

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DO EXTRATO DE
CIANOBACTÉRIA *Nostoc sp.* E SENSIBILIDADE À FARMÁCOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania (L.) infantum***

KARINA CRISTINA SILVA TORRES

São Luís – MA
2021

KARINA CRISTINA SILVA TORRES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DO EXTRATO DE
CIANOBACTÉRIA *Nostoc sp.* E SENSIBILIDADE À FARMÁCOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania (L.) infantum***

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Hivana Patricia Melo B. Dall' Agnol

Coorientadora: Prof. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima

São Luís – MA
2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Torres, Karina Cristina Silva.

Avaliação da atividade antileishmanial do extrato de cianobactéria *Nostoc* sp. e sensibilidade á fármacos em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* / Karina Cristina Silva Torres. - 2021.

85 p.

Coorientador(a): Mayara Ingrid Silva Lima.

Orientador(a): Hivana Patricia Melo Barbosa Dall' Agnol.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2021.

1. Citotoxicidade. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Maranhão. I. Dall' Agnol, Hivana Patricia Melo Barbosa. II. Lima, Mayara Ingrid Silva. III. Título.

KARINA CRISTINA SILVA TORRES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DO EXTRATO DE
CIANOBACTÉRIA *Nostoc sp.* E SENSIBILIDADE À FARMÁCOS EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania (L.) infantum***

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Aprovada em 16 / 12 / 2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall'Agnol (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Emerson Augusto Castilho Martins
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Dra. Tânia Keiko Shishido
Universidade de Helsinki, Finlândia

*Tendo por certo isto mesmo, que aquele que em vós começou a boa obra a aperfeiçoará até ao dia de Jesus
Cristo.
(Filipenses 1:6)*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu dedico este trabalho inteiramente a **Deus**. Desde do ingresso da Pós-graduação até a presente data tenho sido amparada, cuidada e sustentada por Aquele que me permitiu realizar mais este sonho em minha vida.

A minha **família**, em especial meus pais, **Maria do Carmo e Pedro**, pelo incentivo desde de sempre, cuidando em todos os momentos e guiando para o melhor caminho à ser seguido, pelo seu amor incondicional que me fazem prosseguir todos os dias. Pelos meus irmãos, **Daniel e Karlene**, obrigada pelas risadas e carinho, mesmo diante de tantas adversidades sempre estamos prontos pra ajudar uns aos outros. E também pelos meus padrinhos, **Alcinda e Galvão**, pelo coração gigante que possuem, por não medirem esforços pra ajudar e cuidar de cada pessoa que precisa de auxílio. Amo muito vocês.

Ao meu marido, **Manoel Inácio Jr.** Que é um sinônimo de resiliência e força, e transmitiu toda sua calma e tranquilidade nos momentos que eu mais precisei. Minha companhia nas alegrias e também nas tristezas, te amo pela pessoa que és e pela pessoa que tem me ajudado a ser a cada dia de longos anos que temos pela frente. Te amo.

A minha orientadora **Profa Hivana Dall' Agnol**, pela orientação, pelas exortações, cuidado e compreensão ao longo desses dois anos. Além de me proporcionar novos aprendizados sobre as cianobactérias, me tornando parte do grupo de pesquisa em Biodiversidade, Bioprospecção e Biotecnologia GB³. Muito Obrigada.

A minha coorientadora, **Profa Mayara Ingrid**, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Genética e Biologia Molecular. Você foi fundamental para que todo esse trabalho fosse possível, pela enorme paciência em cada etapa desse trabalho. Ao longo desses 3 anos, cresci profissionalmente e muito disso devo a sua pessoa. Saiba que tenho uma enorme admiração pelo seu empenho, cuidado e força para lidar com as situações adversas que aparecem. E quando eu pensava que está tudo perdido, você me mostrava que ainda podíamos lutar e terminar o que começamos. És uma mulher incrível!!!

A todos do **Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM)**, em especial à **Santana**, que foi um verdadeiro anjo, me socorrendo em tudo que eu precisava, sempre com amor e palavras sábias. A **Vera Maciel, Vanessa, Rosinha, Israel Higino, Hugo e Patrícia** pelos ensinamentos e disposição em ajudar sempre que necessário. E um agradecimento especial pelos professores coordenadores do LabGeM, a **Profa Silma Regina** e ao **Prof. Leonardo Dall' Agnol**, pela dedicação e grandes exemplos de profissionais.

