



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

JADY MOREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS EXTRATOS  
BIOATIVOS DE MICRORGANISMOS FOTOSINTETIZANTES FRENTE A  
DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* SPP.**

RECIFE  
2023

JADY MOREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS EXTRATOS  
BIOATIVOS DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES FRENTE A  
DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* SPP.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal de  
Pernambuco como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientador: Dra. Milena de Paiva  
Cavalcanti.

Coorientador: Me. Victor Vaitkevicius  
Antão de Souza.

RECIFE  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Jady Moreira da.

Avaliação *in vitro* do potencial terapêutico dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes frente a diferentes espécies de *Leishmania* spp. / Jady Moreira da Silva. - Recife, 2023.

54 : il., tab.

Orientador(a): Milena de Paiva Cavalcanti

Cooorientador(a): Victor Vaitkevicius Antão de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, , 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Atividade antiparasitária. 2. Imunomodulação. 3. Produtos naturais. 4. Tratamento. 5. Leishmanioses. I. Cavalcanti, Milena de Paiva. (Orientação). II. Souza, Victor Vaitkevicius Antão de. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

JADY MOREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS EXTRATOS BIOATIVOS DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES FRENTE A DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA SPP.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Dra. Milena de Paiva Cavalcanti  
Instituto Aggeu Magalhães/Departamento de Microbiologia

---

Coorientador: Me. Victor Vaitkevicius Antão de Souza  
Instituto Aggeu Magalhães/Departamento de Imunologia

---

Dra. Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque  
Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco – LACEN/PE

---

Dr. Rômulo Pessoa e Silva  
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino – NUPIT-SG/UFPE

Esta monografia é dedicada aos meus pais e à minha avó, pilares da minha formação e meus maiores exemplos de força, determinação e amor. Este trabalho, assim como tudo que faço, é por vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por toda a força. Devo a Ele tudo o que sou, que conquistei e que irei conquistar.

Agradeço aos meus pais, Jaciara Maria e Jailson Moreira, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Sem eles, eu não conseguiria chegar até aqui. Nada do que eu diga ou faça será suficiente para expressar minha gratidão. Agradeço à minha segunda mãe, a minha querida avó Juraci Silva, que sempre cuidou tão bem de mim e contribuiu para minha formação.

Agradeço à minha orientadora Milena Paiva por acreditar e confiar no meu desenvolvimento acadêmico, além de me fornecer todo o conhecimento e suporte necessário. Agradeço ao meu orientador Victor Vaitkevicius por toda a paciência, ensinamentos, experimentos compartilhados, momentos de descontração e suporte emocional durante estes anos.

Aos colegas e parceiros que fazem parte do grupo de pesquisa “Inovações no controle de patógenos” e do Laboratório de Imunoparasitologia, em especial à Maria Gabriella Mello e Isabelle Barreto.

Às minhas amigas Ana Cecília Lithg, Beatriz Dourado, Crislaine Nascimento, Marcely Gondim e Nathália Nascimento, agradeço por todos os momentos compartilhados durante estes 13 anos de amizade. Com vocês a vida é muito mais leve e divertida.

Aos amigos que conheci ao longo da graduação, agradeço a cada um pelos momentos que deixaram a caminhada um pouco mais fácil. Em especial à Bruno Torres que foi meu grande companheiro durante os primeiros períodos da graduação. Agradeço por todo o companheirismo e amizade que nutrimos e levamos para fora da UFPE.

À minha companheira de estágio curricular, Sharla Gomes, a qual tive o prazer de compartilhar felicidades e angústias durante este período final da graduação. E a todos os profissionais do laboratório de patologia clínica do Hospital da Restauração pelo acolhimento e aprendizado.

À UFPE e aos professores do curso de biomedicina por todo o aprendizado e experiência.

E por fim, ao CNPq, IAM-FIOCRUZ e UFRPE por me proporcionarem o suporte financeiro e estrutural para vivenciar a iniciação científica que foi essencial para meu amadurecimento durante a graduação.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

(Bíblia, Josué 1:9)

SILVA, Jady Moreira da. **Avaliação *in vitro* do potencial terapêutico dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes frente a diferentes espécies de *Leishmania* spp.** 2023. 54 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## RESUMO

Diante das limitações no atual tratamento das leishmanioses, há uma busca crescente por novos compostos com potencial terapêutico. Alvos de origem natural estão sendo estudados, incluindo alguns microrganismos fotossintetizantes (MFs), nos quais já foi observado potencial imunomodulador e antiparasitário, além de apresentarem uma ampla diversidade química e metabólica, tornando-os fontes de substâncias ativas que podem ser utilizadas no tratamento de diversas doenças. O estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial terapêutico dos extratos bioativos de MFs em diferentes espécies de *Leishmania* spp. Após o cultivo das espécies *Arthrospira platensis* (EAP), *Chlorella vulgaris* (ECV), *Dunaliella tertiolecta* (EDT) e *Tetrademus obliquus* (ETO), os extratos foram obtidos pelo método de sonicação. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de humanos saudáveis foram tratadas com os extratos para determinação da concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) através de ensaios de viabilidade celular. Por sua vez, formas promastigotas de *Leishmania infantum* e *L. braziliensis* foram tratadas para determinação da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) através de contagem celular. Os índices de seletividade (IS) foram determinados pela razão entre o valor da CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>. As drogas de referência (DRs) utilizadas para comparação foram o Antimoniato Pentavalente (Sb<sup>V</sup>) e a Miltefosina (MTF). Além disso, a atividade imunomodulatória foi avaliada a partir da dosagem de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) e da produção de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes da cultura de PBMC humano tratados com EAP e EDT. Nos resultados obtidos, foi observado que o EAP e ECV apresentaram menor citotoxicidade (CC<sub>50</sub>= 986,11  $\mu$ g/mL e 999,66  $\mu$ g/mL, respectivamente) quando comparados ao Sb<sup>V</sup> (CC<sub>50</sub>= 412,46 $\mu$ g/mL). Em comparação à MTF (CC<sub>50</sub>= 245,81 $\mu$ g/mL), todos os extratos apresentaram menor toxicidade. Na análise da IC<sub>50</sub> para *L. infantum*, observou-se que o EDT apresentou a maior atividade antiparasitária (IC<sub>50</sub>= 53,75  $\mu$ g/mL). Para *L. braziliensis*, o ECV apresentou o melhor resultado com uma IC<sub>50</sub> de 144,93  $\mu$ g/mL. Em relação as DRs, observou-se que a MTF possui uma alta ação leishmanicida para as duas espécies de *Leishmania*. Ao avaliar os IS dos extratos, o EDT (IS= 4,7) e ECV (IS= 5,2) foram os que apresentaram os melhores resultados. Em relação a produção de citocinas, foi observado que o EAP e o EDT induziram a produção de citocinas do perfil Th1 em todas as concentrações, além de induzir a produção de IL-10 de forma dose-dependente (*p-value*= 0,031). Ao analisar a correlação entre as citocinas estimuladas pelo extrato EAP, observou-se que nas concentrações da CC<sub>50</sub> e 1/2 da CC<sub>50</sub>, o TNF e IL-4 obtiveram uma forte correlação negativa (*r*= -0,92) e positiva (*r*= 0,97), respectivamente. Avaliando a produção de NO, houve uma maior indução na maioria das concentrações quando comparado às células sem estímulo para os dois extratos estudados. Diante dos resultados, os extratos bioativos de MFs mostraram-se promissores, podendo se tornarem possíveis candidatos terapêuticos para as leishmanioses.

**Palavras-chave:** Atividade antiparasitária. Imunomodulação. Produtos naturais. Tratamento. Leishmanioses.

SILVA, Jady Moreira da. ***In vitro* evaluation of the therapeutic potential of bioactive extracts from photosynthetic microorganisms against different species of *Leishmania* spp.** 2023. 54 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## ABSTRACT

Given the limitations in the current treatment of leishmaniasis, there is a growing search for new compounds with therapeutic potential. Targets of natural origin are being studied, including some photosynthetic microorganisms (MFs), in which immunomodulatory and antiparasitic potential has already been observed, in addition to presenting a wide chemical and metabolic diversity, making them sources of active substances that can be used in the treatment of various diseases. The study aimed to evaluate, *in vitro*, the therapeutic potential of bioactive extracts of MFs in different species of *Leishmania* spp. After cultivation of *Arthrospira platensis* (EAP), *Chlorella vulgaris* (ECV), *Dunaliella tertiolecta* (EDT) and *Tetradismus obliquus* (ETO) species, the extracts were obtained by sonication method. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy humans were treated with the extracts to determine the 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) by cell viability assays. In turn, promastigotes of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis* were treated to determine the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) by cell count. The selectivity indexes (SI) were determined by the ratio between the CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values. The reference drugs (RDs) used for comparison were Pentavalent Antimoniate (Sb<sup>V</sup>) and Miltefosine (MTF). In addition, the immunomodulatory activity was evaluated based on the dosage of cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) and the production of nitric oxide (NO) in culture supernatants of human PBMC treated with EAP and EDT. The results showed that EAP and ECV presented lower cytotoxicity (CC<sub>50</sub>= 986.11  $\mu$ g/mL and 999.66  $\mu$ g/mL, respectively) when compared to Sb<sup>V</sup> (CC<sub>50</sub>= 412.46  $\mu$ g/mL). Compared to MTF (CC<sub>50</sub>= 245.81  $\mu$ g/mL), all extracts showed less toxicity. In the IC<sub>50</sub> analysis for *L. infantum*, it was observed that EDT had the highest antiparasitic activity (IC<sub>50</sub>= 53.75  $\mu$ g/mL). For *L. Braziliensis*, ECV showed the best result with an IC<sub>50</sub> of 144.93  $\mu$ g/mL. Regarding DRs, it was observed that MTF has a high leishmanicidal action for both species of *Leishmania*. When evaluating the IS of the extracts, the EDT (IS= 4.7) and ECV (IS= 5.2) were the ones that presented the best results. Regarding cytokine production, it was observed that EAP and EDT induced the production of Th1 profile cytokine in all concentrations, in addition to inducing a dose-dependent production of IL-10 (p-value= 0.031). When analyzing the correlation between the cytokines stimulated by the EAP extract, it was observed that at the concentrations of CC<sub>50</sub> and ½ of CC<sub>50</sub>, TNF and IL-4 obtained a strong negative (r= -0.92) and positive (r= 0.97) correlation, respectively. Evaluating NO production, there was a greater induction in most concentrations when compared to cells without stimulation for the two studied extracts. In view of the results, the bioactive extracts of MFs showed to be promising, and may become possible therapeutic candidates for leishmaniasis.

**Key words:** Antiparasitic activity. Immunomodulation. Natural products. Treatment. Leishmaniasis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico do protozoário do gênero <i>Leishmania</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Células dos microrganismos fotossintetizantes observados em microscópio óptico (40x). .....	23
<b>Figura 3.</b> Taxa de sobrevivência das células humanas tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e com as drogas de referência. ....	31
<b>Figura 4.</b> Taxa de sobrevivência das promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e com as drogas de referência.....	33
<b>Figura 5.</b> Taxa de sobrevivência das promastigotas de <i>L. braziliensis</i> tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e com as drogas de referência.....	34
<b>Figura 6.</b> Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o extrato bioativo de <i>Arthrospira platensis</i> . .....	36
<b>Figura 7.</b> Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o extrato bioativo de <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	36
<b>Figura 8.</b> Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o Sb <sup>V</sup> . .....	38
<b>Figura 9.</b> Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com a MTF. ....	39
<b>Figura 10.</b> Medição do NO após os estímulos das células com os extratos bioativos e drogas de referência. ....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tipos de leishmaniose tegumentar, suas manifestações clínicas e espécies envolvidas.....	18
<b>Tabela 2.</b> Concentração citotóxica de 50% (CC <sub>50</sub> ) dos extratos bioativos e drogas de referências em células humanas.....	30
<b>Tabela 3.</b> Valores de concentração inibitória de 50% (IC <sub>50</sub> ) para formas promastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. braziliensis</i> frente aos extratos e drogas de referências.....	32
<b>Tabela 4.</b> Índice de seletividade dos extratos bioativos e drogas de referências para <i>L. infantum</i> e <i>L. braziliensis</i> .....	35
<b>Tabela 5.</b> Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células tratadas com os extratos de <i>Arthrospira platensis</i> e <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	37
<b>Tabela 6.</b> Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células tratadas com as drogas de referência.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i> (Demanda bioquímica de oxigênio)
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica de 50%
CDC	Centro de Controle de Doenças
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico sintase induzível)
IS	Índice de seletividade
L	<i>Leishmania</i>
LSA-Li	<i>L. infantum soluble antigen</i> (Antígeno solúvel de <i>L. infantum</i> )
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MTF	Miltefosina
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salino)
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> (Fitohemaglutinina)
PMSF	<i>Phenylmethyl-Sulfony Floride</i> (Inibidor de proteases)
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SB <sup>V</sup>	Antimonial Pentavalente - Glucantime <sup>®</sup>
SFB	Soro fetal bovino

SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
Th	T <i>helper</i>
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de necrose tumoral)
Treg	T reguladoras

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE AS LEISHMANIOSES.....	14
2.2 CICLO BIOLÓGICO.....	15
2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i> .....	16
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	18
2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS .....	19
2.6 TRATAMENTO.....	20
2.7 INOVAÇÃO TERAPÊUTICA .....	21
2.7.1 Produtos Naturais .....	21
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS NATURAIS .....	24
4.2 CULTIVO DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> .....	25
4.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL .....	25
4.4 OBTENÇÃO DE PBMC HUMANO .....	26
4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA DE 50% (CC <sub>50</sub> ).....	26
4.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (IC <sub>50</sub> ).....	27
4.7 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICES DE SELETIVIDADE (IS) .....	27
4.8 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE .....	27
4.8.1 Avaliação da Produção de Citocinas.....	28
4.8.2 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico.....	28
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
4.10 QUESTÕES ÉTICAS, FINANCEIRAS E ESTRUTURAIS.....	29
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA DE 50% (CC <sub>50</sub> ).....	30
5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (IC <sub>50</sub> ) PARA PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. ....	32
5.3 COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE SELETIVIDADE.....	34
5.4 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE.....	35
5.4.1 Avaliação da Produção de Citocinas.....	35
5.4.2 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico.....	40
5.5 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA.....	41

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>49</b>
ANEXO A.....	49

## 1. INTRODUÇÃO

Leishmaniose é um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania*, o qual compreende cerca de 20 diferentes espécies (BRASIL, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma das doenças tropicais de maior relevância devido ao seu amplo espectro de manifestações clínicas, que variam de formas cutâneas à uma forma visceral. Além disso, possui características clínicas de diferentes graus de severidade a depender das espécies de *Leishmania* envolvidas e da resposta imune do hospedeiro (HEFNAWY et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^V$ ), sendo o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) o medicamento utilizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014; KOREA et al., 2015). Esses medicamentos estão em uso há cerca de 100 anos e apresentam diversas limitações como uma janela terapêutica estreita e efeitos tóxicos, além de falhas terapêuticas relatadas na Índia e Nepal devido a casos de resistência do parasito (CROFT et al., 2006; PONTE-SUCRE et al., 2017; HEFNAWY et al., 2017).

