



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AMANDA CRISTINA MACHADO CARLOTO

**ATIVIDADE *in vitro* DA BETA-GLUCANA
BOTRIOSFERANA SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS E
AMASTIGOTAS DE *Leishmania (Leishmania)*
*amazonensis***

Londrina
2020

AMANDA CRISTINA MACHADO CARLOTO

**ATIVIDADE *in vitro* DA BETA-GLUCANA BOTRIOSFERANA
SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Carloto, Amanda Cristina Machado.

Atividade in vitro da beta-glucana botriosferana sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Amanda Cristina Machado Carloto. - Londrina, 2020.
69 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose - Tese. 2. Beta-glucana - Tese. 3. Tratamento - Tese. 4. Apoptose - Tese. I. Pavanelli, Wander Rogério . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

AMANDA CRISTINA MACHADO CARLOTO

**ATIVIDADE *in vitro* DA BETA-GLUCANA BOTRIOSFERANA SOBRE
FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Idessania Nazareth Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de Janeiro de 2020

Dedico este trabalho a minha família,
como agradecimento por toda
confiança, fé e suporte a mim
concedidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque foi graças a Ele que consegui conquistar tudo até aqui. Obrigada por me dar exatamente tudo que eu preciso e sempre na hora certa.

Agradeço a minha família por ter embarcado comigo nesse desafio. Obrigada pelo apoio, por terem acreditado no meu potencial e por terem lutado ao meu lado para que esse sonho fosse realizado.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli por esses seis anos de parceria. Por ter aberto as portas do laboratório para mim, onde pude crescer e aprender na minha carreira científica. Obrigada não só pela orientação, mas também pela amizade, ensinamentos, dedicação e paciência.

Às professoras Dra. Ivete Conchon Costa e Dra. Idessania Nazareth Costa, por estarem do meu lado desde o início de tudo, por todo carinho, ensinamento, companheirismo e amizade.

À Profa. Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla por todo apoio desde o início da minha carreira acadêmica. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos, pela paciência e todo aprendizado.

À Profa. Dra. Danielle Lazarin Bidóia pela amizade, esforço e dedicação com esse trabalho. Obrigada pela belíssimas imagens de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Aos membros da banca examinadora de qualificação e de defesa, Profa. Dra. Idessania Nazareth Costa, Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior e Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo pela dedicação, paciência, disponibilidade e contribuição com este trabalho.

Aos amigos do laboratório Bruna Bortoleti, Ana Carolina Jacob, Manoela Gonçalves, Virgínia Concato, João Paulo Assolini, Fernanda Tomiotto, Raquel Arruda, Taylon Silva, Elaine Siqueira, Alex Alves, Mariana Detoni e Tatiane Fagundes por toda a ajuda, pela amizade e companheirismo. Sem a ajuda de vocês nada disso seria possível!

À Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa-Dekker por gentilmente ceder a botriosferana. Por ter me ensinado passo a passo de sua produção, a paciência por me ensinar e tirar minhas dúvidas sempre que precisei.

Ao meu amor Allan Santos, por todo apoio que você sempre me dá e paciência ao me ouvir. Obrigada por acreditar nos meus sonhos, me ajudar a crescer e sempre acreditar no meu potencial.

Ao Central de Microscopia do Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa – COMCAP da Universidade Estadual de Maringá pela contribuição com as imagens de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

À todos os professores do Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo conhecimento e contribuição no processo de formação profissional.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Emanuella Silveira de Oliveira, Sandra R. Moitinho Lage e Dhiovana F. M. Barreto Conde, por todo apoio, atenção e ajuda sempre que eu precisei.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Ciências Patológicas pela contribuição para realização deste trabalho, especialmente Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião.

Agradeço à CAPES e CNPq pela concessão da bolsa e financiamento.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano de verdade continua misterioso diante de meus olhos” **Isaac Newton**

CARLOTO, Amanda Cristina Machado. **Atividade *in vitro* da beta-glucana botriosferana sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2020. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada pelo protozoário *Leishmania* com diversas de manifestações clínicas. A Organização Mundial da Saúde estima que 350 milhões de pessoas estão expostas ao parasito. É um grave problema de saúde pública, sendo uma das dez endemias consideradas negligenciadas. O tratamento disponível se baseia em fármacos de alto custo, causando sério efeitos colaterais, dificuldades na administração, além de já ter sido relatado o surgimento de cepas resistentes. Com isso, a busca por novas alternativas terapêuticas que possam apresentar uma ação mais eficaz, sem causar efeitos colaterais aos pacientes, têm sido investigado por muitos pesquisadores. Diversos trabalhos já demonstraram os efeitos benéficos das β -glucanas fúngicas tais como atividade antiproliferativa sob linhagens tumorais, proteção contra infecções bacterianas e parasitárias. Dentre estas, a botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana tem mostrado promissora atividade biológica por apresentar propriedades antiproliferativas, pró-apoptótica, antioxidante, quimiopreventiva, anticoagulante, anticlastogênica, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica. O nosso objetivo foi avaliar *in vitro* o efeito da botriosferana sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, bem como elucidar seu mecanismo de ação. A atividade direta da botriosferana sobre formas promastigotas foi avaliada *in vitro* por contagem em câmara de Neubauer em 24, 48 e 72 horas, e observamos que em todos os períodos houve inibição da proliferação. Adicionalmente, nós observamos que o composto induziu uma produção de óxido nítrico (NO), hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e acúmulo de corpos lipídicos, desencadeando processo autofágico por monodansilcadaverina, danos à membrana do parasito e exposição de fosfatidilserina. Com isso, foi visto que a maioria dos parasitas passavam por um processo de apoptose-like. Além disso, o intervalo de concentrações utilizadas não alterou a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e eritrócitos ovinos. Também observamos que a botriosferana foi capaz de reduzir o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos, promovendo a produção de citocinas como TNF- α e IL-6 e conseqüentemente aumentando a produção de EROs e NO. Com base nos dados obtidos, é possível inferir que a botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana exerce efeito leishmanicida, atuando nas formas promastigotas através de processos autofágicos e apoptóticos e em formas intracelulares/amastigotas induzindo o aumento de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico nas maiores concentrações.

Palavras-chave: Leishmaniose. Beta-glucana. Tratamento. Apoptose.

CARLOTO, Amanda Cristina Machado. ***In vitro* activity of beta-glucan botryosphaeran on promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2020. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious-parasitic disease caused by the protozoan *Leishmania* with several clinical manifestations. The World Health Organization estimates that 350 million people are exposed to the parasite. It is a serious public health problem, being one of the ten endemic diseases considered neglected. The available treatment is based on high-cost drugs, causing serious side effects, difficulties in the administration, in addition to having been reported the emergence of resistant strains. Thus, the search for new therapeutic alternatives that can present a more effective action, without causing side effects to patients, has been the object of study by many researchers. Several studies have already demonstrated the beneficial effects of fungal β -glucans such as antiproliferative activity in various tumor cell lines, protection against bacterial and parasitic infections. Among these, the botryosphaeran β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucan has shown promising biological activity by having antiproliferative properties, pro-apoptotic, antioxidant, chemopreventive, anticoagulant, anticlastogenic, hypoglycemic and hypocholesterolemic. Our objective was to evaluate *in vitro* the effect of botryosphaeran on promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*, as well as to elucidate its mechanisms of action. The direct activity of botryosphaeran on promastigotes forms was evaluated *in vitro* by counting in a Neubauer chamber at 24, 48 and 72 hours, and we observed that proliferation was inhibited in all periods. Additionally, we observed that the compound induced a production of nitric oxide (NO), hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential, increase in reactive oxygen species (ROS) and accumulation of lipid droplets, triggering an autophagic process by monodansylcadaverine, damage to the parasite membrane and phosphatidylserine exposure. Thus, it was seen that most of the parasites passed by an apoptosis-like process. In addition, the range of concentrations used did not alter the viability of peritoneal macrophages from BALB/c mice and sheep erythrocytes. We also observed that botryosphaeran was able to reduce the number of infected macrophages and the number of amastigotes per macrophage, promoting the production of cytokines such as TNF- α and IL-6 and consequently affecting the production of ROS and NO. Based on the obtained data, it is possible to infer that botryosphaeran β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucan exerts a leishmanicidal effect, acting on promastigotes forms through autophagic and apoptotic processes and in intracellular/amastigotes forms inducing the increase of species reactive oxygen and nitric oxide in the highest concentrations.

Key words: Leishmaniasis. Beta-glucan. Treatment. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

- Figura 1** Ciclo biológico do protozoário *Leishmania* spp18
- Figura 2** Botriosferana β (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6) D-glucana26

FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1** Botriosferana possui atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.....60
- Figura 2** Mecanismos de ação da botriosferana sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.....11
- Figura 3** Análise morfológica e ultraestrutural de promastigotas de *L. amazonensis*63
- Figura 4** Processos autofágicos e apoptóticos induzidos pela botriosferana em formas promastigotas de *L. amazonensis*.....63
- Figura 5** Viabilidade de macrófagos peritoneais e eritrócitos ovinos.....64
- Figura 6** Botriosferana possui efeito sobre macrófagos infectados com *L. Amazonensis*.....64
- Figura 7** Botriosferana elimina formas amastigotas de *L. amazonensis* por aumento de citocinas, EROs e NO65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
ATP	Adenosina Trifosfato
BALB/c	Linhagem de camundongos isogênicos
C57BL/6	Linhagem de camundongos isogênicos
CO ₂	Dióxido de carbono
CR1	Receptor 1 do complemento
CR2	Receptor 2 do complemento
CR3	Receptor 3 do complemento
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Dioxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
gp63	Metaloproteinase gp63
H	Horas
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₂ DCFDA	2' 7' –dichlorodihydrofluorescein diacetate
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2'-ethanesulfonic acid)
IDRM	Teste de Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ	Inferferon gamma
IFI	Imunofluorescência Indireta
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13

IP	Iodeto de Propídio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
kDNA	kinetoplast DNA
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutâneo Difusa
LCM	Leishmaniose Cutâneo Mucosa
L	Litro
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LTB4	Leucotrieno B4
LV	Leishmaniose Visceral
M1	Macrófagos tipo 1
M2	Macrófagos tipo 2
MAC	Complexo de Ataque a Membrana
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
MRB	Modificador de Resposta Biológica
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	Nanômetro
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO2	Nitrito de sódio
NLRP3	NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3
NO	Nitric oxide
NOX2	Enzima Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Oxidase 2
NK	Natural killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPS	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS	Phosphate-Buffered Saline (tampão fosfato)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões

qPCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RPM	Rotações por Minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
T CD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TMRE	Tetramethylrhodamine ethyl ester
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alfa
WHO	World Health Organization
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	15
1.2	EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.3	AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO	16
1.4	INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE.....	18
1.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	20
1.6	DIAGNÓSTICO	21
1.7	TRATAMENTO CONVENCIONAL.....	23
1.8	BOTRIOSFERANA B (1→3; 1→6) D-GLUCANA.....	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA	29
3.2	MANUTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE LEISHMANIA AMAZONENSIS	29
3.3	PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA (B- 1→3; 1→6) D-GLUCANA.....	29
3.4	DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS DA BOTRIOSFERANA PELO MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO.....	30
3.5	ATIVIDADE DA BOTRIOSFERANA SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE L. AMAZONENSIS	30
3.6	CO-DETERMINAÇÃO DE ANEXINA-V E IODETO DE PROPÍDIO	30
3.7	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	31
3.8	PRESENÇA DE VACÚOLOS AUTOFÁGICOS	31
3.9	PRESENÇA DE CORPOS LIPÍDICOS POR VERMELHO DO NILO	31
3.10	PRODUÇÃO DE EROS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE L. AMAZONENSIS	31
3.11	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO PELO MÉTODO DE GRIESS EM FORMAS PROMASTIGOTAS	32
3.12	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E TRANSMISSÃO	32
3.13	VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	33

3.14	ENSAIO HEMOLÍTICO	33
3.15	ENSAIO CELULAR ANTIAMASTIGOTA.....	33
3.16	MENSURAÇÃO DE CITOCINAS.....	34
3.17	DETERMINAÇÃO DE EROS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS	34
3.18	DETERMINAÇÃO DE NITRITO COMO ESTIMATIVA DOS NÍVEIS DE NO EM FORMAS AMASTIGOTAS	34
3.19	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
4	RESULTADOS	36
5	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO	73
	ANEXO A Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

Leishmanioses são um conjunto de doenças de caráter zoonótica causadas por protozoários de pelo menos 20 espécies do gênero *Leishmania*, a qual são transmitidas entre hospedeiros mamíferos por meio da picada do inseto flebotomíneo (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Apresentam diversas manifestações clínicas como forma cutânea, mucocutânea, difusa e visceral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Essa variação é decorrente principalmente da espécie de *Leishmania* envolvida, variando em gravidade, desde lesões cutâneas autocuráveis até doenças viscerais com risco de vida, como também a interação das características do parasita, biologia do vetor e fatores do hospedeiro, como susceptibilidade, idade, estado nutricional e resposta imunológica (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Este complexo é um grave problema de saúde pública mundial, sendo uma das dez endemias consideradas negligenciadas e ocupa o segundo lugar entre as seis doenças infecto-parasitárias mais frequentes no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao parasito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose tegumentar (LT) possui ampla distribuição mundial, pois está presente em 88 países distribuídos em quatro continentes. A maioria dos casos ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia e República Árabe da Síria. É predominantemente urbana e periurbana, caracterizada por grandes surtos em cidades densamente povoadas, especialmente em zonas de guerra e conflitos, campos de refugiados e em locais onde há migração de populações em larga escala (WHO, 2019). No continente americano há registros de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Uruguai e Chile (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No Brasil, é considerada endêmica e possui uma das maiores taxas de notificação em relação aos outros países, sendo confirmado em todos os estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A partir da década de 1980, verificou-se um aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). Observaram-se picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos a partir do ano de 1985, quando se solidifica a implantação das ações de vigilância e controle da LT no país. No período de 1995 a 2014, verificou-se uma média anual de 25.763 novos casos registrados e coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes,

verificando-se coeficiente mais elevado no ano de 1995, quando atingiu 22,94 casos por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Além disso, foi possível observar um padrão cíclico no Brasil, onde existe um pico de incidência a cada 5 anos que está relacionado com alterações nos padrões de chuva e umidade, afetando assim vetores e reservatórios (DETONI et al., 2019).

No estado do Paraná, a LT também possui caráter endêmico com notificação em 276 dos 399 municípios e alta prevalência nas regiões norte e oeste, contudo ainda faltam informações detalhadas (MONTEIRO et al., 2008). Em 2012, dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), confirmaram 167 casos notificados no estado (Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net, 2012). Um estudo realizado por Detoni et al. (2019) mostraram que no ano de 2014 houve 108 casos de LTA no norte do Paraná, tendo um caráter endêmico e afetando principalmente trabalhadores agrícolas do sexo masculino.

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

Leishmania é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (REY, 1992). É um organismo unicelular e possui morfologia variável. No Brasil, foram identificadas sete espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, e identificadas apenas nos estados das regiões Norte e Nordeste, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) lindenberg*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) shawi*. São transmitidos pela fêmea do inseto vetor flebotomíneo, pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da região, como mosquito-palha, tatuquira e birigui. No Brasil, as principais espécies encontradas são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O parasito possui um ciclo biológico digenético, se reproduzem por divisão binária e envolvem um hospedeiro mamífero e um vetor. Apresenta durante o ciclo, morfologia variável, promastigotas e amastigotas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). As formas promastigotas são alongadas e possuem flagelo livre, utilizado para sua mobilidade, sobrevivência e transmissão, ligado ao cinetoplasto (mitocôndria única que contém o DNA mitocondrial) encontrado na parte anterior do corpo celular. É a forma infectante, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor. Diferentemente, as formas amastigotas são arredondadas, com flagelo rudimentar, no entanto sem função de mobilidade. São observadas principalmente em macrófagos teciduais de hospedeiros vertebrados (GLUENZ; GINGER; MCKEAN, 2010).

O ciclo se inicia quando fêmeas de flebótomos infectados durante a

alimentação, inocula junto com saliva e fluidos digestivos, as formas promastigotas metacíclicas (Figura 1). Estas interagem com proteínas do soro, sistema complemento e receptores de células hospedeiras. A saliva possui diversos agentes quimioatrativos, havendo uma intensa migração de neutrófilos e macrófagos para o local da picada. Estes neutrófilos podem agir como “cavalo de tróia”, onde parasitos sobrevivem em seu interior, porém em pouco tempo estas células sofrem apoptose e rapidamente são internalizadas por macrófagos e células dendríticas sem desencadear mecanismos microbicidas (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008; PETERS et al., 2008a). Células dendríticas também são capazes de se infectar, tornando-se maduras e migrando para o linfonodo onde vão apresentar antígenos para linfócitos, além disso, produzem interleucina (IL)-12, importante citocina para indução de uma resposta T auxiliar 1 (Th1) no hospedeiro (BOGGIATTO et al., 2009; KAYE; SCOTT, 2011).

Os macrófagos são as principais células envolvidas nesta infecção, sobrevivência, replicação e diferenciação do parasito (LIU; UZONNA, 2012). Apresentam uma variedade de receptores que se ligam à padrões moleculares presente na superfície do parasito, como lipofosfoglicanos (LPG) e metaloproteinase gp63 kDa (gp63). Através da emissão de pseudópodes, fagocitam as promastigotas. Após a internalização, há a formação de um vacúolo parasitóforo, que ao se fundir com o lisossomo, forma o fagolisossomo, que possui um baixo pH. No entanto, o parasito é capaz de retardar essa fusão, para primeiramente se diferenciar de promastigotas para amastigotas. Assim, estas formas se multiplicam por divisão binária. A proliferação destas formas, induz a ruptura dos macrófagos. Os parasitos liberados podem infectar novos macrófagos ou um flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (KAYE; SCOTT, 2011).

Quando um flebotomíneo se infecta através do repasto sanguíneo, onde juntamente com o sangue ou linfa, ingere também macrófagos periféricos infectados com formas amastigotas. No tubo digestivo do mosquito, essas formas são liberadas e se diferenciam em promastigotas procíclicas, se multiplicando por divisão binária e em grande número diferenciam-se em promastigotas metacíclicas infectantes. Migram do intestino médio para as glândulas salivares, prontas para serem inoculadas em um novo hospedeiro (KAYE; SCOTT, 2011; PONTE-SUCRE, 2003).