Aos meus amigos do **Grupo de Pesquisa em Genética e Biotecnologia aplicada á saúde (BioGen)**, em especial **Juliana** que nesta etapa final foi meu braço direito, além das risadas, lanches e memes aleatórios que nos ajudaram a descontrair a tensão de cada experimento. Agradeço também a **Robson, Meydson, Natália, Emily**, que mesmo distantes o legado de vocês continua e descontração no final do dia sempre era garantida. Obrigada por me acolherem. **Ricardo, Ana Jéssica e André** pelo companheirismo e por deixarem nossos dias mais leves. E ao **Antônio e Gustavo Almeida** que tive oportunidade de conhecer e admirar. Torço por cada um de vocês.

Ao meu amigo, **Gustavo Henrique**, pelo apoio e companheirismo. Pelas longas conversas e me acolher no grupo da leishmaniose, com auxílio e dedicação, tornando os meus dias muito mais leves ao seu lado. Tenho imenso orgulho de você e tudo que conquistou e tenho certeza que irá conquistar muito mais. Sucesso sempre.

Aos meus amigos do **Grupo de Pesquisa em Biodiversidade, Bioprospecção e Biotecnologia GB³**, em especial **Malena**, pela ajuda no início de adaptação com as amostras de cianobactérias, e pelo companheirismo. **Iolanda, Milene, Mairla** pelas longas jornadas de experimento e mesmo assim, sempre com um sorriso no rosto para dizer que ia ficar tudo bem. E deu tudo certo!!!

Ao **André Alvares Marques Vale**, por todo o auxílio nas etapas finais dos experimentos com o método da citometria de fluxo e manuseio dos animais, pelas explicações, paciência e pelas conversas descontraídas que fazem de você uma pessoa cada vez mais especial. Agradeço a **Sulayne** e também a **Profa. Ana Paula** pela disposição em ajudar e ceder seu tempo e equipamento para dar continuidade aos nossos experimentos. Muito obrigada.

A todos os professores do programa de pós-graduação, em especial o **Prof. Rafael Cardoso**, que nos abraçou na disciplina de Seminários II em um momento tão delicado que nos encontramos, Covid 19, sem ele muito de nós já teríamos desistido de tudo. Nunca esquecerei do seu apoio e amor em cada gesto e palavra. Guardarei para sempre no meu coração.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA)** pela concessão da bolsa durante dois anos de pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde –PPGCS**.

RESUMO

No Brasil, os principais fármacos adotados para o tratamento de leishmaniose visceral são o Antimônio pentavalente (Glucantime®) e ao antifúngico Anfotericina B (AmB), ambos com elevada toxicidade e ocorrências de falhas terapêuticas relatadas mundialmente, que é fenômeno complexo e multifatorial, relacionado com a interação hospedeiro-parasito, bem como a resposta do parasito às drogas, medida pela sensibilidade dos mesmos aos fármacos. Considerando a escassez de fármacos e ainda fenômenos como a resistência medicamentosa, identificar novos compostos naturais com ação antileishmanial tem sido foco de muitas pesquisas. Nesse sentido, as cianobactérias são organismos fotossintetizantes, responsáveis pela produção de compostos bioativos com atividade antiparasitária. Desse modo, o presente estudo, teve como objetivo testar a atividade antileishmanial do extrato de cianobactéria *Nostoc* sp. e avaliar a sensibilidade à fármacos em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* obtidos de pacientes com LV do estado Maranhão. Para verificar a sensibilidade das formas promastigotas, os isolados foram submetidos a teste de viabilidade celular, utilizando MTT, frente ao Antimônio trivalente e Anfotericina B, verificando uma variação de EC₅₀ de 66.2 ± 9.8 a 155 ± 3.6 µM e 118.9 ± 14.7 nM a 243.5 ± 21.3 nM, respectivamente. Nas formas amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais, avaliadas por contagem direta, os valores de o EC₅₀ para antimônio pentavalente e anfotericina B variaram de 16,1 a 39,3 µM e 0,09 a 0,18 µM, respectivamente. Ademais, tanto nas formas promastigotas quanto amastigotas intracelulares observou-se maior tolerância dos isolados clínicos ao antimônio, nas formas tri ou pentavalentes. Em paralelo, ao avaliar-se a atividade antileishmanial de promastigotas da cepa referência de *L. (L.) infantum* frente ao extrato bruto de cianobactéria do gênero *Nostoc* sp. GBBB01, por contagem direta, houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações de 500 a 31,25ug/mL em relação ao controle sem tratamento, entretanto quando a análise foi realizada pela citometria de fluxo, essas diferenças não foram encontradas. Já nas formas amastigotas intracelulares, o extrato bruto de cianobactéria do gênero *Nostoc* sp apresentou atividade antileishmanial, sendo possível calcular a IC₅₀, somente para um dos isolados clínicos (MHOM/BR/2018/ASFF-MA) avaliado. Ademais, o extrato bruto de cianobactéria também não induziu efeito citotóxico em macrófagos peritoneais, nas condições testadas. Dessa forma, pode-se afirmar que existe uma variabilidade intraespecífica na sensibilidade aos fármacos tradicionais (Antimônio e Anfotericina B) nos isolados clínicos dessa área de alta endemia para LV, e que o extrato bruto de cianobactéria do gênero *Nostoc* sp. GBBB01 apresentou atividade antileishmanial, que precisa ser melhor explorada devido a divergência de resultados entre técnicas de análise, a necessidade de novos testes, considerando que mesmo para o extrato de cianobactéria ocorre variação nesse atividade a depender da cepa de *L. infantum* avaliada.

