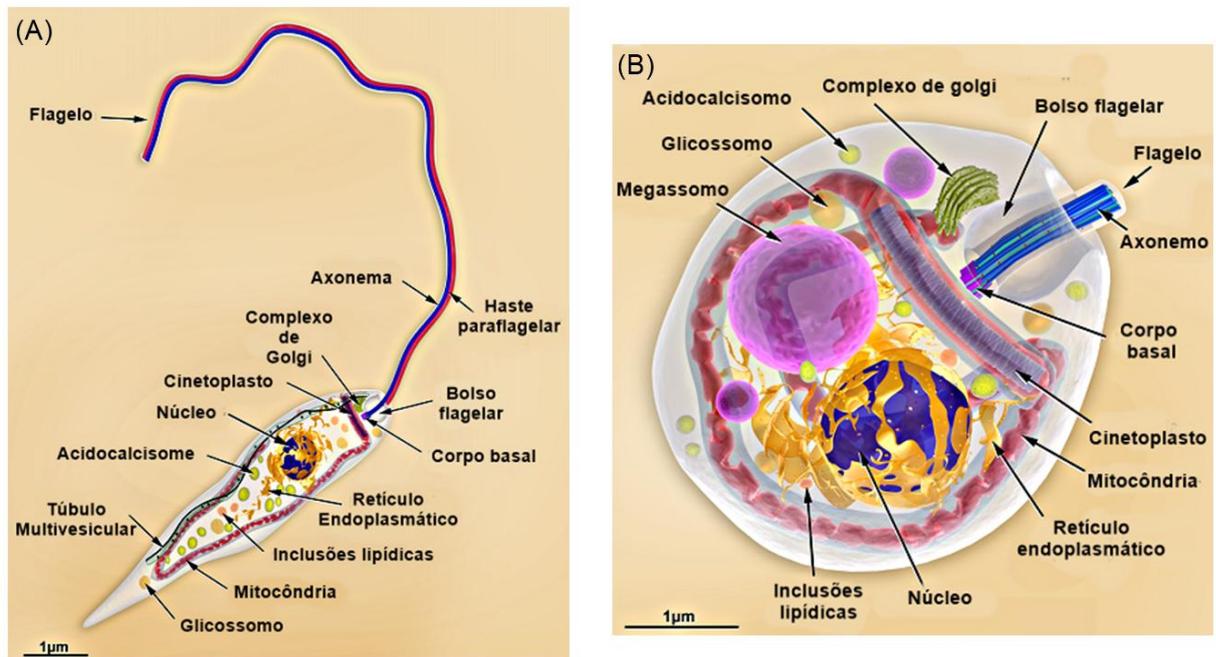
(COELHO et al., 2008). Com isso, desenvolvimento de novos medicamentos alternativos, principalmente de fontes naturais são importantes para um tratamento eficaz e seguro para combater a leishmaniose (SILVA et al., 2016).

2.1.1 Ciclo de vida do parasita e modulação do sistema imune

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam duas formas de vida chamadas amastigota (oval) e promastigota (flagelada) (Figura 1) (SUNTER; GULL, 2017). O ciclo dessa doença (Figura 2) envolve a infecção do vetor, *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, por *Leishmania* spp. (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). Ao realizar o repasto sanguíneo em mamíferos infectados com o parasita, o inseto ingere a forma amastigota, que vai se desenvolver no intestino médio do inseto e, a partir de intensas divisões mitóticas ou binárias, ele se transforma na forma móvel e flagelada ou promastigota. Essas promastigotas migram para a probóscide do inseto e, conseqüentemente, quando o inseto realiza um novo repasto sanguíneo em um mamífero, nesse caso, humano, o infecta, e são fagocitadas por células imunológicas do hospedeiro, como células dendríticas, neutrófilos, e especialmente macrófagos (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; RODRIGUES et al., 2016; BOITZ et al., 2017; BATES, 2018). Essas células imunológicas, por sua vez, podem matar o parasita ou acabarem se tornando o habitat dele, que passa da forma promastigota para a forma amastigota, assim como no intestino do inseto, se replicando por fissão binária ou mitose, provocando a lise celular, passando a infectar outras células do hospedeiro (BORGHI et al., 2016; BATES, 2018).

Silva e colaboradores (2013) relataram, a partir de uma experimentação com promastigotas do tipo selvagem de *L. amazonensis*, que o ciclo celular desse parasita ocorre em duas ordens temporais distintas, sendo elas: divisão do cinetoplasto antes da divisão do núcleo, deixando a célula com dois cinetoplastos e um núcleo; e divisão do cinetoplasto após a divisão do núcleo, deixando a célula com dois núcleos e 1 cinetoplasto.

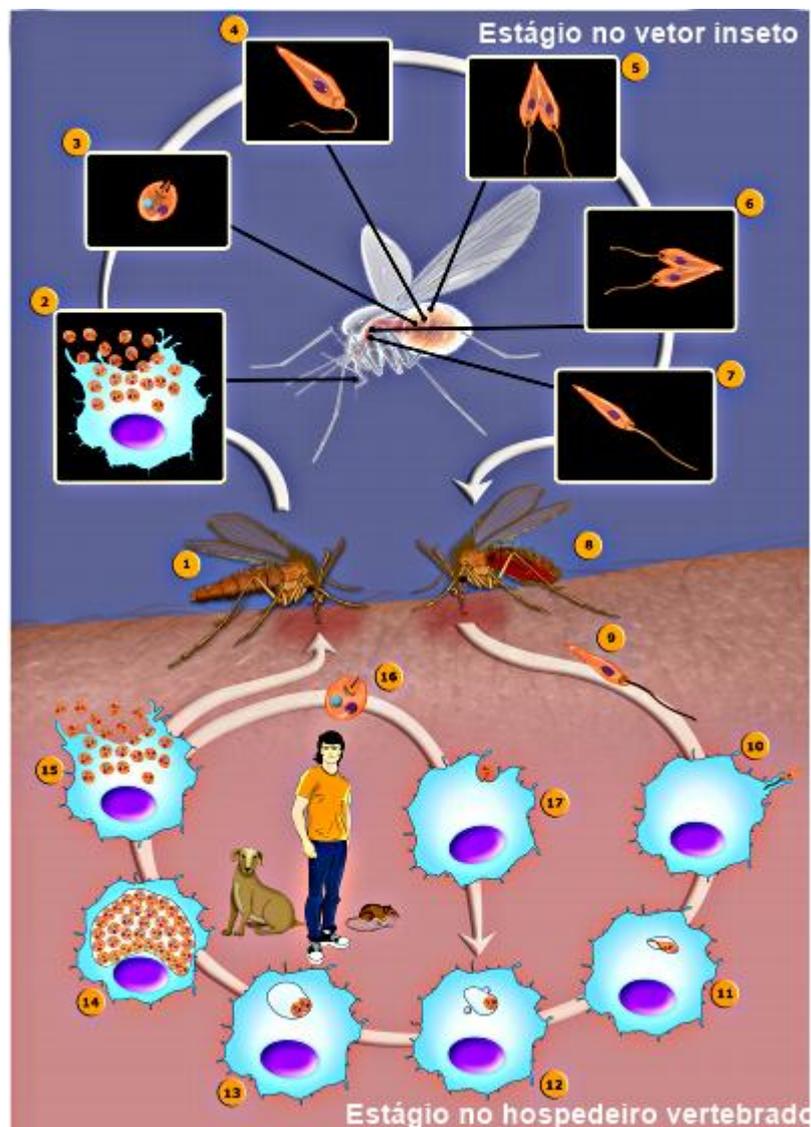
Figura 1. Ilustração das formas promastigota (A) e amastigota (B) de *L. amazonensis*.



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA et al. (2013)

Mecanismos imunológicos do hospedeiro são alterados pelos parasitas, que modulam vias de sinalização das células imunes do hospedeiro no local da infecção, alterando a liberação de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (FANTI et al., 2018). Essa modulação se dá a partir da interação com proteínas de membrana, lipofosfoglicano, proteofosfoglicano e glicoinositolfosfolipídios (SILVA-ALMEIDA et al., 2012). No caso do parasita ser fagocitado e morto pelo macrófago, ocorrerá a resposta imune pro-inflamatória (Th1), com produção de algumas citocinas como TNF- α e IFN- γ , promovendo a ativação da produção da enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2) pelos macrófagos, ativando a conversão de L-arginina em óxido nítrico (NO). Por outro lado, o parasita pode se estabelecer dentro do macrófago, evadindo e alterando mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro, com a indução da resposta Th2, ocorrendo a produção de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, que promovem a produção de outra enzima pelos macrófagos, a arginase 1, que por converte L-arginina em ornitina que produz a poliamina, que favorece e permite a vida e multiplicação do parasita (MUXEL et al., 2018).

Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. na leishmaniose humana. (1-2) Vetor pica o hospedeiro e ingere as formas amastigotas do parasita; (3) as amastigotas migram para o intestino médio do inseto; (4-6) as amastigotas se transformam em promastigotas a partir de divisão mitótica; (7) as promastigotas migram para a probóscide do inseto; (8) Vetor infectado pica o hospedeiro e infecta-o com as formas promastigotas; (9-10) promastigotas são fagocitados pelas células imunológicas do hospedeiro; (11-13) promastigotas se transformam por divisão mitótica nas formas amastigotas; (14) as amastigotas se proliferam dentro das células; (15) com a proliferação ocorre lise celular e as amastigotas ficam livre para infectar outras células do hospedeiro.



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA et al. (2013)

Assim, indivíduos com leishmaniose podem apresentar duas respostas imunológicas características, uma resposta Th1 com uma forte produção de células T ou uma resposta Th2 (resposta humoral), com produção de células B e níveis altos de produção de anticorpos. Tem sido observado que indivíduos que dispõem de uma resposta predominantemente Th2 não conseguem controlar a imensa quantidade de parasitas, e nesses casos, podem apresentar formas mais graves de leishmaniose, como a LCD (SCOTT; NOVAIS, 2016).

2.1.2. *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (ÁVILA et al., 2018). Cerca de 20 das 53 espécies de *Leishmania* conhecidas são causadoras de leishmaniose humana (OMS, 2020) e 10 dessas 20 são de grande relevância na saúde pública (COTTON, 2017).

O gênero *Leishmania* se subdivide em duas seções, a seção *Euleishmania* que compreende quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e complexo *L. enriettii*; e a seção *Paraleishmania* que não é tão uniforme quanto a anterior, e compõe-se de *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis*, *L. colombiensis* e do gênero *Endotrypanum* (AKHOUNDIA et al., 2017). O subgênero *Viannia* é característico do Novo Mundo, enquanto que o subgênero *Leishmania* tanto do Novo quanto do Velho Mundo. As espécies de ambos os subgêneros são responsáveis pelo desenvolvimento da LC, enquanto que a LV se caracteriza por infecções com espécies do subgênero *Leishmania* (COTTON, 2017). É importante salientar que as espécies de *Leishmania* se distinguem com relação a sua patogenicidade e suscetibilidade aos medicamentos (GEBHARDT et al., 2015).

Nas Américas, as principais espécies causadoras de leishmaniose humana são: *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* (REZENDE et al., 2017). No Brasil observa-se uma maior prevalência de espécies infectantes de LC, que são as: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenbergi*, *L. panamensis* e *L. amazonensis* (BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015), sendo as principais espécies a *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, e *L. braziliensis* que é considerada a de maior prevalência e distribuição no País; já para LV, a principal espécie é *Leishmania infantum* (BRITO; DIAS; SOUSA, 2019).

2.1.2.1 *Leishmania amazonensis*

Leishmania amazonensis é uma das espécies de protozoário tripanossomatídeo (SILVA et al., 2013) frequentes em grande parte da América do Sul, porém com maior prevalência no Brasil, especialmente na região Amazônica, sendo responsável por causar todas as formas de LC: LCD, LCL (Figura 3) (CARVALHO et al., 2015; BARROSO et al., 2018; CHRISTENSEN et al., 2019) e LMC (DA SILVA JR. et al., 2015; CAMPOS et al., 2018). Os vetores responsáveis por transmitir esse parasita ao mamífero são: *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca*, sendo o principal vetor, a *Lu. flaviscutellata* (BRASIL, 2007; ROCHA; PETRONI, 2017).

De acordo com o Ministério da Saúde, *L. amazonensis* ocasiona úlceras cutâneas localizadas que podem progredir para o estágio clássico de LCD. As lesões causadas por essa espécie apresentam bordas mais infiltradas, com um denso infiltrado dérmico de macrófagos parasitados, além disso, é relatado que esse parasita interfere negativamente na resposta imune das pessoas contaminadas. A LCD é mais abundante na infância, devido a imaturidade do sistema imunológico, levando a multiplicação do parasita, expansão da distribuição corporal e aumento das lesões (BRASIL, 2007).