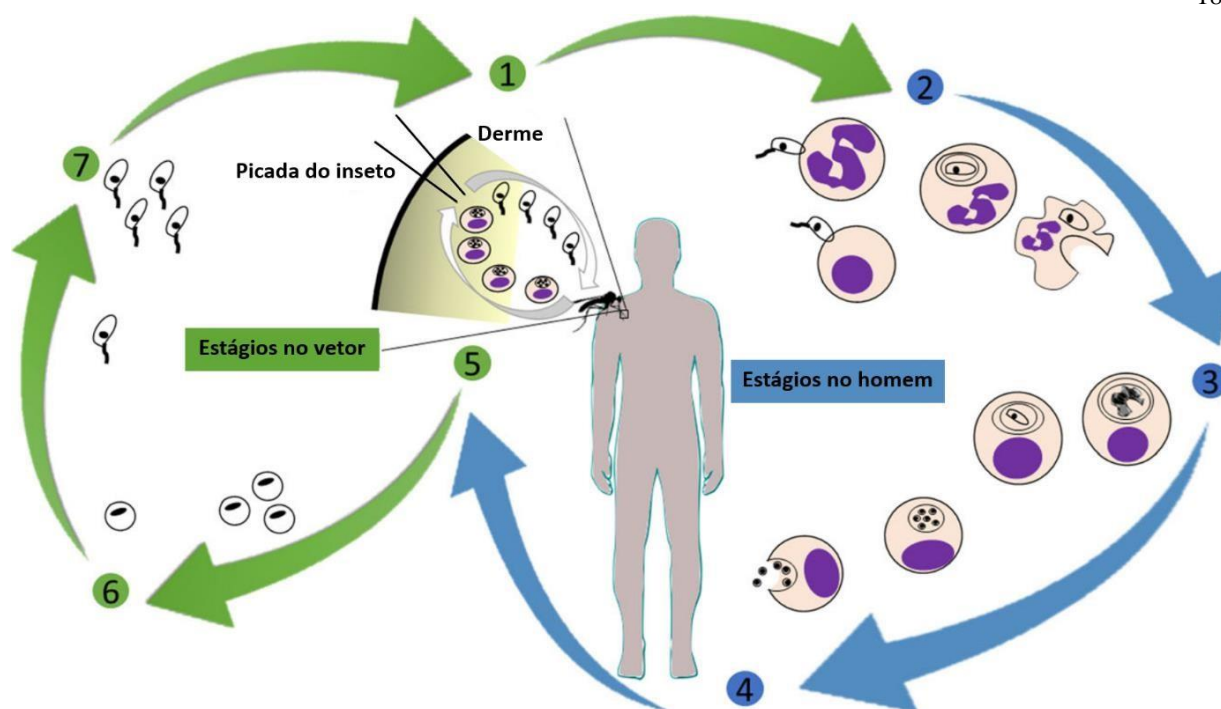


Figura 1: Ciclo biológico do protozoário transmissor da Leishmaniose Tegumentar Americana adaptado de Borghi et al. (2017). (1) Durante o repasto sanguíneo, fêmeas de mosquitos flebotomíneos inoculam formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro; (2) na derme do hospedeiro vertebrado, os parasitos são fagocitados por macrófagos; (3) no interior dos macrófagos, formas promastigotas se diferenciam em amastigotas se multiplicando por divisão binária; (4) após multiplicação, as amastigotas são liberadas após a lise celular; (5) o ciclo se completa quando outro flebotomíneo ingere fagócitos infectados durante o repasto sanguíneo; (6) no interior do seu intestino, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas; (7) os parasitos se multiplicam e diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, que migram para a probóscide do inseto.

1.4 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE

A resposta imune é um fator crucial para o desfecho clínico. A instalação no hospedeiro depende de sua capacidade de se estabelecer no interior de fagócitos durante as primeiras horas após infecção (GENARO, 2005). A saliva do vetor é fundamental nesse estágio, pois possui um efeito imunomodulador contribuindo com o aumento da infectividade dos parasitos, além de atrair fagócitos para o local da inoculação (ROSSI; FASEL, 2017). No local da picada, ocorre intensa migração, primeiramente de neutrófilos, seguido por macrófagos, a principal célula envolvida na defesa (PETERS et al., 2008b).

O parasito possui diversos escapes capazes de subverter os mecanismos microbicidas do hospedeiro. O primeiro é a capacidade das formas promastigotas inativarem os componentes C3, C5 e C9 dos sistema Complemento, através das moléculas presentes na sua superfície, como LPG e gp63. Com isso, impedem a fixação do complexo de ataque à membrana do complemento (MAC) e a formação de poros na superfície do parasita. Etapas

anteriores do sistema Complemento podem contribuir para a entrada do parasito nos macrófagos. A geração de opsoninas C3b e C3bi, ligam-se à superfície de *Leishmania*, facilitando a ligação com receptores do Complemento tipo 1 e 3 (CR1 e CR3) nos macrófagos, sem desencadear o “burst” oxidativo e prejudicando a produção de citocinas. Essa internalização das formas promastigotas, inicia o processo de maturação e fusão do fagossomo com lisossomos, originando o fagolisossomo, constituído por várias hidrolases ácidas ativas. No entanto, a presença do LPG é capaz de retardar esta fusão na intenção de completar a diferenciação de promastigotas para amastigotas, formas mais adaptadas ao pH encontrado no fagolisossomo (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012).

As respostas mais eficazes dos macrófagos contra a infecção por *Leishmania* são a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Os produtores destas espécies se dá através da enzima fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase 2 (NOX2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) após a ativação dos macrófagos. Essa ativação, leva ao aumento de citocinas como interferon γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a liberação de superóxidos (O_2^-) e óxido nítrico (NO), visando a eliminação do invasor sem danificar a célula hospedeira. No entanto, estes parasitos desenvolveram estratégias capazes de interferir neste processo (ROSSI; FASEL, 2017).

O LPG presente na superfície do parasito o protege contra EROs e ERNs, sendo mais espessa nas amastigotas, como também atrasa a montagem de NOX2, evitando a produção de O_2^- . Além disso, a *Leishmania* pode induzir macrófagos para produzir arginase, competindo com iNOS pela arginina. A arginina é um aminoácido fundamental para sobrevivência do parasito, assim ele utiliza no seu metabolismo ao mesmo tempo que diminui a produção de NO (ROSSI; FASEL, 2017; VAN ASSCHE et al., 2011).

Quando o parasita é fagocitado, as células da imunidade inata reagem produzindo citocinas que moldam o desenvolvimento da imunidade adaptativa (ROSSI; FASEL, 2017). O desenvolvimento do quadro clínico está intimamente relacionado com a resposta imune adaptativa, com consequente aumento de linfócitos T CD4+ (MATTNER et al., 1996). Para melhor compreensão sobre fenótipos de resistência ou susceptibilidade ao parasito, foram desenvolvidos estudos em modelos murinos. Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e seu hospedeiro, a resposta imunológica possui um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (SCOTT; NOVAIS, 2016; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Essa polarização é bem estabelecida em modelo murino causada por *Leishmania major*. Na linhagem C57BL/6 é estabelecida pela ativação preferencial da subpopulação de linfócitos Th1, que por sua vez produzem diversas citocinas, principalmente INF- γ e TNF- α , que em conjunto levam a ativação dos macrófagos desencadeando o “burst oxidativo” formando moléculas altamente reativas como EROs e ERNs, como O_2^- e NO,

moléculas microbidas envolvidas na eliminação deste parasito (CUNNINGHAM, 2002; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). A susceptibilidade em camundongos BALB/c é baseada na ativação preferencial da subpopulação Th2, com produção de IL-4, IL-10 e IL-13 e suprimindo a resposta Th1, com consequente aumento da proliferação do parasito (MURAILLE; LEO; MOSER, 2014). Essa polarização Th1/Th2 é muito semelhante ao que ocorre na leishmaniose cutânea (LC) autolimitante em humanos (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). No entanto, diferentes espécies de *Leishmania* desencadeiam respostas imunes distintas, diferente da polarização clássica Th1/Th2 (MENDONÇA, 2016).

A infecção de camundongos susceptíveis por *L. amazonensis* é diferente da por *L. major*, onde as lesões cutâneas são progressivas na maioria das linhagens de camundongos. Observou-se que esta espécie de parasito consegue impedir a produção precoce de citocinas inflamatórias e quimiocinas, impedindo o desenvolvimento de células Th1 específicas ao antígeno na presença de baixos níveis de citocinas Th2 (JI; SUN; SOONG, 2003). Tomiotto-Pelissier et al. (2018) revisaram que diferentes espécies de *Leishmania* exibem fatores de virulência que podem subverter os mecanismos microbidas do hospedeiro, favorecendo a proliferação do parasito devido à uma polarização para macrófagos tipo 2 (M2) nos estágios iniciais da infecção. Em períodos posteriores, haveria uma polarização para macrófagos tipo 1 (M1) gerando uma resposta exacerbada, levando ao agravamento das lesões.

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais frequente, caracterizada por úlcera única ou múltiplas na pele. É transmitida principalmente pelas espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania laisoni* (REIS; GONTIJO, 2016). Se iniciam no local de inoculação da picada do inseto vetor, principalmente em áreas expostas da pele. A lesão se inicia com vermelhidão, inchaço e após um período variável de incubação desenvolve-se uma úlcera típica apresentando bordas elevadas, contornos regulares e fundo granuloso, podendo ou não apresentar exsudato purulento. Essa lesão é proveniente da inflamação em resposta a presença do parasito. Moléculas envolvidas nessa inflamação como citocinas e leucotrieno B4 (LTB4), ativam os fagócitos, levando à produção de NO na intenção de eliminar a *Leishmania*, no entanto, acaba por causar danos aos tecidos (RODRIGUES et al., 2015). Dependendo da frequência das células T no infiltrado celular da lesão e equilíbrio destas respostas, as lesões podem cicatrizar espontaneamente (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Alguns pacientes podem apresentar disseminação destas lesões, onde estes possuem altos níveis de TNF- α . Sugere-se uma forte resposta Th1 e consequente estado hiperinflamatório (ROSSI; FASEL, 2017). Em algumas espécies de

Leishmania, a lesão pode progredir através de disseminação hematogênica e/ou linfática do parasito, surgindo lesões nas mucosas (ANVERSA et al., 2018; GONZÁLEZ et al., 2008; MAGILL, 2005). Infecções não controladas por mecanismos imunes mediados por células podem evoluir para uma das duas formas polares da doença, hipersensibilidade celular, caracterizando leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) ou hiposensibilidade celular, representando leishmaniose cutâneo difusa (LCD) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A LCM é a forma mais agressiva sendo caracterizada pela capacidade do parasito de se disseminar para mucosa oral e/ou nasal por via hematogênica e/ou linfática e está associada principalmente a espécie *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis*. Cerca de 3% dos pacientes infectados com *L. braziliensis* podem apresentar a forma mucosa da doença, concomitantemente com a forma LC ou após remissão, como também devido à má resolução da doença ou terapia inadequada (CARVALHO et al., 2001; MARSDEN, 1986; MIRANDA LESSA et al., 2007). É uma condição onde as lesões destroem mucosas, cartilagens do septo nasal, lábios e palato, sendo comum os pacientes apresentarem agravamento da congestão nasal, epistaxe ou corrimento. Ocasionalmente afetam a laringe, levando a pneumonia por aspiração (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Estudos mostraram que a resposta imune nos estágios iniciais é insuficiente e está relacionada à uma inflamação descontrolada. Além disso, no hospedeiro são encontrados níveis mais altos de citocinas como IL-10, IFN- γ e TNF- α quando comparado com a LC (DUTRA et al., 2011; STRAZZULLA et al., 2013). Diferentemente da LC, a LCM nunca evolui para a cura espontaneamente, apresenta dificuldade de responder ao tratamento, além de apresentar alto risco de deformidades permanentes, podendo levar o paciente à morte (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; GOTO; LINDOSO, 2010).

A LCD é uma variante rara da LC que ocorre em pacientes considerados anérgicos com deficiência de uma resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania*. Causada pelas espécies *L. amazonensis*, *L. aethiopica* ou *L. mexicana*, o paciente desenvolve múltiplas pápulas e nódulos não-ulcerados, onde os parasitos se multiplicam descontroladamente. As lesões normalmente não cicatrizam e são de difícil tratamento, podendo assumir caráter crônico, se disseminando por via linfática ou por migração de macrófagos, persistindo por toda a vida do paciente (ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A falta de resolução deste tipo de infecção pode ser devido a uma alta produção de IL-10 e IL-4, levando ativação inadequada de DC e produção de IL-12, como também aumento dos níveis de arginina I, prostaglandinas E₂ e fator de transformação do crescimento (TGF)- β (SCOTT; NOVAIS, 2016).

1.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LT deve ser feito de acordo com a forma clínica e as características da lesão baseado em critérios clínicos e epidemiológicos. Deve ser primeiramente feito um diagnóstico diferencial, para não confundir com outras doenças como

esporotricose, infecção cutânea por *Mycobacterium*, infecções cutâneas piogênicas e outros (GOTO; LINDOSO, 2010). Além disso, o diagnóstico clínico, deve ser complementado com o diagnóstico laboratorial como exame imunológico, parasitológico e histopatológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O Teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um marcador de resposta imune celular que avalia a resposta de hipersensibilidade do tipo IV mediada por células T, sendo positivo após a quarta semana de surgimento da lesão cutânea (ANTONIO et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). É o principal teste diagnóstico na atenção primária, com sensibilidade de 88,64% a 100%. No entanto, em pacientes imunossuprimidos e fraco-reatores, o IDRM pode negatizar, além disso, em áreas endêmicas, o IDRM pode ser positivo, mesmo na ausência da lesão, podendo ser interpretada como leishmaniose anterior ou aplicação anterior de antígeno de IDRM (GOTO; LINDOSO, 2010).

Outros testes imunológicos são o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), porém a sensibilidade e a especificidade são variáveis de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida. O ELISA pode detectar anticorpos específicos ou antígenos do parasito (GOTO; LINDOSO, 2010). Novos testes imunológicos estão sendo aprimorados, como o ELISA quimioluminescente, onde se detecta anticorpos anti- α -galactosil. Esse diagnóstico demonstra ser até nove vezes maiores em pessoas infectadas por *L. tropica* e *L. major* comparando com pessoas saudáveis (AL-SALEM et al., 2014). O teste rápido de detecção de leishmaniose cutânea foi recentemente introduzido no mercado (LC Detect™) (Inbios Internacional, Seattle, WA, EUA) sendo capaz de detectar o antígeno peroxidoxina, expressa em amastigotas e promastigotas com a finalidade de proteger o parasita da destruição por estresse oxidativo com alta sensibilidade e especificidade, além de baixo custo (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DE SILVA et al., 2017).

Outra forma de diagnóstico é a pesquisa direta do parasito. Pode-se realizar a biópsia da lesão, aspirado por agulha, esfregaço de pele e cultura *in vitro* do parasito. Em amostras de biópsia, raspagem ou manchas de impressão, pode-se pesquisar amastigotas corados com Giemsa utilizando microscópio óptico. A partir de biópsias e aspirados, cultiva-se em ágar sangue ou infecta-se um animal susceptível, como hamster, para análise do parasita. O exame microscópico é provavelmente a abordagem diagnóstica mais utilizada, porque técnicas mais sofisticadas são caras e raramente estão disponíveis na atenção primária, secundária e terciária em áreas endêmicas, no entanto, recomenda-se uma combinação com outras técnicas dado que a sensibilidade dos exames diretos é baixa

(BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER et al., 2007).

Os métodos moleculares baseados na amplificação do DNA nuclear ou do cinetoplasto (kDNA) são técnicas mais sensíveis que permitem a identificação das espécies de *Leishmania*, sendo importante para a conduta clínica para o tratamento e prognóstico (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR quantitativo em tempo real (qPCR) são técnicas sensíveis, com taxas de detecção de 97%, no entanto são técnicas caras não utilizadas na rotina de diagnóstico (HANDLER et al., 2015).

É necessário o uso de mais de uma técnica para confirmação, a fim de se reduzir os casos de falsos-negativos. Atualmente, não existe um teste de referência único para LTA. A observação de amastigotas na amostra clínica já estabelece o diagnóstico, podendo ser aprimorada associando a detecção baseada em PCR (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

1.7 TRATAMENTO CONVENCIONAL

De modo geral, o tratamento convencional se baseia na eliminação das formas amastigotas. Os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes como o N-metil-glucamina (Glucantime® da Sanofi-Aventis Farmacêutica) e o estibogluconato de sódio (Pentostan® da GlaxoSmithKline e Solustibosan® da Bayer) (LIMA et al., 2007). São eficazes, pois promovem uma regressão rápida do número de parasitos presentes nos tecidos e sangue. Seu mecanismo de ação é pouco conhecido, porém acredita-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, convertido em trivalente no fígado (ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998). Esta forma ativa, interferiria na β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito, levando à uma depleção de ATP intracelular (BALAÑA-FOUCE et al., 1998). No entanto, também causa toxicidade para o paciente, levando a efeitos colaterais como: mialgia, artralgia, inapetência, náuseas, vômitos, sensação de plenitude gástrica, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, insônia, edema, aumento sérico das enzimas hepáticas, insuficiência renal aguda, pancreatite e cardiotoxicidade. Há relatos onde a cura clínica não é acompanhada de cura parasitológica, onde há a cicatrização da lesão, mas ainda existem parasitos no paciente. Também existe a dificuldade na administração, que deve ser feito em ambiente hospitalar por ser via endovenosa ou intramuscular, além do alto custo (BERMAN, 1997; CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; RATH et al., 2003).

Fármacos como Anfotericina b (Amb), Miltefosina, Paramomicina e Pentamidina são recomendados em casos de contraindicações aos antimoniais, como cardiopatas, hepatopatas, nefropatas e gestantes e resistência dos parasitos (LIMA et al., 2007). No entanto, estes fármacos não possuem índice terapêutico favorável e também

causam várias reações adversas no paciente (BERMAN, 1997; BRAY et al., 2003; GOTO; LINDOSO, 2010; SILVA-LÓPEZ, 2010).

A Amb é um fármaco antifúngico, que age formando poros na membrana da *Leishmania*, se ligando ao ergosterol (principal esteroide presente na membrana), isso altera sua permeabilidade e permite a saída de íons como Na⁺, K⁺ e Mg²⁺, levando a morte celular (MACHADO- PINTO et al., 2002). Por possuir uma baixa seletividade, também pode se ligar ao colesterol, presente na membrana das células de mamíferos, levando a efeitos colaterais (CZUB; BOROWSKI; BAGINSKI, 2007). Febre, calafrios, tremores, náuseas, vômitos e dor de cabeça são reações adversas devido a infusão da droga. Já a hipocalcemia, hipernatremia, diurese aumentada, hipomagnesemia, disfunção renal e toxicidade sobre medula óssea estão relacionadas às administrações repetidas (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Outras reações são observadas com menor frequência como hipotensão, hipertensão e arritmias cardíacas (WALSH et al., 1999).