Palavra-chave: Citotoxicidade; Leishmaniose Visceral; Maranhão.

ABSTRACT

In Brazil, the main drugs adopted for the treatment of visceral leishmaniasis are pentavalent antimony (Glucantime®) and the antifungal Amphotericin B (AmB), both with high toxicity and occurrences of therapeutic failures reported worldwide, which is a complex and multifactorial phenomenon, related with the host-parasite interaction, as well as the response of the parasite to drugs, measured by their sensitivity to drugs. Considering the scarcity of drugs and even phenomena such as drug resistance, identifying new natural compounds with antileishmanial action has been the focus of much research. In this sense, cyanobacteria are photosynthetic organisms, responsible for the production of bioactive compounds with antiparasitic activity. Thus, the present study aimed to test the antileishmanial activity of the cyanobacteria extract *Nostoc* sp. and to evaluate drug sensitivity in clinical isolates of *Leishmania (L.) infantum* obtained from patients with VL in the state of Maranhão. To verify the sensitivity of the promastigote forms, the isolates were submitted to cell viability test, using MTT, against trivalent Antimony and Amphotericin B, verifying an EC50 variation from 66.2 ± 9.8 to 155 ± 3.6 μ M and 118.9 ± 14.7 nM to 243.5 ± 21.3 nM, respectively. In the intracellular amastigote forms in peritoneal macrophages, evaluated by direct counting, the EC50 values for pentavalent antimony and amphotericin B ranged from 16.1 to 39.3 μ M and 0.09 to 0.18 μ M, respectively. Furthermore, both in the intracellular promastigote and amastigote forms, a greater tolerance of clinical isolates to antimony was observed, in the tri- or pentavalent forms. In parallel, when evaluating the antileishmanial activity of promastigotes of the reference strain of *L. (L.) infantum* against the crude extract of cyanobacteria of the genus *Nostoc* sp. GBBB01, by direct counting, there was a statistically significant difference in concentrations from 500 to 31.25 μ g/mL in relation to the untreated control, however when the analysis was performed by flow cytometry, these differences were not found. In the intracellular amastigote forms, the crude extract of cyanobacteria of the genus *Nostoc* sp showed antileishmanial activity, being possible to calculate the IC50, only for one of the clinical isolates (MHOM/BR/2018/ASFF-MA) evaluated. Furthermore, the crude cyanobacteria extract also did not induce cytotoxic effect on peritoneal macrophages under the conditions tested. Thus, it can be stated that there is an intraspecific variability in the sensitivity to traditional drugs (Antimony and Amphotericin B) in clinical isolates from this highly endemic area for VL, and that the crude extract of cyanobacteria of the genus *Nostoc* sp. GBBB01 presented antileishmanial activity, which needs to be better explored due to the divergence of results between analysis techniques, the need for new tests, considering that even for the cyanobacteria extract there is variation in this activity depending on the strain of *L. infantum* evaluated.