Uma alternativa terapêutica para substituir o uso dos antimoniais é a miltefosina (Milteforan™), que possui um efeito leishmanicida. No Brasil, esta droga é administrada apenas para os cães, sendo a única disponível para os animais, no entanto, possui um custo elevado, impossibilitando uma utilização em larga escala (GONÇALVES et al., 2019; REGUERA et al., 2016).

O tratamento atual disponível para as leishmanioses tem sido discutido e questionado. A alta toxicidade, os efeitos colaterais, o alto custo, a dificuldade de adesão e a resistência aos medicamentos dificultam o uso destes e em muitos casos, se faz necessário levar em consideração a relação risco-benefício na decisão de continuar com o tratamento (RODRIGUES et al., 2015; ZULFIQAR et al., 2017). Diante dessas limitações, faz-se necessário constantes estudos para a avaliação de novos compostos com potencial terapêutico, sem efeitos colaterais e que não induzam facilmente a resistência, deste modo aumentando o arsenal terapêutico contra as leishmanioses (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; HEFNAWY et al., 2017). Um tratamento imunoterapêutico, que não só atue contra o parasito, mas que module a resposta do sistema imunológico do hospedeiro, pode ser uma das

alternativas para o combate à doença, uma vez que aumenta a resposta protetora (SINGH; SUNDAR, 2014).

Ao longo da história, produtos naturais foram e são fontes de novos compostos para as mais diversas doenças, devido a sua diversidade de metabólitos (DIAS; URBAN; ROESSNER., 2012; WATERS et al., 2010). Além dos organismos terrestres, o ecossistema marinho demonstra ser uma grande fonte de organismos potencialmente candidatos a compostos terapêuticos (HAEFNER, 2003; KANG et al., 2015). Como resultado da adaptação e sobrevivência em variados habitats ao longo da evolução, esses microrganismos possuem a capacidade de sintetizar inúmeros metabólitos, os quais vêm atraindo estudos acerca de novas moléculas para o emprego em indústrias farmacêuticas e biotecnológicas (CADWELL, 2009; SHING et al., 2005; SUGANYA et al., 2016).

O interesse na exploração desses microrganismos fotossintetizantes reflete o grande potencial de produzirem diversos metabólitos secundários bioativos que demonstraram ter propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, anti-helmínticas, anticoagulantes e antiprotozoárias (YAMTHE et al., 2017; ALIANÇA et al., 2014). Somado a isso, esses microrganismos podem ser cultivados facilmente e em um curto tempo. Eles possuem a capacidade de se desenvolver em cultivos artificiais exigindo apenas CO<sub>2</sub>, luz e alguns minerais, demonstrando ser uma estratégia favorável ao meio ambiente a fim de evitar a superexploração dos recursos naturais (LAURITANO et al., 2016; YAMTHE et al., 2017).

Entretanto, poucas espécies desses microrganismos foram exploradas, havendo pouco conhecimento sobre as atividades biológicas desse grupo (LAURITANO et al., 2016; YAMTHE et al., 2017), sendo necessário mais estudos que avaliem a capacidade de se tornarem potenciais terapêuticos, inclusive para as leishmanioses. Diante disso, esta pesquisa teve como proposta a realização de estudos *in vitro* do potencial antiparasitário e imunomodulador de extratos bioativos provenientes de microalgas e cianobactéria. Levando em consideração as particularidades imunológicas de cada forma clínica, a análise imunológica foi realizada levando-se em consideração a imunopatogenia da leishmaniose visceral. O trabalho objetivou a geração de subsídios científicos que propiciem a realização de estudos posteriores, como os ensaios *in vivo*, que possibilitem a utilização das moléculas desses extratos de forma aditiva ou substituta à terapia atualmente usada.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são primariamente classificadas como zoonoses que podem acometer os seres humanos quando estes entram em contato com o ciclo de transmissão do parasito, desenvolvendo-se em antropozoonoses (BRASIL, 2014). A doença é causada por um protozoário do gênero *Leishmania* que é transmitido ao hospedeiro, de forma vetorial, durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas, principalmente do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) (ELMAHALLAWY et al., 2014; CRUZ; FREITAS-CASTRO, 2019). Existem diversas formas clínicas da doença, que podem se manifestar desde lesões cutâneas até acometimento visceral (HEFNAWY et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) compreende um conjunto de manifestações que acometem a pele e/ou a mucosa, de forma localizada ou difusa (BASANO et al., 2004; CONCEIÇÃO-SILVA et al. 2014). No Brasil, a LT possui distribuição ao longo de todo o território, tendo maior incidência nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Há seis principais espécies de *Leishmania* envolvidas na etiologia da LT no país, valendo o destaque para três delas: *Leishmania (L) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (V) guyanensis* (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Por sua vez, a Leishmaniose Visceral (LV) é considerada a forma mais grave da doença, podendo resultar em uma alta taxa de morbidade e mortalidade, caso não seja tratada adequadamente. Há duas espécies responsáveis por causar a LV: *Leishmania (L) donovani* e *Leishmania (L) infantum* (syn. *L. (L) chagasi*) (GONÇALVES et al., 2019). Nas Américas, a espécie responsável por causar a LV é a *L. infantum*. O parasito se distribui por todo o organismo, afetando órgãos como o baço, fígado, rins, gânglios linfáticos e medula óssea. A LV também afeta o cão doméstico (LVC - Leishmaniose Visceral Canina), sendo esse animal considerado o principal reservatório de importância epidemiológica para a doença (BRASIL, 2014).

Na LV, o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é considerado o principal reservatório de importância epidemiológica devido à intensa presença de parasitos nas regiões cutâneas, além do contato mais próximos com humanos. Essas

condições favorecem a contaminação do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo e a continuação do ciclo de transmissão (NUNES et al., 2016).

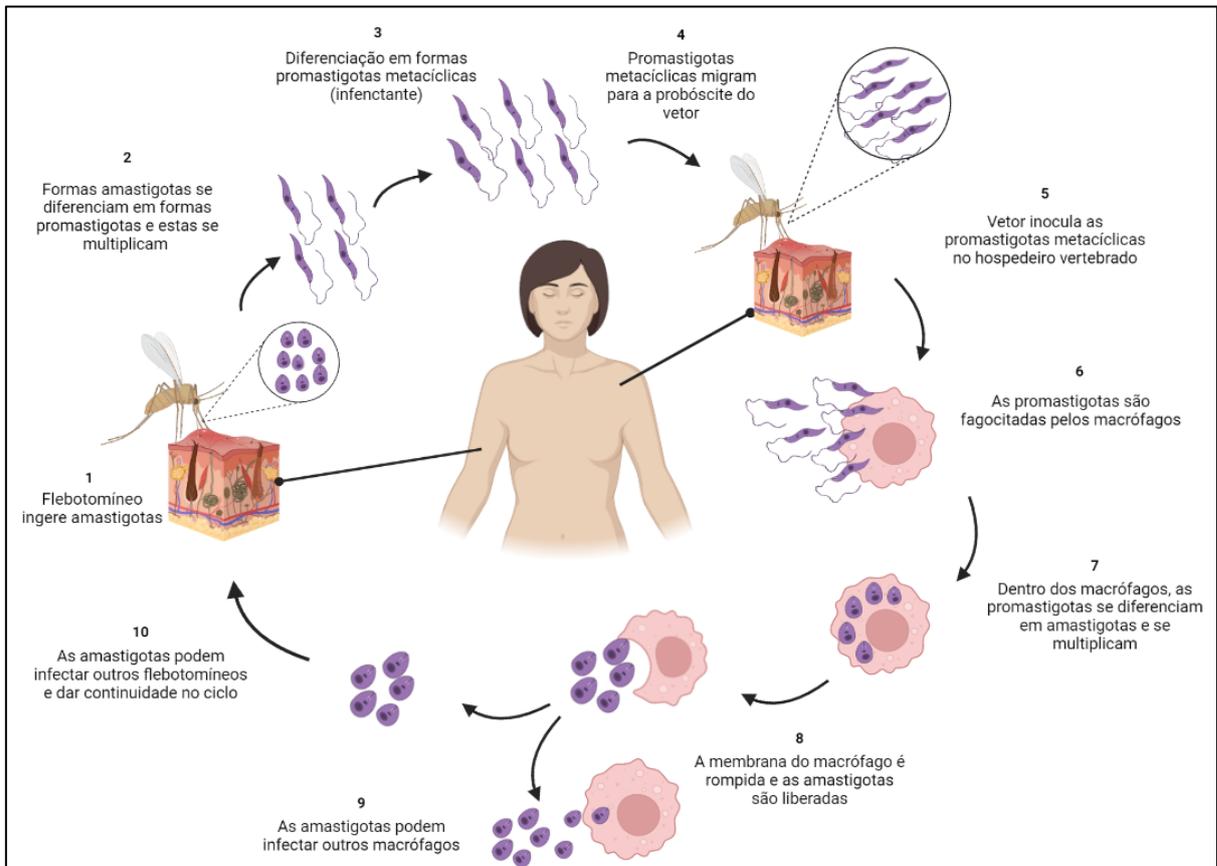
## 2.2 CICLO BIOLÓGICO

O protozoário do gênero *Leishmania* possui um ciclo biológico heteroxênico, ou seja, apresenta desenvolvimento em dois hospedeiros e possui duas principais formas evolutivas durante seu ciclo de vida: as formas promastigotas, que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor, e as formas amastigotas, que residem nos macrófagos infectados do hospedeiro vertebrado (BRASIL, 2014; CRUZ; FREITAS-CASTRO, 2019).

O ciclo biológico pode ser dividido em duas fases, de acordo com o hospedeiro e a forma evolutiva do parasito (Figura 1). A primeira fase ocorre quando o flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, ingere as formas amastigotas. Estas formas se diferenciam em formas promastigotas e multiplicam por divisão binária e, no epitélio do intestino do vetor, adquirem uma morfologia alongada, com a presença de um flagelo, tornando-se as formas infectantes denominadas promastigotas metacíclicas, as quais migram para a probóscide do inseto, permitindo a inoculação no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (NEVES, 2011; ROCHA et al., 2019).

A segunda fase ocorre a partir da inoculação das promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, onde estas formas são fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) e se desenvolvem para a forma intracelular amastigota. Nos fagossomos dos macrófagos, as amastigotas multiplicam-se exponencialmente, levando ao rompimento da membrana celular e liberando os protozoários que irão parasitar novos macrófagos, disseminando o parasito no hospedeiro. Ocasionalmente, outro flebótomo pode se alimentar do sangue contaminado, podendo transmitir para outro hospedeiro durante um repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo do patógeno (NEVES, 2011; MCGWIRE; SATOTSKAR, 2014; ROCHA et al., 2019).

**Figura 1.** Ciclo biológico do protozoário do gênero *Leishmania*.



**Fonte:** a autora.

**Legenda:** O ciclo biológico das leishmanioses inicia-se quando o vetor ingere amastigotas livres ou macrófagos infectados. Essas formas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, que são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Essas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam causando a disseminação no hospedeiro. Esse ciclo pode continuar caso outro vetor se alimente do sangue contaminado.

### 2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

Para desencadear a resposta imune, células apresentadoras de antígenos (APCs: *Antigen presenting cells*) realizam a apresentação antigênica para células T CD4+. Isso desencadeia a produção de citocinas no local e a interação de moléculas coestimuladoras, resultando na diferenciação de células T *naive* em células T *helper* (Th). As células Th podem ter um perfil Th1, Th2, Th17 ou T regulador (Treg) (AZEREDO et al., 2010).

A resposta do perfil Th1 promove a produção de citocinas inflamatórias, ativando macrófagos e desencadeando a destruição do parasito. Essa via de ativação relaciona-se com a resolução do processo infeccioso (KUMAR; ENGWERDA, 2014). Neste perfil de resposta, quando as APCs são ativadas por um receptor *Toll-like* (TLR: *Toll-like receptors*), há produção de interleucina 12 (IL-12), que estimula a produção

de fator de necrose tumoral (TNF: *Tumor necrosis factor*) por macrófagos ativados, linfócitos T e células natural killer (NK). O TNF desempenha papel relevante na proteção contra o parasito na imunopatogenia das leishmanioses, juntamente com interferon gama (INF- $\gamma$ ) (KUMAR; ENGWERDA, 2014). Este efeito protetor pode estar relacionado ao controle da carga parasitária, já que essas citocinas atuam ativando a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS: *inducible nitric oxide synthase*) que contribui para a produção de NO pelo macrófago, promovendo a morte do parasito intracelularmente e contribuindo para o controle da infecção (BOGDAN et al., 2000; KUMAR; ENGWERDA, 2014; CARNEIRO et al., 2016). Além disso, as citocinas interleucina 2 (IL-2) e IL-12 atuam na reestimulação dessas citocinas responsáveis pela síntese de NO, causando a inibição da proliferação do parasito e a diferenciação de células Treg (OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016).