A resposta imunológica nas infecções por *L. amazonensis* caracteriza-se por atingir o sistema imune inato, ocasionando imunossupressão da resposta pró-inflamatória dos macrófagos (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015), ou seja, diminuição da produção das moléculas como as citocinas IL-12, IL-17 e IL-6 (CRUPI et al., 2020). Por outro lado, já foi relatado na literatura que promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* podem ser mortas pelas conhecidas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs); dessa forma, os neutrófilos tem ação leishmanicida e podem auxiliar no combate a essa espécie juntamente com os macrófagos (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; SCOTT; NOVAIS, 2016).

Figura 3. Formas de leishmaniose causadas por *L. amazonensis*: (A) lesão cutânea localizada, LCL; (B) lesão cutânea difusa, LCD; (C) lesão mucocutânea, - LMC.



Fonte: Adaptado de BRASIL (2007)

Um grupo de pesquisadores realizou estudos com culturas de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e observou que existe uma autoprodução da enzima arginase por esses parasitas, que aumenta a expressão de microRNAs 294 e 721, diminuindo a produção de NOS2 e NO. Porém, com a ausência da arginase, ocorre a redução da expressão dos microRNAs 294 e 721 promovendo o aumento de NOS2 e de NO, conseqüentemente reduzindo a infecção por *L. amazonensis* (MUXEL et al., 2018).

Camundongos foram infectados por via intraperitoneal por promastigotas de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/1973/M2269) ou por vesículas extracelulares (EVs) liberadas pelo parasita e modularam a expressão de alguns receptores das células B-1 (população de células B inatas), mais especificamente, induzindo um aumento da expressão de arginase (que diminui a produção de NO e ROS) além de um aumento da expressão dos receptores TLR-2 e TLR-6. No caso, a expressão de TLR-9 foi maior nas células B-1 que foram estimuladas com EVs por 48 h, mostrando assim, que os parasitas e suas vesículas modulam de forma distinta as

células B-1 (REIS et al. 2020).

Recente estudo mostra que a paromomicina (antibiótico aminoglicosídeo) utilizado para o tratamento de leishmaniose visceral causada por *L. donovani*, conseguiu ser ativa frente a isolado clínico de *L. amazonensis* (leishmaniose cutânea) nas duas formas do parasita, *in vitro*, enquanto que reduziu o tamanho da lesão e da carga parasitária nos camundongos infectados *in vivo* (COSER et al. 2020).

Um dos modos de prevenção específico para locais de transmissão de *L. amazonensis* é a utilização da armadilha “Disney”, que consiste numa estrutura galvanizada, fechada com tela, em que, coloca-se um animal de pequeno porte em seu interior como isca para flebotomíneo; em sua cobertura se coloca um óleo vegetal, para que os insetos fiquem presos e posteriormente retirados; essa armadilha fica exposta por 12 h a partir do entardecer, durante 3 noites consecutivas (SANTOS, 2014b).

2.2 LECTINAS

As lectinas são proteínas que se ligam de forma reversível e específica a carboidratos simples (monossacarídeos, dissacarídeos), polissacarídeos ou glicoconjugados (glicoproteínas, glicolipídeos) (MARTÍNEZ-ALARCÓN; BLANCO-LABRA; GARCÍA-GASCA, 2018; NAPOLEÃO et al., 2019). Possuem no mínimo um domínio não catalítico que lhe permite essa interação com carboidratos (SINGH; KAUR; SINGH, 2015; VAN HOLLE; DAMME, 2015). Essas proteínas podem ser encontradas em microrganismos, animais e plantas (CHEUNG et al., 2015; LARGADA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

São classificadas quanto a ligação específica aos carboidratos em: lectinas ligadoras de glicose, galactose, manose, N-acetil-D-galactosamina, L-fucose, ácidos siálicos, entre outros (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017; MARTÍNEZ-ALARCÓN; BLANCO-LABRA; GARCÍA-GASCA, 2018). Ainda, podem ser classificadas com base nas características e quantidade de domínios de ligação aos carboidratos em: merolectinas (um domínio de ligação e não aglutinam células), hololectinas (no mínimo dois domínios de ligação), quimimerolectinas (proteínas híbridas com domínios para ligação a carboidrato e para outra atividade) e superlectinas (locais diferentes de ligação que reconhecem diferentes carboidratos) (HASHIM;

JAYAPALAN; LEE, 2017; BHUTIA et al., 2019).

Devido à capacidade de reconhecerem e se ligarem a glicoconjugados na superfície das células, essas proteínas podem interferir em diversas funções biológicas como, por exemplo, comunicação e sinalização celular, propriedade que tem sido explorada para fins biomédicos e biotecnológicos (COELHO et al., 2017). Muitos estudos já foram realizados demonstrando diversas atividades biológicas que as lectinas apresentam, tais como: atividade inseticida (CHEN et al., 2018), antibacteriana (JANDÚ et al., 2017), antifúngica (DA SILVA et al., 2019a), anti-inflamatória (FONTENELLE et al., 2018), antinociceptiva (CAMPOS et al., 2016), antioxidante (WU et al., 2016; SINGH; WALIA, 2019; FERREIRA et al., 2020a), antiparasitária (DE MEDEIROS et al., 2018), imunomoduladora (PATRIOTA et al., 2017; ZENG et al., 2019), antitumoral (PALHARINI et al., 2017; FERREIRA et al., 2020b), antiviral (MITCHELL; RAMESSAR; O'KEEFE, 2017; BILAL et al., 2019), entre outras.

As lectinas também vêm sendo utilizadas como ferramentas para biomarcação em tecidos cancerígenos com o objetivo de auxiliar no seu diagnóstico e prognóstico (JAYAWARDENA; WANG; YAN, 2013; HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017), ou ainda como ferramentas multifuncionais para marcar e identificar diferentes tipos de células como eritrócitos e células-tronco (GORAKSHAKAR; GHOSH, 2016). Estudos recentes mostram que as lectinas podem ser associadas Pontos Quânticos (*Quantum Dots*, QDs), que são nanopartículas fluorescentes. Oliveira e colaboradores (2020a) constataram a eficácia do conjugado de QDs-Cramoll (nanopartículas + lectina de sementes de *Cratylia mollis*) na marcação de glicoconjugados de glicose/manose presentes nas células fúngicas de espécies de *Candida*. Outro estudo relatou a conjugação de QDs com BmoLL (lectina de ligação a galactose extraída de folhas de *B. monandra*) mostrando sua eficácia para marcar galactose a partir de ensaios de hemaglutinação e detecção em grupo sanguíneo ABO (OLIVEIRA et al., 2020b).

Devido a essa propriedade de interagir com carboidratos em membranas celulares, uma propriedade das lectinas é a capacidade de aglutinar células, que tem sido explorada para detecção dessas proteínas partir de ensaios de aglutinação (SANTOS et al., 2014a). É importante ressaltar que lectinas que apresentem apenas um domínio de ligação a carboidratos não apresentam essa propriedade de aglutinação e portanto não podem ser detectadas dessa forma (MACEDO;

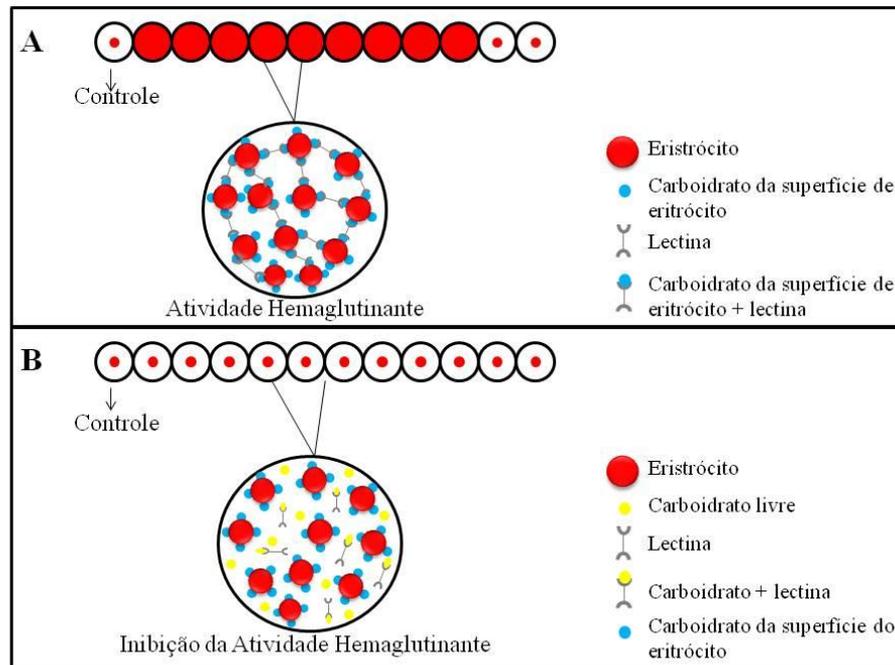
OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015).

O ensaio de atividade hemaglutinante para detecção de lectinas pode ser feito em microplacas de 96 poços. Uma suspensão de eritrócitos é colocada nos poços juntamente com diferentes diluições da amostra e a presença de lectinas pode ser visualizada a olho nu pela formação de uma rede de hemaglutinação; não ocorrendo essa interação, os eritrócitos se depositam no fundo dos poços (Figura 4A) (PROCÓPIO et al., 2017). Para confirmar se houve aglutinação devido a presença de lectinas e não de interferentes, deve ser realizado o ensaio de inibição de atividade hemaglutinante, em que, são adicionados carboidratos livres à solução, e dessa forma, as lectinas se ligam aos carboidratos livres diminuindo a ligação aos eritrócitos, e conseqüentemente sua aglutinação (Figura 4B). O ensaio de inibição pode ser usado também para avaliação a afinidade da lectina por diferentes carboidratos (SANTOS et al., 2014a; CECIONI; IMBERTY; VIDAL, 2015).

2.2.1 Lectinas de plantas

As plantas apresentam uma imensa quantidade de metabólitos primários e secundários encontrados em seus distintos órgãos (ZANGUEU et al., 2018). Dentre eles, uma imensidade de metabólitos bioativos importantes para sua nutrição, desenvolvimento e defesa (KESSLER; KALSKE, 2018; YANG et al., 2018; WANI et al., 2020). Os seres humanos têm explorado essas moléculas devido às suas diversas propriedades biológicas que podem ser empregadas com fins terapêuticos no tratamento de doenças (BORGES et al., 2017). Lectinas vêm sendo isoladas de plantas e apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas, todas as descritas no tópico anterior.

Figura 4. (A) Ensaio de atividade hemaglutinante; (B) Inibição de ensaio hemaglutinante.



Fonte: Elaborado pela autora

As lectinas podem ser encontradas e isoladas dos diferentes órgãos e tecidos das plantas, tais como sementes (ADAMUDE et al., 2020), folhas (PATRIOTA et al., 2017), rizoma (FERREIRA et al., 2020a), raízes (DA SILVA et al., 2019a) e frutos (SHIVAMADHU et al., 2017; DA SILVA et al., 2019b). Nas plantas, essas proteínas desempenham função protetora contra insetos, animais herbívoros, e microrganismos de caráter fitopatogênico como os fungos. Além disso, regulam as condições ambientais alteradas, modulam atividades enzimáticas e participam na regulação do crescimento de algumas plantas; ainda, fazem parte do estabelecimento da simbiose que ocorre entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio, dentre outras funções (MANNING et al, 2016; MISHRA et al., 2019). As lectinas de plantas podem ser produzidas constitutivamente ou em resposta ao estresse ambiental e ataque de patógenos (lectinas induzidas) (LANNON; VAN DAMME, 2010).

Lectinas de plantas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura molecular, evolução e quanto ao domínio de reconhecimento de carboidratos em 12

famílias, são elas: (1) amarantinas, (2) aglutinina de *Agaricus bisporus*, (3) aglutinina relacionada a quitinase classe V, (4) aglutinina de *Euonymus europeus*, (5) aglutinina de *Galanthus nivalis*, (6) aglutinina de *Nicotiana tabacum*, (7) cianovirinas, (8) lectinas de leguminosas, (9) jacalinas, (10) lectinas com motivo de lisina (LysM), (11) proteínas com domínio heveínico (motivo estrutural de reconhecimento da quitina) e (12) famílias da ricina-B (VAN HOLLE; DAMME, 2015; SHI et al., 2016; SHI et al., 2017).

2.2.2. Atividade antiparasitária de lectinas

As lectinas têm apresentado ação antiparasitária (IORDACHE et al., 2015). Um estudo avaliou a lectina isolada das sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) contra ovos e larvas de nematoides dos gêneros *Strongyloides*, *Oesophagostomum*, *Haemonchus*, e *Trichostrongylus* encontrados em fezes de cabras, apresentando atividade anti-helmíntica significativa com redução da eclosão dos ovos em 40,4%. Quanto ao desenvolvimento larval, WSMoL inibiu a passagem estágio L1 ao L3 com Cl_{50} de 78,22 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, foi observada a ausência desse efeito quando a lectina estava na presença de frutose, indicando o envolvimento do sítio de ligação a carboidratos (DE MEDEIROS et al., 2018).