Miltefosina é o primeiro e único medicamento oral aprovado para leishmaniose. Por ser de uso oral, existe a facilidade do uso e sua eficácia, o tornaram o medicamento de escolha para leishmaniose visceral (LV) na Índia, Nepal e Bangladesh, no entanto, em outros lugares como África, sua eficácia foi baixa quando comparada aos países asiáticos. Além disso, um ensaio clínico de fase II realizado no Brasil, mostrou que pacientes com LV por *Leishmania infantum* tratados tiveram um recidiva de 40% (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019). Em relação ao seu mecanismo de ação, estudos demonstraram que atua como inibidores da biossíntese lipídica em cinetoplastídeos. Mostrou uma redução na concentração de fosfatidilcolina em *Trypanosoma cruzi* e tem alta seletividade para o parasito (LIRA et al., 2001). No entanto, suas principais desvantagens são a alta incidência de toxicidade gastrointestinal, ocasional toxicidade hepática e nefrotoxicidade, teratogenia, além do alto custo do fármaco (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

A Paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo-aminociclitol utilizado na forma parenteral para LV e parenteral e tópica para LC (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019). Age ligando-se a subunidade ribossômica 30s, interferindo na síntese protéica de protozoários, podendo também levar a leitura incorreta do RNA mensageiro (RNAm). Foi amplamente utilizado no Sudão, onde a terapia foi associada ao estibogluconato de sódio, observando um efeito sinérgico entre os dois fármacos, diminuindo o tempo de tratamento. No entanto, este fármaco não apresentou segurança devido sua necessidade de monitoramento das transaminases hepáticas, febre, nefrotoxicidade, ototoxicidade, além de não trazer informações adequadas sobre seu uso em gestantes sobre seu uso parenteral (DAVIDSON; DEN BOER; RITMEIJER, 2009; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2008; WIWANITKIT, 2012). Em relação ao seu uso tópico, foram relatados efeitos adversos como prurido local, sensação de queimação, dor local e edema local (ARANA et al., 2001).

Pentamidina é uma diamina aromática, desenvolvido como um análogo sintético da insulina, utilizada no início dos anos 80 para o tratamento da LV resistente aos antimônios na Índia (BRAY et al., 2003). Este fármaco pode competir com as poliaminas pela ligação aos ácidos nucléicos, como também pode ligar-se DNA do cinetoplasto (SANDS; KRON; BROWN, 1985). Sands; Kron; Brown (1985) mostraram que a pentamidina era capaz de causar alterações morfológicas como ruptura mitocondrial, frangmentação de membrana e inibição da conversão de amastigotas em promastigotas de *Leishmania mexicana*. Com passar dos anos, sua eficácia diminuiu e mostrou causar graves efeitos colaterais como pancreatite, hipoglicemia, hipotensão, prolongamento do intervalo QT, hipercalemia e com isso seu uso foi abandonado (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

Como visto, o tratamento para leishmaniose é baseado em fármacos com alta toxicidade, graves efeitos colaterais, dificuldade de administração e elevados custos, dificultando o tratamento em países onde a leishmaniose é endêmica (RODRIGUES et al., 2015). Diante dessas dificuldades, existe a necessidade de desenvolvimento de novos compostos que apresentem atividade leishmanicida e imunomoduladora mais eficaz e menor efeito colateral ao paciente.

1.8 BOTRIOSFERANA B (1→3; 1→6) D-GLUCANA

Exopolissacarídeos são polímeros extracelulares produzidos por bactérias e fungos, excretados para o meio extracelular. Esses biopolímeros vêm substituindo progressivamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais, como plantas e animais, devido à facilidade de obtenção e possibilidade de utilização nas indústrias alimentícias, farmacêutica, cosmética e têxtil. Dentre os variados exopolissacarídeos, encontra-se as β -glucanas (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013; METHACANON et al., 2005).

As β -glucanas fúngicas produzidas e excretadas para o meio, são menos comuns e há poucas informações sobre a fisiologia microbiana de sua produção e atividades biológicas (JUNG et al., 2008; NOVAK; VETVICKA, 2008). Despertaram a atenção por seus efeitos biológicos notáveis, pertencendo a um grupo de compostos fisiologicamente ativos, denominados modificadores de resposta biológica (MRB). Os MRB podem ser classificados em dois grupos: as citocinas, responsáveis pela comunicação entre as células do sistema imunológico e os imunomoduladores que são capazes de potencializar ou suprimir o sistema imunológico (NOVAK; VETVICKA, 2008). Como as β -glucanas não são reconhecidas pelo sistema biológico como automoléculas, induzem tanto uma resposta imune inata como a adaptativa (CHEN; SEVIOUR, 2007; GRAUBAUM et al., 2012). São reconhecidas pelo sistema imunológico como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) ligados à membrana plasmática como

receptor do tipo toll 4 (TLR4) e dectina-1, além de ser reconhecido também pelo receptor 3 do complemento (CR3, CD11b/CD18) (KANKKUNEN et al., 2010; VETVICKA; FERNANDEZ-BOTRAN, 2018). Estudo realizado por Kannkkunen et al. (2010) mostra que as β -glucanas primeiramente ligam-se a dectina-1 ativando macrófagos e células dendríticas e produzindo uma resposta pró-inflamatória, com produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de citocinas como IL-1 β . Em seguida, são reconhecidos pelo complexo inflamassoma NLRP3 citosólico, resultando na secreção de IL-1 β dependente de caspase-1.

De fato, diversos estudos têm demonstrado que esse carboidrato possui atividade antiproliferativa sob linhagens tumorais (RAW 264.7, S-180 e HEK293) (FANG et al., 2012), antioxidante (DENG et al., 2012), além de proteção contra infecções bacterianas (*Escherichia coli*, *Streptococcus suis* e *Staphylococcus aureus*), fúngicas (*Candida albicans* e Aspergiloses) e parasitárias (*Leishmania* sp., *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei* e *Trypanosoma cruzi*) (NOVAK; VETVICKA, 2008).

Dentre as β -glucanas, a botriosferana é produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAM-05 em meio líquido contendo glicose. Constitui uma cadeia principal composta por resíduos de glicose ligados a (1 \rightarrow 3)- β com ramificações laterais β (1 \rightarrow 6) ligadas à glicose e di-glicose (gentiobiose) localizadas na posição C-6 da glicose ao longo da cadeia principal (Figura 2) (BARBOSA et al., 2003). Estudos demonstraram propriedades biológicas como antiproliferativas (MALINI et al., 2015; QUEIROZ et al., 2015), pró-apoptótica (QUEIROZ et al., 2015), antioxidante (GIESE et al., 2015), quimiopreventiva (MALINI et al., 2016; SILVA-SENA et al., 2018), antimutagênico (KERCHE-SILVA et al., 2017), anticoagulante (MENDES et al., 2009), anticlastogênica (MIRANDA et al., 2008), hipoglicêmica e hipocolesterolêmica (MIRANDA-NANTES et al., 2011; SILVA-SENA et al., 2018) e antiviral (SACCHELLI et al., 2019), além de ser eficaz na diminuição da obesidade, esteatose hepática, resistência à insulina e intolerância à glicose em ratos (SILVA et al., 2018).

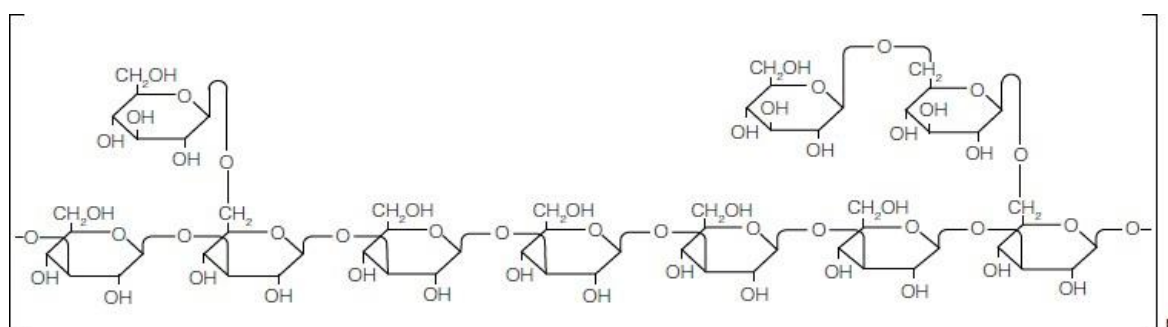


Figura 2: Botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana produzida e caracterizada por Barbosa et al. (2003).

Alguns estudos já foram realizados envolvendo certos tipos de β -glucanas

na infecção por *Leishmania*. O primeiro trabalho realizado foi por Goldman e Jaffe (1991), onde o tratamento via intraperitoneal com β -glucana preparada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de impedir a progressão das lesões por *L. major* em camundongos BALB/c. Outro estudo mostrou que a suplementação via oral com 5% de β -glucana derivada de *Aureobasidium* diminuiu a espessura da pata de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* comparado com o controle. Também foi observado nesses animais um aumento na atividade de células natural killer (NK) e aumento dos níveis de IFN- γ (YATAWARA et al., 2009). Diferente destes, Shivahare et al. (2016) mostrou que a lentinana sozinha e em combinação com baixas doses de miltefosina produzem um efeito estimulador contra *Leishmania donovani*. Essa associação se mostrou sinérgica em macrófagos J774A.1, exibindo níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e NO, como também diminuiu os níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (SHIVAHARE et al., 2016). Outros trabalhos foram realizados analisando o pré-tratamento com β -glucanas, Zimara et al. (2018) mostraram que a presença de β -glucanas tipo Curdlan (1 \rightarrow 3) no momento da infecção intradérmica por *L. major* em camundongos BALB/c desencadeia uma modulação adaptativa de células T de maneira dependente de dectina-1, desenvolvendo um fenótipo resistente (ZIMARA et al., 2018). Em um estudo utilizando monócitos derivados de pacientes, mostrou que estas células treinadas com β -1,3-(D)-glucana conferem maior proteção contra infecção por *L. braziliensis* através da produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, mostrou que macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6J treinados com esta β -glucana continham três vezes menos parasitas vivos em comparação com o controle (DOS SANTOS et al., 2019).

Visto que, os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose causam sérios efeitos colaterais, existe a necessidade do desenvolvimento de novos compostos e que estes trabalhos com diferentes β -glucanas demonstraram atividades promissoras como tratamento e pré-tratamento, desperta a atenção de um estudo mais aprofundado sobre a botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana. Elucidando por quais mecanismos esse composto age sobre o parasito e sua capacidade imunomoduladora.

2 OBJETIVOS

Avaliar *in vitro* o efeito da botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, bem como sua citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais e hemácias.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar *in vitro* a ação leishmanicida direta da botriosferana sobre formas promastigotas;
- b) Elucidar os mecanismos envolvidos na ação direta da botriosferana como mensuração de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, análise do potencial de membrana mitocondrial, corpos lipídicos, vacúolos autofágicos, permeabilidade da membrana do parasito e exposição de fosfatidilserina;
- c) Analisar as alterações morfológicas e ultraestruturais das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* após o tratamento com botriosferana através de microscopia eletrônica de varredura e transmissão;
- d) Determinar *in vitro* a citotoxicidade da botriosferana sobre macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos ovinos;
- e) Avaliar a atividade anti-amastigota da botriosferana em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*;
- f) Investigar o efeito imunomodulador e possíveis mecanismos microbicidas e estresse oxidativo envolvidos sobre macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com botriosferana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA

Foram utilizados camundongos BALB/c de 6 a 12 semanas de idade, gentilmente doados pelo Dr. Giovanny Mazzarotto do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Curitiba, Brasil. Os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina em caixas de polietileno nas dimensões de 41x34 cm, contendo até 15 camundongos por caixa. Na temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade controlada segundo o ciclo claro/escuro (12/12 h), com livre acesso a água estéril e ração comercial *ad libitum* autoclavada. O projeto seguiu as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (nº 88/2018).

3.2 MANUTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE LEISHMANIA AMAZONENSIS

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) provenientes da Universidade Estadual de Maringá foram mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO Invitrogen, New York, EUA), meio HEPES 1M, urina humana 1%, L-glutamina 1%, estreptomicina com penicilina (GIBCO Invitrogen) e 10% bicarbonato de sódio. O cultivo celular foi mantido em estufa tipo B.O.D a 25°C , em frasco de cultura de 25 cm^2 . Foram utilizadas em todos os experimentos formas promastigotas na fase de crescimento estacionária (cultura de 5 dias).

3.3 PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA (B- 1→3; 1→6) D-GLUCANA

A botriosferana foi produzida conforme descrito por Barbosa et al. (2003). Isolado do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAM-05 foi mantido a 4°C em batata dextrose ágar. Foi preparado um inóculo para o crescimento do fungo em placas contendo ágar a 28°C . Após 5 dias, os fragmentos miceliais foram transferidos para quatro frascos de 125 mL contendo 25 mL de glicose (0,5 g/L) e incubados a 28°C por 48 h em agitador rotativo (180 rpm). As pré-culturas foram homogeneizadas em um liquidificador esterilizado durante 0,5 min na velocidade máxima. Após, o homogenato foi centrifugado (1250 g por 10 min), o micélio recuperado e diluído com PBS estéril para uma absorbância de 0,4/ 0,5 a 400 nm e alíquota de 4 mL da suspensão foram utilizadas para inocular em frascos de Erlenmeyer (1L), contendo 200 mL de meio glicose (5 g/L). As culturas foram mantidas em cultivo submerso em Erlenmeyer (180 rpm) por 72 h a 28°C . O líquido extracelular livre de células foi obtido

após a remoção do micélio por centrifugação (3000 g/10 min) a 4°C. O sobrenadante foi tratado com 3 volumes de etanol absoluto e o precipitado foi recuperado, dissolvido em água deionizada e dialisado com frequentes trocas de água deionizada durante 48 h. A solução obtida foi armazenada em um frasco e autoclavada a 120°C por 40 min.

3.4 DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS DA BOTRIOSFERANA PELO MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO

O método se baseia na desidratação de pentoses e hexoses pelo ácido sulfúrico, convertendo-o em furfural e hidroxifurfural, respectivamente. Reagem com fenol formando um complexo colorido de cor alaranjada. O complexo formado com pentoses absorve com maior intensidade na região de 480 nm, enquanto com hexoses em 490 nm. As análises foram feitas de acordo com o método de Dubois et al. (1956). Tubos de ensaio foram preparados, completando o volume de cada amostra para 0,5 mL com água destilada. Adicionou-se 0,5 mL de solução fenol a 5%. Acrescentou 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado, agitando vigorosamente. Em seguida, foram mantidas em repouso à temperatura ambiente durante 20 min. Foi realizada uma curva padrão nas concentrações de 0, 10, 20, 25, 30, 40 e 50 µg/mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm, utilizando a solução do tubo branco (água destilada) para zerar o aparelho.

3.5 ATIVIDADE DA BOTRIOSFERANA SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (1x10⁶ células/mL) foram tratadas com diferentes concentrações de botriosferana (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL) em placas de 24 poços. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 h após o tratamento. Como controle negativo, utilizou-se as promastigotas mantidas em meio de cultura sem tratamento (meio 199) e como controle positivo utilizou-se Anfotericina B na concentração de 1µM. A partir da curva dose-resposta gerada, foi calculado o valor de IC₅₀ por regressão não-linear nos tempos de 24, 48 e 72 h (GraphPad Software, Inc., USA, 5.00).

3.6 CO-DETERMINAÇÃO DE ANEXINA-V E IODETO DE PROPÍDIO

Promastigotas de *L. amazonensis* (1x10⁶ células/mL) foram tratadas com IC₅₀ e 2xIC₅₀, 7 e 14 µg/mL respectivamente, de botriosferana no tempo de 48 h à 25°C em placas de 24 poços. Os parasitos foram lavados e ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação (Santa Cruz Biotechnology), seguido pela adição de uma mistura contendo 0,5 µL de anexina-V FITC e 0,5 µL de iodeto de propídio (PI) (Santa Cruz Biotechnology). A aquisição e análise dos dados foram realizados utilizando um citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus

(BD Biosciences, San Jose, CA). As células foram analisadas de acordo com Miranda-Sapla e colaboradores (2019), onde observou-se processos necróticos (PI+), apoptótico (anexina V+) ou apoptótico tardio (dupla marcação para anexina V+/ PI+).

3.7 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Formas promastigotas (1×10^6 células/mL) foram tratadas com 7 e 14 $\mu\text{g/mL}$ de botriosferana por 48 h em placas de 24 poços, com a finalidade de avaliar o potencial de membrana mitocondrial interna. Para isso, utilizou-se a coloração de Tetrametil-Rodamina e Etil Ester (TMRE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os parasitos tratados foram lavados com PBS e incubados com 2,5 μM de TMRE por 30 min a 25°C e foi analisado em comprimento de onda de excitação de 480 nm e onda de emissão de 580 nm em fluorímetro Perkin-Elmer Victor X3.

3.8 PRESENÇA DE VACÚOLOS AUTOFÁGICOS

Avaliou-se a presença de vacúolos autofágicos e para isso, formas promastigotas foram tratadas por 48 h com 7 e 14 $\mu\text{g/mL}$ de botriosferana em placas de 24 poços. Os parasitos foram lavados duas vezes em PBS e incubados com 5 μL de monodansilcadaverina (MDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 1 h à 25°C. Foram analisados a partir de um fluorímetro Perkin-Elmer Victor X3 em comprimento de onda de excitação de 380 nm e emissão 525 nm.

3.9 PRESENÇA DE CORPOS LIPÍDICOS POR VERMELHO DO NILO

Formas promastigotas (1×10^6 células/mL) foram tratadas com 7 e 14 $\mu\text{g/mL}$ em placas de 24 poços. Os parasitos foram colhidos e lavados duas vezes em PBS e diretamente corados com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Vermelho do Nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 30 min à 25°C. Os corpos lipídicos citoplasmáticos dos parasitas foram detectados por fluorímetro Perkin-Elmer Victor X3 utilizando comprimentos de onda de 530 nm e 635 nm para emissão e excitação, respectivamente.

3.10 PRODUÇÃO DE EROS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

Avaliou-se a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), onde formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 células/mL) foram tratadas com 7 e 14 $\mu\text{g/mL}$ de botriosferana por 48 h em placas de 24 poços, lavadas com PBS e carregada com 10 μM

da sonda permeante diacetato 2',7' -diclorofluoresceína (H₂DCFDA) (Sigma St. Louis, MO, USA) diluída em DMSO e incubadas no escuro por 45 min à 25°C. Como controle positivo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 30 min. EROs foram mensuradas como um aumento na fluorescência causada pela conversão do corante não fluorescente para o altamente fluorescente 20,70 diclorofluoresceína, com comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm em leitor de microplaca de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finland).