A compreensão das vias que induzem a resposta do perfil Th2 ainda é incerta, mas sabe-se que a produção de interleucina 4 (IL-4) e interleucina (IL-10) é promovida por essa resposta (ABELES et al., 2012; KHANDEM; UZONNA, 2014). As citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) facilitam a proliferação parasitária, através da inibição da produção de IFN- $\gamma$  e TNF, além de serem responsáveis pela proliferação e diferenciação das células B, o que permite maior ativação do perfil Th2 (FREITAS; NUNES-PINHEIRO, 2013; SRIVASTAVA et al., 2016).

Tem-se ainda que as células Th17 se diferenciam a partir dos linfócitos T CD4+ na presença de TGF- $\beta$  e IL-6. O perfil Th17 produz concentrações elevadas de IL-21, que é um fator de amplificação importante para a indução das células Th17. As citocinas IL-6 e IL-21 estimulam a expressão de receptores de IL-23 nas células Th17, fazendo com que a IL-23 atue sobre essas células estabilizando o seu fenótipo. Embora não esteja completamente esclarecido, a literatura sugere que as células Th17 migram para o local inflamado, recrutando outras células T pró-inflamatórias, tais como Th1, neutrófilos e células da resposta imune inata (SCOTT; NOVAIS, 2016). As células Th17 estão associadas à produção de IL-17, que aumenta a produção de mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF e iNOS. A produção de IL-17 durante a infecção por *Leishmania braziliensis* e a correlação direta com a citocina TNF sugere que a IL-17 possa ter um papel relevante no progresso da LT com inflamação exacerbada (PEREIRA-CARVALHO et al., 2013).

No contexto da LV, o perfil Th2 estimula o desenvolvimento de uma resposta imune humoral que leva a uma superprodução de imunoglobulinas por células B. Esse processo favorece a formação de imunocomplexos que terminam depositados em órgãos do hospedeiro. Além disso, células como mastócitos são ativadas e geram mediadores inflamatórios que resultam em alterações nos tecidos e em sintomas da doença (FREITAS; NUNES-PINHEIRO; 2013).

#### 2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A LT pode ser subdividida em quatro formas clínicas principais (Tabela 1) e as manifestações dependem de fatores como a espécie do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro (BRASIL, 2007; HANDLER et al., 2015; ROCHA et al., 2019).

**Tabela 1.** Tipos de leishmaniose tegumentar, suas manifestações clínicas e principais espécies envolvidas.

FORMA CLÍNICA	MANIFESTAÇÃO	ESPÉCIES
<b>Cutânea localizada</b>	Lesões nodulares no local de inoculação das promastigotas	<i>Leishmania braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. Major</i> e <i>L. tropica</i>
<b>Cutânea difusa</b>	Lesões nodulares distribuídas por todo o corpo	<i>L. amazonensis</i>
<b>Cutânea disseminada</b>	Lesões não contíguas formadas pela disseminação do parasito por via linfática e/ou hematogênica	<i>L. braziliensis</i>
<b>Mucocutânea</b>	Lesões que cometem mucosas, principalmente a nasal, formando lesões ulcera-infiltrante	<i>L. braziliensis</i>

**Fonte:** a autora (baseada em BRASIL, 2007; TORRES-GUERRERO et al., 2017; ROCHA et al., 2019).

Em maior parte dos casos de LT, as lesões são capazes de cicatrizar sem intervenção terapêutica. Entretanto, esta cura espontânea pode levar meses ou anos. Além disso, pode ser encontrado DNA parasitário mesmo após o tratamento e cura clínica dos pacientes (CARVALHO; WILSON, 2017; ROCHA et al., 2019).

A LV apresenta um amplo espectro clínico, que pode variar desde sinais sutis até manifestações moderadas ou severas que, se não tratadas, possuem o potencial de causar a morte do paciente (BRASIL, 2014). A forma assintomática se caracteriza por sorologia positiva sem apresentação de sinais e sintomas da doença. Na forma oligossintomática, há a presença de sinais clínicos discretos como febre e hepatomegalia e/ou esplenomegalia discreta. A forma clássica pode ser observada a partir de manifestações mais acentuadas, como hepatoesplenomegalia mais grave, febre persistente e, geralmente, apresenta associação com infecções secundárias (LEMOS et al., 2019). Além disso, linfonomegalia, pancitopenia e caquexia são sinais frequentes (KARIMI et al., 2015).

## 2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico das leishmanioses deve ser baseado em dados epidemiológicos, achados clínicos e laboratoriais. Os exames laboratoriais são baseados na detecção direta do parasito (testes parasitológicos), na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (testes sorológicos) ou detecção do DNA do parasito (testes moleculares) (BRASIL, 2007; GOMES et al., 2014; ARONSON et al., 2016).

O padrão-ouro para o diagnóstico da LV é feito pelo encontro de formas amastigotas do parasito em material biológico obtido preferencialmente por meio de punção da medula óssea. Apesar da punção aspirativa esplênica ser o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para pesquisa do parasito, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea (sensibilidade de 76-85%) por ser um procedimento mais seguro (Sundar, 2002). Já para a LT, a pesquisa direta é realizada pela identificação de formas amastigotas em esfregaços por escarificação da borda interna da lesão, *imprint* do fragmento cutâneo da biópsia ou punção aspirativa (BRASIL, 2017). A pesquisa direta em escarificados da lesão possui uma baixa sensibilidade (50-70%) quando comparada à identificação de parasitos em amostra de biópsia (sensibilidade de 70-100%) (VEGA-LOPEZ, 2003; ANDRADE et al., 2005).

Os testes sorológicos possuem a finalidade de identificar anticorpos anti-*Leishmania* no soro de pacientes suspeitos, podendo ser identificados por teste imunoenzimático, imunofluorescência indireta, aglutinação direta, entre outros (ANVERSA et al., 2017). No entanto, para casos de LV, o Ministério da Saúde recomenda a utilização do teste rápido imunocromatográfico com o antígeno

recombinante rk39, o qual possui uma boa sensibilidade (EJAZI; ALI, 2013). Já para a LT, a sorologia não é indicada como critério isolado de cura ou recorrência (BRASIL, 2017).

Os testes moleculares, especialmente a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), possuem uma alta sensibilidade e especificidade na detecção de frações do DNA do parasito, sendo uma alternativa aos desafios encontrados nas técnicas parasitológicas e sorológicas. Além disso, possibilita o acompanhamento dos níveis de carga parasitária no paciente (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009; 2013).

## 2.6 TRATAMENTO

No Brasil, os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes ( $Sb^{III}$ ), foram utilizados pela primeira vez no tratamento da LT em 1913. Na LV, a droga só foi utilizada dois anos depois. Os derivados pentavalentes ( $Sb^V$ ), só foram introduzidos na década de 40 e, desde então, os mesmos têm sido considerados como drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América devido ao aparecimento de resistência primária do parasito a essas drogas (BRASIL, 2014; BRASIL, 2007).

O principal efeito colateral do antimoniato-N-metilglutamina é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Além disso, induzir artralgias, adinamia, anorexia, dor no local da aplicação e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária (BRASIL, 2014; BRASIL, 2007).

Como tratamento alternativo para a LT, é indicado a Pentamidina, e por sua vez, para a LV, a Anfotericina B é a indicada (BRASIL, 2014; CONCEIÇÃO-SILVA et al. 2014). Estes medicamentos de segunda escolha possuem uma alta eficácia contra parasitos resistentes, mas os efeitos adversos, a via de administração, tempo de tratamento e o alto custo são os principais desafios (HEFNAWY et al., 2017); YAMTHE et al., 2017). A Anfotericina B é altamente tóxica às células do endotélio vascular e gera complicações renais em praticamente todos os pacientes durante o tratamento assim como a Pentamidina que, além de gerar comprometimento renal,

também pode levar à insuficiência hepática e provocar distúrbios no metabolismo da glicose, sendo necessário o acompanhamento glicêmico durante todo o tratamento (BRASIL, 2014; BRASIL, 2007).

Para o tratamento da LVC, em 2016 foi aprovado o uso da miltefosina (Milteforan™) no Brasil e segue sendo a única escolha para os cães (GONÇALVES et al., 2019). O uso do medicamento promove a cura clínica de cães infectados pois, com a continuidade do tratamento, há uma diminuição da carga parasitária no organismo resultando em uma redução no potencial de infecção do flebotomíneo e na transmissão da LVC (ALBUQUERQUE; LONGUINE, 2018; SOUSA et al., 2020). Entretanto, não há cura parasitológica, uma vez que o parasito pode permanecer nos tecidos linfóides do animal, sendo necessário o acompanhamento veterinário para identificar possíveis recidivas (SOUSA et al., 2020).

## 2.7 INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Devido à sua natureza multifacetada, as leishmanioses apresentam respostas variáveis aos tratamentos, que são influenciados por diferentes fatores como a espécie do parasito, a imunidade do hospedeiro e a ocorrência de infecções simultâneas, tornando desafiador o combate à doença. Apesar dos progressos alcançados na área da saúde, os tratamentos disponíveis atualmente são tóxicos, onerosos e de uso prolongado, o que dificulta a sua acessibilidade para as pessoas afetadas (INICIATIVA MEDICAMENTOS PARA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, 2019).

Para desenvolver novos medicamentos de forma eficaz é importante a realização de um planejamento com base no mecanismo de ação e estrutura do composto. Entretanto, estudos sobre medicamentos para o tratamento das leishmanioses ainda não apresentam um método experimental uniformemente padronizado (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

### 2.7.1 Produtos Naturais

Alvos terapêuticos de origem natural vêm sendo investigados, dentre eles, alguns microrganismos fotossintetizantes, os quais já foram observados com potencial imunomodulador e leishmanicida e, por apresentarem uma ampla diversidade química e metabólica, são fontes de substâncias ativas que podem ser utilizadas no tratamento de várias doenças (FREILE-PELEGRIN et al., 2008;

TEMPONE; MARTINS-DE-OLIVEIRA; BERLINK, 2011; YAMTHE et al., 2017). As microalgas e cianobactérias possuem várias vantagens em comparação aos demais organismos na produção de bioativos de interesse industrial devido aos seus requisitos nutricionais mínimos, reduzindo o custo de produção. Além disso, em diferentes condições de cultivos, os mesmos microrganismos podem sintetizar diferentes metabólitos bioativos podendo, assim, serem amplamente explorados (BODE et al., 2002; MATOS et al., 2018).

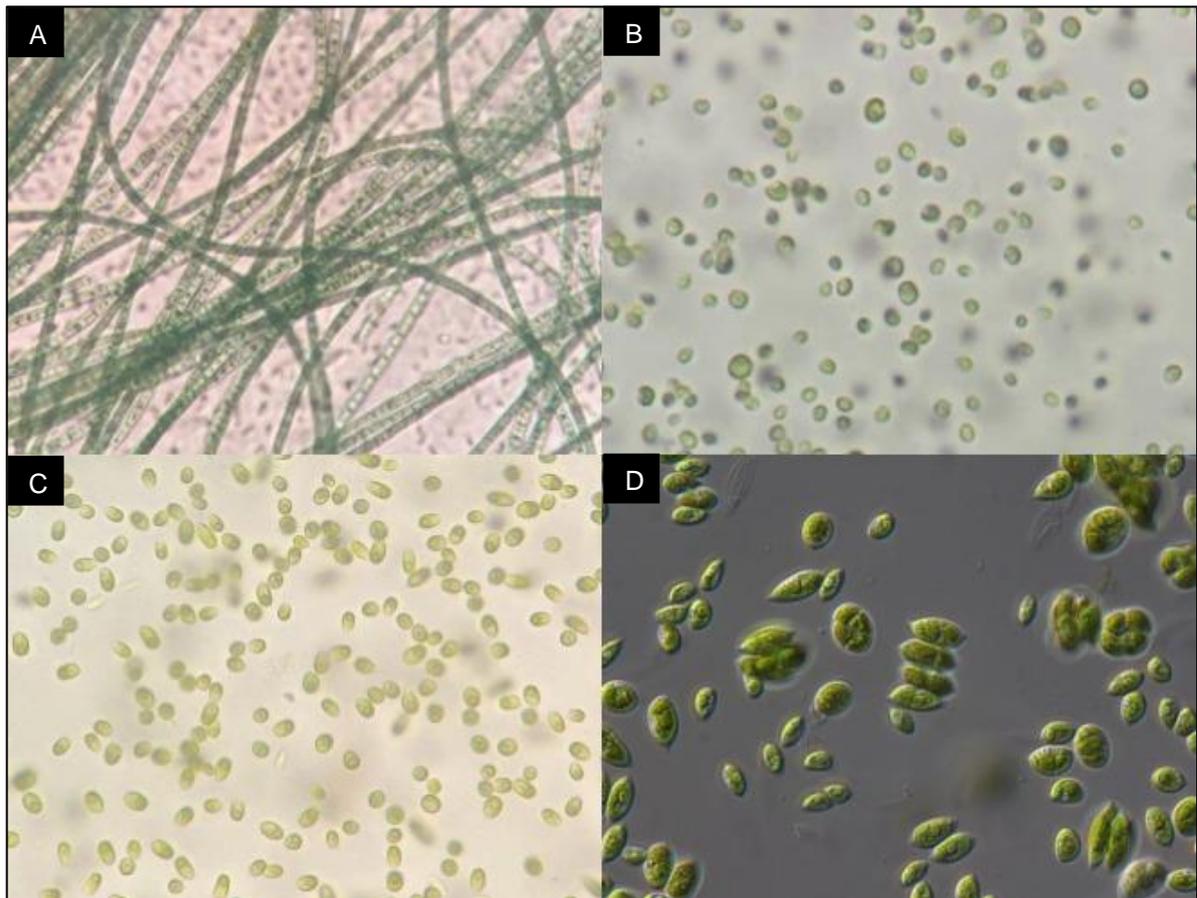
O gênero *Arthrospira*, pertencente à família Phormidiaceae, inclui um grupo de cianobactérias filamentosas que possuem uma disposição celular em espiral envolta por uma fina camada de proteção, cujas paredes transversais são visíveis ao microscópio (Figura 2A). Coloração verde, tricomas não ramificados e a presença de septos entre as células são características típicas do grupo (ARAÚJO; FACCHINETTI; SANTOS, 2003). Vários estudos têm se concentrado no potencial dessa cianobactéria como fonte de compostos bioativos que ajudam a diminuir o risco de doenças crônicas (RAPOSO; DE MORAIS, 2015). Além disso, a espécie *Arthrospira platensis* está ganhando cada vez mais relevância como um agente antimicrobiano natural, além de apresentar atividades anti-inflamatórias, antioxidante, anti-toxicidade, anticoagulantes, antineoplásica e antiprotozoárias (SUBHASHINI et al., 2004; KOKOU et al., 2012; ALIANÇA et al., 2014; ABOMOHRRA et al., 2016; EBAID et al., 2017; SILVA-JÚNIOR et al., 2019).