Lectinas isoladas de sementes de *Parkia platycephala* (PPL) e sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foram avaliadas quanto a sua atividade antiparasitária frente ao nematoide *Haemonchus contortus*, mostrando ação anti-helmíntica por inibir o desenvolvimento das larvas dessa espécie (BATISTA et al., 2018; SILVA et al., 2019). *Meloidogyne incognita*, conhecido como nematoide de raiz, sofreu potente efeito tóxico de uma lectina de ligação à manose denominada RVL, isolada dos tubérculos da planta *Remusatia vivipara* (BHAT et al., 2010). Outro estudo avaliou o potencial da lectina purificada das sementes *Abelmoschus esculentus* (AEL), frente a *M. incognita* e *Meloidogyne javanica*, inibindo a eclosão de juvenis de segundo estágio dessas espécies (LACERDA et al., 2017).

Estudo realizados por MELO et al. (2011) relataram o potencial anti-helmíntico *in vivo* da lectina Cramoll 1,4, extraída de sementes de *Cratylia mollis*, em camundongos albinos fêmeas Swiss infectados pelo parasita *Schistosoma mansoni*, mostrando a redução de 79% a 89% da liberação dos ovos por esse parasita. Lectina isolada da raiz de *Urtica dioica* (UDA) foi testada em estudo *in vivo* em

camundongos fêmeas BALB/c infectados com o parasita *Trypanosoma brucei*, mostrando atividade tripanocida significativa para as formas sanguíneas de *T. brucei*, após exposição de cinco vezes na concentração de CI_{50} (1,125 μ M) (CASTILLO-ACOSTA et al., 2015). Cramoll 1,4 foi testada em cultura de células epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, promovendo a morte por necrose. Ainda, Cramoll 1,4 inibiu a aglutinação e proliferação celular, além de permeabilizar as membranas plasmáticas das epimastigotas para o influxo de Ca^{2+} e estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondriais, diminuindo o potencial da membrana mitocondrial e prejudicando a produção de ATP (FERNANDES et al., 2010).

Lectinas também são utilizadas em associação com antígenos de parasitas com o intuito de promover imunização dos indivíduos infectados (JANDÚ et al., 2017). Sabe-se que as lectinas isoladas do latex de *Synadenium carinatum* (ScLL) e das sementes de *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) são imunoestimuladoras, capazes de induzir respostas imunes eficientes contra parasitas. Elas foram avaliadas no tratamento de infecções causadas pelo protozoário *Toxoplasma gondii* em sua fase aguda em culturas de macrófagos de medula óssea, e ScLL mostrou ter capacidade de induzir citocinas pro-inflamatórias, enquanto que ArtinM induziu a produção de citocinas anti-inflamatórias, além de estimularem a produção de óxido nítrico. Na avaliação com camundongos C57BL/6 infectados com a cepa de *T. gondii*, houve redução da carga parasitária nos camundongos tratados com as lectinas, semelhante ao controle positivo, a sulfadiazina (SOUZA et al., 2016).

2.2.2.1 Atividade leishmanicida de lectinas de plantas

Poucos estudos sobre a ação de lectinas de plantas contra espécies de *Leishmania* são encontrados na literatura. Foi avaliada uma associação de nanopartículas de óxido de magnésio revestidas ou não com a lectina do amendoim (*Arachis hypogaea*) (PNA) em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. major*, e foi observado que as nanopartículas revestidas com PNA desempenham uma maior atividade antileishmania e ativação de macrófagos quando comparadas com as nanopartículas não revestidas (JEBALI et al., 2014).

Uma lectina ligadora de D-manose purificada das sementes de jaca

(*Artocarpus heterophyllus*) (ArtinM) apresentou propriedades imunomoduladoras, estabelecendo uma resposta do tipo Th1, a partir da ligação com N-glicanos das células imunológicas. Essa lectina foi testada em culturas de neutrófilos isolados de sangue humano infectados com *Leishmania major*. ArtinM induziu a depuração do parasita juntamente com a produção de citocinas TNF e IL-1 β , aumento da produção de EROs e desgranulação celular, como também impossibilitou a formação das Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (NETs), diminuindo a vida útil dos neutrófilos e favorecendo a integridade do tecido (RICCI-AZEVEDO, et al., 2016).

Também foram avaliados o papel imunoestimulador na vacinação em camundongos infectados com *L. amazonensis* de lectinas extraídas de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Pisum arvense* (PAA) e *Artocarpus integrifolia* (KM+). Melhores resultados foram obtidos com KM+ associada com o antígeno SLA do parasita, diminuindo a carga parasitária nos camundongos infectados, aumentando a expressão de MHC II, além de diminuir o tamanho da lesão, mesmo quando testada sem a associação com o antígeno (TEIXEIRA et al., 2006). Lectina do látex de *Synadenium carinatum* (ScLL), avaliada em cultura de macrófagos preitoneais inflamatórios de camundongos BALB/c infectados com promastigotas de *L. amazonensis*, induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1 e TNF- α) e reduziu o crescimento de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (AFONSO-CARDOSO et al., 2011). Ainda, avaliação de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com Con A demonstrou aumento de citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), e da síntese de EROs, além de aumentar a capacidade fagocítica das células imunológicas, favorecendo a eliminação do parasita (THOMAZELLI et al., 2018).

2.3 *Microgramma vacciniifolia*

Polypodiaceae é uma das maiores famílias de pteridófitas de distribuição pantropical, desde locais úmidos a secos, com maior diversidade nos Andes e Sudeste do Brasil, apresentando cerca de 56 gêneros e 1.200 espécies, classificadas em epífitas, terrícolas ou rupícolas (TERCEIRO et al., 2012; VILLELA et al., 2019). Dentro dessa família, o gênero *Microgramma* compreende

aproximadamente 30 espécies, incluindo *Microgramma vacciniifolia*, uma espécie considerada epífita reptante, também chamada hemicriptófita reptante, que pode ser encontrada em cascas de árvores (corticícola), em muros, ou afloramentos rochosos (rupícola) (PERES et al., 2009; VILLELA et al., 2019). Essa espécie apresenta uma distribuição neotropical, basicamente nas Antilhas, Venezuela, Colômbia, Paraguai, Argentina, alguns lugares da América do Norte e no Brasil (TERCEIRO et al., 2012).

M. vacciniifolia é conhecida popularmente por cipó-peludo, cipó-cabeludo, erva-silvina, erva-silveira, erva-de-largarto, erva-tereza e apresenta uma morfologia de caule longo revestido por escamas e frondes (folhas) dimorfas, sendo as estéreis ovais e as férteis lanceoladas (Figura 5). Essa espécie apresenta alguns relatos de uso medicinal para tratar hemorragias, expectorações, disenterias, infecções intestinais, cólicas intestinais, sendo utilizadas também como adstringentes e para hidropsia (PERES et al., 2009; VILLELA et al., 2019; FERREIRA et al., 2020a). Algumas moléculas bioativas já foram identificadas e isoladas das frondes de *M. vacciniifolia*, dentre elas, pode-se destacar os esteroides β -sitosterol e hopan-22-ol, 6-metoxiapinenina-7-O- β -D-allopiranosídeo e uma mistura de ésteres graxos (PERES et al., 2009).

Figura 5. Fronde de *Microgramma vacciniifolia*.



Fonte: <https://www.fernssoftheworld.com/2015/07/21/microgramma-vacciniifolia/>

Foram isoladas duas lectinas da *M. vacciniifolia*. A lectina isolada do rizoma (MvRL) apresenta uma massa molecular de 17 kDa e mostra atividade hemaglutinante estimulada por íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e com maior afinidade para eritrócitos humanos do tipo O (SANTANA et al., 2012). A MvRL apresenta citotoxicidade frente a uma linhagem tumoral de pulmão (NCI-H292) e promove efeitos deletérios em embriões de *Biomphalaria glabrata* (ALBUQUERQUE et al., 2014a). MvRL também apresenta potencial termiticida sobre cupins da espécie *Nasutitermes corniger*, possivelmente devido a suas propriedades de ligação à quitina e ação modulatória sobre enzimas digestivas (ALBUQUERQUE et al., 2012), e também atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (ALBUQUERQUE et al., 2014b). MvRL possui atividade antinutricional agindo de forma negativa no ganho de biomassa e eficiência na conversão dos alimentos ingeridos pelo inseto *Sitophilus zeamais*, sendo a lectina capaz de inibir a atividade das enzimas β -glicosidase e α -amilase *in vitro* (ALBUQUERQUE et al., 2020). Além disso, MvRL apresenta atividades antinociceptiva e antiinflamatória, uma vez que, diminuiu as contorções induzidas por ácido acético e promoveu efeitos analgésicos no teste de formalina em camundongos, como também causou diminuição do edema de pata, redução dos níveis de TNF- α e aumento dos níveis de IL-10 (citocinas pro e anti-inflamatória, respectivamente) (SILVA et al., 2021).

A lectina de fronde de *M. vacciniifolia* (MvFL) apresenta ponto isoelétrico (PI) de 4,51 e massa molecular de 54 kDa, apresentando uma maior atividade hemaglutinante em pH ácido (4,0–5,0) e suportando aquecimento a temperatura de até 100 °C (PATRIOTA et al., 2017). MvFL apresentou atividade imunomoduladora, promovendo a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e óxido nítrico (NO), além de ativação e diferenciação de células T CD8+ em PBMCs humanas (PATRIOTA et al., 2017). Ainda, MvFL possui atividade antitumoral em camundongos portadores de sarcoma 180, tendo reduzido o peso do tumor em cerca de 89,2 a 96,8%, sendo observada a presença de pontos necróticos e infiltrados leucocitários (PATRIOTA et al., 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo.

4.1 ARTIGO 1

Atividade leishmanicida da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) sobre *Leishmania amazonensis*

Lethícia Maria de Souza Aguiar^a, Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Enoque Pereira Costa Sobrinho Júnior^b, Michel Muálem de Moraes Alves^{b,c}, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Fernando Aécio de Amorim Carvalho^{b,d}, Lidiane Pereira de Albuquerque^d, Thiago Henrique Napoleão^{a*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^b*Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.*

^c*Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.*

^d*Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.*

*Autor correspondente. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail: thiago.napoleao@ufpe.br

Resumo

A leishmaniose é uma antropozoonose grave causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento é bastante limitado por fatores como efeitos adversos, toxicidade e alto custo, o que estimula a importância da descoberta de novos medicamentos. As lectinas são proteínas que se ligam de forma reversível e específica a carboidratos simples polissacarídeos ou glicoconjugados. Essa interação das lectinas com carboidratos de superfícies celulares desencadeia diversas atividades biológicas, dentre elas a antiparasitária.

Este estudo investigou a atividade leishmanicida da lectina de fronde de *Microgramma vaciniifolia* (MvFL) sobre promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Adicionalmente, foi investigada a capacidade dessa lectina (6,25–100 µg/mL) em modular atividades lisossomal e fagocítica e a liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais murinos não infectados. Como avaliação de segurança, a capacidade hemolítica de MvFL (6,25–200 µg/mL) sobre eritrócitos de camundongo e humanos foi determinada. Após 24 h, MvFL inibiu a replicação de promastigotas de *L. amazonensis* com concentração inibitória média (CI₅₀) de 88 µg/mL. MvFL também reduziu a infecção de macrófagos por amastigotas com CI₅₀ de 52 µg/mL. Além disso, o número de amastigotas internalizadas por macrófago peritoneais murinos infectados foi reduzido em 48 h até 68,9% na presença de MvFL. Na concentração de 25 µg/mL, MvFL estimulou em 72 h a atividade lisossomal dos macrófagos, porém não alterou a atividade fagocitária e não induziu a produção de NO em nenhuma das concentrações testadas. MvFL não apresentou atividade hemolítica. Em conclusão, MvFL é um potencial agente leishmanicida para investigações em modelos *in vivo* contra leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose; macrófagos infectados; atividade lisossomal; promastigotas; amastigotas.

1 Introdução

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (OPAS, 2020), não contagiosa, causada por mais de 20 diferentes espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae) (SADLOVA et al., 2017). É transmitida aos mamíferos através da picada de fêmeas de mosquitos flebotomíneos (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018), especialmente dos gêneros *Phlebotomus* e/ou *Lutzomyia* (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). A leishmaniose afeta cerca de 98 países distribuídos em quatro continentes (África, América, Ásia e Europa), sendo assim, um grave problema de saúde pública (STEVERDING, 2017; OMS, 2020). Embora a maioria das leishmanioses sejam doenças zoonóticas, os humanos também podem ser infectados quando expostos ao ciclo natural de transmissão do parasita (DIAS et al., 2020).

A Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Cutânea (LC) ou Tegumentar

(LT) são as principais formas clínicas da doença (OZBILGIN et al., 2017). *Leishmania amazonensis* é frequente em grande parte da América do Sul, com maior prevalência no Brasil, onde é responsável por causar todas as formas de LC (BARROSO et al., 2018; CHRISTENSEN et al., 2019). Os principais fármacos utilizados para o tratamento de leishmaniose são antimoniais pentavalentes, paromomicina, pentamidina, miltefosina e anfotericina B (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2016). No Brasil, dentre os mais utilizados estão a anfotericina B e a pentamidina (BEZERRA et al., 2020). Porém, alguns desses fármacos mostram eficácia limitada, fortes efeitos colaterais, toxicidade e custo elevado. Ainda, foi observado que cepas de *L. amazonensis* adquiriram resistência aos antimoniais (MONTE-NETO et al., 2011) e à pentamidina (COELHO et al., 2008).