3.11 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO PELO MÉTODO DE GRIESS EM FORMAS PROMASTIGOTAS

O óxido nítrico (NO) foi determinado pelo método de Griess nas alíquotas de 60 µL do ensaio direto sobre as formas promastigotas, foi adicionado 60 µL de reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e 0,1% de naftililodiamino-bicloridrato em ortofosfórico (H₃PO₄) 5%) e incubou-se por 10 min. Uma curva padrão foi feita usando diluições seriadas de NaNO₂, e a absorbância foi determinada a 550 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO).

3.12 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E TRANSMISSÃO

Formas promastigotas tratadas por 48 h com 7 e 14 µg/mL de botriosferana foram coletadas por centrifugação, lavadas em PBS 0,01 M pH 7,2. Para avaliação das alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), os parasitos foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e aderidos em lamínulas recobertas com poli-L-lisina por 12 h. As células aderidas foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixadas em tetróxido de ósmio por 1 h, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30-100%), submetidas a secagem ao ponto crítico através da substituição do etanol por dióxido de carbono (CO₂), metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de duplo feixe de alta resolução FEI SCIOS. Para avaliações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão (MET), os parasitos foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 1 h. Após, foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50-100%), incluídos em resina EPON e polimerizados em estufa a 60 °C durante 72 h. Cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrotomo, depositados sobre grid de cobre, contrastados com acetato

de uranila e citrato de chumbo, durante 20 a 10 min, respectivamente. A análise foi realizada em microscópio de transmissão JEOL JEM 1400.

3.13 VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para avaliar possível efeito citotóxico da botriosferana em células peritoneais, foi realizado o teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), que mensura a atividade metabólica da mitocôndria (Sigma-Aldrich) como descrito por Mosmann, 1983. Macrófagos (5×10^5 células/mL) foram recuperados da cavidade peritoneal com PBS gelado suplementado com 3% de SBF e então cultivados em placas de 24 poços com 500 μ L de meio RPMI 1640 (10% SBF) por 24 h (37°C, 5% de CO₂). As células aderentes foram incubadas com botriosferana (6,25; 12,5; 25; 50 μ g/mL) por 24 h nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado aos poços o MTT (5 mg/mL), seguido de nova incubação por 4 h. O produto do MTT (cristais de formazan) foi diluído com 300 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), transferido para uma placa de 96 poços e lido em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) a 550 nm. Como controle negativo, utilizou-se macrófagos não tratados, enquanto o controle positivo foram células tratadas com H₂O₂. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade em comparação com o grupo controle e calculado com a seguinte fórmula: % (macrófagos viáveis) = amostra do grupo tratado/ média do controle não tratado) x 100.

3.14 ENSAIO HEMOLÍTICO

A toxicidade da botriosferana foi avaliada com ensaio hemolítico utilizando eritrócitos de carneiro (Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina: 8286.2016.60). Sangue de carneiro foi coletado com heparina, e os eritrócitos lavados 3 vezes com PBS (centrifugação a 1000 rpm por 10 min). Uma suspensão de eritrócitos a 2% foi preparada com PBS e misturada numa placa de 96 poços com botriosferana 1:1 em volume final de 200 μ L para se obter concentrações finais de (6,25; 12,5; 25; 50 μ g/mL). As placas foram então incubadas durante 3 h a 37°C com 5% de CO₂. PBS serviu como controle negativo, e o controle positivo foi utilizado água destilada para hemólise. As placas foram centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min e a absorbância dos sobrenadantes foi lida em 550 nm.

3.15 ENSAIO CELULAR ANTIAMASTIGOTA

Macrófagos peritoneais provenientes de BALB/c (5×10^5 cel/mL) foram

cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm, incubados com 500 µL de meio RPMI 1640 por 24 h à 37°C e 5% CO₂. Os macrófagos aderentes foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* (2,5x10⁶) por 3 h. Após a infecção, as formas promastigotas não internalizadas foram removidas por lavagem com PBS e as células aderentes foram tratadas com botriosferana (6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL), meio RPMI 1640 (controle negativo) e Anfotericina B 1 µM (controle positivo) por 24 h (37°C, 5% CO₂). Em seguida, as células foram coradas com Leishman e 20 campos foram analisados por imersão aumentada (ampliação de 1000x), usando microscópio óptico (Olympus Bx41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para determinar o índice de eliminação e o número de amastigotas após 24 h de tratamento.

3.16 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS

Os sobrenadantes do ensaio celular anti-amastigota foram utilizados para mensurar os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucina (IL) -6 pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fischer Scientific®). As placas foram lidas a 450 nm usando o leitor de placas ELISA (Thermo Fischer Scientific, Multiskan, GO) e os resultados foram expressos em pg/mL com base em uma curva padrão.

3.17 DETERMINAÇÃO DE EROS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

Avaliou-se a produção de EROs, onde macrófagos peritoneais de BALB/c foram cultivados em placa de 96 poços (2,5x10⁵ células/mL) e incubados com 100 µL de meio RPMI 1640 por 24 h à 37°C e 5% de CO₂. Após a aderência, as células foram infectadas com formas promastigotas (5x10⁵ células/mL) durante 3 h. Após a infecção, as células aderentes foram tratadas com botriosferana (6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL), meio RPMI 1640 (controle negativo) por 24 h à 37°C e 5% de CO₂. Após o tratamento, adicionou-se 10 µM de sonda permeante diacetato 2',7' – diclorofluoresceína (H₂DCFDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluída em DMSO e incubada no escuro por 30 min à 25°C. Como controle positivo, foi utilizado o H₂O₂ por 1 h. As EROs foram mensuradas com comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm em leitor de microplaca de fluorescência (Victor X3, Perkin-Elmer, Finland).

3.18 DETERMINAÇÃO DE NITRITO COMO ESTIMATIVA DOS NÍVEIS DE NO EM FORMAS AMASTIGOTAS

O óxido nítrico (NO) foi determinado pelo método de Griess, nas alíquotas de 60 µL do sobrenadante do ensaio celular anti-amastigota pós 24 h de tratamento,

adicionando 60 μL de reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e 0,1% de naftililodiaminobicloridrato em ortofosfático (H_3PO_4) 5%) e incubou-se por 10 min. Uma curva padrão foi feita usando diluições seriadas de NaNO_2 , e a absorbância foi determinada a 550 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO).

3.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram determinadas por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Três experimentos independentes foram realizados, cada um com conjuntos de dados em triplicata. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA, 500-288). p -valor $\leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico que será submetido à revista *Acta Tropica*, com fator de impacto 2.629.

1 Botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana promove morte in vitro de promastigotas
2 de *Leishmania amazonensis* por apoptose-like e de amastigotas devido ao
3 aumento dos níveis de EROs e NO
4 Amanda Cristina Machado Carloto^a; Bruna Taciane da Silva Bortoleti^b; Ana Carolina
5 Jacob Rodrigues^a; Fernanda Tomiotto-Pellissier^b; Manoela Daisele Gonçalves^c; Danielle
6 Lazzarin Bidóia^a; João Paulo Assolini^a; Taylon Felipe Silva^a; Aneli de Melo Barbosa-
7 Dekker^d; Idessania Nazareth Costa^a; Ivete Conchon-Costa^a; Milena Menegazzo
8 Miranda-Sapla^a; Wander Rogério Pavanelli^a

9 ^a Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer,
10 Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
11 Estadual de Londrina, PR, Brasil

12 ^b Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ/PR), Curitiba, Paraná, Brasil

13 ^c Laboratório de Biotransformação e Fitoquímica, Departamento de Química, Centro de
14 Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil

15 ^d Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de
16 Londrina, PR, Brasil

17 * Autor Correspondente:

18 Amanda Cristina Machado Carloto / Wander Rogério Pavanelli

19 Departamento de Ciências Patológicas, Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças
20 Negligenciadas e Câncer. Universidade Estadual de Londrina – UEL. Rodovia Celso
21 Garcia Cid, PR-445 Km-380, CEP 86057-970. Londrina, PR, Brasil. Telefone: +055 43
22 33714539 Email: amanda.carloto@gmail.com / wanderpavanelli@yahoo.com.br

23

24

25 **Resumo**

26 A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Leishmania* com
27 amplo espectro de manifestações clínicas. O tratamento disponível se baseia em
28 fármacos de alto custo, com efeitos colaterais, dificuldades na administração, além de
29 já ter sido relatado o surgimento de cepas resistentes. Dessa forma, a busca por novas
30 alternativas terapêuticas que possam apresentar uma ação mais eficaz, sem causar
31 efeitos colaterais ao paciente, tem sido o objeto de estudo de vários pesquisadores.
32 Uma vez tendo observado que diversos trabalhos já demonstraram os efeitos benéficos
33 das β -glucanas fúngicas tais como: atividade antiproliferativa, pró-apoptóticas,
34 antioxidante, antimutagênico, quimiopreventiva, anticoagulante, anticlastogênica,
35 antiviral, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica. O nosso objetivo foi é avaliar *in vitro* o
36 efeito da botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana sobre formas promastigotas e
37 amastigotas de *L. amazonensis*. A atividade direta da botriosferana sobre formas
38 promastigotas foi avaliada *in vitro* por contagem em câmara de Neubauer em 24, 48 e
39 72 horas, e nós observamos que em todos os períodos houve inibição da proliferação.
40 Adicionalmente nós observamos que o composto induziu uma produção de óxido nítrico
41 (NO), hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial, aumento de espécies
42 reativas de oxigênio (ERO) e acúmulo de corpos lipídicos, desencadeando processo
43 autofágico por monodansilcadaverina, danos à membrana do parasito e exposição de
44 fosfatidilserina. Com isso, foi visto que a maioria dos parasitas estavam passando por
45 um processo de apoptose-like. Esses mecanismos de ação sobre o parasito foram
46 confirmados através de MEV e MET. Além disso, o intervalo de concentrações utilizadas
47 não alterou a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e
48 eritrócitos ovinos. Também observamos que a botriosferana foi capaz de reduzir o
49 número de macrófagos infectados, conseqüentemente o número de amastigotas por
50 macrófagos, por promover o aumento de citocinas pró-inflamatórias e
51 conseqüentemente aumento de EROs e NO. Com base nos dados obtidos, é possível

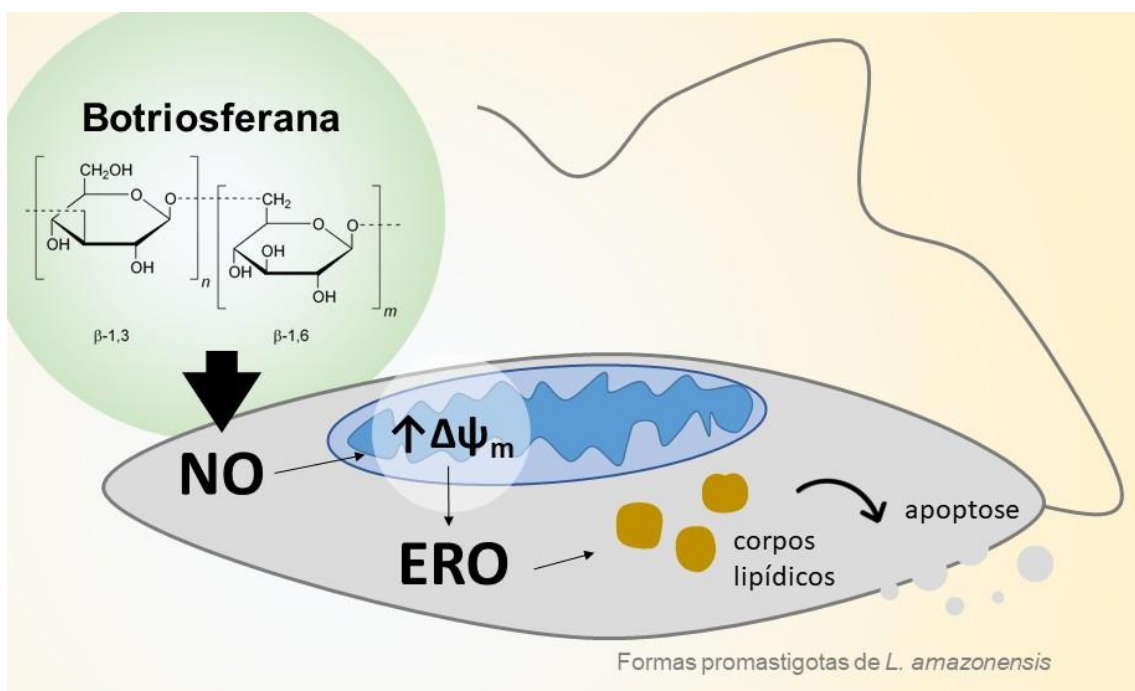
52 inferir que a botriosferena β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana exerce efeito leishmanicida e
53 imunomodulador, atuando nas formas promastigotas através de processos autofágicos
54 e apoptóticos e em formas intracelulares/amastigotas induzindo o aumento de EROs e
55 NO.

56 **Abstract**

57 Leishmaniasis is na infectious disease caused by the protozoan *Leishmania* with
58 a wide spectrum of clinical manifestations. The available treatment is based on high-cost
59 drugs, with side effects, difficulties in administration, in addition to the appearance of
60 resistant strains. Thus, the search for new therapeutic alternatives that can presente a
61 more effective action, without causing side effects to the patient, has been studied by
62 many researchers. Having observed that several studies have already demonstrated the
63 beneficial effects of fungal β -glucans such as: antiproliferative, pro-apoptotic,
64 antioxidante, antimutagenic, chemopreventive, anticoagulante, anticlastogenic, antiviral,
65 hypoglycemic and hypocholesterolemic activity. Our objective was to evaluate *in vitro*
66 the effect of botryosphaeran β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucan in the promastigote and amastigote
67 of *L. amazonensis*. The direct activity of botryosphaeran on promastigote forms was
68 evaluated *in vitro* by counting in a Neubauer chambre at 24, 48 and 72 hours, and we
69 observed that proliferation was inhibited in all periods. Additionally, we observed that the
70 compound induced a production of nitric oxide (NO), hyperpolarization of the
71 mitochondrial membrane potential, increase in reactive oxygen species (ROS), and
72 accumulation of lipid droplets, triggering na autophagic process by
73 monodansylcadaverine, damage to the parasite membrane and phosphatidylserine
74 exposure. Thus, it was seen that most of the parasites were going through an apoptosis-
75 like process. These mechanisms of action on the parasite were confirmed by SEM and
76 TEM. In addition, the range of concentrations used did not alter the viability of peritoneal
77 macrophages from BALB/c mice and sheep erythrocytes. We also observed that
78 botryosphaeran was able to reduce the number of infected macrophages, consequently

79 the number of amastigotes per macrophages, by promoting an increase in pro-
 80 inflammatory cytokines and, consequently, an increase in ROS and NO. Based on the
 81 data obtained, it is possible to infer that botryosphaeran β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucan exerts
 82 an leishmanicidal and immunomodulatory effect, acting on promastigotes through
 83 autophagic and apoptotic processes and in intracellular/amastigotes forms inducing the
 84 increase of ROS and NO.

85 Resumo gráfico



86

87 Leishmaniasis; Beta-glucan; Polysaccharides; Cytotoxicity; Apoptosis-like.

88

89

90

91

92

93

94 1. Introdução

95 A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por espécies do
96 protozoário do gênero *Leishmania*, transmitida aos mamíferos através do vetor
97 flebotomíneo (Burza et al., 2018). Esta doença possui diversas manifestações clínicas,
98 sendo a forma cutânea a mais comum. De acordo com a Organização Mundial da Saúde
99 (OMS), estima-se que ocorram de 600.000 a 1 milhão de novos casos anualmente de
100 leishmaniose cutânea, sendo a maioria dos casos presentes no Afeganistão, Argélia,
101 Brasil, Colômbia e República Árabe da Síria (WHO, 2019).

102 Os tratamentos de primeira escolha baseiam-se principalmente no uso de
103 antimoniais pentavalentes como estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e antimoniato
104 de meglumina (Glucantime[®]). Apesar da eficácia comprovada, estes fármacos trazem
105 sérios efeitos colaterais, devido ao longo período de tratamento, bem como toxicidade
106 nos sistemas cardíaco, renal e hepático (Anversa et al., 2018; Sundar and Singh, 2018).
107 Em casos de contraindicação aos antimoniais, tratamentos alternativos como
108 anfotericina B[®], paramomicina, pentamidina e miltefosina podem ser utilizados. No
109 entanto, estes fármacos de segunda escolha também causam diversos efeitos
110 colaterais ao paciente, como disfunções gastrointestinais, nefrotoxicidade e pancreatite,
111 possuem alta toxicidade, além do desenvolvimento de cepas resistentes (Ghorbani and
112 Farhoudi, 2017). Sendo assim, a busca por fármacos alternativos se torna importante e
113 urgente.

114 Neste sentido, trabalhos demonstraram os efeitos benéficos de substâncias e/ou
115 compostos provenientes de fontes alternativas, como produtos naturais derivados de
116 plantas, bactérias e fungos. As β -glucanas fúngicas, produzidas e excretadas para o
117 meio, são realizadas por um número considerável de fungos, incluindo basidiomicetos,
118 fungos filamentosos e leveduras (Jung et al., 2008; Mahapatra and Banerjee, 2013;
119 Vetvicka and Fernandez-Botran, 2018). São carboidratos que tem despertado atenção
120 por sua capacidade de induzir resposta imune inata e adaptativa (Chen and Seviour,

121 2007; Graubaum et al., 2012). Dentre as β -glucanas fúngicas, a botriosferana produzida
122 pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAM-05 em meio líquido contendo
123 glicose, é uma β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) –D-glucana, caracterizada estruturalmente por Barbosa et
124 al. (2003). Estudos anteriores demonstraram atividades biológicas deste carboidrato,
125 como propriedades antiproliferativas, pró-apoptótica, antimutagênico e
126 quimiopreventiva (Kerche-Silva et al., 2017; Malini et al., 2016, 2015; Queiroz et al.,
127 2015; Silva-Sena et al., 2018) sobre células tumorais, antioxidante (Giese et al., 2015),
128 antiviral (Sacchelli et al., 2019), anticoagulante (Mendes et al., 2009), anticlastogênica
129 (Miranda et al., 2008), hipoglicêmica e hipocolesterolêmica (Miranda-Nantes et al.,
130 2011).