A *Chlorella vulgaris* pertence à família Oocystaceae e exibe uma morfologia esférica, com tamanho que varia entre 2 e 10 µm de diâmetro (Figura 2B). Produz pigmentos fotossintéticos com capacidade de utilização entre os mais variados setores, desde o alimentício ao medicinal (LIU et al., 2015; NURACHMAN et al., 2015). Demonstrando uma significativa capacidade fotossintética, esta alga verde é rica em micronutrientes, clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos. Somado a isso, a *C. vulgaris* é uma espécie de grande interesse biológico e farmacológico, possuindo propriedades de proteção contra o estresse oxidativo, processos cancerígenos e doenças crônicas (PANHAI et al., 2015).

A espécie de alga verde pertencente à família Dunaliellaceae, denominada *Dunaliella tertiolecta*, apresenta um tamanho que pode variar de 3 a 13 µm de largura e 5 a 25 µm de comprimento (Figura 2C). Uma importante característica da espécie é a sua grande capacidade de tolerância a altas concentrações de sal, permitindo o crescimento em meios salinos que seriam inóspitos para a maioria dos

organismos, diminuindo assim a probabilidade de contaminação do cultivo (BINTE-SAFIE et al., 2018). Segundo Skjanes et al. (2013), esta microalga é uma fonte de compostos farmacêuticos, tais como betacaroteno, luteínas, ácido linoleico, além de vitaminas C e E. Os autores mencionam que testes farmacológicos realizados com *D. tertiolecta* demonstraram atividades anti-hipertensivas, broncodilatadoras, efeitos antiserotónérgicos, bloqueio polissináptico e efeitos analgésicos.

**Figura 2.** Células dos microrganismos fotossintetizantes observados em microscópio óptico (40x).



**Fonte:** Imagens A, B e C: acervo pessoal; Imagem D: Culture collection of algae and protozoa.

**Legenda:** A: *Arthrospira platensis*; B: *Chlorella vulgaris*; C: *Dunaliella tertiolecta*; D: *Tetradismus obliquus*.

Apesar dos estudos que demonstram as diversas atividades biológicas dos microrganismos fotossintetizantes (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; ATHIBI; AL-MAYAH; KHALAF, 2014; EL GAMAL, 2010; LAURITANO et al., 2016), poucas espécies foram exploradas havendo pouco conhecimento sobre o potencial terapêutico desse grupo (LAURITANO et al., 2016; YAMTHE et al., 2017), sendo necessário mais estudos que avaliem a capacidade de se tornarem potenciais terapêuticos, inclusive para as leishmanioses. Diante disso, esta pesquisa tem como

proposta a realização de estudos *in vitro* acerca do potencial terapêutico de extratos bioativos provenientes de microrganismos fotossintetizantes para o tratamento das leishmanioses.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o potencial terapêutico de extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes contra diferentes espécies do gênero *Leishmania* spp.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes em células mononucleares do sangue periférico de humanos;

b) Avaliar a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes em formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*;

c) Avaliar a produção das citocinas dos perfis Th1 e Th2 em sobrenadante de cultura de PBMC humano;

d) Analisar a produção de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de PBMC humano;

e) Comparar os índices de seletividade e atividade imunomodulatória dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes com as drogas de referência para o tratamento das leishmanioses.

### 4. METODOLOGIA

#### 4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS NATURAIS

A cianobactéria *Arthrospira platensis* (Utex, 1926) e as microalgas *Chlorella vulgaris* (Utex 1803) e *Dunaliella tertiolecta* (Utex, 1644) foram selecionados

a partir da coleção de cultura da Universidade do Texas (Utex, 2010). A microalga *Tetrademus obliquus* (SISGEN A5F5402) foi isolada do açude de Apipucos em Recife-PE. Estes microrganismos fotossintetizantes foram obtidos a partir da parceria com a equipe da Dra. Raquel Pedrosa Bezerra da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Os cultivos das microalgas foram realizados em uma concentração celular inicial de 50mg/mL, com seus respectivos meios de cultura (Bold's basal e BG11) em um volume de 400 mL, a uma temperatura de aproximadamente 28°C e iluminância de 24μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. O cultivo da cianobactéria foi realizado sob condições autotróficas em frascos de Erlenmeyers com volume de cultivo de 100 mL de meio padrão Schlösser, descrito por Schlösser (1982), em mesa agitadora com frequência de agitação de 100 rpm, em uma concentração celular inicial de 50 mg/mL, temperatura de aproximadamente 28°C e iluminância de 24 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

A concentração celular foi determinada por turbidimetria utilizando uma curva de calibração em função da biomassa seca. Após a finalização do cultivo, a biomassa foi liofilizada, ressuspensa em um tampão Tris HCL 0,1M e então as proteínas foram extraídas pelo método de ultrassonicação, através de 20 pulsos de 60 segundos com intervalo de 60 segundos entre cada pulso. Após centrifugação para obtenção do sobrenadante proteico, a dosagem das proteínas foi realizada utilizando o kit BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo-Scientific).

#### 4.2 CULTIVO DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

As formas promastigotas das espécies de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) e *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram cultivadas e expandidas em meio Schneider (SIGMA) com 10% de soro bovino fetal (SBF) até a fase de crescimento exponencial.

#### 4.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL

Para obtenção do antígeno solúvel de *L. infantum* (*L. infantum soluble antigen: LSA-Li*), a massa parasitária foi submetida a três lavagens em Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate Buffered Saline: PBS*) (pH 7,2) a partir de centrifugação à 1000 x g, durante 10 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -20°C. O *pellet* resultante foi ressuspensa em 1mL de PBS para cada 1x10<sup>9</sup> parasitos. Em seguida, foram acrescentados 10mg de inibidor de proteases (*Phenylmethyl-Sulfonyl Floride: PMSF*) para cada 1mL da solução. As células foram submetidas a

rápidos ciclos de congelamentos (-197°C) em nitrogênio líquido e descongelamentos (40°C) em banho-maria. Posteriormente, a suspensão celular foi submetida ao processo de ultrassonicação, três pulsos de 60 segundos sob 40W, e então centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e, posteriormente, foi estocado à -80°C para utilização nos ensaios de cultura celular.

#### 4.4 OBTENÇÃO DE PBMC HUMANO

Para a obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*: PBMC), foram coletados, aproximadamente, 20mL de sangue de seis humanos saudáveis (VIANA et al., 2018) em tubos à vácuo com heparina.

Após a coleta, o sangue heparinizado foi adicionado ao Ficoll-hypaque juntamente com PBS (pH 7,2) na proporção de 1:3, posteriormente foi submetido à centrifugação a 900 x g, sem freio, durante 30 minutos a fim de obter o anel de PBMC. As células foram lavadas duas vezes em PBS e, então, ressuspendidas em 1mL de meio RPMI 1640. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan (1:10). O valor de células obtido foi ajustado para a concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL através da adição de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA DE 50% (CC<sub>50</sub>)

Para a realização dos ensaios de CC<sub>50</sub>, PBMC de humanos saudáveis foram cultivados em placas de 96 poços, contendo  $1 \times 10^6$  células/mL em 200µL, com o tratamento dos extratos bioativos e as drogas de referência (Glucantime® e Milteforan™) em concentrações que variaram de 1000 a 62,5 µg/mL. Após incubação durante 24 horas, foi realizada uma centrifugação à 2500 x g durante 5 minutos (BASAK et al., 2017). O sobrenadante foi então descartado e o método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide), na concentração de 1mg/mL, foi realizado para avaliar a viabilidade celular, através da leitura em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 540nm (MOSMANN, 1983).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (IC<sub>50</sub>)

Para a realização dos ensaios de IC<sub>50</sub>, as formas promastigotas das espécies de *L. infantum* e *L. braziliensis* foram cultivadas em placas de 96 poços, 1x10<sup>6</sup> células/mL e 3x10<sup>6</sup> células/mL, respectivamente, com o tratamento dos extratos bioativos e com as drogas de referência. Para os extratos bioativos foram utilizadas concentrações que variaram de 500 a 15,6 µg/mL (COMANDOLLI-WYREPkowski et al., 2017) e para as drogas de referência as concentrações variaram de 250 a 7,8 µg/mL para o Glucantime® e 4 a 0,1 µg/mL para o Milteforan™ (MORAIS-TEIXEIRA et al., 2011). Após a incubação em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (*Biochemical Oxygen Demand: BOD*) por 48 horas à uma temperatura de 26°C (KHADEM VATAN et al., 2017), as promastigotas foram avaliadas e quantificadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscopia óptica.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICES DE SELETIVIDADE (IS)

Os índices de seletividade dos extratos foram determinados pela razão entre o valor da CC<sub>50</sub> e o valor da IC<sub>50</sub>, sendo considerados promissores os extratos que apresentaram IS > 10,0 ou com CC<sub>50</sub> elevada e IC<sub>50</sub> baixa (WENIGER et al., 2001; SHARIFI et al., 2018). Após a determinação, os IS dos extratos foram comparados aos IS das drogas de referência (Glucantime® e Milteforan™) a fim de observar se os extratos são mais seletivos ao parasito sem causar danos à viabilidade das células humanas.

#### 4.8 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE

Para análise da resposta imune, seis indivíduos saudáveis, sem sinais clínicos, que não receberam transfusão sanguínea e que foram negativos nos testes moleculares realizados para as leishmanioses foram enquadrados na pesquisa.

As culturas de PBMC humano foram realizadas em placas de 48 poços de poliestireno, contendo 5x10<sup>5</sup> células/poço. As células foram estimuladas com o mitógeno Fitohemaglutinina (PHA) (10 µg/mL), o LSA-*Li* (25 µg/mL) e tratadas com as drogas de referência (Glucantime® e Milteforan™), além dos dois extratos que apresentaram os melhores resultados na inibição dos parasitos de *L. infantum*, a partir dos dados obtidos nos experimentos descritos anteriormente. As concentrações das drogas de referência e dos extratos bioativos foram os valores da CC<sub>50</sub>, ½ da CC<sub>50</sub>, ¼ da CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> obtidos. Os poços contendo células sem estímulo ou tratamento foram

consideradas como o controle negativo e o estímulo PHA como controle positivo. Posteriormente, as células foram incubadas por 48 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após o tempo de cultivo, foi realizada uma centrifugação de 1.800 x g durante 10 minutos. Em seguida, 300µL dos sobrenadantes foram coletados e estocados à -20°C para a dosagem das citocinas e óxido nítrico (*Nitric Oxide*: NO).

#### 4.8.1 Avaliação da Produção de Citocinas

A partir do sobrenadante do cultivo de PBMC, foi realizada a dosagem da produção de citocinas (IFN-γ, TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) utilizando o kit *BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine* (Becton Dickinson). Uma curva padrão foi preparada com diluição até 1:256. As *beads* de captura foram misturadas e adicionadas nos tubos de ensaio, logo após, cada amostra foi adicionada, seguida do reagente de detecção. Os tubos foram incubados durante três horas à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, foi realizado o processo de lavagem com PBS e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O *pellet* de *beads* foi ressuspendido em 300µL de solução tampão. A aquisição de 1800 eventos foi realizada no Citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson), presente no Núcleo de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ-PE, conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram analisados utilizando o *software* FCAP Array 3.0 (Becton Dickinson) e expressos pela subtração obtida entre as culturas com tratamento e as culturas sem tratamento.

#### 4.8.2 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico

A produção de NO foi avaliada indiretamente a partir da medição do nitrito nos sobrenadantes das culturas de PBMC humano, através da reação de Griess (Resende et al., 2013). Os estímulos (LSA-Li, Glucantime, Miltefosina e os extratos bioativos) foram comparados ao controle negativo (PBMC sem estímulo).

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinação do valor da CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> foram realizados os cálculos de sobrevivência e inibição celular. Diante do valor de inibição, foi realizada uma análise de regressão por PROBIT através do *software* IBM SPSS Statistic 25, em que foi selecionado a concentração que inibiu 50% das células dos hospedeiros humanos e das espécies de *Leishmania*.

Por meio da estatística descritiva, foram realizadas análises comparativas. Foi aplicada o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e para comparações entre dois grupos foi realizado o teste T de Student, quando paramétricos, ou teste de Mann-Whitney, quando não paramétricos. Enquanto a comparação entre mais de dois grupos foi realizada por análise de variância ANOVA One-way com Pós Teste de Tukey (paramétrico) ou Kruskal-Wallis com Pós-Teste de Dunns (não paramétrico).

As análises de correlação entre as citocinas foram realizadas através do teste de Pearson, quando paramétricos, e teste de Spearman, quando não paramétricos. As aplicações de todos os testes foram realizadas através do *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. 2007, San Diego, CA, USA), sendo considerada a diferença estatística significativa quando *p-value* < 0,05.

#### 4.10 QUESTÕES ÉTICAS, FINANCEIRAS E ESTRUTURAIS

Em todos os procedimentos de coleta do material biológico, os participantes foram convidados a participar da pesquisa e assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando a utilização do material coletado para fins científicos. Além disso, este estudo está inserido no projeto “Avaliação do potencial imunomodulador e profilático de novos antígenos de *Leishmania spp.* candidatos ao desenvolvimento de novas terapias e/ou vacinas contra as leishmanioses”, que possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IAM/FIOCRUZ-PE (parecer nº 4.077.060 CAAE: 89972718.8.0000.5190), (ANEXO A).