Devido aos obstáculos das atuais estratégias terapêuticas para a leishmaniose, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incentiva a busca de novos medicamentos, incluindo o uso de produtos naturais (OMS, 2020). É provável que a próxima geração de antiparasitários para o tratamento de doenças tropicais sejam obtidos de plantas (FREITAS, 2020). Nesse contexto, estudos estão sendo desenvolvidos com base em moléculas ativas de plantas ou análogos estruturalmente semelhantes com atividade leishmanicida (DIAS et al., 2020).

Lectinas são proteínas que se ligam de forma reversível e específica a carboidratos (NAPOLEÃO et al., 2019). Lectinas de plantas tem apresentado diversas atividades biológicas (COELHO et al., 2017), dentre elas, imunomoduladora (CORIOLANO et al., 2018) e antiparasitária (DE MEDEIROS et al., 2018), com potencial anti-*Leishmania in vitro* e *in vivo* (RICCI-AZEVEDO, et al., 2016; THOMAZELLI et al., 2018), por vezes associado a indução de resposta imune pró-inflamatória (AFONSO-CARDOSO et al., 2011; THOMAZELLI et al., 2018). *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae) é uma planta usada para tratar problemas renais, reumatismo, tosse, hemorragias, diarreia e vômito (NUNES et al., 2020). Duas lectinas já foram identificadas e isoladas dessa planta, uma do rizoma (MvRL) (SANTANA et al., 2012) e a outra da fronde (MvFL) (PATRIOTA et al., 2017). MvRL possui atividades antifúngica, citotóxica, inseticida e moluscicida (ALBUQUERQUE et al., 2012, 2014a, 2014b, 2020; FERREIRA et al., 2020). MvFL apresentou atividade imunomoduladora em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs), promovendo resposta pró-inflamatória (TNF- α , IFN- γ , IL-6), produção de óxido nítrico e ativação e diferenciação de células T CD8+

(PATRIOTA et al., 2017). Ainda, MvFL apresentou atividade antitumoral *in vivo* em camundongos portadores de sarcoma 180 (PATRIOTA et al., 2021).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial leishmanicida de MvFL frente ao crescimento de formas promastigotas e sobrevivência de macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Também foi investigado se MvFL é capaz de modular as atividades lisossomal, fagocítica e produtora de NO de macrófagos. Por fim, foi avaliada a atividade hemolítica de MvFL em eritrócitos de camundongos e humanos.

2. Metodologia

2.1 Purificação de MvFL

MvFL foi isolada de acordo com PATRIOTA et al. (2017). Resumidamente, as frondes de *M. vacciniifolia* foram coletadas, sob autorização (36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O acesso foi registrado (A9D147B) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). A identificação taxonômica foi confirmada no herbário Dárdano de Andrade Lima (Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife), onde foi depositado um espécime (número 63.291). As frondes foram lavadas em água corrente e postas para secar por 7 dias a 28 °C. Posteriormente, as frondes foram trituradas e seu pó foi homogenizado (10%, p/v) em solução de NaCl 0,15 M por 16 h a 25 °C. Em seguida, o extrato foi filtrado, centrifugado (9000 g; 15 min) e aplicado em cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-75 (GE Healthcare Life Sciences, Suécia) equilibrada com água destilada. As frações correspondendo ao primeiro pico de absorbância a 280 nm foram coletadas e o *pool* foi liofilizado, ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e aplicado em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada com o tampão Tris. MvFL foi eluída com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo NaCl 1,0 M, dialisada com água destilada durante 4 h e liofilizada.

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), utilizando curva-padrão de albumina sérica bovina (31,25–500 µg/mL). A capacidade de ligação a carboidratos foi identificada pelo ensaio de atividade hemaglutinante (PATRIOTA et al. 2017) usando eritrócitos de coelho

tratados com glutaraldeído (BING et al. 1967), obtidos conforme autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE (processo 23076.033782/2015-70). A atividade hemaglutinante (AH) foi quantificada como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu aglutinação total. AH específica foi definida como a razão entre a AH e a concentração de proteína (mg/mL).

2.2 Atividade leishmanicida em promastigotas

Foi utilizada a cepa *Leishmania (Leishmania) amazonensis* IFLA/BR/67/PH8 em todos os ensaios. Os parasitas foram cultivados em meio de Schneider, suplementado com 10% FBS, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 26 °C, em estufa incubadora com 5% de CO₂ (CARNEIRO et al., 2012; VALADARES et al., 2011).

MvFL foi adicionada em placa de 96 poços em diluições seriadas de 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL, contendo meio de Schneider suplementado. Em seguida, promastigotas na fase de crescimento logarítmico foram semeadas (1×10^6 por poço em 100 µL de meio) na placa de cultura de 96 poços contendo o meio e a lectina. A placa foi mantida a 26 °C na incubadora DBO e as promastigotas foram observadas e contadas após 24 h em microscópio com aumento de 400x usando hemocitômetro de Neubauer. No controle negativo utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% no meio Schneider suplementado com 100% de viabilidade.

2.3 Efeito sobre a infecção de macrófagos por amastigotas

Foram utilizados macrófagos coletados de camundongos BALB/c machos e fêmeas (25–30 g, 4–5 semanas de idade). Os animais foram acondicionados a uma temperatura de 23 ± 2 °C e 12 h em ciclo claro/escuro com acesso a água e ração (Presence Nutrição Animal, Paulínia, São Paulo, Brasil). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animal da UFPE, processo 0037/2020.

Os macrófagos peritoneais de camundongos foram semeados (2×10^5 células/poço) em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro por poço e meio RPMI (suplementado com 10% SFB, 100 U/mL de

penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 37 °C em 5% de CO₂ por 3 h para permitir a adesão celular. Logo em seguida, os macrófagos foram incubados com promastigotas em fase estacionária de crescimento na proporção de 10 promastigotas para 1 macrófago durante 4 h a 37 °C em 5% de CO₂. O sobrenadante foi aspirado para a remoção de parasitas não internalizados. Os macrófagos infectados foram então tratados com MvFL nas concentrações de 22,5, 45,0 e 90,0 µg/mL ou com anfotericina B a 0,2 µM e incubados durante 48 h. O controle utilizado foi DMSO 0,5% em meio RPMI suplementado. A placa foi incubada por 48 h e, após isso, as lamínulas foram removidas e coradas pelo método panóptico (Laborclin, Paraná, Brasil). O número de macrófagos infectados (%) e o índice de sobrevivência (n) (número de amastigotas recuperados por macrófago) foram determinados e os valores foram utilizados para determinar os valores da concentração inibitória média (CI₅₀) (MEDEIROS et al., 2011).

2.4 Investigação da modulação da atividade de macrófagos

2.4.1 Atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram colocados em placas de cultura de 96 poços a uma concentração de 2×10^5 de células e incubados com MvFL (6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL). Após 72 h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foram adicionados 10 µL de solução de vermelho neutro e os macrófagos foram incubados por mais 30 min. Depois, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com NaCl 0,15 M a 37 °C e 100 µL de solução de extração (ácido acético glacial 1%, v/v, e etanol 50%, v/v, dissolvido em água destilada) foi adicionada para solubilizar o vermelho neutro dentro das vesículas de secreção lisossômica. Após 30 min em um agitador Kline (modelo AK 0506), a densidade óptica foi determinada a 540 nm usando um leitor de microplacas. No controle, as células foram tratadas com DMSO 0,5% em meio RPMI suplementado (GRANDO et al., 2009).

2.4.2 Atividade fagocitária

Macrófagos peritoneais foram colocados em placas de cultura de 96 poços em uma concentração de 2×10^5 células e incubadas com MvFL (6,25, 12,5, 25, 50

e 100 µg/mL). Após 72 h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, 10 µL da solução de coloração de zimosan foram adicionados e incubados por 30 min a 37 °C. Depois disso, 100 µL de fixador de Baker (formaldeído a 4%, v/v, cloreto de sódio a 2%, p/v, e acetato de cálcio 1%, p/v, em água destilada) foram adicionados para interromper o processo de fagocitose. Após 30 min, a placa foi lavada com NaCl 0,15 M para remover o zimosan que não foi fagocitado pelos macrófagos. O sobrenadante foi removido e 100 µL da solução de extração foram adicionados e, após a solubilização em um agitador, a densidade óptica foi determinada a 540 nm usando um leitor de microplacas. No controle, as células foram tratadas com DMSO 0,5% em meio RPMI suplementado (GRANDO et al., 2009).

2.4.3 Produção de óxido nítrico (NO)

Macrófagos peritoneais foram adicionados a placas de cultura de 96 poços em concentração de 2×10^5 e incubados a 37 °C em 5% de CO₂ por 4 h para permitir a adesão celular. Um novo meio contendo promastigotas (na fase estacionária) na proporção de 10 promastigotas para 1 macrófago foi adicionado em 50% dos poços contendo os macrófagos. MvFL foi diluída em meio de cultura e adicionada em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg mL) nos poços com ausência ou presença de *L. amazonensis* e foi incubada novamente a 37 °C em 5% de CO₂ durante 24 h. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi coletado e transferido para outra placa para medição dos níveis de nitrito. Uma curva padrão foi preparada com nitrito de sódio diluído em meio de cultura em concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µM. Alíquotas de 100 µL das amostras foram adicionadas aos poços e posteriormente 100 µL de reagente de Griess foram adicionados nas amostras e nas soluções preparadas para a curva padrão. A análise foi realizada usando um leitor de microplacas a 540 nm. No controle negativo, as células foram tratadas com DMSO 0,5% (AMORIM et al., 2012).

2.5 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica de MvFL foi avaliada usando eritrócitos de camundongos e humanos de acordo com Pita et al. (2012), com algumas

modificações. Fêmeas Swiss (25–30 g, 6–8 semanas de idade) foram anestesiadas com uma mistura de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidas à coleta de sangue braquial, o qual foi imediatamente misturado com o anticoagulante ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA). Para obtenção de sangue humano, foram coletados cerca de 4 mL de sangue venoso periférico em tubo contendo EDTA de doadores voluntários com tipo sanguíneo A+, B+, AB+ e O+ que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animal da UFPE (processo 0037/2020) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da UFPE (processo 33550320.1.0000.5208).

Para obter uma suspensão de eritrócitos, um volume de 2 mL do sangue total foi completado para 10 mL em PBS pH 7,4, seguido de centrifugação a 3.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi então removido por aspiração suave e a centrifugação foi repetida mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em PBS para produzir uma suspensão a 1% para o ensaio de hemólise. MvFL foi solubilizada em PBS (1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL) e foi adicionado 1 mL da suspensão de eritrócitos. Os tubos foram homogeneizados em um equipamento homogenizador de sangue por 60 min e depois centrifugados a 3.000 rpm por 5 min. A absorbância dos sobrenadantes foi determinada a 540 nm usando um espectrofotômetro para medir a extensão da lise dos glóbulos vermelhos. No controle positivo (100% de hemólise) e no controle negativo (0% de hemólise) foram utilizados Triton X-100 a 1% (v/v) em PBS e somente PBS, respectivamente.

2.6 Análise estatística

Em todos os casos, três experimentos independentes foram realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada usando o Software GraphPad Prism versão 5 para Windows. As diferenças significativas entre os grupos de tratamento foram analisadas usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Os valores de CI_{50} foram calculados usando análise de probitos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 Resultados

A lectina MvFL inibiu significativamente ($p < 0,05$) o crescimento da cultura das promastigotas de *L. amazonensis* de forma dose-dependente (Figura 1), apresentando uma CI_{50} de 88 $\mu\text{g/mL}$ (1,63 μM) após 24 h de incubação.

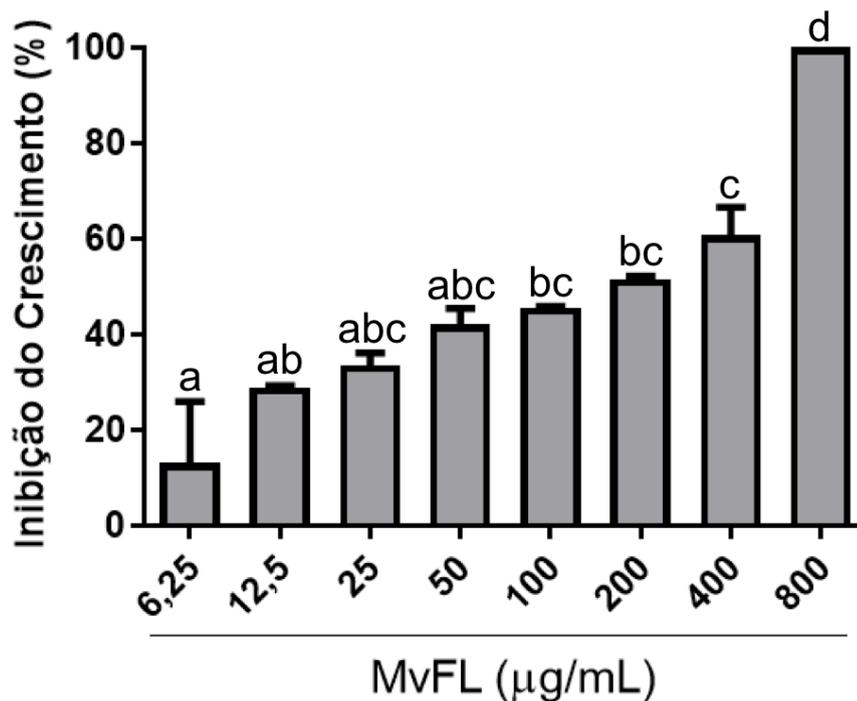


Figura 1. Efeito da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) na replicação de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Culturas de parasitas em fase logarítmica (1×10^6) foram incubadas a 26 °C durante 24 h com diferentes concentrações da lectina. As barras representam a inibição percentual média do crescimento (%) \pm desvio padrão (DP) para três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o grupo controle como 0% de inibição. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações da lectina.