131 Além disso, a β -glucana proveniente do fungo *Lentinus edodes* apresentou efeito
132 imunomodulador sobre macrófagos J774A.1, elevando os níveis de citocinas pró-
133 inflamatórias (IL-12 e TNF- α) e diminuindo as anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β)
134 (Shivhare et al., 2016). Foram realizados também estudos envolvendo outros tipos de
135 β -glucanas provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aureobasidium pullulans* na
136 infecção por *Leishmania*, as quais foram capazes de impedir a progressão da infecção
137 *in vivo* por *L. major* e *L. amazonensis* em camundongos BALB/c (Goldman and Jaffe,
138 1991) e C57BL/6 (Yatawara et al., 2009), respectivamente.

139 Embora alguns estudos tenham demonstrado as atividades das β -glucanas
140 frente à infecção por *Leishmania*, pouco se sabe sobre a ação da botriosferana β (1 \rightarrow 3;
141 1 \rightarrow 6) D-glucana e os mecanismos microbicidas e imunomoduladores envolvidos na
142 morte de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com esta
143 molécula. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* da botriosferana
144 β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana sobre formas promastigotas livres e amastigotas intracelulares
145 de *L. amazonensis*, bem como elucidar seu mecanismo de ação na morte deste
146 parasita.

147 2. Materiais e Métodos

148 2.1 Animais e Comitê de Ética

149 Foram utilizados camundongos BALB/c de 6 a 12 semanas de idade, gentilmente
150 doados pelo Dr. Giovanni Mazzarotto do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Curitiba,
151 Brasil. Os camundongos foram mantidos e utilizados de acordo com o protocolo
152 aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Estadual de (nº de
153 aprovação 88/2018).

154 2.2 Cultura de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

155 As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*
156 (MHOM/BR/1989/166MJO) foram mantidas como descrito previamente por Tomiotto-
157 Pellissier e colaboradores (2018), em meio de cultura 199 (GIBCO Invitrogen, New York,
158 EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO Invitrogen, New York,
159 EUA), meio HEPES 1M, urina humana 1%, L-glutamina 1%, estreptomicina com
160 penicilina (GIBCO Invitrogen) e a 10% de bicarbonato de sódio. O cultivo celular foi
161 mantido em estufa tipo B.O.D a 25°C, em frasco de cultura de 25 cm². Foram utilizadas
162 em todos os experimentos formas promastigotas na fase de crescimento estacionária
163 (cultura de 5 dias).

164 2.3 Produção de Botriosferana β (1→3; 1→6) D-glucana

165 A botriosferana foi produzida conforme descrito por Barbosa e colaboradores
166 (2003). Resumidamente, o isolado de *Botryosphaeria rhodina* MAM-05 foi mantido a 4°C
167 em ágar batata-dextrose. Após o crescimento do fungo, fragmentos miceliais foram
168 cultivados em frascos contendo glicose por 48 h a 28°C e 180 rpm. As pré-culturas foram
169 homogeneizadas e o homogenato foi centrifugado (1250xg/10 min) e a suspensão foi
170 inoculada em frascos contendo glicose por 72 h a 28°C e 180 rpm. Foi obtido um líquido
171 extracelular após centrifugação (3000xg/10min) a 4°C. O sobrenadante foi coletado e
172 dialisado (48 h) com trocas frequentes de água. O dialisado então foi tratado com 3
173 volumes de etanol absoluto e incubado a 4°C por 24 h. O material precipitado foi

174 coletado por filtração, re-dissolvido em água e dialisado contra água deionizada por 48h.
175 A solução obtida foi armazenada em um frasco e autoclavada a 120°C por 40 min. Após
176 o processo, a concentração foi mensurada pelo método fenol-sulfúrico conforme
177 descrito por Dubois et al. (1956).

178 *2.4 Atividade da botriosferana sobre formas promastigotas de L. amazonensis*

179 As formas promastigotas de *L. amazonensis* (10^6 células/mL) foram tratadas com
180 diferentes concentrações de botriosferana (6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg/mL). Os parasitos
181 foram contados em câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 h de tratamento (25°C). Como
182 controle negativo, utilizou-se as formas promastigotas mantidas em meio de cultura sem
183 tratamento (meio 199). Parasitos tratados com 1 µM de Anfotericina B (AmB) foram
184 utilizados como controle positivo. A partir da curva dose-resposta gerada, foi calculado
185 o valor de IC₅₀ por regressão não-linear (GraphPad Software, Inc., USA, 5.00).

186 *2.5 Determinação de nitrito como estimativa dos níveis de NO em formas promastigotas* 187 *e amastigotas*

188 O óxido nítrico (NO) foi determinado pelo método de Griess. Foram aliqüotados
189 60 µL do ensaio direto sobre as formas promastigotas nas concentrações de IC₅₀ e
190 2xIC₅₀ (7 e 14 µg/mL) no tempo 48 h, como também aliqüotados do ensaio
191 antiamastigota (5×10^5 células/mL – infectados e tratados nas mesmas condições
192 descritas no ensaio) e adicionou-se 60 µL de reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e
193 0,1% de naftililodiamino-bicloridrato em 5% de H₃PO₄ seguidos por 10 min de
194 incubação. Uma curva padrão foi feita usando diluições seriadas de NaNO₂, e a
195 absorbância foi determinada a 550 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific,
196 Multiskan GO).

197 *2.6 Determinação do potencial de membrana mitocondrial*

198 Formas promastigotas (10^6 células/mL) foram tratadas com as concentrações
199 equivalentes ao IC₅₀ e 2xIC₅₀ (7 e 14 µg/mL) de botriosferana por 48 h com a fim de

200 avaliar o potencial de membrana mitocondrial interna. Para isso, utilizou-se a sonda
201 tetrametilrodamina metil ester (TMRE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os
202 parasitos tratados foram lavados e incubados com 2,5 μM de TMRE por 30 min a 25°C
203 e foram analisados utilizando comprimento de onda de excitação de 480 nm e emissão
204 de 580 nm em fluorímetro Perki-Elmer Victor X3.

205 *2.7 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em promastigotas e macrófagos* 206 *infectados*

207 A produção de EROs foi avaliada em formas promastigotas de *L. amazonensis*
208 (10^6 células/mL) tratadas com 7 e 14 $\mu\text{g/mL}$ de botriosferana por 48 h ou os macrófagos
209 infectados por *L. amazonensis* (5×10^5 células/mL – infectados e tratados nas mesmas
210 condições descritas no ensaio anti-mastigota) lavadas em PBS (pH 7,4) e carregadas
211 com 10 ou 2 μM , respectivamente, de um diacetato de sonda permeante 2',7' -
212 diclorofluoresceína (H_2DCFDA) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluído em DMSO e
213 incubado no escuro por 45 min, à temperatura da célula. As EROs foram medidas com
214 um comprimento de onda de excitação de 488 nm e comprimento de onda de emissão
215 de 530 nm em um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3).

216 *2.8 Avaliação da presença de corpos lipídicos por vermelho do Nilo*

217 Formas promastigotas (10^6 células/mL) foram tratadas com 7 e 14 $\mu\text{g/mL}$ por 48
218 h. Após, foram lavadas duas vezes em PBS e marcados com 10 $\mu\text{g/mL}$ de vermelho do
219 Nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 30 min à 25°C. Os corpos lipídicos
220 citoplasmáticos dos parasitos foram detectados por fluorímetro Perkin-Elmer Victor X3
221 utilizando comprimentos de onda de 530 nm e 635 nm para emissão e excitação,
222 respectivamente.

223 *2.9 Avaliação da presença de vacúolos autofágicos*

224 Para avaliar a presença de vacúolos autofágicos, formas promastigotas foram
225 tratadas por 48 h com 7 e 14 $\mu\text{g/mL}$ de botriosferana. Os parasitos foram lavados duas

226 vezes em PBS e incubados com 5 μ L de monodansilcadaverina (MDC) (Sigma-Aldrich,
227 St. Louis, MO, EUA) por 1 h à 25°C, em seguida, foram analisados por fluorímetro
228 (Perkin-Elmer Victor X3) em comprimento de onda de excitação de 380 nm e emissão
229 525 nm.

230 *2.10 Co-determinação de anexina-V e iodeto de propídio*

231 Formas promastigotas de *L. amazonensis* (10^6 células/mL) foram tratadas com
232 7 e 14 μ g/mL de botriosferana por 48 h a 25°C. Os parasitos foram lavados e
233 ressuspendidos em 100 μ L de tampão de ligação (Santa Cruz Biotechnology), seguido
234 pela adição de uma mistura contendo 0,5 μ L de anexina-V FITC e 0,5 μ L de iodeto de
235 propídio (PI) (Santa Cruz Biotechnology). A aquisição e análise dos dados foram
236 realizados utilizando um citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences, San
237 Jose, CA). As células foram analisadas de acordo com Miranda-Sapla e colaboradores
238 (2019).

239 *2.11 Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais por microscopia eletrônica*

240 Formas promastigotas tratadas por 48 h com 7 e 14 μ g/mL de botriosferana
241 foram coletadas por centrifugação, lavadas em PBS 0,01 M pH 7,2. Para avaliação das
242 alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), os parasitos
243 foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em
244 seguida, os parasitos foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e aderidos
245 em lamínulas recobertas com poli-L-lisina. As células aderidas foram lavadas com
246 tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixadas em tetróxido de ósmio, desidratadas em
247 concentrações crescentes de etanol (30 – 100%), submetidas a secagem ao ponto
248 crítico através da substituição do etanol por dióxido de carbono (CO₂), metalizadas com
249 ouro e analisadas em microscópio eletrônico de duplo feixe de alta resolução FEI
250 SCIOS. Para avaliações ultraestruturais por microscopia de eletrônica de transmissão
251 (MET), os parasitos foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de

252 sódio 0,1 M, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% a
253 temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após, foram desidratados em concentrações
254 crescentes de acetona (50 – 100%), incluídos em resina EPON e polimerizados em
255 estufa a 60 °C durante 72 h. Cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo,
256 depositados sobre grid de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de
257 chumbo, durante 20 e 10 min, respectivamente. A análise foi realizada em microscópio
258 eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400.

259 *2.12 Análise da viabilidade macrófagos peritoneais*

260 Para avaliar um possível efeito citotóxico da botriosferana em células peritoneais,
261 foi realizado o teste de MTT (Sigma-Aldrich) conforme descrito por Fanti e colaboradores
262 (2018). Macrófagos (5×10^5 células/mL) foram incubados com botriosferana (6,25; 12,5;
263 25; 50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h (37°C, 5% de CO_2). O produto do MTT (cristais de formazan) foi
264 diluídos com 300 μL de DMSO (Sigma-Aldrich), transferido para uma placa de 96 poços
265 e lido em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) a 550 nm. Como
266 controle negativo, utilizou-se macrófagos não tratados, enquanto o controle positivo
267 foram células tratadas com H_2O_2 . Os resultados foram expressos como porcentagem de
268 viabilidade em relação ao grupo controle.

269 *2.13 Ensaio hemolítico*

270 A ação hemolítica da botriosferana foi avaliada conforme Bortoleti e
271 colaboradores (2018), utilizando eritrócitos de carneiro (Comitê de Ética em
272 Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina: N° 8286/2016.60). O
273 sangue foi coletado com heparina, e os eritrócitos lavados 3 vezes com PBS
274 (centrifugação a 1000 rpm por 10 min). Uma suspensão de eritrócitos a 2% foi preparada
275 com PBS e misturada numa placa de 96 poços com botriosferana 1:1 em um volume
276 final de 200 μL para se obter concentrações finais de (6,25; 12,5; 25; 50 $\mu\text{g/mL}$). As
277 placas foram então incubadas durante 3h a 36°C em 5% de CO_2 . PBS foi utilizado como

278 controle negativo, e água destilada como controle positivo para hemólise. As placas
279 foram centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min e os sobrenadantes foram coletados
280 para a determinação da absorbância em 550 nm.

281 *2.14 Ensaio celular anti-amastigota*

282 Macrófagos peritoneais provenientes de BALB/c (5×10^5 cel/mL) foram mantidos
283 em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm, incubados com 500 μ L
284 de meio RPMI 1640 por 24 horas à 37°C e 5% CO₂. Os macrófagos aderentes foram,
285 então, infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* ($2,5 \times 10^6$) por 3 h. Após
286 a infecção, as formas promastigotas não internalizadas foram removidas por lavagem
287 com PBS e as células infectadas foram tratadas com botriosferana (6,25; 12,5; 25 e 50
288 μ g/mL), meio RPMI 1640 (controle negativo) ou AMB 1 μ M (controle positivo) por 24
289 horas (37°C, 5% CO₂). Em seguida, as células foram coradas com Leishman e 20
290 campos foram analisados por ampliação de 1000x em microscópio de óptico (Olympus
291 Bx41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para determinar a porcentagem de
292 macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago após 24 horas de
293 tratamento.

294 *2.15 Mensuração de citocinas*

295 Os sobrenadantes do ensaio celular anti-amastigota foram utilizados para
296 mensurar os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina (IL) -6 pelo
297 ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), de acordo com as instruções do
298 fabricante (Thermo Fischer Scientific®). As placas foram lidas a 450 nm usando o leitor
299 de placas ELISA (Thermo Fischer Scientific, Multiskan, GO) e os resultados foram
300 expressos em pg/mL com base em uma curva padrão.

301 *2.16 Análise Estatística*

302 Foram utilizados os dados de três experimentos independentes realizados em
303 triplicata e expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados

304 utilizando o software estatístico GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., EUA,
305 500.288). Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas por
306 ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey para comparações múltiplas. As diferenças foram
307 consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

308 **3. Resultados e Discussão**

309 Diante do cenário atual, com tratamentos limitados e toxicidade elevada, a busca
310 por produtos naturais derivados de plantas e/ou fungos com ação leishmanicida têm
311 sido de grande interesse por alguns pesquisadores (Fatima et al., 2016). Desse modo,
312 o presente estudo busca esclarecer alguns mecanismos de ação sobre as
313 promastigotas e atividade anti-mastigota da botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-glucana no
314 modelo experimental *in vitro* de *Leishmania amazonensis*.

315 Primeiramente, nós avaliamos a concentração total da botriosferana pelo método
316 de fenol-sulfúrico e encontramos um valor de 0,5 g/L (dados não mostrados). A partir
317 desta, investigamos a atividade direta da botriosferana sobre formas promastigotas de
318 *L. amazonensis*. Todas as concentrações (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL) e tempos
319 testados (24, 48 e 72 h) mostraram uma redução significativa na proliferação de *L.*
320 *amazonensis* em relação ao controle (Figura 1a) ($p \leq 0,001$). O tratamento com 1 μ M de
321 Amb também reduziu significativamente a proliferação dos parasitos em relação ao
322 controle ($p \leq 0,001$) em todos os tempos testados. A partir destes dados, foi calculado o
323 valor de IC_{50} , isto é, a concentração capaz de inibir o crescimento dos parasitos em
324 50%. As concentrações estabelecidas foram de 37,4; 7 e 13 μ g/mL, respectivamente
325 para 24, 48 e 72 h (Figura 1b, c, d). Desta forma, optamos por prosseguir os
326 experimentos no tempo em que o composto apresentou a menor concentração eficaz,
327 isto é, a concentração 7 μ g/mL, no tempo de 48 h. Estudos anteriores utilizando β -
328 glucana fúngicas mostraram a ação deste composto frente a espécies de *L. major* e *L.*
329 *amazonensis*, onde β -glucanas provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* e
330 *Aurobasidium pullulans* foram capaz de impedir a progressão das lesões e diminuir a

331 espessura das patas de camundongos BALB/c e C57BL6, respectivamente (Goldman
332 and Jaffe, 1991; Yatawara et al., 2009).

333 Sabendo do efeito leishmanicida da botriosferana, analisamos quais possíveis
334 mecanismos de ação poderiam estar envolvidos na eliminação do parasita. Nós
335 verificamos que o tratamento ($2 \times IC_{50}$) foi capaz de aumentar os níveis de óxido nítrico
336 (NO) nos parasitos após 48 horas de tratamento ($p \leq 0,001$) (Figura 2a). Além disso,
337 observamos que a botriosferana ($2 \times IC_{50}$) provocou hiperpolarização mitocondrial
338 ($p \leq 0,05$) sendo confirmado por MET, onde a mitocôndria apresentou-se inchada (Figura
339 3g-h). Ambas as concentrações (IC_{50} e $2 \times IC_{50}$) provocaram aumento nos níveis de EROs
340 ($p \leq 0,05$) e da presença de corpos lipídicos ($p \leq 0,0005$) no tempo de 48 horas (Figura 2b-
341 d).

342 O NO, além de ser uma potente molécula microbicida, é um importante
343 modulador do metabolismo mitocondrial, afetando suas funções cruciais e gerando
344 hiperpolarização das membranas mitocondriais (Nagy et al., 2007). As mitocôndrias são
345 essenciais na sobrevivência de tripanossomatídeos, como *Leishmania* spp., uma vez
346 que estes parasitos possuem uma única mitocôndria, responsável pela geração do ATP
347 celular (Fidalgo and Gille, 2011; Monzote and Gille, 2010). A hiperpolarização
348 mitocondrial, por sua vez, está diretamente relacionada com a síntese de superóxido
349 (O_2^-) e, conseqüentemente, EROs intracelular (Fidalgo and Gille, 2011). Essa
350 sobrecarga pode resultar em alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial
351 e induzir a abertura de poros de transcrição de permeabilidade não seletiva e de alta
352 condutância na membrana mitocondrial interna, resultando em inchaço mitocondrial,
353 podendo levar a morte celular por apoptose ou necrose (Javadov et al., 2018). Além
354 disso, Queiroz et al. (2015) mostraram que a mesma botriosferana β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) D-
355 glucana foi capaz de aumentar a produção de EROs em linhagem celular de câncer de
356 mama (MCF-7) no tempo de 48 horas. O estresse oxidativo acarreta em danos no
357 material genético, proteínas e lipídios, podendo causar a deposição de lipídios no citosol

358 (Ray et al., 2012; Scariot et al., 2017). A presença de vacúolos lipídicos, por sua vez, é
359 indicativa de morte celular (Boren and Brindle, 2012).

360 Assim, nosso próximo objetivo foi identificar qual o tipo de morte celular
361 desencadeada nas formas promastigotas tratadas. Primeiramente verificamos que os
362 tratamentos com IC_{50} e $2xIC_{50}$ da botriosferana por 48 horas foram capazes de causar
363 um acúmulo de vacúolos autofágicos no parasita (Figura 4a) ($p \leq 0,05$), o mesmo foi
364 observado em MET (Figura 3g-h). Para organismos como *Leishmania*, a autofagia
365 desempenha um papel fundamental, participando de diversos efeitos, desde a
366 sobrevivência à depleção de nutrientes até a diferenciação de sua morfologia durante o
367 ciclo biológico (Giri and Shaha, 2019). No entanto, estudos sugerem que a autofagia
368 pode preceder ou mesmo desencadear a apoptose (Mariño et al., 2014).