Todos os processos de cultivo e obtenção dos extratos bioativos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Enquanto os demais experimentos foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia (LIMP) do Departamento de Imunologia e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ-PE, durante o período de agosto de 2020 a agosto de 2022.

O projeto obteve financiamento próprio APQ FACEPE: 08562.11/22, PROEP IAM – 005-22-2-38, CNPq/PROEP/FIOCRUZ – 400711/2019-2.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA DE 50% (CC<sub>50</sub>)

Nos resultados de viabilidade celular obtidos em PBMC humano, foi observado que os extratos de *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris* apresentaram os maiores valores de CC<sub>50</sub>, 986,11 µg/mL e 999,66 µg/mL respectivamente, mostrando que foram os extratos que causaram a menor toxicidade em células humanas (Figura 3). Já o extrato de *Tetrademus obliquus* apresentou valor de 659,57 µg/mL e o extrato de *Dunaliella tertiolecta* demonstrou o menor valor (252,55 µg/mL).

Analisando as drogas de referência, o Milteforan™ (MTF - Miltefosina) apresentou uma CC<sub>50</sub> de 159,59 µg/mL, demonstrando alta toxicidade ao PBMC humano e, por sua vez, o valor para o Glucantime® (Sb<sup>V</sup> - Antimonial Pentavalente) foi de 412,46 µg/mL. A Tabela 2 expressa os valores de CC<sub>50</sub>.

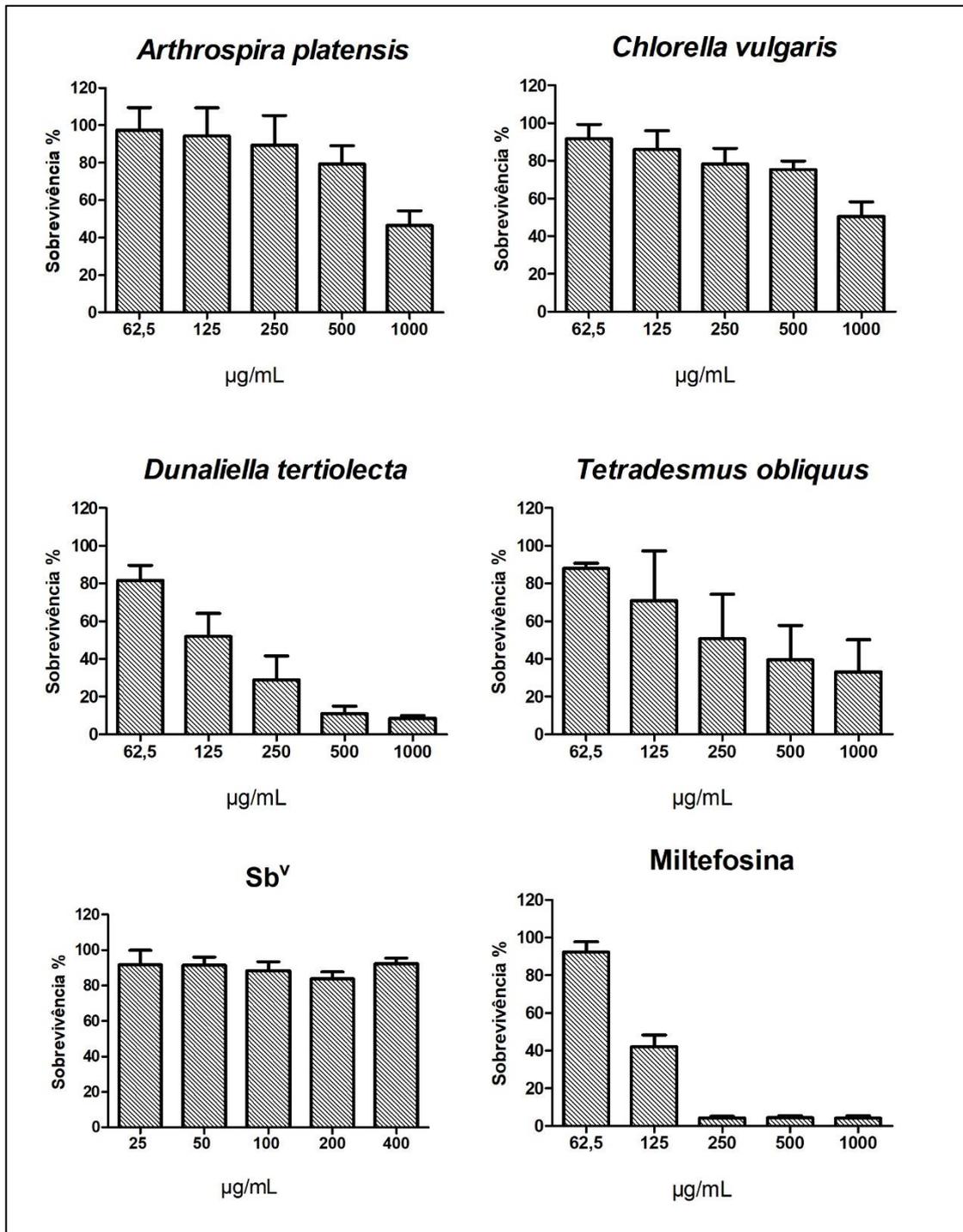
**Tabela 2.** Concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) dos extratos bioativos e drogas de referências em células humanas.

CC <sub>50</sub> (µg/mL)					
<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Tetrademus obliquus</i>	Sb <sup>V</sup>	MTF
986,11	999,66	252,55	659,57	412,46	159,49

Fonte: a autora.

Legenda: Sb<sup>V</sup>: antimonial pentavalente. MTF: miltefosina.

**Figura 3.** Taxa de sobrevivência das células humanas tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e com as drogas de referência.



Fonte: a autora.

Legenda: Sb<sup>v</sup>: antimonia pentavalente.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% (IC<sub>50</sub>) PARA PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* SPP.

Ao avaliar os valores de IC<sub>50</sub> para promastigotas de *L. infantum* observou-se que o extrato de *Dunaliella tertiolecta* apresentou uma IC<sub>50</sub> de 53,75 µg/mL, indicando ser o extrato com maior atividade contra *L. infantum* (Figura 4). Observou-se que o extrato de *Arthrospira platensis* apresentou o maior valor (259,2 µg/mL), indicando ser o extrato menos tóxico. Por sua vez, os extratos de *Chlorella vulgaris* e *Tetrademus obliquus* apresentaram valores de IC<sub>50</sub> de 192,12 µg/mL e 224,42 µg/mL, respectivamente. As drogas de referência, Sb<sup>V</sup> e MTF, apresentaram 195,15 µg/mL e 1,23 µg/mL, respectivamente, este último demonstrando a maior atividade leishmanicida.

Por outro lado, para os ensaios com *L. braziliensis*, observou-se que o extrato bioativo de *Chlorella vulgaris* apresentou uma IC<sub>50</sub> de 144,93 µg/mL, indicando ter a maior atividade inibitória entre os extratos estudados (Figura 5). Por sua vez, o extrato de *Arthrospira platensis* apresentou uma IC<sub>50</sub> de 279,96 µg/mL, o extrato de *Dunaliella tertiolecta* demonstrou uma IC<sub>50</sub> de 284,41 µg/mL e o extrato de *Tetrademus obliquus* indicou um valor de 233,94 µg/mL. As drogas de referência, Sb<sup>V</sup> e MTF, apresentaram 119,46 µg/mL e 1,02 µg/mL, respectivamente, este último demonstrando a maior atividade leishmanicida para a espécie. A Tabela 3 expressa os valores de IC<sub>50</sub>.

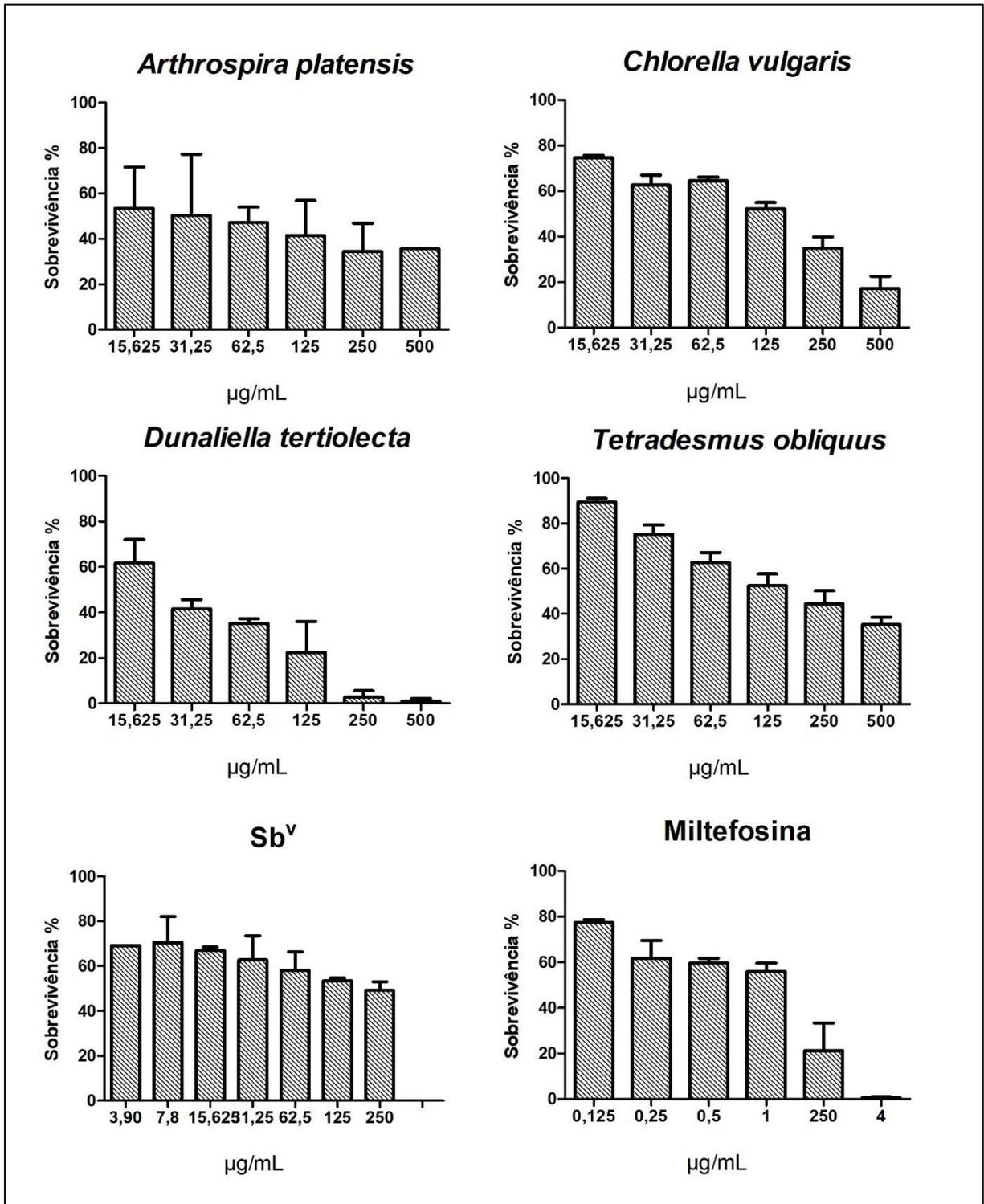
**Tabela 3.** Valores de concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) para formas promastigotas de *L. infantum* e *L. braziliensis* frente aos extratos e drogas de referências.

	IC <sub>50</sub> (µg/mL)					
	<i>A. platensis</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>T. obliquus</i>	Sb <sup>V</sup>	MTF
<i>L. infantum</i>	259,2	192,12	53,75	224,42	195,15	1,23
<i>L. braziliensis</i>	279,96	144,93	284,41	233,94	119,76	1,02

Fonte: a autora.

Legenda: Sb<sup>V</sup>: antimonial pentavalente. MTF: miltefosina.

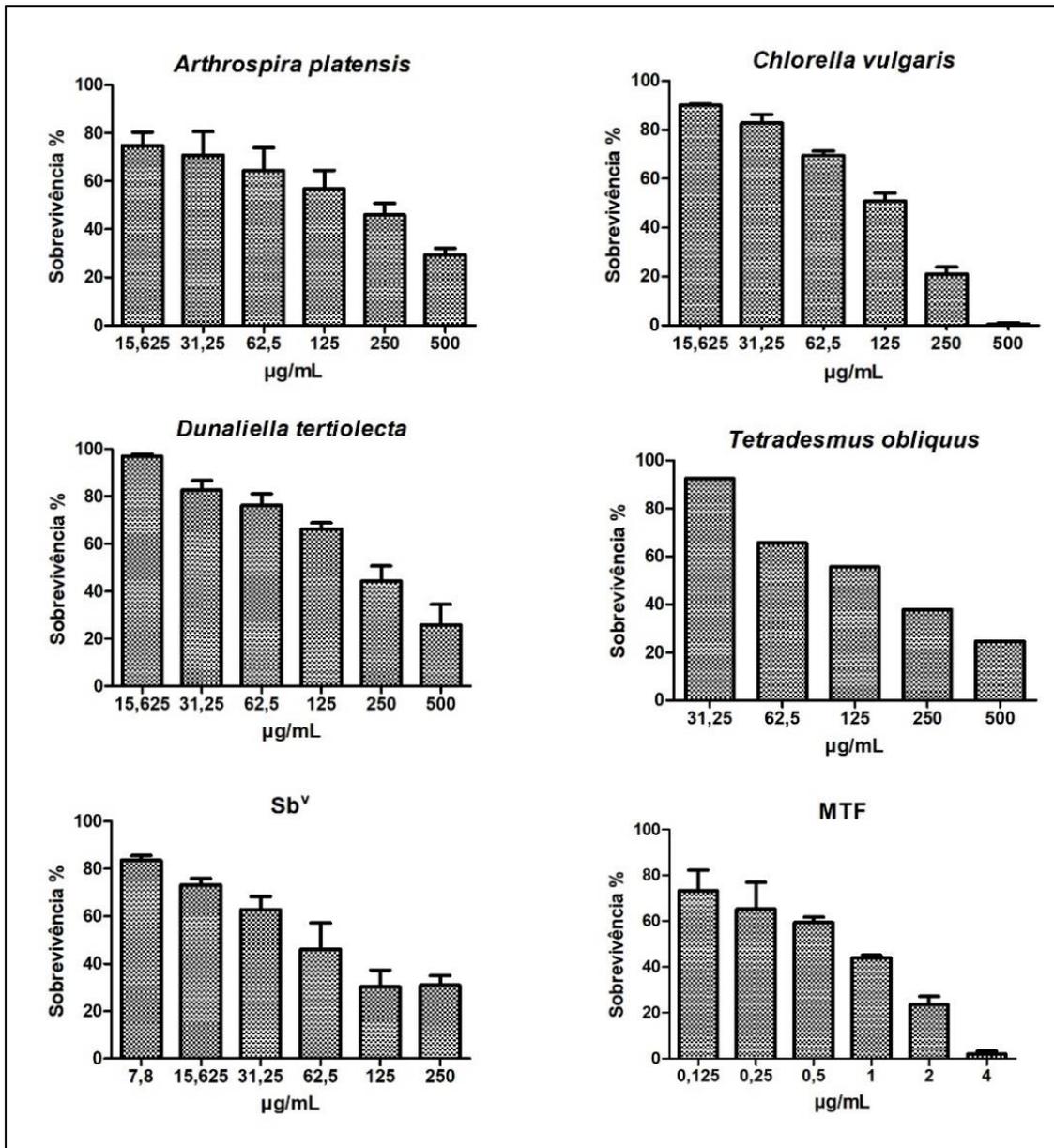
**Figura 4.** Taxa de sobrevivência das promastigotas de *L. infantum* tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e com as drogas de referência.