Keywords: Cytotoxicity; Visceral Leishmaniasis; Maranhão.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
ANOVA	Análise de Variância
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Gás carbônico
D.O.	Densidade Óptica
DHA	Ácidos docosa-hexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPA	Eicosapentaenóico
FACS	Células ativadas por fluorescência
<i>HaeIII</i>	Enzima de restrição
HIV	Vírus imunodeficiência adquirida
IC50	Concentração que inibe a concentração celular em 50%
ICBGa	Grupo de biodiversidade cooperativa internacional de Panamá
IFAT	Testes de anticorpos para imunofluorescência
ITS1	Espaçador transcrito interno 1
LC	Leishmaniose Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
MSCs	metabólicos Secundários de Cianobactérias
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR- RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
RPMI	Roswell park memorial institute medium
Sb ^{III}	Antimônio trivalente
Sb ^V	Antimônio pentavalente
SDS	Docedil sulfato de sódio

SINAN Sistema de informação de agravos de notificação
WHO Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Microfotografia das formas morfológicas principais de <i>Leishmania</i> sp.	15
FIGURA 2. Ciclo biológico do protozoário parasita <i>Leishmania</i> sp.....	16
FIGURA 3. Distribuição de países com alta prevalência de leishmaniose visceral.....	17
FIGURA 4. Indicador composto de leishmaniose visceral, estratificação de risco nas Américas, Brasil e Maranhão (2015-2017).....	18
FIGURA 5. Distribuição de casos confirmados de leishmaniose notificados no estado do Maranhão.....	19
FIGURA 6. Sintomas clínicos da Leishmaniose visceral.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Leishmaniose: uma doença negligenciada no mundo	15
2.2 Ciclo de Vida do Parasito	16
2.3 Epidemiologia.....	17
2.4 Leishmaniose Visceral.....	21
2.5 Tratamento da Leishmaniose Visceral	22
2.6 Cianobactérias e seu amplo potencial biológico.....	23
2.6.1 Cianobactérias	23
2.6.6.1 Gênero <i>Nostoc</i>	24
2.6.2 Propriedades dos compostos bioativos de cianobactérias.	25
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos.....	29
CAPÍTULO I	39
REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária endêmica em regiões tropicais incluindo o Brasil, causada por *Leishmania (Leishmania) infantum*, sendo considerada a forma mais grave da doença e potencialmente fatal caso não seja tratada adequadamente.

O arsenal terapêutico para o tratamento limita-se ao antimônio pentavalente como droga de primeira escolha e a anfotericina B como droga de segunda escolha. Entretanto, devido aos efeitos colaterais, elevada toxicidade e a ocorrência de falhas terapêuticas tem se tornado cada vez mais frequentes estudos sobre variações na resposta clínica as drogas utilizadas atualmente, além da busca por novos compostos naturais como extrato brutos de cianobactérias encontradas em regiões ainda não exploradas, como o cerrado maranhense.

As cianobactérias são organismos fotossintetizantes que podem ser encontradas em diversos ambientes no aspecto mundial e apresentam um interesse comercial, farmacêutico e terapêutico, pois são responsáveis pela produção de um grande número de bioativos naturais com diferentes atividades biológicas, incluindo antileishmanial.

O capítulo I deste estudo, avaliamos o potencial antileishmanial do extrato bruto de cianobactérias do gênero *Nostoc* sp., provenientes da região do Cerrado - MA, em isolados clínicos de *L. (L.) infantum* de uma área endêmica visando contribuir para uma possível alternativa quimioterápica da doença, devido ao surgimento de isolados clínicos de *Leishmania* sp. com resistência medicamentosa.

Devido a necessidade de compreender os motivos que possam causar as variações na resposta clínica diante do fenômeno da resistência, seria interessante avaliar a diferença de sensibilidade do parasito às drogas utilizadas no tratamento da doença. Mas além da sensibilidade da *Leishmania* existem diversos outros fatores que podem estar envolvidos neste processo. Diante disso, em anexo neste trabalho apresentamos o artigo submetido na qual avaliamos a sensibilidade *in vitro* de isolados obtidos de pacientes com diagnóstico positivo para LV aos principais fármacos utilizados na quimioterapia da doença. Nos últimos anos, estudos tem mostrado a divergência em relação a resposta clínica de diferentes espécies de *Leishmania* aos medicamentos disponíveis a décadas no mercado.

Portanto, essa dissertação possui dados sobre ausência do efeito citotóxico do extrato bruto *Nostoc* sp. e o potencial antileishmanial com a cepa de *L. (L.) infantum* e os isolados de pacientes com LV do estado Maranhão. Destacamos pela primeira vez dados de extrato bruto de cianobactérias em relação aos isolados clínicos da espécie causadora a doença

em nosso estado. Permitindo assim, que outros trabalhos futuros possam ser desenvolvidos e explorados utilizando estas abordagens.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmaniose: uma doença negligenciada no mundo

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que acomete mais de 350 milhões de pessoas que vivem em áreas de risco distribuídas em 98 países. As leishmanioses afetam principalmente pessoas mais pobres e com maiores dificuldades de acesso aos serviços de saúde básica (WHO, 2019).