Quando macrófagos peritoneais foram incubados com formas promastigotas na presença de MvFL, foram observadas reduções significativas ($p < 0,05$) no número de macrófagos infectados por amastigotas (Figura 2A) nos diferentes tratamentos com a lectina, indicando uma CI_{50} de 52 $\mu\text{g/mL}$ (0,96 μM). Além disso, o número de amastigotas internalizadas por macrófago infectado (Figura 2B) também foi reduzido na presença de MvFL em $68,9 \pm 0,53\%$ na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$. A

anfotericina B reduziu fortemente tanto o número de macrófagos infectados quanto o de amastigotas internalizadas.

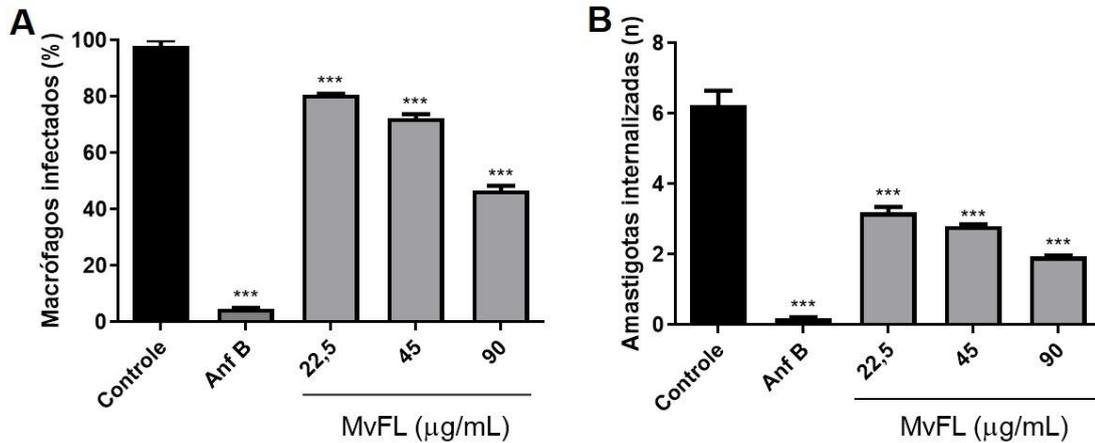


Figura 2. Eficácia da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) no percentual de macrófagos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e no número de amastigotas internalizadas em macrófagos (B). Os resultados representam a média \pm DP (***) $p < 0,001$ versus controle. Anf B: Anfotericina B.

Em seguida, foi investigado se MvFL, por si só, teria um efeito estimulatório sobre as atividades lisossomal e fagocítica dos macrófagos. Para tanto, os estudos foram realizados na ausência do parasita. MvFL causou um aumento significativo da atividade lisossomal apenas na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3A) e não alterou a atividade fagocitária dos macrófagos em nenhuma das concentrações testadas (Figura 3B).

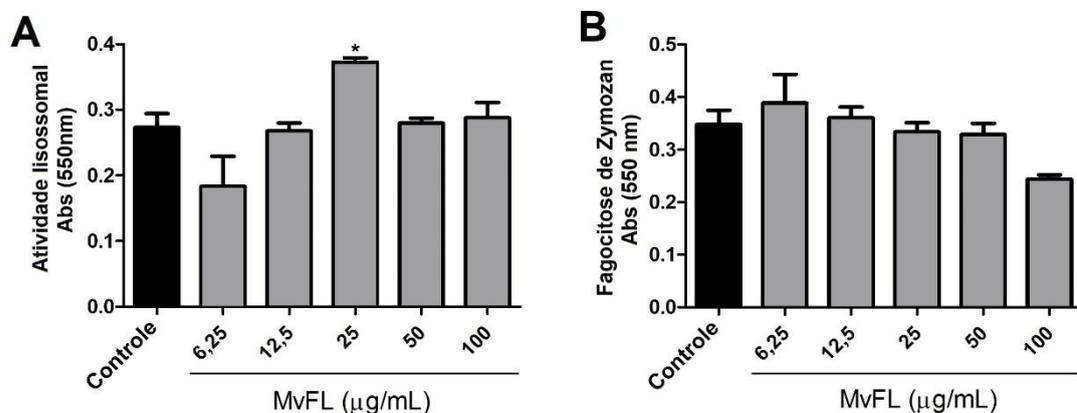


Figura 3. Avaliação de alterações na atividade de macrófagos após incubação com MvFL. (A) Atividade lisossomal, determinada pela quantificação do aumento na captação de vermelho neutro. (B) Atividade fagocítica, determinada pela quantificação da incorporação de zimosan corado com vermelho neutro. Os macrófagos foram tratados por 72 h. Os resultados representam a média \pm DP. (***) $p < 0,001$ versus controle.

Também foi avaliada a possibilidade de MvFL induzir a produção do NO pelos macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Contudo, a presença da lectina não resultou em alteração significativa dos níveis produzidos de NO (Figura 4), em relação ao controle negativo, causando uma leve redução na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

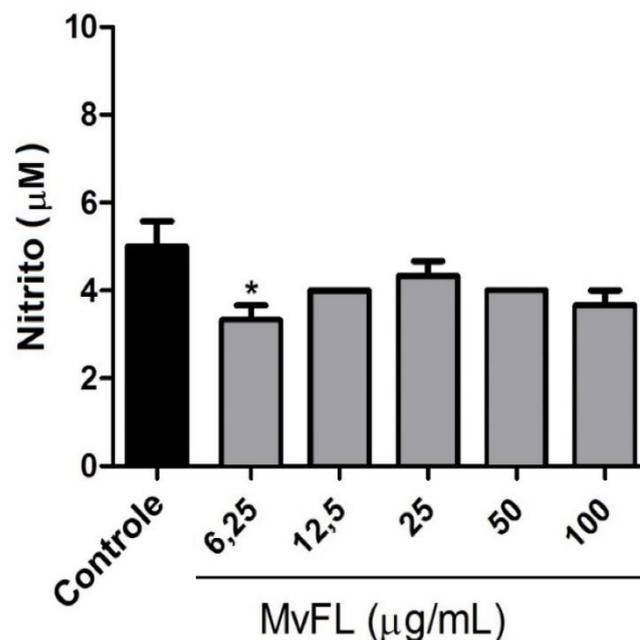


Figura 4. Níveis de óxido nítrico produzidos por macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratados com MvFL durante 24 h a 37 °C e 5% de CO_2 . Os resultados representam a média \pm desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) $p < 0,05$ versus controle.

MvFL não se mostrou um potencial agente hemolítico, apresentando hemólise máxima de $14,3 \pm 0,11\%$ nos eritrócitos de camundongo e de $1,66 \pm 0,36\%$,

2,53±0,08%, 1,67±0,08% e 3,86±0,08% para os tipos sanguíneos humanos A+, B+, AB+ e O+, respectivamente (Figura 5).

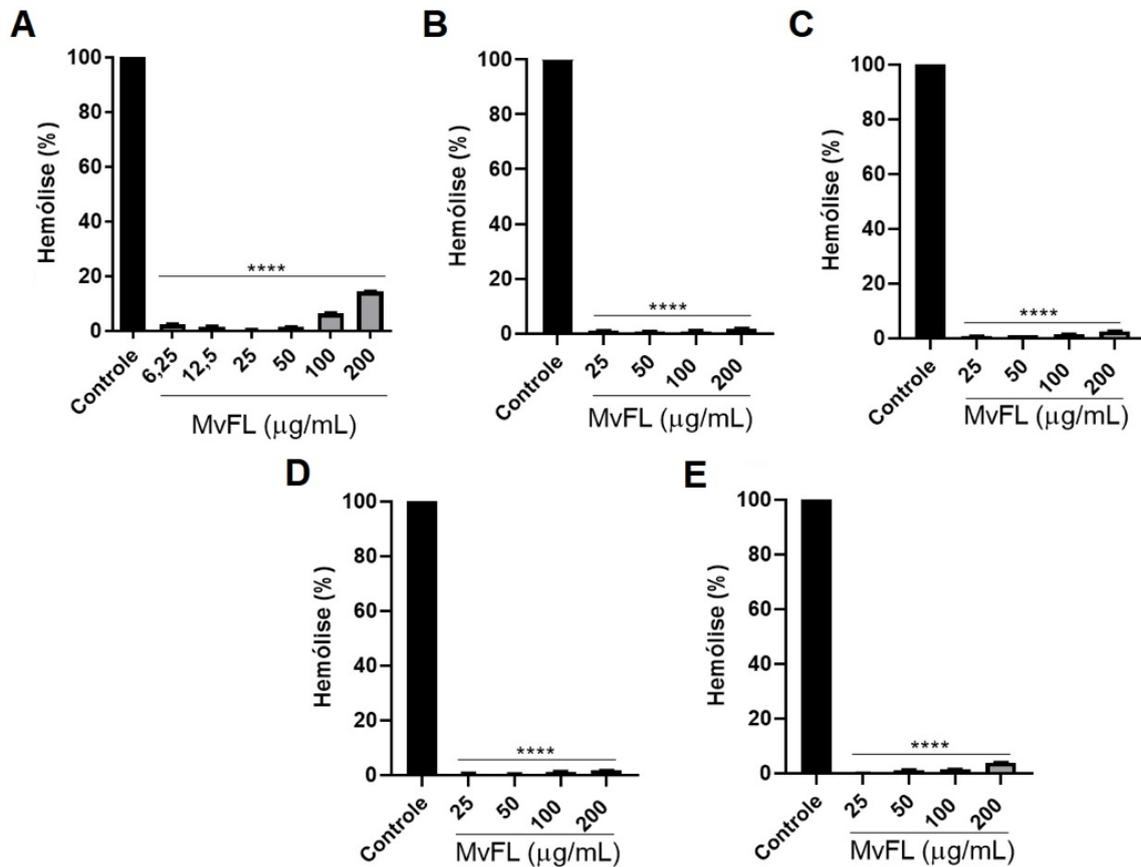


Figura 5. Efeito da lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) na atividade hemolítica sobre eritrócitos de camundongo (A) e humanos do tipo A+ (B), B+ (C), AB+ (D) e O+ (E). Os resultados representam a média ± desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o grupo controle como 0% de inibição; (*) p < 0,05 versus controle; (**) p < 0,01 versus controle; (***) p < 0,001 versus controle. O controle representa 1% de Triton X-100 em PBS.

4 Discussão

As plantas estão se tornando cada vez mais relevantes no tratamento de diversas doenças, pois são importantes fontes de compostos bioativos (BEZERRA et al., 2020). Esses compostos apresentam algumas propriedades e utilidades biológicas como por exemplo: utilização em embalagens biodegradáveis devido ao

seu potencial antioxidante e antimicrobiano (JAFARZADEHA et al., 2020); defesa contra pragas na plantação (BLOCK et al., 2019); melhoram o transporte de nutrientes no trato gastrointestinal (PATRA et al., 2018); e ações neuroativas (YILMAZ; GOKMEN, 2019). Além disso, a resistência e toxicidade dos medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose atualmente ampliam a necessidade de novos fármacos anti-*Leishmania* (MENEZES; PETERSEN; VERAS, 2015; SILVA et al., 2016; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019; HORÁCIO et al., 2021).

Promastigotas são as formas flageladas de *Leishmania* spp. (SUNTER; GULL, 2017) e são elas que infectam o ser humano ao serem picados pelo flebotomíneo contaminado, sendo fagocitadas pelas células imunológicas se transformando em amastigotas (BATES, 2018). Para que não haja a infecção das células hospedeiras pelo parasita nem o desenvolvimento da leishmaniose, é importante a inibição do crescimento das promastigotas, para que não se proliferem nem se transformem nas formas amastigotas intracelulares.