**Fonte:** a autora.

**Legenda:** Sb<sup>v</sup>: antimonia pentavalente.

**Figura 5.** Taxa de sobrevivência das promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes e com as drogas de referência.



**Fonte:** a autora.

**Legenda:** Sb<sup>v</sup>: antimonia pentavalente. MTF: Miltefosina.

### 5.3 COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE SELETIVIDADE

Ao avaliar os índices de seletividade (IS) dos extratos para *L. infantum*, a *C. vulgaris* apresentou o melhor resultado, tendo IS=5,2 e indicando ser cerca de 5 vezes mais seletiva ao parasito do que às células humanas. Enquanto o extrato de *A. platensis*, *D. tertiolecta* e *T. obliquus* demonstraram, respectivamente, IS= 3,8, IS=4,7 e IS=2,94.

Para as drogas de referências, os resultados demonstraram que o Sb<sup>v</sup> possui baixa seletividade ao parasito, tendo IS=2,11 para *L. infantum*. Já a MTF

apresenta IS=129,6 indicando ser altamente seletivo para as promastigotas de *L. infantum*.

Ao avaliar os IS dos extratos para *L. braziliensis*, a *C. vulgaris* apresentou o melhor resultado, tendo IS= 6,89 e indicando ser cerca de 6 vezes mais seletiva ao parasito do que às células humanas. Enquanto o extrato de *A. platensis*, *D. tertiolecta* e *T. obliquus* demonstraram, respectivamente, IS= 3,52, IS=0,89 e IS=2,82.

Para as drogas de referências, os resultados demonstraram que o Sb<sup>V</sup> possui baixa seletividade ao parasito, tendo IS=3,45 para *L. braziliensis*. Já a MTF apresenta IS=156,36 para células humanas, indicando ser altamente seletivo para as promastigotas de *L. braziliensis*. A Tabela 6 expressa os índices de seletividade.

**Tabela 4.** Índice de seletividade dos extratos bioativos e drogas de referências para *L. infantum* e *L. braziliensis*.

	IS					Sb <sup>V</sup>	MTF
	<i>A. platensis</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>T. obliquus</i>			
<i>L. infantum</i>	3,80	5,20	4,70	2,94		2,11	129,60
<i>L. braziliensis</i>	3,52	6,89	0,89	2,82		3,45	156,36

**Fonte:** a autora.

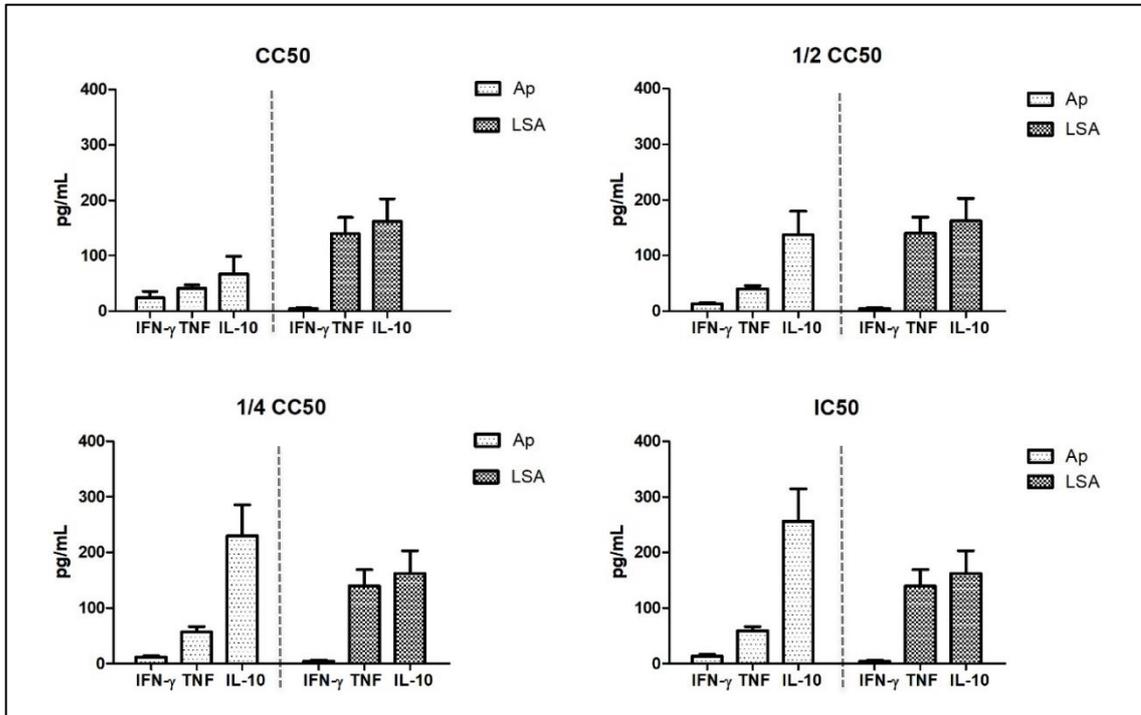
**Legenda:** IS: índice de seletividade; Sb<sup>V</sup>: antimonial pentavalente; MTF: miltefosina.

## 5.4 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE

### 5.4.1 Avaliação da Produção de Citocinas

Foi possível observar que os extratos de *A. platensis* e *D. tertiolecta* induziram a produção de citocinas do perfil Th1 em todas as concentrações estudadas (Figura 6 e 7). Além disso, os extratos induziram a produção da citocina IL-10 (perfil Th2) de forma dose-dependente, apresentando diminuição gradativa de acordo com o aumento da concentração dos extratos, havendo uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações, tanto para o extrato de *A. platensis* (*p-value*: 0,031) como para o extrato de *D. tertiolecta* (*p-value*: 0,007).

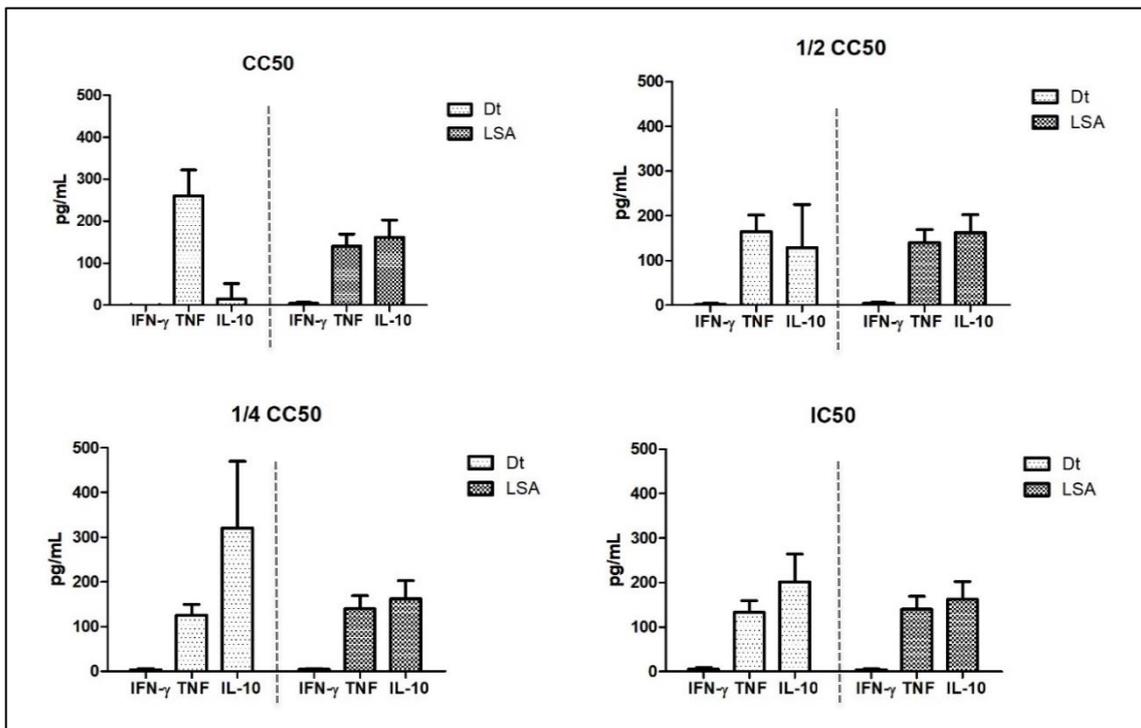
**Figura 6.** Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o extrato bioativo de *Arthrospira platensis*.



Fonte: a autora.

**Legenda:** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); LSA-Li (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum*); Ap (*Arthrospira platensis*). \* ( $p$ -value < 0,05).

**Figura 7.** Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o extrato bioativo de *Dunaliella tertiolecta*.



Fonte: a autora.

**Legenda:** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); LSA-Li (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum*); Dt (*Dunaliella tertiolecta*). \* ( $p$ -value < 0,05).

Ao comparar os resultados obtidos do extrato de *A. platensis* com o LSA-Li, foi observado que houve uma resposta protetora Th1 com estímulo à produção de IFN- $\gamma$  maior do que a estimulada pelo LSA-Li em todas as concentrações, havendo diferença estatística significativa para a concentração da IC<sub>50</sub>, com p-value igual a 0,032. Em relação ao TNF, o LSA-Li induziu maiores níveis estatisticamente significativos quando comparado às concentrações do extrato.

Por sua vez, comparando o extrato de *D. tertiolecta* com o LSA-Li, observou-se que houve uma resposta protetora Th1 em todas as concentrações, com estímulo de TNF semelhante ao observado com o LSA-Li. Além disso, o extrato induziu a produção de IL-10 (p-value: 0,002) e IFN- $\gamma$  (p-value: 0,008) inferior ao LSA-Li na concentração de CC<sub>50</sub>. A Tabela 4 apresenta os valores médios da produção das citocinas após o estímulo com as concentrações de cada extrato estudado.

**Tabela 5.** Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células tratadas com os extratos de *Arthrospira platensis* e *Dunaliella tertiolecta*.

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

**Fonte:** a autora.

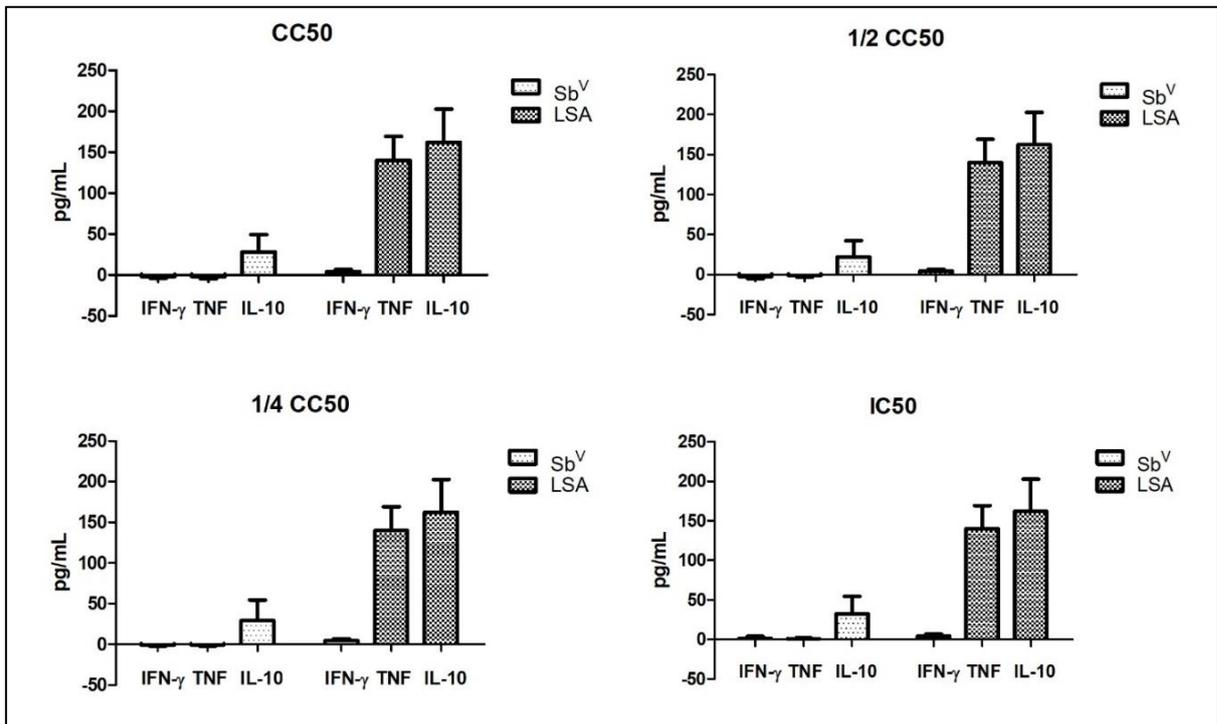
**Legenda:** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); \* (p-value < 0,05).