Esta doença é uma zoonose sistêmica causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes à família Trypanossomatidae (Kinetoplastida) e transmitidos por flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. Esses parasitos alternam seu ciclo biológico entre hospedeiros vertebrados e invertebrados e apresentam-se duas formas morfológicas principais: promastigotas (Fig. 1 A) e amastigotas (Fig. 1 B) (REY, 2016).

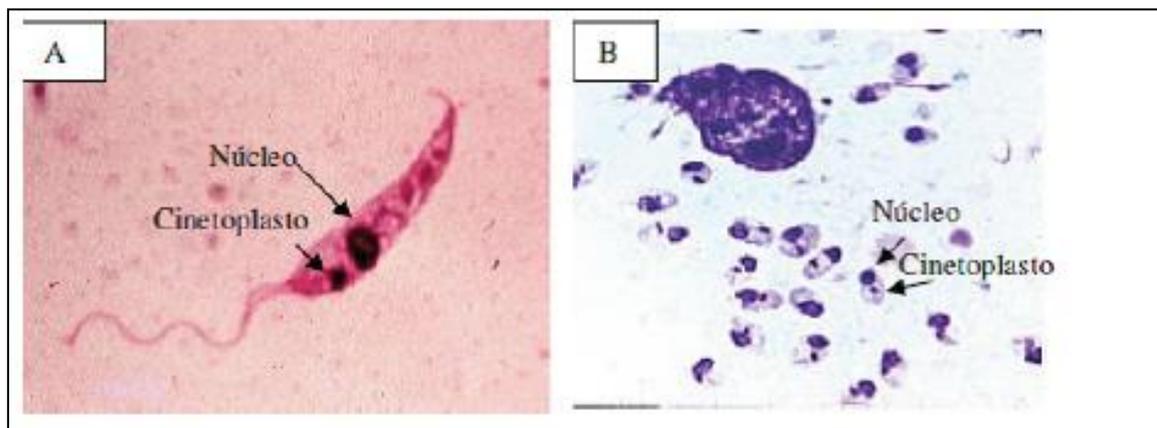


Figura 1: Microfotografia das formas morfológicas principais de *Leishmania* spp. (A) Promastigotas; (B) Amastigotas. Fonte: Adaptado de Aguiar et al. (2017).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Os dois gêneros se desenvolvem no intestino do inseto vetor sob a forma promastigota, o que os diferencia é que as espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* são encontradas na porção anterior do tubo digestivo, enquanto que as espécies do subgênero *Viannia* se desenvolvem na porção posterior do tubo digestivo do inseto. Ao entrar em contato com o hospedeiro mamífero, cada espécie dos diferentes subgêneros desencadeia manifestações clínicas diversas (FRAGA et al., 2012).

Em seres humanos, a leishmaniose pode se manifestar em diferentes formas clínicas, com graus de severidade: forma cutânea localizada, cutânea disseminada, difusa, mucocutânea, e a visceral. Além disso, esta doença pode ser assintomática nos humanos e também nos animais que servem de reservatório para o parasito (AGUIAR et al., 2017).

2.2 Ciclo de Vida do Parasito

Os dois tipos de transmissão existentes para a leishmaniose visceral são: ciclo zoonótico, onde a doença é transmitida ao homem a partir de um vetor que fez o repasto sanguíneo em reservatório animal e o ciclo antroponótico onde é transmitida de homem para homem através do vetor (SILVA et al., 2013).

A doença é transmitida por fêmeas de insetos do gênero *Lutzomyia* (nas Américas) que ao picar o hospedeiro mamífero inoculam promastigotas metacíclicas, formas flageladas infectantes para vertebrados. Estas caem na corrente circulatória e, então, são fagocitadas por células de sistema fagocítico mononuclear, como células dendríticas e também macrófagos. Estes, diferenciam-se em amastigotas intracelulares, formas arredondadas e com flagelo internalizado, as quais se multiplicam através de divisão binária causando rompimento celular e infectando novas células, disseminando-se para órgãos linfoides (SPATH et al., 2000; CHAPPUIS et al., 2007).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor, por sua vez, contamina-se ao ingerir células parasitadas por amastigotas, e dentro do tubo digestório do inseto se transformam em promastigotas procíclicas que aderidas ao epitélio iniciam uma intensa atividade multiplicadora, por divisão binária (REY et al., 2001).