A lectina isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus* (BLL) também inibiu o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*, com CI_{50} de 1,5 μ M (ARANDA-SOUZA et al., 2018), próximo ao valor encontrado para MvFL. Compostos naturais de outras classes também têm apresentado ação frente a formas promastigotas de *Leishmania*. Eugenol, um constituinte do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, inibiu o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* com CI_{50} de 80 μ g/mL (UEDA-NAKAMURA et al., 2005). O triterpenóide chamado lupeol, isolado da casca do caule de *Sterculia villosa*, inibiu o crescimento de promastigotas de *Leishmania donovani* com CI_{50} de 65 μ g/mL (DAS et al., 2017). Um glicosídeo feniletanóide chamado verbascosídeo apresentou atividade antileishmania inibindo promastigotas de *L. amazonensis* com uma CI_{50} de 19 μ M (MAQUIAVELI et al., 2016).

Uma vez confirmado o potencial de inibir a replicação de promastigotas, nós investigamos se MvFL também seria capaz de reduzir o percentual de macrófagos infectados pelas promastigotas de *L. amazonensis*, uma vez que é nos macrófagos que ocorre a replicação dessas promastigotas em amastigotas, que se proliferam no organismo hospedeiro. Os resultados mostraram que MvFL apresenta excelente potencial tanto como inibidor de crescimento das promastigotas como na redução do quantitativo de amastigotas internalizadas em macrófagos.

Afonso-Cardoso et al. (2011) avaliaram *in vitro* a lectina do látex de

Synadenium carinatum (ScLL) (100, 50 e 10 µg/mL) frente à infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c por *L. amazonensis*, apresentando infecção de 55%, 65% e 45% respectivamente, em relação ao controle (100% das células infectadas). Aranda-Souza et al. (2018) também analisaram a lectina BLL frente a macrófagos infectados por amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, mostrando uma porcentagem de infecção nas células tratadas com a lectina (1,6 µM) foi de 28,5±7,91% e 35±8,83% para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente.

Em 2007, Afonso-Cardoso e colaboradores analisaram se ScLL, associada ou não com o antígeno solúvel de *L. amazonensis* (SLA), deixaria os camundongos BALB/c imunizados contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Eles observaram que ScLL (100 µg/animal) promoveu uma redução de 61,7% na carga parasitária no interior dos macrófagos em comparação ao grupo controle, sendo necessário a investigação de quais mecanismos são responsáveis por essa proteção. A lectina de sementes de *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) é uma lectina que apresenta ligação a D-manose e apresenta ações imunomoduladoras devido a sua interação com N-glicanos das células do sistema imune; ela foi testada em neutrófilos humanos infectados com promastigotas de *Leishmania major*, induzindo os neutrófilos infectados a reduzir a viabilidade do parasita em 50% quando comparado aos neutrófilos não tratados (RICCI-AZEVEDO et al., 2016).

MvFL promoveu reduções significativas no quantitativo de amastigotas intracelulares além de reduzir a infecção; porém, seria isso devido a um efeito direto sobre o parasita ou também uma associação com alguma ativação dos mecanismos de defesa dos macrófagos? Macrófagos são fagócitos mononucleares importantes na defesa do hospedeiro contra parasitas *Leishmania*, atuando através de mecanismos estruturais (fagocitose, vacuolização e aumento do volume lisossomal) e moleculares (perfil alterado de NO e dos níveis de citocinas) (DIAS et al., 2020). Com o objetivo de compreender as diminuições do índice de sobrevivência para amastigotas intramacrofágicos, alguns parâmetros da resposta imune foram analisados em macrófagos tratados com MvFL para observar se a lectina poderia estimular mecanismos que essas células usam para matar os parasitas. Como mecanismos estruturais foram analisadas as atividades fagocítica e lisossomal e como mecanismos moleculares, a produção de NO.

Afonso-Cardoso et al. (2011) observaram que, assim como a MvFL, ScLL não

estimulou a produção de NO. No estudo de THOMAZELLI et al. (2018), a ConA aumentou a capacidade fagocitária das células imunológicas e estimulou a produção de NO. Nossos resultados sugerimos que a atividade leishmanicida de MvFL frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* pode estar relacionada ao seu potencial pró-inflamatório descrito anteriormente por Patriota et al. (2017).

Produtos naturais têm sido amplamente estudados devido a sua capacidade de ativar o poder fagocitário de macrófagos (GHAZANFARI et al., 2006). Fagocitose e sistema lisossomal são funções essenciais dos macrófagos ativados durante a resposta imune inata, levando à internalização e degradação de antígenos. Dentro dos macrófagos, o parasita fica restrito ao fagossomo que então se funde aos lisossomos formando o vacúolo parasitário, um compartimento inóspito com hidrolases ácidas, espécies reativas de oxigênio e NO, todos responsáveis pela degradação do patógeno (NIEDERGANZ;CHAVRIER, 2004). Contudo, os resultados indicam que o efeito no número de amastigotas de MvFL não está relacionado aos estímulos de fagocitose e provavelmente também não está associado ao estímulo de ação lisossomal; sendo assim, o efeito da lectina pode ser direto no parasita ou inibindo a infecção pelos promastigotas.

A atividade hemolítica demonstra a citotoxicidade da molécula testada frente aos eritrócitos. Aquelas moléculas que promovem a hemólise acabam se tornando um desafio para o desenvolvimento de testes clínicos (BRANDÃO-COSTA et al., 2020), por isso, é importante a avaliação do potencial hemolítico *in vitro* antes de seguir para ensaios *in vivo* (BRAGA et al., 2015). Uma vez que MvFL não provocou hemólise significativa nos tipos sanguíneos humanos e em hemácias de camundongos (PATRIOTA et al., 2021), podemos sugerir, que MvFL tem potencial para futuramente ser testada em modelos animais nas concentrações testadas.

4 Conclusão

MvFL mostrou potencial contra *L. amazonensis* frente a replicação de promastigotas e infecção de macrófagos. Além disso, MvFL não apresentou ação hemolítica relevante nas concentrações testadas. Sendo assim, MvFL pode ser considerado um agente antileishmania e uma futura perspectiva seria a investigação desta lectina em modelos de imunização *in vivo* contra leishmaniose.

Referências

- AFONSO-CARDOSO, S. R.; RODRIGUES, F. H.; GOMES, M. A.; SILVA, A. G.; ROCHA, A.; GUIMARÃES, A. H.; CANDELORO, I.; FAVORETO JR., S.; FERREIRA, M. S.; DE SOUZA, M. A. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 45, n. 4, p. 255, 2007.
- AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; SOUZA, M. A. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 61-67, 2011.
- ALBUQUERQUE, L. P.; DE SÁ SANTANA, G. M.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 158-166, 2012.
- ALBUQUERQUE, L. P.; DE SÁ SANTANA, G. M.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. V.; PAIVA, P. M. G. Antifungal Activity of *Microgramma vacciniifolia* Rhizome Lectin on Genetically Distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Races. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1098-1105, 2014a.
- ALBUQUERQUE, L. P.; PONTUAL, E. V.; DE SÁ SANTANA, G. M.; SILVA, L. R. S.; DOS SANTOS AGUIAR, J.; COELHO, L. C. B. B.; RÉGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; DA SILVA, T. G.; MELO, A. M. M. A.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014b.
- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Antinutritional effects of the chitin-binding lectin from *Microgramma vacciniifolia* rhizome (MvRL) on *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v.88, p. 101652, 2020.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 519, 2017.
- AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; BARBOSA, T. P.; NÉRIS, P. L. N.;

- CALDAS, J. P. A.; SOUSA, S. C. O.; LEITE, J. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; OLIVEIRA, M. R. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide, **Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 29, 2013.
- ARANDA-SOUZA, M. Â.; DE LORENA, V. M. B.; DOS SANTOS CORREIA, M. T.; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 431-439, 2018.
- BARROSO, D. H.; FALCÃO, S. D. A. C.; MOTTA, J. D. O. C. D.; SEVILHA DOS SANTOS, L.; TAKANO, G. H. S.; GOMES, C. M.; FAVALI, C. B.F.; LIMA, B. D.; SAMPAIO, R. N. R. pD-L1 May Mediate t-Cell exhaustion in a Case of early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. **Front. Immunol.**, v. 11, p. 1021, 2018.
- BATES, P. A. Revising *Leishmania's* life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 2018, p. 529-530, 2018.
- BEZERRA, E. A.; DE MORAES ALVES, M. M.; AMORIM, L. V.; CARVALHO, R. D. C. V.; CRUZ, L. P. L.; COSTA-JÚNIOR, J. S.; OLIVEIRA, M. D. A.; CITÓ, A. M. G. L.; ARCANJO, D. D. R. Garcinielliptone FC: Selective anti-amastigote and immunomodulatory effects on macrophages infected by *Leishmania amazonensis*. **Toxicology in Vitro**, v. 63, p. 104750, 2020.
- BING, D.H.; WEYAND, J.G.M.; STAVITSKY, A.B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, p. 1166-1170, 1967.
- BLOCK, Anna K. et al. Biosynthesis and function of terpenoid defense compounds in maize (*Zea mays*). **Planta**, v. 249, n. 1, p. 21-30, 2019.
- BRAGA, A. A.; E LACERDA, R. R.; DE VASCONCELOS MEDEIROS, G. K. V.; GONÇALVES, G. F.; PESSOA, H. D. L. F.; CARDOSO, J. D.; GADELHA, C. A. A.; SILVA, B. A.; SANTI-GADELHA, T. (2015). Antibacterial and hemolytic activity of a new lectin purified from the seeds of *Sterculia foetida* L. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1689-1699, 2015.
- BRANDÃO-COSTA, R. M.; NASCIMENTO, T. P.; BEZERRA, R. P.; PORTO, A. L. FDS, a novel saponin isolated from *Felicium decipiens*: Lectin interaction and

- biological complementary activities. **Process Biochemistry**, v. 88, p. 159-169, 2020.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet Regional Health**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.
- CARNEIRO, S. M.; CARVALHO, F. A.; SANTANA, L. C.; SOUSA, A. P.; NETO, J. M.; CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, p. 111-116, 2012.
- CHRISTENSEN, S. M.; BELEW, A. T.; EL-SAYED, N. M.; TAFURI, W. L.; SILVEIRA, F. T.; MOSSER, D. M. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 13, p. e0007152, 2019.
- COELHO, A. C.; GENTIL, L. G.; DA SILVEIRA, J. F.; COTRIM, P. C. Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 2008, p. 98-102, 2008.
- COELHO, L. C. B. B.; SILVA P. M. D. S.; LIMA, V. L. D. M.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEAO, T. H.; CORREIA, M. T. D. S. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-based Complementary and Alternatative Medicine**, p. 1594074, 2017.
- CORIOLOANO, M. C.; BRITO, J. S.; PATRIOTA, L. L. S.; SOARES, A. K. A.; LORENA, V. M. B.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; MELO, C. M. L. Immunomodulatory Effects of the Water-soluble Lectin from *Moringa oleifera* Seeds (WSMoL) on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). **Protein & Peptide Letters**, v. 25, p. 295-301, 2018.
- DAS, A.; JAWED, J. J.; DAS, M. C.; SANDHU, P.; DE, U. C.; DINDA, B.; AKHTER, Y.; BHATTACHARJEE, S. Antileishmanial and immunomodulatory activities of lupeol, a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 4, p. 512-522, 2017.
- DE MEDEIROS, M. L. S.; DE MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; BEZERRA, A. C. D. S.; DA SILVA, M. D. C. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782-789, 2018.