369 Nossos resultados mostraram a presença da dupla marcação para anexina
370 V+/PI+ demonstrando que o tratamento é capaz de induzir apoptose-*like* na maioria dos
371 parasitas ($p \leq 0,0005$) (Figura 4b). Situação semelhante foi observado por MEV e MET,
372 onde os parasitos tratados com IC_{50} e $2xIC_{50}$ mostraram rugosidade na superfície celular
373 (Figura 3b-e), núcleos atípicos com marginalização da cromatina e alterações na
374 membrana plasmática (Figura 3g-h). Além disso, o tratamento com $2xIC_{50}$ exibiu
375 extravasamento do conteúdo celular na região do flagelo (Figura 3d-e).

376 A apoptose-*like* é descrita em tripanossomatídeos, pois compartilham aspectos
377 morfológicos e moleculares da apoptose de metazoários, no entanto não possuem
378 moléculas que são mediadores canônicos como membros da família Bcl-2, caspases e
379 família de receptores relacionados ao TNF (Proto et al., 2013; Smirlis and Soteriadou,
380 2011). Na *Leishmania*, pode estar presente o arredondamento celular, encolhimento
381 celular, alterações na membrana plasmática com manutenção de sua integridade,
382 modificações mitocondriais, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e do
383 DNA. Além disso, células apoptóticas tardias são indistinguíveis das células necróticas
384 (Basmacıyan and Casanova, 2019; Jiménez-Ruiz et al., 2010). Diversos estudos têm

385 demonstrado a importância da indução deste tipo de morte em estudos com compostos
386 com ação leishmanicida (Antinarelli et al., 2018; Bortoleti et al., 2018; López-Arencibia
387 et al., 2019; Miranda-Sapla et al., 2019; Tomiotto-Pellissier et al., 2018a). Resultado
388 semelhante foi observado por Queiroz et al. (2015), onde mostraram que o tratamento
389 com a botriosferana aumentou os níveis de apoptose em células MCF-7, associada ao
390 estresse oxidativo e ativação de AMPK e FOXO3a.

391 Sabendo do efeito da botriosferana sobre formas promastigotas, investigamos
392 seu potencial de ação sobre formas intramacrofágicas. Primeiramente, nós avaliamos a
393 citotoxicidade da botriosferana em células primárias, onde observamos que nenhuma
394 concentração testada foi tóxica tanto para macrófagos peritoneais de camundongos
395 BALB/c, como para eritrócitos ovinos (Figura 5a e 5b). Corroborando com nossos
396 resultados, Roudbary et al., (2015) demonstraram que uma β -glucana proveniente de
397 *Saccharomyces cerevisiae*, não apresentou citotoxicidade sobre macrófagos
398 peritoneais. Similarmente, Choromanska et al. (2018) demonstraram que a hemólise só
399 estava presente em concentrações de β -glucana acima de 300 $\mu\text{g/mL}$. A partir dessa
400 análise, as concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 24 horas foram
401 escolhidas para prosseguir os próximos experimentos.

402 Em seguida, avaliamos o tratamento da botriosferana sobre macrófagos
403 peritoneais infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos são as principais células
404 hospedeiras para *Leishmania* spp., sendo fundamentais na resposta contra estes
405 parasitos (Tomiotto-Pellissier et al., 2018b). Nossos resultados demonstraram que o
406 tratamento foi capaz de reduzir a porcentagem de macrófagos infectados nas
407 concentrações de 12,5 (50,75% \pm 6,48), 25 (55,66% \pm 3,93) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (72,9% \pm 6,98),
408 quando comparado com o controle ($p \leq 0,0001$) (Figura 6a). Também foi possível
409 observar redução no número de amastigotas por macrófagos nas concentrações de
410 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p \leq 0,0001$) (Figura 6b). Resultado semelhante foi observado por
411 Shivahare et al. (2016) que avaliou a atividade da lentinana, uma β -glucana, frente a

412 macrófagos infectados por *L. donovani*, onde sua concentração mais alta 20 µg/mL foi
413 capaz de inibir 55,8 ±3,8% da carga parasitária.

414 Uma vez comprovado o efeito da botriosferana sobre macrófagos infectados,
415 investigamos por quais mecanismos ocorreram a eliminação das formas amastigotas.
416 Nossos resultados mostraram que o tratamento com a botriosferana foi capaz de
417 aumentar os níveis de citocinas como TNF-α e IL-6 em todas as concentrações testadas
418 (Figura 7a-b), como também aumentar os níveis de EROs e NO nas concentrações de
419 25 e 50 µg/mL (Figura 7c) e apenas 50 µg/mL (Figura 7d), respectivamente, quando
420 comparado com o controle ($p \leq 0,0005$).

421 Estudos mostraram que as β-glucanas são capazes de agir como
422 imunomoduladores, ativando componentes celulares e humorais e aumentando a
423 atividade de células como macrófagos ligando-se através de receptores como dectina-
424 1 (Chang et al., 2010; Reid et al., 2009; Tsoni and Brown, 2008). Após a ligação com
425 dectina-1, há a indução da sua via de sinalização. A dectina-1 possui em sua cauda um
426 motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM), com a ligação de
427 uma β-glucana, as sequências de ITAM tornam-se fosforiladas em tirosina pelas
428 quinases da família Src, fornecendo um sítio de ligação para ancoragem de Syk,
429 iniciando os eventos subsequentes de sinalização a jusante. Estes eventos envolvem o
430 adaptador CARD9, ativação de proteínas ativação por mitogênio (MAP) quinases, fator
431 nuclear de células T ativadas (NFAT) e fator nuclear kappa B (NFκB) (Tsoni and Brown,
432 2008). Em macrófagos, a ativação da Syk é suficiente para gerar uma explosão
433 respiratória, visando eliminar o patógeno (Underhill et al., 2005). No entanto, para
434 produção de citocinas pró-inflamatórias, a dectina-1 necessita da sinalização
435 cooperativa de outros receptores do tipo *toll* (TLRs) acoplados ao Myd88, resultando em
436 translocação aprimorada de NFκB para o núcleo e conseqüentemente resultando na
437 indução de múltiplas citocinas como TNF, IL-23, IL-6, IL-10, IL-12 e outras (Brown, 2006;
438 Chang et al., 2010; Reid et al., 2009; Roma et al., 2016; Tsoni and Brown, 2008).

439 Outras β -glucanas como lentinana, também possuem um efeito
440 imunomodulador, potencializando respostas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e NO
441 no modelo de *Leishmania* (Shivhare et al., 2016). A regulação positiva de citocinas pró-
442 inflamatórias está associada à indução da produção de EROs e NO, que em conjunto
443 visam a eliminação do patógeno, principalmente por dano oxidativo direto (Horta et al.,
444 2012; Rossi and Fasel, 2017).

445 4. Conclusão

446 Em conjunto, nossos resultados demonstraram que a botriosferana β (1 \rightarrow 3;
447 1 \rightarrow 6) D-glucana apresenta atividade leishmanicida em formas promastigotas de
448 *Leishmania amazonensis*, atuando em processos autofágicos e apoptóticos. Já em
449 macrófagos infectados, observou-se o efeito imunomodulador induzindo produção de
450 EROs e NO, contribuindo com a eliminação das formas amastigotas nas maiores
451 concentrações. É importante destacar que esses dados são os primeiros a
452 determinarem os mecanismos de eliminação de *L. amazonensis in vitro* quando tratados
453 com uma β -glucana.

454 **Declarações de interesse:** nenhuma.

455 **Financiamento:** Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq,
456 Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil
457 001) e Fundação Araucária pelo Governo do Estado do Paraná (Brasil).

458 5. Referências

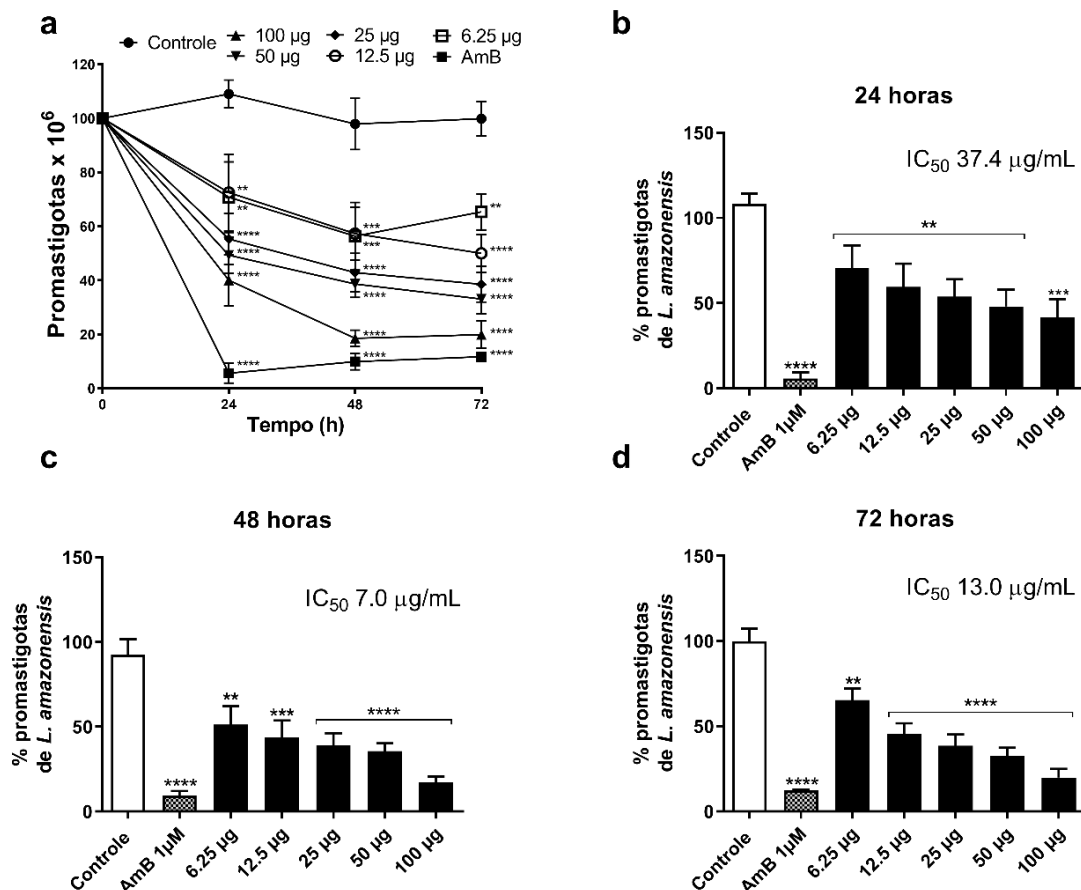
- 459 Antinarelli, L.M.R., de Oliveira Souza, I., Zabala Capriles, P.V., Gameiro, J., Britta, E.A.,
460 Nakamura, C.V., Lima, W.P., da Silva, A.D., Coimbra, E.S., 2018. Antileishmanial
461 activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: Induction of autophagy and
462 apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous
463 leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 195, 78–86.
464 <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.007>
- 465 Anversa, L., Tiburcio, M.G.S., Richini-Pereira, V.B., Ramirez, L.E., 2018. Human
466 leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista da Associação Médica
467 Brasileira* 64, 281–289. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>
- 468 Barbosa, A.M., Steluti, R.M., Dekker, R.F.H., Cardoso, M.S., Corradi da Silva, M.L.,
469 2003. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -d-glucan

- 470 produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. Carbohydrate
471 Research 338, 1691–1698. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00240-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00240-4)
- 472 Basmaciyan, L., Casanova, M., n.d. Cell death in *Leishmania*. Parasite 26.
473 <https://doi.org/10.1051/parasite/2019071>
- 474 Boren, J., Brindle, K.M., 2012. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes
475 cytoplasmic lipid droplet formation. Cell Death Differ 19, 1561–1570.
476 <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.34>
- 477 Bortoleti, B.T. da S., Gonçalves, M.D., Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M.M.,
478 Assolini, J.P., Carloto, A.C.M., de Carvalho, P.G.C., Cardoso, I.L.A., Simão,
479 A.N.C., Arakawa, N.S., Costa, I.N., Conchon-Costa, I., Pavanelli, W.R., 2018.
480 Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like
481 mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity.
482 Phytomedicine 46, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.010>
- 483 Brown, G.D., 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. Nat Rev
484 Immunol 6, 33–43. <https://doi.org/10.1038/nri1745>
- 485 Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. The Lancet 392, 951–970.
486 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- 487 Chang, Z.-Q., Lee, J.-S., Gebru, E., Hong, J.-H., Jung, H.-K., Jo, W.-S., Park, S.-C.,
488 2010. Mechanism of macrophage activation induced by β -glucan produced from
489 *Paenibacillus polymyxa* JB115. Biochemical and Biophysical Research
490 Communications 391, 1358–1362. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.064>
- 491 Chen, J., Seviour, R., 2007. Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans.
492 Mycological Research 111, 635–652.
493 <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.02.011>
- 494 Choromanska, A., Kulbacka, J., Harasym, J., Oledzki, R., Szewczyk, A., Saczko, J.,
495 2018. High- and low-Molecular Weight oat Beta-Glucan Reveals Antitumor
496 Activity in Human Epithelial Lung Cancer. Pathol Oncol Res 24, 583–592.
497 <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0278-3>
- 498 Fanti, J.R., Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M.M., Cataneo, A.H.D., Andrade,
499 C.G.T. de J., Panis, C., Rodrigues, J.H. da S., Wowk, P.F., Kuczera, D., Costa,
500 I.N., Nakamura, C.V., Nakazato, G., Durán, N., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa,
501 I., 2018. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis*
502 promastigote and amastigote death in vitro. Acta Tropica 178, 46–54.
503 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.027>
- 504 Fatima, N., Muhammad, S., Mumtaz, A., Tariq, H., Shahzadi, I., Said, M., Dawood, M.,
505 2016. Fungal Metabolites and Leishmaniasis: A Review. BJPR 12, 1–12.
506 <https://doi.org/10.9734/BJPR/2016/26094>
- 507 Fidalgo, L.M., Gille, L., 2011. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs.
508 Pharm Res 28, 2758–2770. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0586-3>
- 509 Ghorbani, M., Farhoudi, R., 2017. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?
510 Drug Des Devel Ther 12, 25–40. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>
- 511 Giese, E.C., Gascon, J., Anzelmo, G., Barbosa, A.M., da Cunha, M.A.A., Dekker, R.F.H.,
512 2015. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of
513 botryosphaeran and some other β -D-glucans. International Journal of Biological
514 Macromolecules 72, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.046>
- 515 Giri, S., Saha, C., 2019. *Leishmania donovani* parasite requires Atg8 protein for
516 infectivity and survival under stress. Cell Death Dis 10, 808.
517 <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2038-7>
- 518 Goldman, R., Jaffe, C.L., 1991. Administration of β -glucan following *Leishmania major*
519 infection suppresses disease progression in mice. Parasite Immunol 13, 137–
520 145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1991.tb00270.x>
- 521 Graubaum, H.-J., Busch, R., Stier, H., Gruenwald, J., 2012. A Double-Blind,
522 Randomized, Placebo-Controlled Nutritional Study Using an Insoluble Yeast
523 Beta-Glucan to Improve the Immune Defense System. Food and Nutrition
524 Sciences 03, 738–746. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.36100>

- 525 Horta, M.F., Mendes, B.P., Roma, E.H., Noronha, F.S.M., Macêdo, J.P., Oliveira, L.S.,
526 Duarte, M.M., Vieira, L.Q., 2012. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in
527 Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research* 2012, 1–11.
528 <https://doi.org/10.1155/2012/203818>
- 529 Javadov, S., Chapa-Dubocq, X., Makarov, V., 2018. Different approaches to modeling
530 analysis of mitochondrial swelling. *Mitochondrion* 38, 58–70.
531 <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.08.004>
- 532 Jiménez-Ruiz, A., Alzate, J.F., MacLeod, E.T., Lüder, C.G.K., Fasel, N., Hurd, H., 2010.
533 Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 3, 104.
534 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-104>
- 535 Jung, H.-K., Park, S.-C., Park, B.-K., Hong, J.-H., 2008. Physiological activities of a β -
536 glucan produced by *Panabacillus polymyxa*. *Biotechnology Letters* 30, 1545–
537 1551. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9732-3>
- 538 Kerche-Silva, L.E., Cólus, I.M.S., Malini, M., Mori, M.P., Dekker, R.F.H., Barbosa-
539 Dekker, A.M., 2017. In vitro protective effects of botryosphaeran, a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow
540 6)- β -d-glucan, against mutagens in normal and tumor rodent cells. *Mutation*
541 *Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 814, 29–36.
542 <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.12.003>
- 543 López-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., Freijo, M.B., Sifaoui, I., Bethencourt-Estrella, C.J.,
544 Rizo-Liendo, A., Chiboub, O., McNaughton-Smith, G., Lorenzo-Morales, J.,
545 Abad-Grillo, T., Piñero, J.E., 2019. In vitro activity of 1H-phenalen-1-one
546 derivatives against *Leishmania* spp. and evidence of programmed cell death.
547 *Parasit Vectors* 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3854-4>
- 548 Mahapatra, S., Banerjee, D., 2013. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition
549 and Applications. *Microbiol Insights* 6, 1–16. <https://doi.org/10.4137/MBI.S10957>
- 550 Malini, M., Camargo, M.S., Hernandez, L.C., Vargas-Rechia, C.G., Varanda, E.A.,
551 Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H., Matsumoto, S.T., Antunes, L.M.G., Cólus, I.M.S.,
552 2016. Chemopreventive effect and lack of genotoxicity and mutagenicity of the
553 exopolysaccharide botryosphaeran on human lymphocytes. *Toxicology in Vitro*
554 36, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.06.008>
- 555 Malini, M., Souza, M.F. de, Oliveira, M.T. de, Antunes, L.M.G., Figueiredo, S.G. de,
556 Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H., Cólus, I.M. de S., 2015. Modulation of gene
557 expression and cell cycle by botryosphaeran, a (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -d-glucan in
558 human lymphocytes. *International Journal of Biological Macromolecules* 77, 214–
559 221. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.010>
- 560 Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2014. Self-consumption:
561 the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 81–94.
562 <https://doi.org/10.1038/nrm3735>
- 563 Mendes, S.F., Santos, O. dos, Barbosa, A.M., Vasconcelos, A.F.D., Aranda-Selverio,
564 G., Monteiro, N.K., Dekker, R.F.H., Pereira, M.S., Tovar, A.M.F., Mourão, P.A.
565 de S., Silva, M. de L.C. da, 2009. Sulfonation and anticoagulant activity of
566 botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose.
567 *International Journal of Biological Macromolecules* 45, 305–309.
568 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.06.004>
- 569 Miranda, C.C.B.O., Dekker, R.F.H., Serpeloni, J.M., Fonseca, E.A.I., Cólus, I.M.S.,
570 Barbosa, A.M., 2008. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new
571 exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International*
572 *Journal of Biological Macromolecules* 42, 172–177.
573 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.010>
- 574 Miranda-Nantes, C.C.B.O., Fonseca, E.A.I., Zaia, C.T.B.V., Dekker, R.F.H., Khaper, N.,
575 Castro, I.A., Barbosa, A.M., 2011. Hypoglycemic and Hypocholesterolemic
576 Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-
577 Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats. *Mycobiology* 39, 187–193.
578 <https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.3.187>