Após alguns dias, os parasitas migram para o esôfago do vetor e se diferenciam em formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, denominadas de promastigotas metacíclicas, que obstruem o canal alimentar do inseto, que durante um novo repasto sanguíneo, ao sugar o sangue de um novo hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo (BATES et al., 2015) (Figura 2).

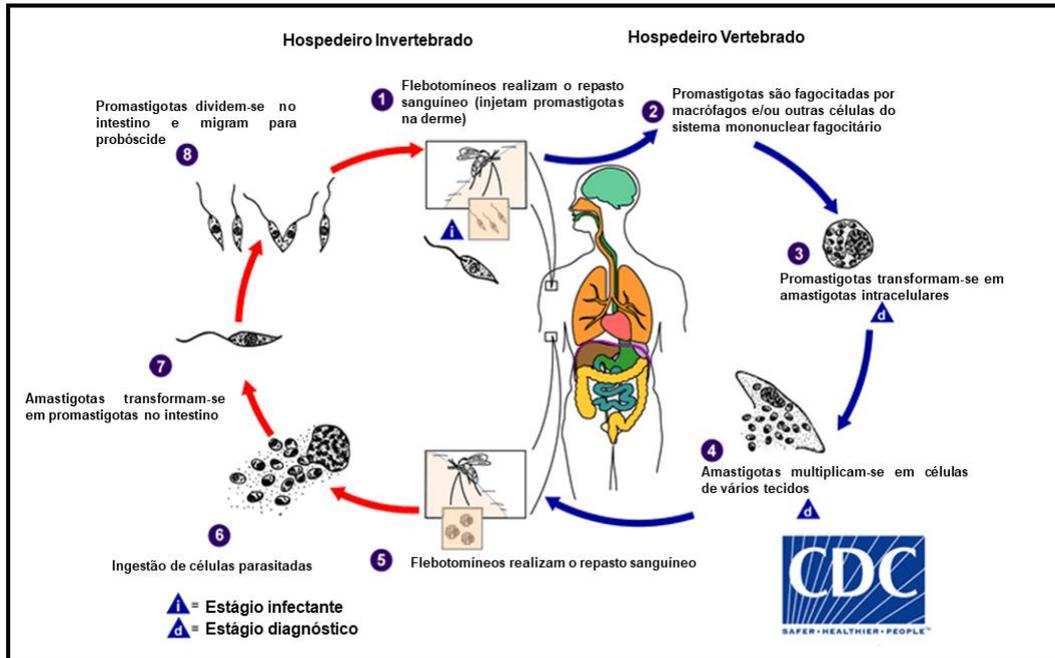


Figura 2: Ciclo biológico do protozoário *Leishmania* sp. Fonte: CDC <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology>

2.3 Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença de grande importância em saúde pública, devido a sua ampla distribuição pelo território mundial e também nacional, onde a ocorrência de formas clínicas graves e dificuldades de diagnóstico e de tratamento das mesmas (WHO, 2017).

Trata-se de uma doença que afeta, principalmente, a população pobre da África, Ásia e América Latina, está diretamente relacionada a má nutrição, moradias precárias, migração populacional e deficiências imunológicas. Segundo dados da OMS (2020), 97 países e territórios são endêmicos para leishmaniose, e de acordo com os casos relatados em 2018, 253.435 novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC) e 17.223 novos casos para Leishmaniose visceral (Figura 3).