- DIAS, C. N.; NUNES, T. A. L.; SOUSA, J. M. S; COSTA, L. H.; RODRIGUES, R. R. L.; ARAÚJO, A. J.; FILHO, J. D. B. M.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, M. R.; CARVALHO, F. A. A.; RODRIGUES, K. A. F. Methyl gallate: Selective antileishmanial activity correlates with host-cell directed effects. **Chemico-Biological Interactions**, p. 109026, 2020.
- FERREIRA, L. R. D.; DA SILVA, A. F.; DA SILVA SIQUEIRA, J.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, R.; DA SILVA LIMA, V.; DE OLIVEIRA, A. M.; SOARES, L. A. L.; DA SILVA, G. C. Study of the phytochemical profile and evaluation of the cytotoxic effects of *Microgramma vacciniifolia*'s Rhizome. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, p.1185-1202, 2020.
- FREITAS, G. B. L. Parasitologia Humana e Veterinária. **Irati, Pasteur**, 1 ed., p. 558, 2020.
- GHAZANFARI, T.; HASSAN, Z. M.; KHAMESIPOUR, A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium Sativum*) treatment, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 333-337, 2006.
- GRANDO, F. C. C.; FELICIO, C. A.; TWARDOWSCHY, A.; PAULA, F. M.; BATISTA, V. G.; FERNANDES, L. C.; CURI, R.; NISHIYAMA, A. Modulation of peritoneal macrophages activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidyl choline. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 599-605, 2009.
- HORÁCIO, Elvira Cynthia Alves et al. Perspectives From Systems Biology to Improve Knowledge of Leishmania Drug Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 351, 2021.
- JAFARZADEH, Shima et al. Biodegradable green packaging with antimicrobial functions based on the bioactive compounds from tropical plants and their by-products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 100, p. 262-277, 2020.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275, 1951.
- MAQUIAVELI, Claudia C. et al. Verbascoside inhibits promastigote growth and arginase activity of *Leishmania amazonensis*. **Journal of**

- natural products**, v. 79, n. 5, p. 1459-1463, 2016.
- MEDEIROS, M. D. G. F.; DA SILVA, A. C.; CITÓ, A. M. D. G. L.; BORGES, A. R.; DE LIMA, S. G.; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International.**, v. 60, p. 237-241, 2011.
- MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C.; RAYMOND, F.; LÉGARÉ, D.; CORBEIL, J.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; QUELLETTE, M. Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1167, 2011.
- NAPOLEÃO, T. H. Plant-derived lectins: a review of their status as alternatives to anticancer chemotherapy. In: Watanabe HS (eds) Horizons in Cancer Research. **Nova Science Publishers Inc**, New York, pp. 171–205, 2019.
- NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome, **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 4, p. 422-428, 2004
- NUNES, J. V. N.; SANTOS, R. C.; MACIEL, L. H.; SILVA, R. E.; LIMA, V. S.; RAMOS, M. L. H.; SILVA, G. C. Biological and therapeutic aspects of the *Microgramma* gender, Polypodiaceae family. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 50403-50416, 2020.
- OMS. Leishmaniosis. Organização Mundial da Saúde. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>.
Acesso: 08/04/2020.
- OPAS. Doenças tropicais negligenciadas. OPAS/OMS Brasil. 2020. Disponível <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=57> Acesso em 08 de Abril de 2020.
- OZBILGIN, A.; HARMAN, M.; KARAKUŞ, M.; BART, A.; TÖZ, S.; KURT, Ö.; CAVUS, I.; POLAT, E.; GÜNDÜZ, C.; GOOL, T. V.; ÖZBEL, Y. Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in Turkey. **Acta Tropica**, v. 173, p. 90-96, 2017.
- PATRA, Amlan Kumar; AMASHEH, Salah; ASCHENBACH, Jörg Rudolf. Modulation of gastrointestinal barrier and nutrient transport function in farm animals by natural plant bioactive compounds—a comprehensive review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 20, p. 3237-3266, 2019.

- PATRIOTA, L. L.; PROCÓPIO, T. F.; DE SANTANA BRITO, J.; SEBAG, V.; DE OLIVEIRA, A. P. S.; DE ARAÚJO SOARES, A. K.; MOREIRA, L. R.; LIMA, T. A.; SOARES, T.; SILVA, T. D.; PAIVA, P. M. G.; LORENA, V. M. B.; MELO, C. M. L.; ALBUQUERQUE, L. P.; NAPOLEÃO, T. H. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biogical Macromolecules**, v. 103, p. 36–46, 2017.
- PATRIOTA, L. L. S. et al. *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL) exhibits antitumor activity against sarcoma 180 in mice. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 1, p. 100013, 2021.
- PITA, J. C. L. L. R.; XAVIER, A. L.; SOUSA, T. K. G.; MANGUEIRA, V. M.; TAVARES, J. F.; JÚNIOR, R. J. O.; VERAS, R. C.; PESSOA, H. L. F.; SILVA, M. S.; MORELLI, S.; ÁVILA, V. M. R.; SILVA, T. G.; DINIZ, M. F. F. M.; CASTELLOBRANCO, M. V. S. In vitro and in vivo antitumor effect of trachylobane-360, a diterpene from *Xylopija langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, p. 9573-9589, 2012.
- RICCI-AZEVEDO, R.; OLIVEIRA, A. F.; CONRADO, M. C.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophils contribute to the protection conferred by ArtinM against intracellular pathogens: a study on *Leishmania major*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004609, 2016.
- SADLOVA, J.; MYSKOVA, J.; LESTINOVA, T.; VOTYPKA, J.; YEO, M.; VOLF, P. *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote- and amastigote-initiated infections. **Parasitology**, v.144, n. 4, p. 403-410, 2017.
- SANTANA, G. M.; DE ALBUQUERQUE, L. P.; NAPOLEÃO, T. H.; DE SOUZA, S. R.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.
- SILVA, B. J. M.; DA SILVA, R. R. P.; RODRIGUES, A. P. D.; FARIAS, L. H. S.; DO NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, E. O. *Physalis angulata* induces death of promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* via the generation of reactive oxygen species. **Micron**, v. 82, p. 25-32, 2016.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82. 2017.
- SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya; MEENA, Lalit P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan**

- Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2019.
- SUNTER, J., GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.
- THOMAZELLI, A. P. F. D. S.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; DA SILVA, S. S.; ALVARENGA, D. S.; PANIS, C.; CATANEO, A. H. D.; BORDIGNON, J.; SILVEIRA, G. F.; YAMAUCHI, L. M.; DE SÁ, J. P. S. R. FELIPE, I.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I. Concanavalin-A displays leishmanicidal activity by inducing ROS production in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, p. 1532-2513, 2018.
- UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P. K.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.
- ULIANA, S. R.; T TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464, 2018.
- VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; OLIVEIRA, J. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; LEITE, J. P. V.; SANTORO, M. M.; RÉGIS, W. C. B.; TAVARES, C. A. P.; COELHO, E. A. F. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in diferente *Leishmania* species. **Parasitology international**, v. 60, n. 4, p. 357-363, 2011.
- YILMAZ, Cemile; GÖKMEN, Vural. Neuroactive compounds in foods: Occurrence, mechanism and potential health effects. **Food Research International**, v. 128, p. 108744, 2020.

5 CONCLUSÕES

MvFL mostrou potencial antileishmania frente a promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonenses*, da mesma forma se mostrou com potencial leishmanicida ao reduzir a infecção de macrófagos, e de amastigotas internalizadas, porém, quanto aos mecanismos de ativação dos macrófagos, MvFL mostrou uma boa atividade lisossomal, mas não teve resultados significantes quanto a atividade fagocítica e produção de NO. Além disso, MvFL não apresentou hemólise nos eritrócitos de camundongo e humano nas concentrações testadas. Com isso, podemos dizer que MvFL é um agente leishmanicida, que apresenta um potencial para investigação em modelos de imunização *in vivo* contra a leishmaniose.

6 SÚMULA CURRICULAR

- **ARTIGO 1:** A CRUZ FILHO, IRANILDO JOSÉ ; DA SILVA BARROS, BÁRBARA RAFAELA ; DE SOUZA AGUIAR, LETHÍCIA MARIA ; NAVARRO, CLAUDIA DANIELE CARVALHO ; RUAS, JULIANA SILVEIRA ; DE LORENA, VIRGÍNIA MARIA BARROS ; DE MORAES ROCHA, GEORGE JACKSON ; VERCESI, ANÍBAL EUGÊNIO ; DE MELO, CRISTIANE MOUTINHO LAGOS ; MAIOR, ANA MARIA SOUTO . Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia fícus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v. 123, p. 1331-1339, 2019.
- **ARTIGO 2:** AGUIAR, L. M. S.; NASCIMENTO1, D. K. D. ; RAMOS, B. A. ; Moura, M. C. ; COELHO, L. C. B. B. ; NAPOLEAO, T. H. ; CORREIA, M. T. S.; CRUZ FILHO, I. J. ; MAIOR, A. M. S. ; SILVA, T. D. ; LIMA, C. S. A. ; Lorena, V. M. B. ; MELO, C. M. L. . Antioxidant, antimicrobial and immunostimulant properties of saline extract from *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz (Fabaceae) leaves. INDIAN JOURNAL OF TRADITIONAL KNOWLEDGE, v. 18, p. 281-289, 2019.
- **CAPÍTULO DE LIVRO:** MELO, CRISTIANE MOUTINHO LAGOS DE ; BARROS, BÁRBARA RAFAELA DA SILVA ; NASCIMENTO, DAYANE KELLY DIAS DO ; SILVA, RICARDO SÉRGIO DA ; AGUIAR, LETHÍCIA MARIA DE SOUZA ; SOUSA, GEORON FERREIRA DE ; CRUZ FILHO, IRANILDO JOSÉ DA . OS BENEFÍCIOS DO USO DAS FOLHAS DE *M. EMARGINATA* (ACEROLEIRA) PARA A SAÚDE ORGÂNICA. Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa. 570ed.: Atena Editora, 2019, v. , p. 160-174.
- **PÓS GRADUAÇÃO Lato sensu:** Especialização em Análises Clínicas. Faculdade Frassinetti do Recife, FAFIRE, Brasil. Título: Métodos diagnósticos e de tratamento de canceres por HPV. Orientador: Me. Dayane Kelly Dias do Nascimento Santo.
- **ARTIGO 3:** DO NASCIMENTO SANTOS, DAYANE KELLY DIAS ; Barros, Bárbara Rafaela da Silva ; Aguiar, Lethícia Maria de Souza ; DA CRUZ FILHO, IRANILDO JOSÉ ; DE LORENA, VIRGÍNIA MARIA BARROS ; DE

MELO, CRISTIANE MOUTINHO LAGOS ; NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE
 Immunostimulatory and antioxidant activities of a lignin isolated from
 Conocarpus erectus leaves. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL
 MACROMOLECULES, v. 150, p. 169-177, 2020.

- **ARTIGO 4:** DE SIQUEIRA PATRIOTA, LEYDIANNE LEITE ; DO
 NASCIMENTO SANTOS, DAYANE KELLY DIAS ; DA SILVA BARROS,
 BÁRBARA RAFAELA ; DE SOUZA AGUIAR, LETHÍCIA MARIA ; SILVA,
 YASMYM ARAÚJO ; DOS SANTOS, ANGELA CAROLINE LIMA AMORIM ;
 GAMA E SILVA, MARIANA ; BARROSO COELHO, LUANA CASSANDRA
 BREITENBACH ; PAIVA, PATRÍCIA MARIA GUEDES ; PONTUAL,
 EMMANUEL VIANA ; DE MELO, CRISTIANE MOUTINHO LAGOS ;
 MENDES, ROSEMAIRY LUCIANE ; NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE .
 Evaluation of the In Vivo Acute Toxicity and In Vitro Hemolytic and
 Immunomodulatory Activities of the Moringa oleifera Flower Trypsin Inhibitor
 (MoFTI). PROTEIN AND PEPTIDE LETTERS, v. 27, p. 1-10, 2020.
- **ARTIGO 5:** DOS SANTOS, ARDILLES JUAN CARLOS ALVES ; DA SILVA
 BARROS, BÁRBARA RAFAELA ; DE SOUZA AGUIAR, LETHÍCIA MARIA ;
 DE SIQUEIRA PATRIOTA, LEYDIANNE LEITE ; DE ALBUQUERQUE LIMA,
 THÂMARA H ; ZINGALI, RUSSOLINA BENEDETA ; PAIVA, PATRÍCIA MARIA
 GUEDES ; NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE ; DE MELO, CRISTIANE
 MOUTINHO LAGOS ; PONTUAL, EMMANUEL VIANA . Schinus
 terebinthifolia leaf lectin (StELL) is an immunomodulatory agent by altering
 cytokine release by mice splenocytes. 3 Biotech, v. 10, p. 144, 2020.

REFERÊNCIAS

- ADAMUDE, F. A. et al. Identification and characterization of lectin gene isolated from an indigenous *Albizia lebbbeck* seeds. **Scientific African**, v. 7, p. e00234, 2020.
- AFONSO-CARDOSO, S. R et al. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 61-67, 2011.
- AKHOUNDI, M., et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, n. 2017, p. 1-29, 2017.
- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 158-166, 2012.
- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Antifungal Activity of *Microgramma vacciniifolia* Rhizome Lectin on Genetically Distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Races. **Applied Biochemistry and Biotechnolog**, v. 172, p. 1098-1105, 2014a.
- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014b.
- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Antinutritional effects of the chitin-binding lectin from *Microgramma vacciniifolia* rhizome (MvRL) on *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v.88, p. 101652, 2020.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 519, 2017.
- ATANASOV, Atanas G. et al. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.

ÁVILA, M. M., et al. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 2018, p. 64, 2018.

BARROSO, D. H. et al. pD-L1 May Mediate t-Cell exhaustion in a Case of early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. **Front. Immunol.**, v. 11, p. 1021, 2018.

BATES, P. A. Revising *Leishmania's* life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 2018, p. 529-530, 2018.

BATISTA, K. L. R. et al. Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 225, p. 67-72, 2018.

BHAT, G. G. Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose-binding lectin from *Remusatia vivipara* with nematicidal activity. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, p. 309-320, 2010.

BHUTIA, S. K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 8-18, 2019.

BILAL, M. et al. Cytotoxicity and in-vitro antiviral activity of lectin from *Crocus vernus* l. Against potato virus y. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 18, n. 1, p. 1301-1315, 2020.

BOITZ, J. M. et al. Arginase is essential for survival of *Leishmania donovani* promastigotes but not intracellular amastigotes. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 1, 2017.

BORGES, C. V. et al. Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. In: **Medicinal Plants and Environmental**

Challenges. Springer, Cham, 2017. p. 259-277.

BORGHI, S. M. et al. *Leishmania* infection: painful or painless?. **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 465-475, 2016.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, p. 182, 2007.