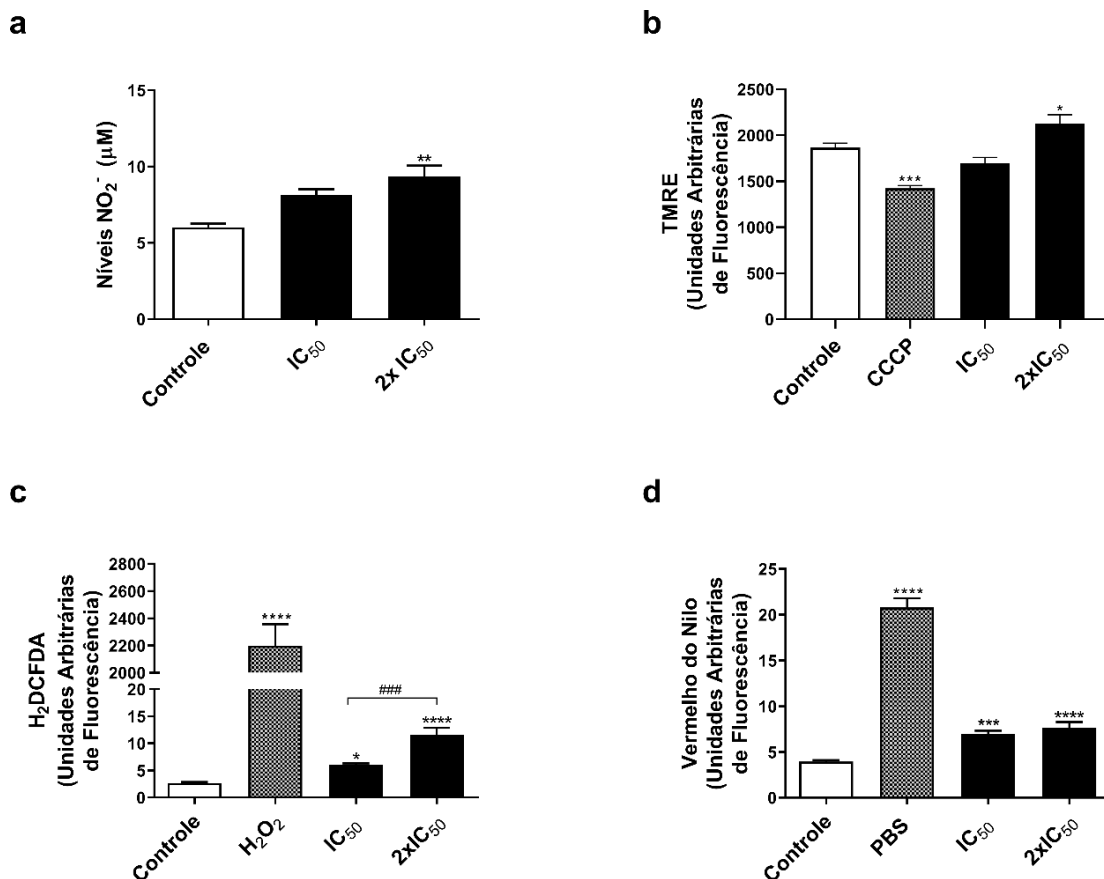
- 579 Miranda-Sapla, M.M., Tomiotto-Pellissier, F., Assolini, J.P., Carloto, A.C.M., Bortoleti,
580 B.T. da S., Gonçalves, M.D., Tavares, E.R., Rodrigues, J.H. da S., Simão,
581 A.N.C., Yamauchi, L.M., Nakamura, C.V., Verri, W.A., Costa, I.N., Conchon-
582 Costa, I., Pavanelli, W.R., 2019. trans-Chalcone modulates *Leishmania*
583 *amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability.
584 *European Journal of Pharmacology* 853, 275–288.
585 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.049>
- 586 Monzote, L., Gille, L., 2010. Mitochondria as a Promising Antiparasitic Target. *CCP* 5,
587 55–66. <https://doi.org/10.2174/157488410790410605>
- 588 Nagy, G., Koncz, A., Fernandez, D., Perl, A., 2007. NITRIC OXIDE, MITOCHONDRIAL
589 HYPERPOLARIZATION AND T-CELL ACTIVATION. *Free Radic Biol Med* 42,
590 1625–1631. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.026>
- 591 Proto, W.R., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2013. Cell death in parasitic protozoa:
592 regulated or incidental? *Nat Rev Microbiol* 11, 58–66.
593 <https://doi.org/10.1038/nrmicro2929>
- 594 Queiroz, E.A.I.F., Fortes, Z.B., da Cunha, M.A.A., Barbosa, A.M., Khaper, N., Dekker,
595 R.F.H., 2015. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal
596 exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative
597 stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription
598 factor, FOXO3a. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 67, 14–
599 24. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.08.003>
- 600 Ray, P.D., Huang, B.-W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis
601 and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24, 981–990.
602 <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- 603 Reid, D.M., Gow, N.A., Brown, G.D., 2009. Pattern recognition: recent insights from
604 Dectin-1. *Current Opinion in Immunology* 21, 30–37.
605 <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.003>
- 606 Roma, E.H., Macedo, J.P., Goes, G.R., Gonçalves, J.L., Castro, W. de, Cisalpino, D.,
607 Vieira, L.Q., 2016. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of
608 parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasit*
609 *Vectors* 9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1472-y>
- 610 Rossi, M., Fasel, N., 2017. How to master the host immune system? *Leishmania*
611 *parasites have the solutions!* *Int Immunol* 30, 103–111.
612 <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx075>
- 613 Roudbary, M., Daneshmandi, S., Hajimoradi, M., Roudbarmohammadi, S., Hassan,
614 Z.M., 2015. Immunomodulatory effect of β -glucan on peritoneal macrophages of
615 *Balb/c* mice. *Pol J Microbiol* 64, 175–179. <https://doi.org/10.33073/pjm-2015-026>
- 616 Sacchelli, B.A.L., Faccin-Galhardi, L.C., Ito, V.Y., Lopes, J.L., Dekker, R.F.H., Barbosa-
617 Dekker, A.M., Orsato, A., 2019. Botryosphaeran and sulfonated derivatives as
618 novel antiviral agents for herpes simplex and dengue fever. *International Journal*
619 *of Biological Macromolecules* 138, 334–339.
620 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.084>
- 621 Scariot, D.B., Britta, E.A., Moreira, A.L., Falzirolli, H., Silva, C.C., Ueda-Nakamura, T.,
622 Dias-Filho, B.P., Nakamura, C.V., 2017. Induction of Early Autophagic Process
623 on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative
624 Semi-synthetic Thiosemicarbazone. *Front Microbiol* 8.
625 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00255>
- 626 Shivahare, R., Ali, W., Singh, U.S., Natu, S.M., Khattri, S., Puri, S.K., Gupta, S., 2016.
627 Immunoprotective effect of lentinan in combination with miltefosine on
628 *Leishmania*-infected J-774A.1 macrophages. *Parasite Immunol* 38, 618–627.
629 <https://doi.org/10.1111/pim.12346>
- 630 Silva-Sena, G.G., Malini, M., Delarmelina, J.M., Dutra, J.C.V., Gervásio, S.V., Leal,
631 M.A.S., Costa Pereira, T. de M., Barbosa-Dekker, A.M., Dekker, R.F.H., de
632 Paula, F., Batitucci, M. do C.P., 2018. In vivo antimutagenic and antiatherogenic
633 effects of the (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -d- glucan botryosphaeran. *Mutation*

- 634 Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 826, 6–14.
635 <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.12.008>
- 636 Smirlis, D., Soteriadou, K., 2011. Trypanosomatid apoptosis: “Apoptosis” without the
637 canonical regulators. *Virulence* 2, 253–256.
638 <https://doi.org/10.4161/viru.2.3.16278>
- 639 Sundar, S., Singh, B., 2018. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis.
640 *Expert Opin Ther Targets* 22, 467–486.
641 <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1472241>
- 642 Tomiotto-Pellissier, F., Alves, D.R., Miranda-Sapla, M.M., de Moraes, S.M., Assolini, J.P.,
643 da Silva Bortoleti, B.T., Gonçalves, M.D., Cataneo, A.H.D., Kian, D., Madeira,
644 T.B., Yamauchi, L.M., Nixdorf, S.L., Costa, I.N., Conchon-Costa, I., Pavanelli,
645 W.R., 2018a. Caryocar coriaceum extracts exert leishmanicidal effect acting in
646 promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes
647 by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion. *Biomedicine &*
648 *Pharmacotherapy* 98, 662–672. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.083>
- 649 Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B.T. da S., Assolini, J.P., Gonçalves, M.D., Carloto,
650 A.C.M., Miranda-Sapla, M.M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., Pavanelli, W.R.,
651 2018b. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Front*
652 *Immunol* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02529>
- 653 Tsoni, S.V., Brown, G.D., 2008. β -Glucans and Dectin-1. *Annals of the New York*
654 *Academy of Sciences* 1143, 45–60. <https://doi.org/10.1196/annals.1443.019>
- 655 Underhill, D.M., Rossnagle, E., Lowell, C.A., Simmons, R.M., 2005. Dectin-1 activates
656 Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen
657 production. *Blood* 106, 2543–2550. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1239>
- 658 Vetvicka, V., Fernandez-Botran, R., 2018. β -Glucan and parasites. *Helminthologia* 55,
659 177–184. <https://doi.org/10.2478/helm-2018-0021>
- 660 Yatawara, L., Wickramasinghe, S., Nagataki, M., Takamoto, M., Nomura, H., Ikeue, Y.,
661 Watanabe, Y., Agatsuma, T., 2009. Aureobasidium-Derived Soluble Branched
662 (1,3-1,6) β -Glucan (Sophy β -glucan) Enhances Natural Killer Activity in
663 *Leishmania amazonensis*-Infected Mice. *Korean J Parasitol* 47, 345–351.
664 <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.4.345>



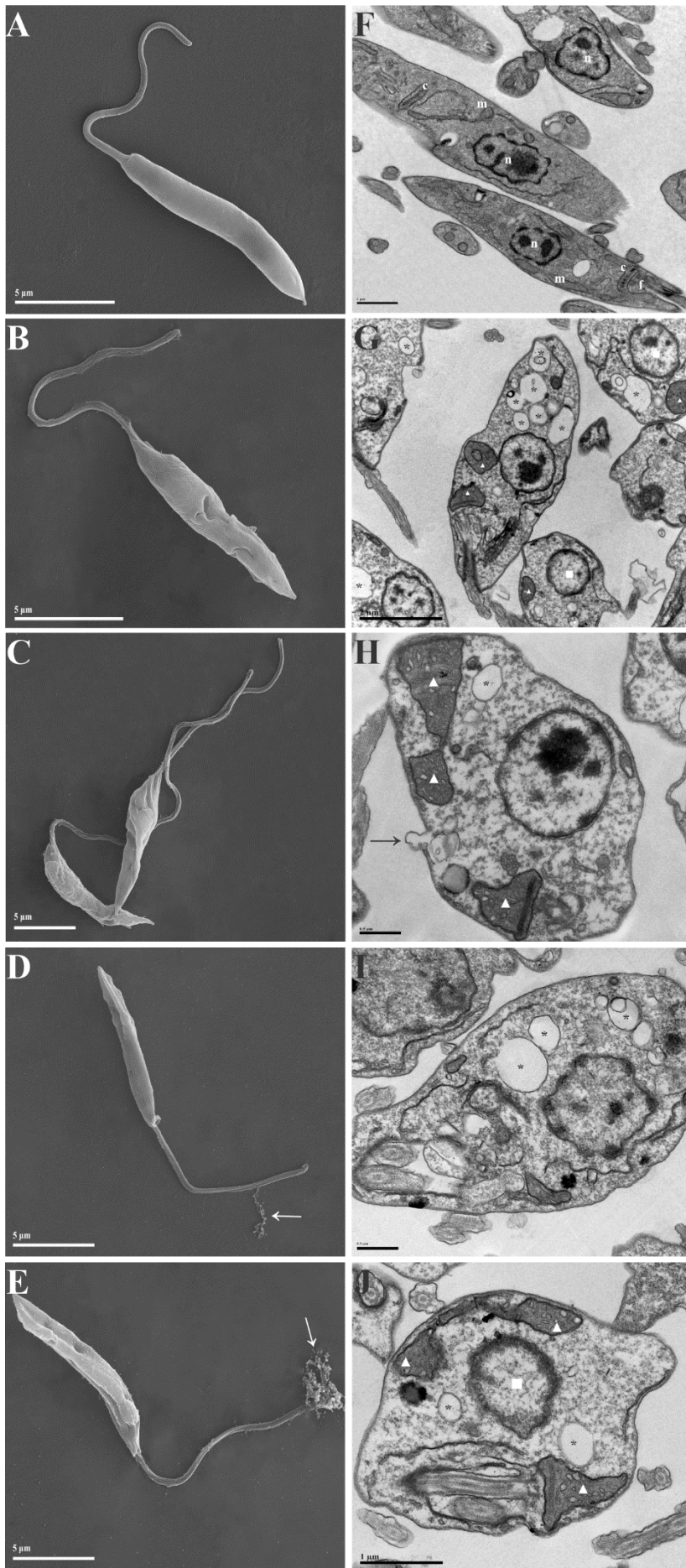
665

666 **Figura 1.** Botriosferana possui atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de
 667 *L. amazonensis*. Formas promastigotas foram tratadas com diferentes concentrações
 668 (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL) de botriosferana, meio M199 (controle) e 1 µM de
 669 anfotericina B (AmB controle positivo) e a proliferação dos parasitos foram analisadas
 670 nos tempos de 24, 48 e 72 h (a). A partir do ensaio de proliferação foram calculadas as
 671 concentrações que inibiam 50% das formas promastigotas nos tempos de 24 (b), 48 (c)
 672 e 72 horas (d) Os valores representam a média ± SEM de três experimentos
 673 independentes realizados em triplicata. ** Diferença significativa comparado com o
 674 grupo controle (p≤0,001), *** (p≤0,0005), **** (p≤0,0001).

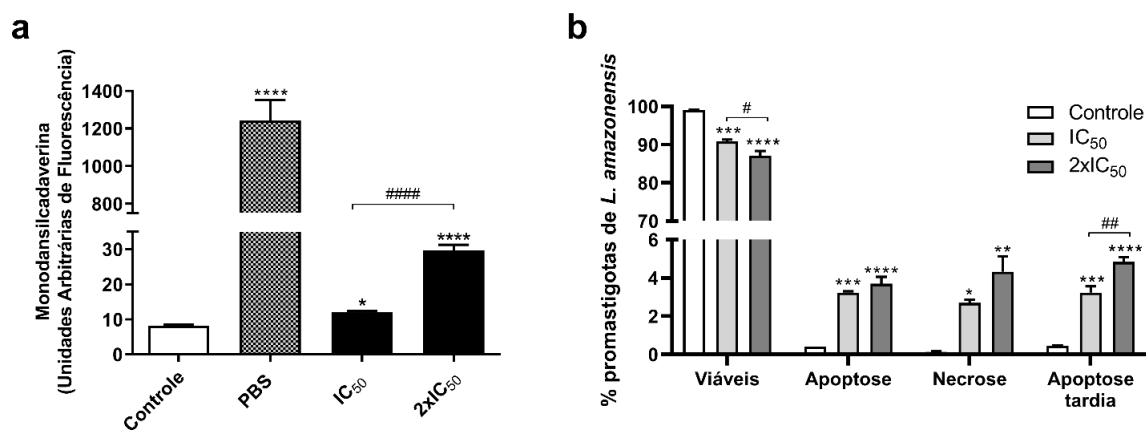


675

676 **Figura 2.** Mecanismos de ação da botriosferana sobre formas promastigotas de *L.*
 677 *amazonensis*. O sobrenadante do ensaio direto sobre as formas promastigotas de *L.*
 678 *amazonensis* foi coletado para dosagem dos níveis de NO pelo método de Griess nas
 679 concentrações de IC₅₀ (7 µg/mL) e 2xIC₅₀ (14 µg/mL) no tempo de 48 horas (a). Os
 680 parasitos foram tratados por 48 h com IC₅₀ (7 µg/mL) e 2xIC₅₀ (14 µg/mL) e analisados
 681 utilizando o ensaio de TMRE pelo método fluorimétrico (b), mensuração de espécies
 682 reativas de oxigênio utilizando a sonda H₂DCFDA (c) e análise da presença de corpos
 683 lipídicos pelo método de vermelho do Nilo (d). Os valores representam a média ± SEM
 684 de três experimentos independentes realizados em triplicata. * Diferença significativa
 685 comparado com o controle (p≤0,05), ** (p≤0,001), *** (p≤0,0005), **** (p≤0,0001), ###
 686 (p≤0,0005).