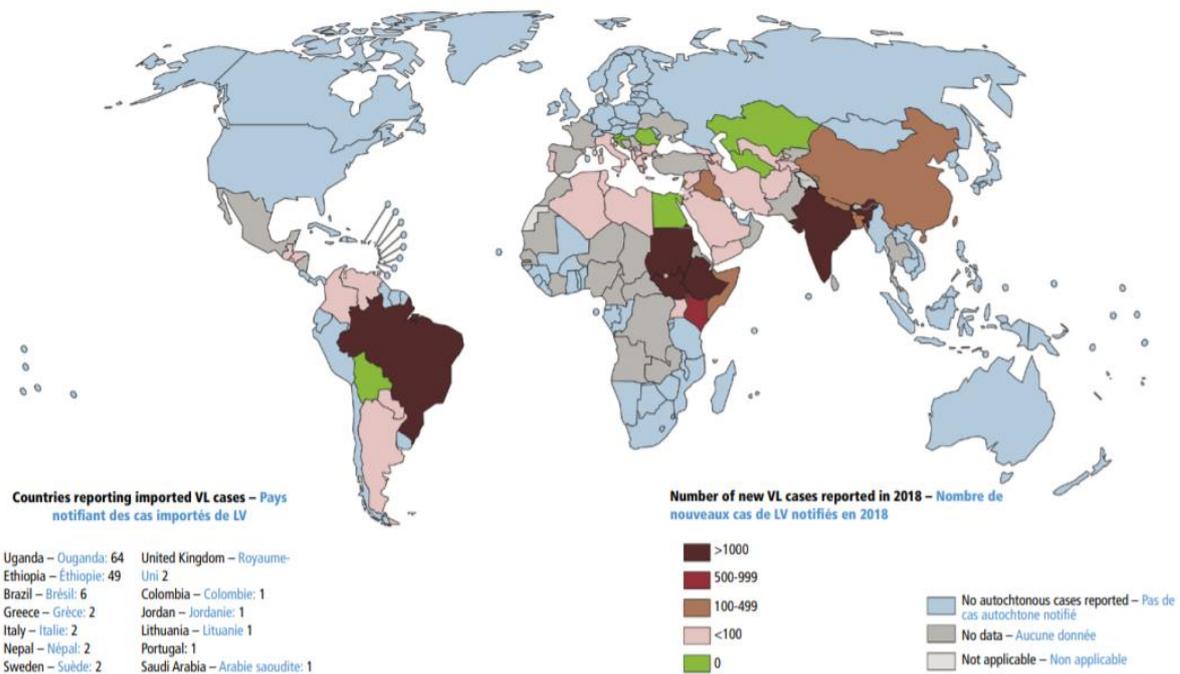


Figura 3: Distribuição de países com alta prevalência de leishmaniose visceral, com base nos dados relatados para a OMS em 2018. Fonte: WHO, 2020.

Nas américas, a LV é endêmica em 12 países e no período de 2001-2017 foram registrados 59.769 casos novos, resultando em uma média de 3.516 casos por ano. Cerca de 96% (57.582) dos casos foram reportados somente no Brasil (Figura 4), entretanto, países como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela também apresentam casos notificados. Por outro lado, alguns países da América Central, como Honduras e Guatemala, que antes reportavam casos esporádicos de LV, nos últimos 3 anos apresentaram um aumento significativo de casos e expansão geográfica da doença (OPAS, 2019).

Inicialmente, a LV ocorria apenas em áreas rurais e peri-urbanas, mas, atualmente está presente nas cinco regiões do Brasil. Tem-se que em 26 anos de notificação (1990-2015), os casos de LV somaram 81.722 casos, sendo 52,3 % deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (Brasil, 2017).