Ao analisar a correlação das citocinas e dos extratos, observou-se que nas concentrações da CC<sub>50</sub> e ½ da CC<sub>50</sub> do extrato de *A. platensis*, as citocinas TNF e IL-4 apresentaram uma correlação negativa forte estatisticamente significativa (r: -0,92; p-value: 0,02) e positiva (r: 0,97; p-value: 0,01), respectivamente. Já para o extrato de *D. tertiolecta*, houveram correlações fortes nas concentrações da CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>, porém nenhuma estatisticamente significativa.

Em relação ao estímulo da produção de citocinas pelas drogas de referência, foi possível observar uma supressão imunológica (Figura 8 e 9), exceto para TNF que apresentou uma maior produção pelas células estimuladas com a concentração de  $\frac{1}{4}$  da  $CC_{50}$  da MTF, além da citocina IL-10 que foi produzida pelas células estimuladas com todas as concentrações do  $Sb^V$  e na concentração de  $IC_{50}$  da MTF. A Tabela 5 apresenta os valores médios da produção das citocinas em cada concentração das drogas de referência.

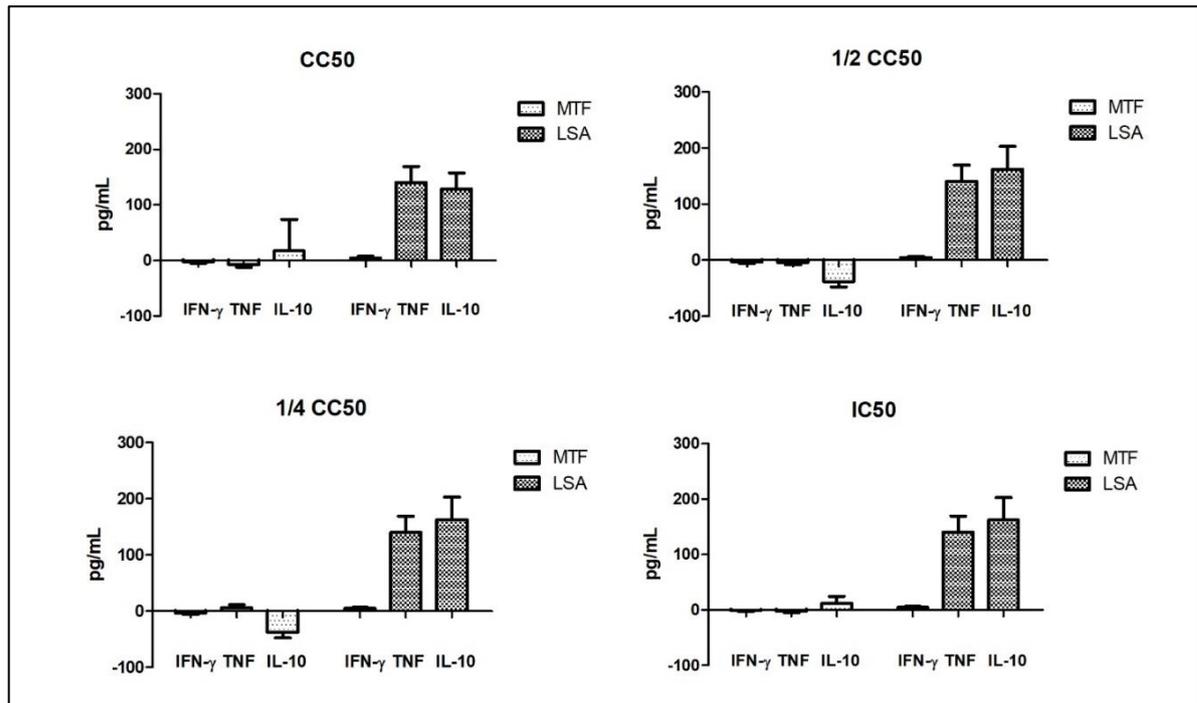
Ao analisar a correlação entre as citocinas para o  $Sb^V$ , observou-se que houveram correlações fortes nas concentrações de  $\frac{1}{2}$  da  $CC_{50}$  e  $\frac{1}{4}$  da  $CC_{50}$ , mas nenhuma estatisticamente significativa. Já para a MTF, foi possível observar correlações negativas fortes estatisticamente significativas entre IL-4 e IL-2 na concentração da  $CC_{50}$  ( $r: -0,97$ ;  $p\text{-value: } 0,03$ ) e entre TNF e IL-10 na concentração da  $IC_{50}$  ( $r: -0,99$ ;  $p\text{-value: } 0,01$ ).

**Figura 8.** Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o  $Sb^V$ .



Fonte: a autora.

**Legenda:** CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); LSA-Li (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum*);  $Sb^V$  (antimonial pentavalente). \* ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

**Figura 9.** Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com a MTF.

Fonte: a autora.

Legenda: CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); LSA-Li (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum*); MTF (Miltefosina). \* (*p-value* < 0,05).

**Tabela 6.** Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células tratadas com as drogas de referência.

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

Fonte: a autora.

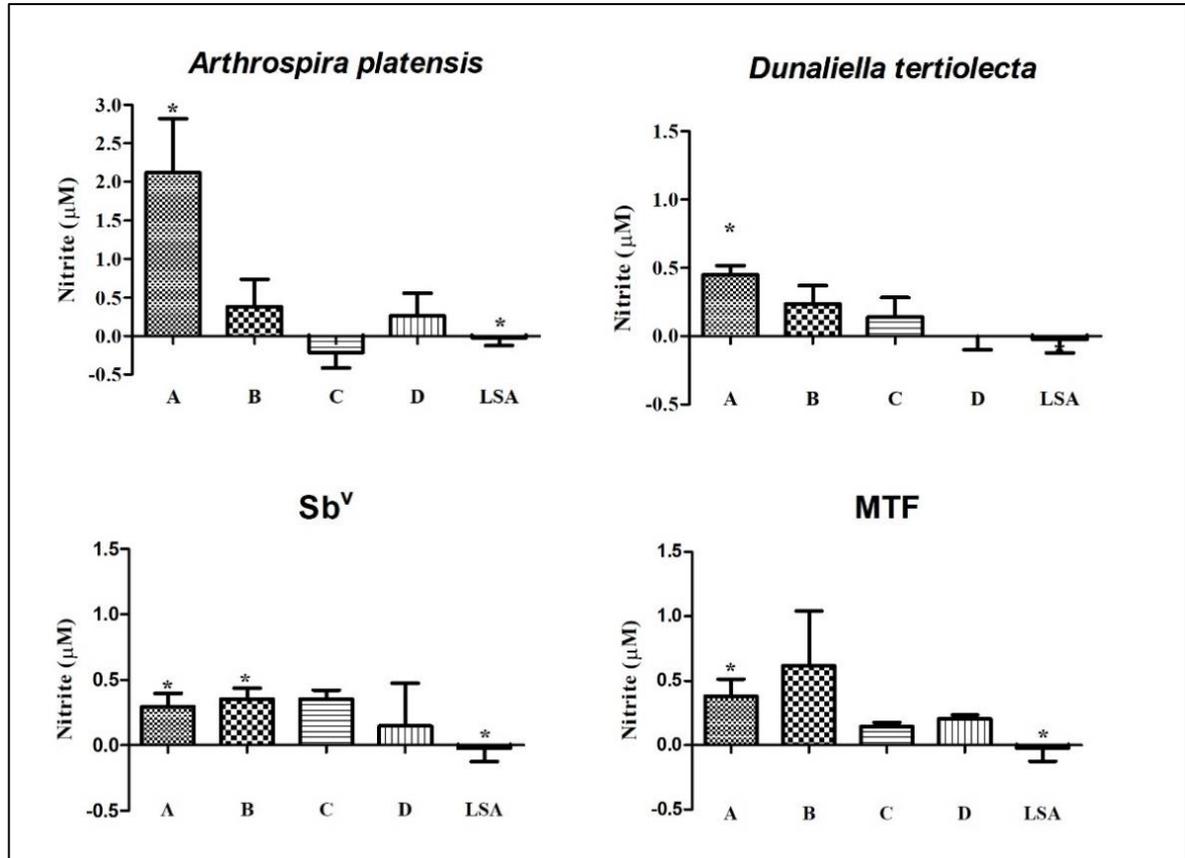
Legenda: CC<sub>50</sub> (Concentração Citotóxica de 50%); IC<sub>50</sub> (Concentração Inibitória de 50%); Sb<sup>V</sup>: antimonial pentavalente. MTF: miltefosina.

#### 5.4.2 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico

Nos resultados do extrato de *A. platensis*, foi possível observar que houve uma maior produção de NO nas concentrações da  $CC_{50}$ ,  $\frac{1}{2}$  da  $CC_{50}$  e no valor da  $IC_{50}$  quando comparado às células sem estímulo. Já para *D. tertiolecta* foi observado uma maior produção nas concentrações da  $CC_{50}$ ,  $\frac{1}{2}$  da  $CC_{50}$  e  $\frac{1}{4}$  da  $CC_{50}$ . Além disso, ambos os extratos demonstraram uma maior produção quando comparados às células estimuladas com LSA-Li, o qual demonstrou uma redução na produção de NO. Foi possível observar também que a dosagem de NO foi diretamente proporcional à concentração do estímulo (Figura 10). Diferenças estatísticas significativas são observadas na maior concentração de cada extrato e no LSA-Li (*A. platensis*: p-value= 0,017; *D. tertiolecta*: p-value=0,005).

As drogas de referência também apresentaram uma produção de NO maior quando comparado às células sem estímulo e as estimuladas com o LSA-Li. Entretanto, não houve proporcionalidade entre as dosagens e concentrações (Figura 10). Para o  $Sb^V$ , houve uma diferença estatística significativa nas concentrações de  $\frac{1}{2}$  da  $CC_{50}$  (p-value: 0,028) e  $\frac{1}{4}$  da  $CC_{50}$  (p-value: 0,023) nas células estimuladas com LSA-Li, já para a MTF, houve uma diferença estatística significativa entre a  $CC_{50}$  e LSA-Li (p-value: 0,041).

**Figura 10.** Dosagem indireta do NO após os estímulos das células com os extratos bioativos e drogas de referência.



**Fonte:** a autora.

**Legenda:** Sb<sup>v</sup>: antimonia pentavalente; MTF: miltefosina; A (valor da CC<sub>50</sub>); B (metade do valor da CC<sub>50</sub>); C (um quarto do valor da CC<sub>50</sub>); D (valor da IC<sub>50</sub>) e LSA-Li (Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* – 25µg/mL); \* = p-value <0,05.

## 5.5 COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA

Ao comparar a atividade imunomodulatória dos extratos bioativos com as drogas de referência, foi possível observar que os extratos induziram a produção de citocinas do perfil protetor para a LV, além de induzir uma redução gradativa da citocina IL-10 (perfil de susceptibilidade) a partir do aumento das concentrações dos extratos. Enquanto as drogas de referência demonstraram indução de uma supressão imunológica, indicando um perfil de susceptibilidade para a LV.

Em relação a produção de NO, nas células tratadas com os extratos bioativos houve uma produção um pouco maior quando comparado às células sem estímulo e as estimuladas com o LSA-Li. Além disso, foi possível observar uma produção diretamente proporcional à concentração. Por sua vez, as drogas de referência também apresentaram um estímulo para a produção de NO quando

comparadas às células sem estímulo e estimuladas com o LSA-*Li*, entretanto, não houve proporcionalidade entre a produção e concentração.

## 6. DISCUSSÃO

Um critério bastante importante na busca de novos compostos com atividade terapêutica para as leishmanioses é a baixa toxicidade para as células mamíferas (BHARGAVA; SINGH, 2012). Partindo desse ponto, todos os extratos bioativos indicam que são pouco tóxicos, principalmente quando comparados com as drogas de referência. Inclusive, esses extratos de microrganismos fotossintetizantes demonstraram valores de  $CC_{50}$  mais elevados do que outros organismos marinhos, como o de *Dictyota lamouroux* que apresentou uma  $CC_{50}$  de 233,10  $\mu\text{g/mL}$  (ALIANÇA et al., 2014). As espécies *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris* demonstraram os melhores resultados quanto à citotoxicidade, sendo considerados os menos tóxicos.

Quanto à atividade antiparasitária em *L. infantum*, o extrato da *Dunaliella tertiolecta* foi o mais promissor entre os extratos bioativos, apresentando o menor valor de  $IC_{50}$  entre os microrganismos estudados. Comparando com dados da literatura, Sousa et al. (2017) demonstraram que um dos compostos meroditerpenóide extraído da macroalga *Cystoseira baccata* apresentou uma  $IC_{50}$  de 94,4  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando que o extrato de *Dunaliella tertiolecta* tem uma maior atividade contra promastigotas de *L. infantum*. Por sua vez, ao analisar a atividade em *L. braziliensis*, a espécie *Chlorella vulgaris* foi a que mais se destacou entre os extratos, apresentando a maior atividade leishmanicida. Ao observar dados da literatura, Correia et al. (2019) demonstraram que o extrato vegetal de *Myrciaria dubia* apresentou efeito contra promastigotas de *L. braziliensis* ( $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ ), no entanto, a  $IC_{50}$  ainda foi maior que ao demonstrado pelo extrato de *C. vulgaris*.