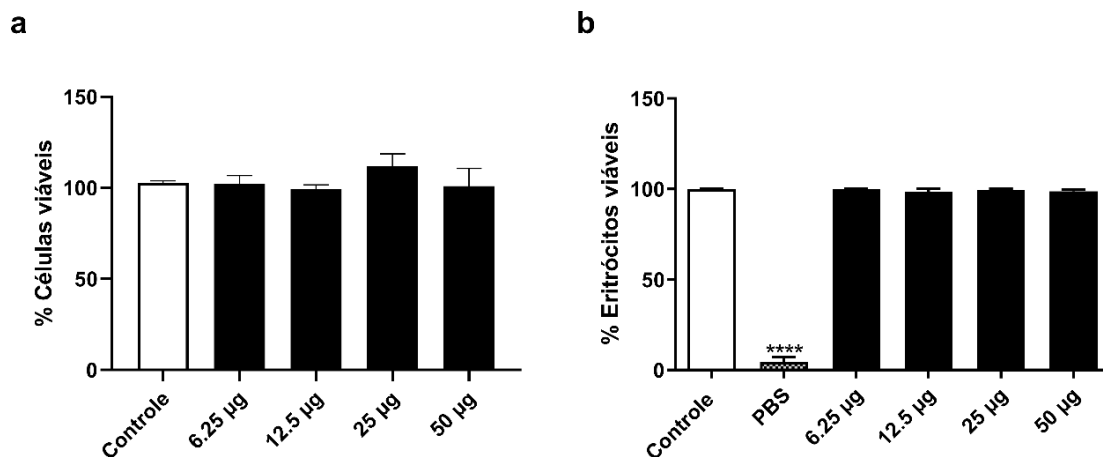


688 **Figura 3.** Análise morfológica e ultraestrutural de promastigotas de *L. amazonensis*.
 689 Formas promastigotas foram tratadas com 7 e 14 $\mu\text{g/mL}$ de botriosferana por 48 h e
 690 analisadas sobre microscopia eletrônica de varredura e transmissão. (A e F) Controle.
 691 (B, C, G e H) IC_{50} . (D, E, I, J) $2\times\text{IC}_{50}$. (A-E) Microscopia Eletrônica de Varredura. (F-K)
 692 Microscopia Eletrônica de Trasmissão. (seta branca) extravasamento celular; (seta
 693 preta), alteração membrana plasmática; \blacktriangle , inchaço mitocondrial; *, vacúolos
 694 autofágicos; \blacksquare , alteração nuclear; c, cinetoplasto; f, flagelo; m, mitocôndria; n, núcleo.
 695 Barras = 5 μM (A-E), 2 μM (G), 1 μM (F,J) e 0,5 μM (H,I).



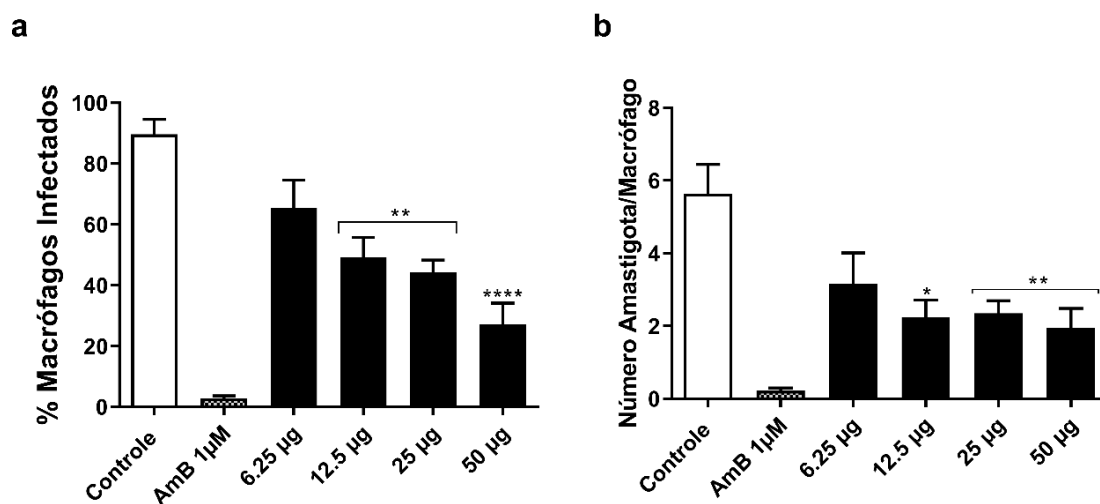
696

697 **Figura 4.** Processos autofágicos e apoptóticos induzidos pela botriosferana em formas
 698 promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos foram tratados por 48 h com IC_{50} (7.0
 699 $\mu\text{g/mL}$) e $2\times\text{IC}_{50}$ (14 $\mu\text{g/mL}$) e analisados utilizando monodansilcadaverina (MDC) para
 700 quantificação de vacúolos autofágicos por fluorimetria (a) e análise de apoptose,
 701 necrose por anexina-V e iodeto de propídio respectivamente por citometria de fluxo (b).
 702 Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados
 703 em triplicata. * Diferença significativa comparado com o controle ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,001$),
 704 *** ($p \leq 0,0005$), **** ($p \leq 0,0001$), # ($p \leq 0,05$), ## ($p \leq 0,001$), ##### ($p \leq 0,0001$).



705

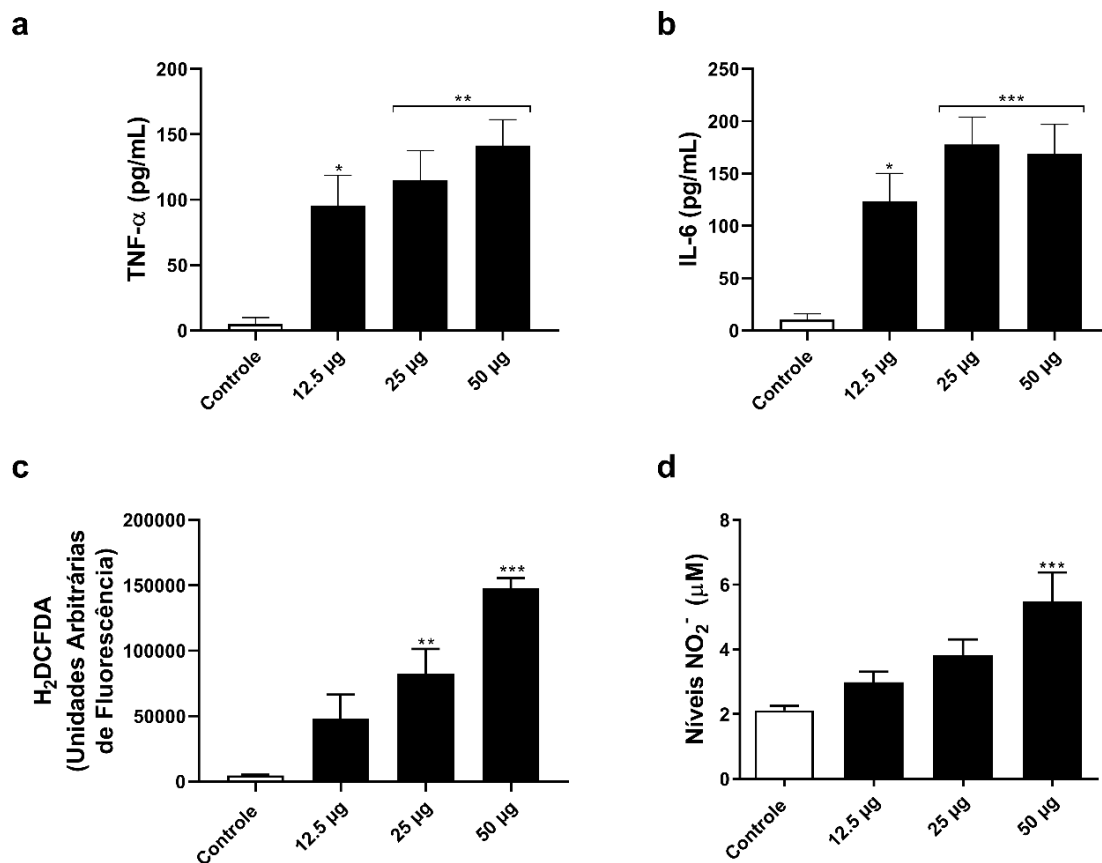
706 **Figura 5.** Viabilidade de macrófagos peritoneais e eritrócitos ovinos. Macrófagos
 707 peritoneais (a) e eritrócitos ovinos (b) foram tratados com botriosferana nas
 708 concentrações de 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL por 24 e 3 h, respectivamente. Controle
 709 positivo (PBS) e controle negativo (RPMI). Os valores representam a média \pm SEM de
 710 três experimentos independentes realizados em triplicata. **** Diferença significativa
 711 ($p \leq 0,0001$).



712

713 **Figura 6.** Botriosferana possui efeito sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*.
 714 Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com
 715 botriosferana por 24 h com AmB 1 µM, 6.25, 12.5, 25 e 50 µg/mL e analisados as
 716 porcentagens de macrófagos infectados (a) e o número de amastigotas por macrófagos

717 (b). Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes
 718 realizados em triplicata. * Diferença significativa comparado com o controle ($p \leq 0,05$) **
 719 ($p \leq 0,001$) **** ($p \leq 0,0001$).



720

721 **Figura 7.** Botriosferana elimina formas amastigotas de *L. amazonensis* por aumento de
 722 citocinas, EROs e NO. Macrófagos peritoneais foram infectados por *L. amazonensis* e
 723 submetidos ao tratamento com botriosferana nas concentrações de 12.5, 25 e 50 μ g/mL
 724 durante 24 h. Para mensuração de EROs foi utilizada a sonda H₂DCFDA. O
 725 sobrenadante da cultura foi coletado para mensuração dos níveis de NO pelo método
 726 de Griess e dosagem de citocinas por ELISA. Os valores representam a média \pm SEM
 727 de três experimentos independentes realizados em triplicata. * Diferença significativa
 728 comparado ao controle ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,001$), *** ($p \leq 0,0005$).

5 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, concluímos que:

- A botriosferana apresenta atividade leishmanicida direta sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* através dos mecanismos de apoptose-like, pela produção de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, hiperpolarização mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos e formação de vacúolos autofágicos no parasito.
- A botriosferana é capaz de causar alterações morfológicas e ultraestruturais nas promastigotas.
- Botriosferana não apresenta efeitos citotóxicos sobre macrófagos peritoneais e eritrócitos ovinos.
- Botriosferana apresenta atividade anti-amastigota, reduzindo a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos.
- A botriosferana apresenta atividade imunomoduladora, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico.

REFERÊNCIAS

- AL-SALEM, W. S. et al. Detection of high levels of anti- α -galactosyl antibodies in sera of patients with Old World cutaneous leishmaniasis: a possible tool for diagnosis and biomarker for cure in an elimination setting. **Parasitology**, v. 141, n. 14, p. 1898–1903, dez. 2014.
- ANTONIO, L. DE F. et al. MONTENEGRO SKIN TEST AND AGE OF SKIN LESION AS PREDICTORS OF TREATMENT FAILURE IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 375–380, set. 2014.
- ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, mar. 2018.
- ARANA, B. A. et al. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 466–470, 1 nov. 2001.
- BALANÍA-FOUCE, R. et al. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 4, p. 435–443, abr. 1998.
- BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)- β -d-glucan produced by the ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 16, p. 1691–1698, jul. 2003.
- BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 684–703, 1 abr. 1997.
- BOGGIATTO, P. M. et al. Altered Dendritic Cell Phenotype in Response to Leishmania amazonensis Amastigote Infection Is Mediated by MAP Kinase, ERK. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 5, p. 1818–1826, maio 2009.
- BORGHI, S. M. et al. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 465–475, fev. 2017.
- BRAY, P. G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232–239, maio 2003.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, set. 2018.
- CARVALHO, E. M. et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 87–89, 1 ago. 2001.
- CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 3 jul. 2019.
- CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 635–652, jun. 2007.
- CROFT, S.; BARRETT, M.; URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, nov. 2005.

- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132–141, abr. 2002.
- CZUB, J.; BOROWSKI, E.; BAGINSKI, M. Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes—A molecular dynamics study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2616–2626, out. 2007.
- DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 653–660, jul. 2009.
- DE SILVA, G. et al. Efficacy of a new rapid diagnostic test kit to diagnose Sri Lankan cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 14 nov. 2017.
- DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.
- DENG, C. et al. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -d-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 1–2, p. 70–75, jul. 2012.
- DETONI, M. B. et al. Temporal and spatial distribution of American tegumentary leishmaniasis in north Paraná: 2010–2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. 0, 14 fev. 2019.
- DOS SANTOS, J. C. et al. β -Glucan-Induced Trained Immunity Protects against *Leishmania braziliensis* Infection: a Crucial Role for IL-32. **Cell Reports**, v. 28, n. 10, p. 2659–2672.e6, set. 2019.
- DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory and Effector Activities in Human Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis: Understanding Mechanisms of Pathology. **Drug development research**, v. 72, n. 6, p. 430–436, set. 2011.
- FANG, J. et al. Structure of a β -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF- κ B signaling. **Glycoconjugate Journal**, v. 29, n. 5–6, p. 365–377, ago. 2012.
- FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167–194, jun. 2006.
- FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.
- GIESE, E. C. et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 125–130, jan. 2015.
- GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473–479, ago. 2010.
- GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 8 out. 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, abr. 2010.

GRAUBAUM, H.-J. et al. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Nutritional Study Using an Insoluble Yeast Beta-Glucan to Improve the Immune Defense System. **Food and Nutrition Sciences**, v. 03, n. 06, p. 738–746, 2012.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, dez. 2015.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines at Early Stages of Infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4278–4288, 1 ago. 2003.

JUNG, H.-K. et al. Physiological activities of a β -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1545–1551, set. 2008.

KANKKUNEN, P. et al. (1,3)- β -Glucans Activate Both Dectin-1 and NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 11, p. 6335–6342, 1 jun. 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, ago. 2011.

KERCHE-SILVA, L. E. et al. In vitro protective effects of botryosphaeran, a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -d-glucan, against mutagens in normal and tumor rodent cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 814, p. 29–36, fev. 2017.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, n. 3–4, p. 183–191, maio 2008.

LIMA, E. B. DE et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–124, abr. 2007.

LIRA, R. et al. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 537–546, 1 maio 2001.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012.

MACHADO-PINTO, J. et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 2, p. 73–78, 2002.

MAGILL, A. J. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 19, n. 1, p. 241–266, mar. 2005.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 29 jan. 2013.

MALINI, M. et al. Modulation of gene expression and cell cycle by botryosphaeran, a (1→3)(1→6)- β -d-glucan in human lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 214–221, jun. 2015.

MALINI, M. et al. Chemopreventive effect and lack of genotoxicity and mutagenicity of the exopolysaccharide botryosphaeran on human lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 36, p. 18–25, out. 2016.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“spundia” Escamel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 859–876, jan. 1986.

MATTNER, F. et al. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 7, p. 1553–1559, 1996.

MENDES, S. F. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 3, p. 305–309, out. 2009.

MENDONÇA, S. C. F. Differences in immune responses against *Leishmania* induced by infection and by immunization with killed parasite antigen: implications for vaccine discovery. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 492, dez. 2016.

METHACANON, P. et al. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 199–203, maio 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Anual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília - DF: Editora do Ministério da Saúde, p. 182, 2 ed. 2017.

MIRANDA, C. C. B. O. et al. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 172–177, mar. 2008.

MIRANDA LESSA, M. et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 73, n. 6, p. 843–847, nov. 2007.

MIRANDA-NANTES, C. C. B. O. et al. Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p. 187–193, set. 2011.

MIRANDA-SAPLA, M. M. et al. trans-Chalcone modulates *Leishmania amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability. **European Journal of Pharmacology**, v. 853, p. 275–288, jun. 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism? **Frontiers in Immunology**, v. 5, 26 nov. 2014.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. **Journal of Immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47–57, jan. 2008.

PETERS, N. C. et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008a.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008b.

PONTE-SUCRE, A. Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, p. 14, 28 out. 2003.

QUEIROZ, E. A. I. F. et al. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 67, p. 14–24, out. 2015.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, ago. 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, set. 2007.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076–1082, maio 1998.

RODRIGUES, I. A. et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 23 dez. 2017.

SACCHELLI, B. A. L. et al. Botryosphaeran and sulfonated derivatives as novel antiviral agents for herpes simplex and dengue fever. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 334–339, out. 2019.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, nov. 2002.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: A Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 625–6344, 1 set. 1985.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, set. 2016.

SHIVAHARE, R. et al. Immunoprotective effect of lentinan in combination with miltefosine on *Leishmania*-infected J-774A.1 macrophages. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 10, p. 618–627, out. 2016.

SILVA, A. Z. et al. Botryosphaeran reduces obesity, hepatic steatosis, dyslipidaemia, insulin resistance and glucose intolerance in diet-induced obese rats. **Life Sciences**, v. 211, p. 147–156, out. 2018.

SILVA-LÓPEZ, R. E. DA. Proteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

SILVA-SENA, G. G. et al. In vivo antimutagenic and antiatherogenic effects of the (1 → 3)(1 → 6)-β-d- glucan botryosphaeran. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 826, p. 6–14, fev. 2018.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, maio 2004.

STRAZZULLA, A. et al. Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787–794, maio 2008.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 31 out. 2018.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, nov. 2007.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, jul. 2011.

VETVICKA, V.; FERNANDEZ-BOTRAN, R. β-Glucan and parasites. **Helminthologia**, v. 55, n. 3, p. 177–184, 1 set. 2018.

WALSH, T. J. et al. Liposomal Amphotericin B for Empirical Therapy in Patients with Persistent Fever and Neutropenia. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 10, p. 764–771, 11 mar. 1999.

WIWANITKIT, V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 8, p. 323–328, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological situation. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 11/02/2020.

YATAWARA, L. et al. Aureobasidium-Derived Soluble Branched (1,3-1,6) β-Glucan (Sophy β-glucan) Enhances Natural Killer Activity in Leishmania amazonensis-Infected Mice. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 4, p. 345–351, dez. 2009.

ZIMARA, N. et al. Dectin-1 Positive Dendritic Cells Expand after Infection with Leishmania major Parasites and Represent Promising Targets for Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 26 fev. 2018.

ANEXO

ANEXO A Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 88/2018

Londrina, 06 de Junho de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação da utilização da nanopartícula de prata biológica e compostos naturais e sintéticos na leishmaniose *in vitro* e *in vivo*." Protocolo CEUA nº 8595.2018.89. sob a responsabilidade de **Ivete Conchon Costa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel) em **05/06/2018**.

O objetivo do trabalho será avaliar o efeito do tratamento com nanopartícula de Prata Biológica (NpAg) em associação com compostos naturais e sintéticos na imunomodulação em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonenses*. Grau de Invasividade : G11

Vigência do Projeto	01/06/2018 a 31/05/2021
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico (BALB/c)
Nº de animais	145
Peso/Idade	25g/ 6 a 8 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério da FIOCRUZ de Curitiba
Amostras a serem coletadas	Macrófagos peritoneais, Linfonodo popliteal, Fígado, Lesão leishmaniótica e Soro/plasma

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
Prof.ª. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/Uel

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a). Ivete Conchon Costa
Responsável pelo projeto
Departamento de Ciências Patológicas /CCB
C/C para a Chefia do Depto do /CCB
C/C para a Direção do CCB
C/C para o Biotério do CCB