BRAZIL, R. P., RODRIGUES, A. A. F., ANDRADE FILHO, J. D. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. **Entomology, Ornithology & Herpetology: Current Research**, v. 4, n.2, p. 144, 2015.

BRITO, V. N., DIAS, A. F. L. R., SOUSA, V. R. F. Epidemiological aspects of Leishmaniasis in the Pantanal region of Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 744-749, 2019.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet Regional Health**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CAMPOS, J. K. L., et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open**, v. 2, n. 2016, p. 62-68, 2016.

CAMPOS, M. B., et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **PLOS one**, v. 13, n.3, e0194383, 2018.

CARVALHO, B. M. et al. Ecological Niche Modelling Predicts Southward Expansion of *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), Vector of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in South America, under Climate Change. **PLOS one**, v. 10, n. 11, e0143282, 2015.

CASTILLO-ACOSTA, V. M. et al. Exposure of *Trypanosoma brucei* to an N-acetylglucosamine-Binding Lectin Induces VSG Switching and Glycosylation

Defects Resulting in Reduced Infectivity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, e0003612, 2015.

CAVALCANTE, I. J. M., VALE, M. R. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 4, p. 911-924, 2014.

CECIONI, S.; IMBERTY, A.; VIDAL, S. Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands. **Chemical reviews**, v. 115, n. 1, p. 525-561, 2015.

CHEN, C. S. et al. Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.

CHEUNG, R. C. F. et al. Marine lectins and their medicinal applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 3755-3773, 2015.

CHOI, H. L. et al. The global procurement landscape of leishmaniasis medicines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0009181, 2021.

CHRISTENSEN, S. M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 13, p. e0007152, 2019.

COELHO, A. C. et al. Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 2008, p. 98-102, 2008.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-based Complementary and Alternatative Medicine**, p. 1594074, 2017.

COSER, Elizabeth M. et al. Activity of paromomycin against *Leishmania*

amazonensis: Direct correlation between susceptibility in vitro and the treatment outcome in vivo. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 91-98, 2020.

COTTON, J. A. The Expanding World of Human Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 5, p. 341-344, 2017.

CRUPI, R. et al. N-acetyl-L-cysteine reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in BALB/c mice. **BMC Veterinary Research**, v. 16, p. 13, 2020.

DA SILVA JR., I. A., et al. In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. **BioMed Research International**, v.2015, ID 393049, p. 15, 2015.

DA SILVA, J. D. F. et al. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 291-297, 2019a.

DA SILVA, P. M. et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **International journal of biological macromolecules**, v. 123, p. 600-608, 2019b.

DE MEDEIROS, M. L. S. et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782-789, 2018.

FANTI, J. R., et al. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. **Acta Tropica**, v. 178, n.2018, p. 46-54, 2018.

FARIA, G.; LUZ, G. S.; BETIN, T. A. Incidence of American Tegumentary Leishmaniosis in the Municipality of Rondoland-MT in the Period 2010 to

2018. **International Journal of Chinese Medicine**, v. 3, n. 3, p. 34, 2019.

FERNANDES, M. P. et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 42, n. 1, p. 69-78, 2010.

FERREIRA, L. R. D. et al. Study of the phytochemical profile and evaluation of the cytotoxic effects of *Microgramma vacciniifolia*'s Rhizome. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, p.1185-1202, 2020.

FERREIRA, L. R. D.; DA SILVA, A. F.; DA SILVA SIQUEIRA, J.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, R.; DA SILVA LIMA, V.; DE OLIVEIRA, A. M.; SOARES, L. A. L.; DA SILVA, G. C. Study of the phytochemical profile and evaluation of the cytotoxic effects of *Microgramma vacciniifolia*'s Rhizome. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, p.1185-1202, 2020a.

FERREIRA, H. J. et al. Molecular Mechanisms Involved in the Antitumor Activity of Isolated Lectins from Marine Organisms: A Systematic Review. **Current Drug Targets**, v. 21, n. 6, p. 616-625, 2020b.

FONTENELLE, T. P. C. et al. Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: Secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 1122-1130, 2018.

FRANÇA-COSTA, J. et al. Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Parasite Infectivity. **Plos One**, v. 7, p, e36595, 2012.

GEBHARDT, M., et al. Fast, sensitive and specific diagnosis of infections with *Leishmania* spp. in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsies by cytochrome b polymerase chain reaction. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 5, p. 1239-49, 2015.

GORAKSHAKAR, A. C.; GHOSH, K. Use of lectins in immunohematology. **Asian**

journal of transfusion science, v. 10, n. 1, p. 12, 2016.

GUIMARÃES-COSTA, A. B., et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748-53, 2009.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, v. 5, p. e3784, 2017.

IORDACHE, F. et al. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 152-161, 2015.

JANDÚ, J. J. B. et al. Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 671, 2017.

JAYAWARDENA, H. S. N.; WANG, X.; YAN, M. Classification of lectins by pattern recognition using glyconanoparticles. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 21, p. 10277-10281, 2013.

JEBALI, A. et al. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 400-409, 2014.

KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. **Annual Evolution, and Systematics**, v. 49, p. 115-138, 2018.

KEVRIC, I., CAPPEL, M. A., KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 2015, p. 579-593, 2015.

LACERDA, J. T. J. G. et al. New insights into lectin from *Abelmoschus esculentus* seeds as a Kunitz-type inhibitor and its toxic effects on *Ceratitis capitata* and root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. **Process Biochemistry**, v. 63, p. 96-104, 2017.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, p. 190–201, 2010.

LARGADA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1242, 2017.

MAZALOVSKA, Milena; KOUOKAM, J. Calvin. Transiently Expressed Mistletoe Lectin II in *Nicotiana benthamiana* Demonstrates Anticancer Activity In Vitro. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2562, 2020.

MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

MANNING, J. C. et al. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. **Histochemistry and cell biology**, v. 147, n. 2, p. 199-222, 2017.

MARTÍNEZ-ALARCÓN, D.; BLANCO-LABRA, A.; GARCÍA-GASCA, T. Expression of lectins in heterologous systems. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 616, 2018.

MELO, C. M. L. et al. Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. **Scandinavian Journal Immunology**, v. 73, p. 112-21, 2011.

MENEZES, J. P. B. et al. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, ID 815023, p. 1-11, 2015.

MIKERY, O. F., et al. Traditional and Geometric Morphometry Analyses of *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations of Chiapas, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 3, p. 697-707, 2019.

MITCHELL, C. A.; RAMESSAR, K.; O'KEEFE, B. R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. **Antiviral research**, v. 142, p. 37-54, 2017.

MONTE-NETO, R. L. et al. Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1167, 2011.

MORAIS, C. G. V. et al. The Dialogue of the Host Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* infection. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MUXEL, S. M., et al. Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2682, 2018.

NAPOLEÃO, T. H. Plant-derived lectins: a review of their status as alternatives to anticancer chemotherapy. In: Watanabe HS (eds) Horizons in Cancer Research. **Nova Science Publishers Inc**, New York, pp. 171–205, 2019.

OLIVEIRA, W. F. et al. Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe. **Microbiological research**, v. 230, p. 126330, 2020a.

OLIVEIRA, W. F. et al. Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 8, n. 3, p. 035009, 2020b.

OMS. Leishmaniosis. Organização Mundial da Saúde. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso: 08/04/2020.

OPAS. Doenças tropicais negligenciadas. OPAS/OMS Brasil. 2020. Disponível <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=57> Acesso em 08 de Abril de 2020.

OZBILGIN, A. et al. Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in Turkey. **Acta Tropica**, v. 173, p. 90-96, 2017.

PALHARINI, J. G. et al. Eutirucallin: A lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 136, 2017.

PATRIOTA, L. L. et al. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biogical Macromolecules**, v. 103, p. 36–46, 2017.

PATRIOTA, L. L. S. et al. *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL) exhibits antitumor activity against sarcoma 180 in mice. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 1, p. 100013, 2021.

PERES, M. T. L. P. et al. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (LANGSD. & FISCH.) COPEL (Polypodiaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 897-901, 2009.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, p. 111-129, 2015.

PROCÓPIO, T. F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. **Antibacterials: synthesis, properties and biological activities**. New York: Nova Sci Pub, p. 69-90, 2017.

RAMOS, D. B. M. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 233, p. 148-157, 2019.

REIS, Natasha Ferraz de Campos et al. *Leishmania amazonensis* Promastigotes or Extracellular Vesicles Modulate B-1 Cell Activation and Differentiation. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 636, 2020.

REZENDE, M. B., et al. Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil

Endemic for Visceral Leishmaniasis. **Transboundary Emerging Diseases**, v. 64, n. 6, p. 36-42, 2017.

RICCI-AZEVEDO, R. et al. Neutrophils contribute to the protection conferred by ArtinM against intracellular pathogens: a study on *Leishmania major*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004609, 2016.

ROCHA, G. P.; PETRONI, T. F. Visceral and Cutaneous leishmaniasis. **Revista Saúde UniToledo**, v. 1, n. 2, 2017.

RODRIGUES, V., et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 118, 2016.

SADLOVA, J. et al. *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote- and amastigote-initiated infections. **Parasitology**, v.144, n. 4, p. 403-410, 2017.

SANTANA, G. M. et al. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.

SANTOS, A. F. S. et al. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current Topics in Peptide & Protein Research**, v. 15, 2014a.

SANTOS, D. R. Curso de Capacitação: Coleta e Identificação de Flebotomíneos. **Companhia Paranaense de Energia: COLÍDER/MT**, 2014b.

SCOTT, P., NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2016, p. 581-592, 2016.

SHI, Z. et al. A novel molecular model of plant lectin-induced programmed cell death in cancer. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, p. b17-00363, 2017.

SHI, Z. et al. Identification of novel pathways in plant lectin-induced cancer cell apoptosis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, p. 228, 2016.

SHIVAMADHU, M. C. et al. Anti-cancer and anti-angiogenic effects of partially purified lectin from *Praecitrullus fistulosus* fruit on in vitro and in vivo model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1299-1309, 2017.

SILVA, Marcelo Santos et al. Leishmania amazonensis promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e81397, 2013.

SILVA, B. J. M. et al. *Physalis angulata* induces death of promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* via the generation of reactive oxygen species. **Micron**, v. 82, p. 25-32, 2016.

SILVA, C. G. et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Saline Extract and Lectin-Rich Fraction from *Microgramma vacciniifolia* Rhizome in Mice. **Chemistry & Biodiversity**, 2021.

SILVA, R. R. S. et al. *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. **Microbial pathogenesis**, v. 135, p. 103629, 2019.

SILVA-ALMEIDA, M., et al. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 5, p. 160, 2012.

SILVA JUNIOR, G. B., BARROS, E. J. G., DAHER, E. F. Kidney involvement in leishmaniasis—a review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 434-440, 2014.

SINGH, R. S.; KAUR, H. P.; SINGH, J. Purification and characterization of a *Mycelial mucin* specific lectin from *Aspergillus panamensis* with potent mitogenic and antibacterial activity. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 12, p. 2251-2258, 2015.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Penicillium* sp. lectins. **Archives of Biological Sciences**, v. 71, n. 3, p. 517-524, 2019.

SOUZA, L. P. F. et al. Lectins from *Synadenium carinatum* (ScLL) and *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) are able to induce beneficial immunomodulatory effects in a murine model for treatment of *Toxoplasma gondii* infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 164, 2016.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82. 2017.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. Expert Opinion on Pharmacotherapy, **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

SUNTER, J., GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

TEIXEIRA, C. R. et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3001-3008, 2006.

TEIXEIRA, D. E. et al. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TERCEIRO, R. G. D. et al. Estrutura populacional de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel em um fragmento de Floresta Ombrófila Aberta no Nordeste Brasileiro. **R. bras. Bioci.**, v. 10, p. 5-12, 2012.

THOMAZELLI, A. P. F. D. S. et al. Concanavalin-A displays leishmanicidal activity by inducing ROS production in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, p. 1532-2513, 2018.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDINA, G. C. Species Typing in Dermal

Leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 265-294, 2015.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Distribution and evolution of the lectin family in soybean (*Glycine max*). **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2868-2891, 2015.

VILLELA, J. S. et al. Estudo de morfologia e histoquímica da espécie *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel, Polypodiaceae - pteridófitas - corrente no campus da Universidade Estadual de Santa Cruz (uesc). **Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 3**, Capítulo 16, 2019.

WANI, S. S. et al. Therapeutic Potential of Medicinal Plant Proteins: Present Status and Future Perspectives. **Current Protein and Peptide Science**, v. 21, n. 5, p. 443-487, 2020.

WU, M. et al. A novel thyroglobulin-binding lectin from the brown alga *Hizikia fusiformis* and its antioxidant activities. **Food chemistry**, v. 201, p. 7-13, 2016.

YANG, Li et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

ZANGUEU, C. B. et al. In Vitro Effects of Aqueous Extract from *Maytenus Senegalensis* (Lam.) Exell Stem Bark On Egg Hatching, Larval Migration and Adult Worms of *Haemonchus contortus*. **BMC Veterinary Research**, v. 14, p. 147, 2018.