Em relação ao índice de seletividade (IS) para células humanas, o extrato de *C. vulgaris* apresentou um IS acima de 6, indicando ser cerca de seis vezes mais tóxico para promastigotas de *L. braziliensis* do que para as células humanas, sugerindo ser um possível candidato terapêutico. No estudo de Aliança et al. (2014), a espécie *Dictyota mertensii* demonstrou ser cerca de 3 vezes mais seletivo para as células de *Leishmania*, inibindo o crescimento e a viabilidade das formas promastigotas. Esses dados, corroboram com o resultado obtido com o extrato de *C. vulgaris*. Além disso, ao comparar os índices de seletividade obtidos, o extrato de *A.*

*platensis* e *C. vulgaris* apresentaram uma maior seletividade ao parasito do que todos os compostos relatados por Clementino et al. (2020) durante o estudo sobre a atividade leishmanicida de algas marrons em *L. amazonensis*.

Apesar dos extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes não ultrapassarem o valor indicado ( $IS > 10$ ) para considerá-los promissores, não se pode descartar a possibilidade de uma atividade imunomodulatória desses extratos. Os bons resultados para  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$  sugerem que esses extratos podem ser interessantes para investigações mais aprofundadas.

Ao avaliar a resposta imune induzida pelos extratos bioativos de *A. platensis* e *D. tertiolecta*, foi observado um estímulo imunológico positivo das células. Em todas as concentrações estudadas, houve um padrão geral de resposta imunológica, com equilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, com destaque para as citocinas do perfil protetor (Th1).

O extrato de *A. platensis* apresentou uma produção de IFN- $\gamma$  e TNF maior do que as células sem estímulo, principalmente IFN- $\gamma$  que apresentou uma síntese maior quando comparado ao LSA-*Li*, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta protetora. Além disso, foi possível observar correlações negativas muito fortes, porém não significativas, entre TNF e as citocinas do perfil Th2, podendo sugerir um potencial imunomodulador. A correlação positiva muito forte entre as citocinas TNF e IL-4 é um resultado promissor, uma vez que o aumento de uma citocina do perfil Th1, juntamente com citocinas anti-inflamatórias, podem combater o parasito pois um equilíbrio entre os dois perfis (com predominância de Th1) é importante para alcançar o controle da morbidade da infecção (RODRIGUEZ-CORTEZ et al., 2016). Ao analisar a produção de NO, foi observado que o extrato de *A. platensis* também induziu sua produção, fortalecendo a hipótese promissora deste extrato.

Por sua vez, o extrato de *D. tertiolecta* apresentou alta produção de TNF e baixa produção de IL-10, principalmente nas maiores concentrações testadas. A divergência dos resultados apresentados com os encontrados na literatura, pode surgir devido a diferença na obtenção do extrato e, conseqüentemente, nas moléculas majoritárias, uma vez que o extrato estudado foi de constituição proteica e nos trabalhos de Caroprese et al. (2012) e Ciliberti et al. (2017) foram provenientes de isolados de fitoesteróis. Esse fato destaca a importância de explorar os diversos extratos bioativos provenientes de microrganismos fotossintetizantes e seus

diferentes métodos de extração. Em relação à produção de óxido nítrico, foi observado que a *D. tertiolecta* também induziu sua produção, havendo uma diferença estatística na maior concentração.

Diante dos resultados obtidos, os extratos bioativos de microrganismos fotossintetizantes estão apresentando resultados que poderão contribuir para futuros estudos acerca de novas moléculas candidatas ao tratamento das leishmanioses. Os ensaios continuarão a ser realizados para embasar os resultados já encontrados e continuar avaliando a ação dos extratos bioativos, inclusive com estudos *in vivo*. Dessa forma, será possível ter uma maior avaliação da capacidade terapêutica dos extratos estudados para as leishmanioses.

## 7. CONCLUSÕES

Os índices de seletividade dos extratos bioativos foram maiores do que os apresentados pelo Glucantime, indicando que os extratos de MFs possuem uma maior seletividade para atuar nas células do parasito, apresentando, assim, uma menor toxicidade para as células do hospedeiro. Apesar disso, apenas os extratos das espécies *A. platensis* e *D. tertiolecta* foram os escolhidos para seguirem com os estudos de resposta imune nesta pesquisa, por demonstrarem o segundo e terceiro melhor resultado. A análise do extrato de *C. vulgaris* continuou a ser executada em outra pesquisa.

Os extratos bioativos de *A. platensis* e *D. tertiolecta* apresentaram a indução de uma resposta imunológica de perfil protetor, com produção de NO e indução da resposta de perfil Th1. Ao contrário dos extratos, as drogas de referências apresentaram um perfil de susceptibilidade, indicando que os extratos demonstraram os melhores resultados relacionados ao estímulo da resposta imunológica.

Diante disso, este trabalho forneceu subsídios científicos capazes de ampliar o conhecimento sobre atividades biológicas de microrganismos fotossintetizantes, principalmente atividade antiparasitária e imunomoduladora. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os extratos bioativos das espécies *A. platensis*, *C. vulgaris* e *D. tertiolecta* possuem potencial terapêutico promissor para as Leishmanioses.

## 8. REFERÊNCIAS

- AZEREDO, Elzinandes L.; NEVES-SOUZA, Patrícia C.; ALVARENGA, Allan R.; REIS, Sônia; TORRENTES-CARVALHO, Amanda; ZAGNE, Sonia Maris; NOGUEIRA, Rita; OLIVEIRA-PINTO, Luzia; KUBELKA, Claire. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. **Immunology**, [s.l.], v.130, n.2, p. 202-216, 2010. DOI:10.1111/j.1365-2567.2009.03224.x
- ALIANÇA, Amanda; ANJOS, Keicyanne; REIS, Thiago de Vasconcelos; HIGINO, Taciana; BRELAZ-DE-CASTRO, Maria; BIANCO, Éverson; FIGUEIREDO, Regina de. The in Vitro Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, [s.l.], v. 19, n. 9, p.14052-14065, 2014. DOI: 10.3390/molecules190914052.
- BASANO, Sergio de Almeida; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s.l.], v. 7, ed. 3, 2004.
- Bhargava P, Singh R. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. **Interdiscip Perspect Infect Dis**. [s.l.], v.2012, p. 1-13, 2012. DOI: 10.1155/2012/626838.
- BINTE-SAFIE SR; NG YK; YAO L; LEE YK. Growth bottlenecks of microalga *Dunaliella tertiolecta* in response to an up-shift in light intensity. **European Journal of Phycology**. [s.l.], v.4, p. 509-519, 2018. DOI: 10.1080/09670262.2018.1478131
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2007.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017
- CAROPRESE, M. et al. A mixture of phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* affects proliferation of peripheral blood mononuclear cells and cytokine production in sheep. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, [s.l.], v. 150, n. 1-2, p. 27-35, 2012. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.08.002
- CILIBERTI, M. et al. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* Reduce Cell Proliferation in Sheep Fed Flaxseed during Post Partum. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 7, p. 216-230, 2017. DOI: 10.3390/md15070216
- CLEMENTINO, Leandro da Costa; ODA, Fernando Bombarda; TEIXEIRA, Thaiz Rodrigues; TAVARES, Renata Spagolla Napoleão; COLEPICCOLO, Pio; SANTOS,

André Gonzaga dos; DEBONSI, Hosana Maria; GRAMINHA, Márcia A. S.. The antileishmanial activity of the antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* Skottsberg. **Natural Product Research**, [s.l.], p. 1-5, 2020. DOI: 10.1080/14786419.2020.1782403.

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

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006. DOI: 10.1128/cmr.19.1.111-126.2006.

CORREIA, Vanessa Carolina de Sena; LIMA, Nathália Oliveira; OLIVEIRA, Flávio Augusto de Souza; SANTOS, Ana Paula de Azevedo dos; TELES, Carolina Bioni Garcia; OLIVEIRA JÚNIOR, Waldesse Piragé de; PIMENTA, And Raphael Sanzio. Evaluation of the antiplasmodial and leishmanicidal potential of *Myrciaria dubia* (Myrtaceae) extract. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 49, n. 5, p. 586-592, 2016. DOI: 10.1590/0037-8682-0227-2016.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.303-336, 2012.

HEFNAWY, Aya; BERG, Maya; DUJARDIN, Jean-Claude; MUYLDER, Géraldine de. Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. **Trends In Parasitology**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 162-174, 2017. DOI: 10.1016/j.pt.2016.11.003.

GONÇALVES, Ana Alice Maia; LEITE, Jaqueline Costa; RESENDE, Lucilene Aparecida; MARIANO, Reysla Maria da Silveira; SILVEIRA, Patricia; MELO-JÔNIO, Otoni Alves de Oliveira; RIBEIRO, Helen Silva; OLIVEIRA, Diana Souza de; SOARES, Diogo Fonseca; SANTOS, Thaiza Aline Pereira. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: what has been tested on dogs and a new perspective on improving treatment efficacy. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 9, 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00427.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 8, n. 12, p. 536-544, 2003. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02713-2.

KANG, H.; SEO, C.; PARK, Y. Marine Peptides and Their Anti-Infective Activities. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 618-654, 2015. DOI: 10.3390/md13010618.

LAURITANO, Chiara; ANDERSEN, Jeanette H.; HANSEN, Espen; ALBRIGTSEN, Marte; ESCALERA, Laura; ESPOSITO, Francesco; HELLAND, Kirsti; HANSSON, Kine Ø.; ROMANO, Giovanna; IANORA, Adrianna. Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. **Frontiers In Marine Science**, [s.l.], v. 3, 2016. DOI: 10.3389/fmars.2016.00068.

NEVES, David Pereira; MELO, Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marcos; Vitor, Ricardo Almeida. Parasitologia humana. **Atheneu**. São Paulo. 12<sup>a</sup> ed, 2011.

NUNES, J. B. et al. *Leishmania infantum* infection in dogs from the southern region of Minas Gerais State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 58, n. 75, 2016.

DOI: 10.1590/S1678-9946201658075.

PONTE-SUCRE, Alicia; GAMARRO, Francisco; DUJARDIN, Jean-Claude; BARRETT, Michael P.; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio; GARCÍA-HERNÁNDEZ, Raquel; POUNTAIN, Andrew W.; MWENECHANYA, Roy; PAPADOPOULOU, Barbara. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 12, p. 1-24, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006052.

REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 227, p. 98–114, 2016.

ROCHA, Tamires; SILVEIRA, Murilo; QUIXABEIRA, Valéria. Leishmaniose tegumentar americana em humanos: uma revisão dos aspectos envolvidos na doença. Saúde e Ciência em Ação. **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**. Goiás, v. 05, n.01, 2019.

RODRIGUES, A Igor; MAZOTTO, Ana Maria; CARDOSO, Verônica; ALVES, Renan; AMARAL, Ana Claudia; SILVA, Jefferson; PINHEIRO, Anderson; VERMELHO, Alane. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, [s.l.], v. 2015, p.1-12, 2015. DOI: 1155/2015/835910.

RODRIGUES, Vasco; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; LAFORGE, Mireille; SILVESTRE, Ricardo; ESTAQUIER, Jérôme. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-13, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1412-x.

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

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

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and Targeted Therapies in Treatment of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Future Prospects. **Frontiers In Immunology**, Lausanne, v. 5, p.1-9, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00296.

SOUSA, Carolina Bruno de; GANGADHAR, Katkam N.; MORAIS, Thiago R.; CONSERVA, Geanne A.A.; VIZETTO-DUARTE, Catarina; PEREIRA, Hugo;

LAURENTI, Márcia D.; CAMPINO, Lenea; LEVY, Debora; UEMI, Miriam. Antileishmanial activity of meroditerpenoids from the macroalgae *Cystoseira baccata*. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 174, n. 4, p. 1-9, 2017. DOI: 10.1016/j.exppara.2017.01.002.

SUGANYA, T. et al. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 55, p.909-941, 2016.

TORRES-GUERRERO, Edoardo; QUINTANILLA-CEDILLO, Marco Romano; RUIZ-ESMENJAUD, Julieta; ARENAS, Roberto. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, [s.l.], v. 6, p. 750-765, 2017. DOI: 10.12688/f1000research.11120.1.

WATERS, A. et al. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 780-786, 2010. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.09.013.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 78, n. 2-3, p.193-200, dez. 2001. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00346-4.

YAMTHE, Lauve Tchokouaha; APPIAH-OPONG, Regina; FOKOU, Patrick Tsouh; TSABANG, Nole; BOYOM, Fabrice Fekam; NYARKO, Alexander; WILSON, Michael. Marine Algae as Source of Novel Antileishmanial Drugs: a review. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 11, p. 323-351, 2017. DOI: 10.3390/md15110323.

ZULFIQAR, Bilal; SHELPER, Todd B.; AVERY, Vicky M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 22, n. 10, p. 1516-1531, 2017. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.06.004.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A

#### Parecer de aprovação do CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

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

**Pesquisador:** Milena de Paiva Cavalcanti

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 89972718.8.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

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

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.077.060

##### Apresentação do Projeto:

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

##### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

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

Objetivos secundários:

- Caracterizar a população estudada (cães e humanos) quanto ao status clínico e à infecção por *Leishmania* spp.; determinar o tempo de cultivo e a concentração mais adequada para o estímulo in vitro de células mononucleares do sangue periférico de cães (LV) e de pacientes humanos (LV e/ou LT), com os novos antígenos e diferentes compostos naturais e sintéticos;

- Avaliar a expressão gênica de citocinas dos perfis Th1, Th2, Treg e Th17 em diferentes grupos de estudo (cães), após o estímulo com os antígenos recombinantes, e comparar com os resultados obtidos após o estímulo com o antígeno bruto solúvel de *L. (L.) infantum* (LiSA);

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



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

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

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

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

**Benefícios:**

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

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

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

**Recomendações:**

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

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



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

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

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

1. Relatório parcial

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

2. Orçamento

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

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

3. Projeto detalhado:

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

4. Folha de rosto

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

5. TCLE/TALE:

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

ATENDIDA.

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



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

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

ATENDIDA.

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

ATENDIDA.

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

ATENDIDA.

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

ATENDIDA.

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

ATENDIDA.

6. Formulário da Plataforma Brasil:

Atualizar o objetivo primário condizente com o projeto principal modificado.

ATENDIDA.

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

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

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



Continuação do Parecer: 4.077.060

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

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

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



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 4.077.060

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 08 de Junho de 2020

---

**Assinado por:**  
**Maria Almerice Lopes da Silva**  
**(Coordenador(a))**

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

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

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

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

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