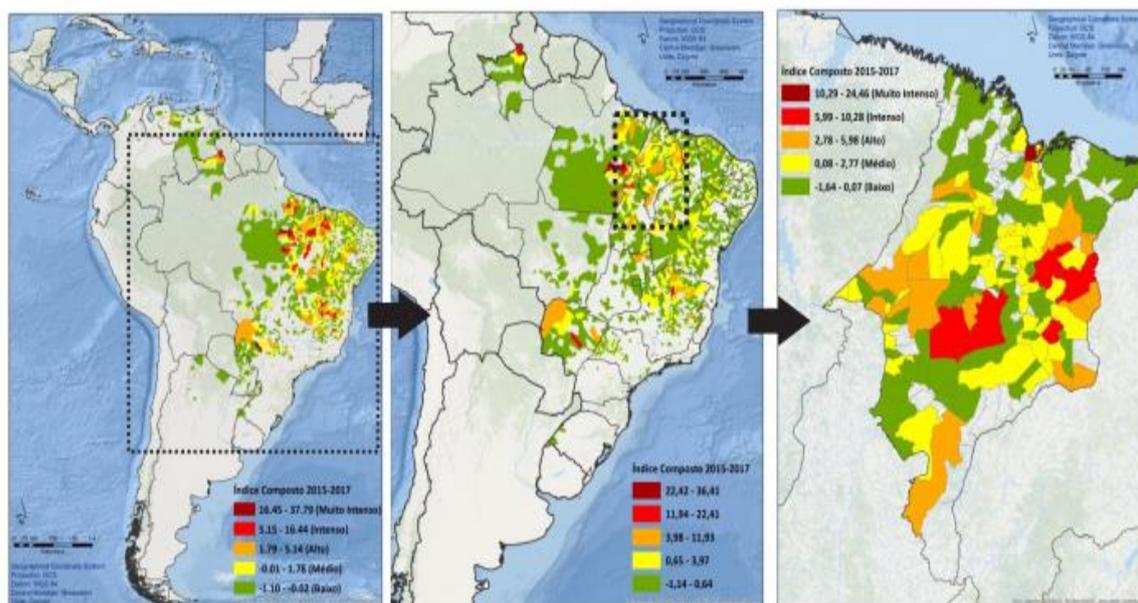


Figura 4: Indicador composto de Leishmaniose Visceral, sendo estratificação de risco nas américas, Brasil e maranhão, 2015-2017. Fonte: SisLeish-OPS/OMS:2019.

O estado do Maranhão apresenta-se como endêmico para LV, visto que a doença está presente em todas as mesorregiões do estado (Figura 4), possuindo elevado número de municípios que apresentam transmissão intensa da doença (COUTINHO et al., 2012). Entre os municípios com maior número de notificações destacam-se: São Luís (1.702 casos), Imperatriz (475 casos), Caxias (323 casos), Barra do Corda (171 casos) e Açailândia (134 casos) (SOUSA et al., 2020). Diante disso, São Luís tornou-se a quarta capital do país e a terceira do nordeste com o maior número de notificações de casos de LV entre 2008 a 2017 (SOUSA et al., 2020).

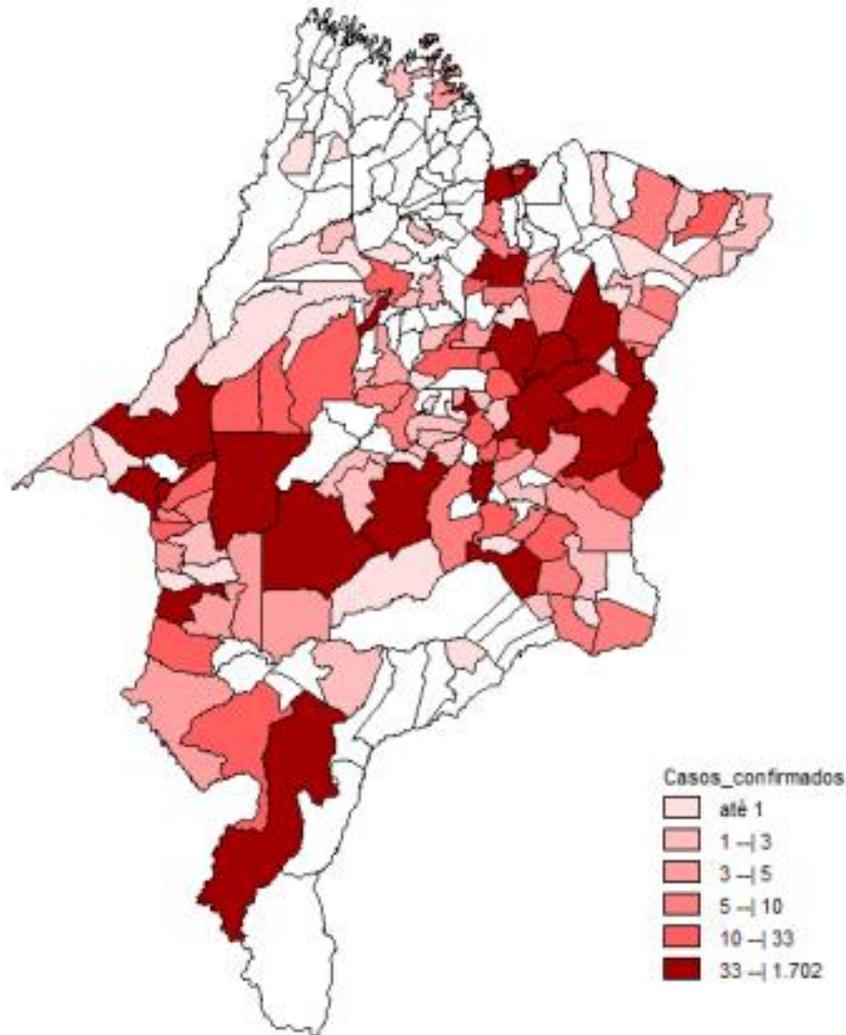


Figura 5: Distribuição de casos confirmados de leishmaniose notificados no estado do Maranhão entre os anos de 2008 a 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net. Adaptado (Sousa et al., 2020).

A Ilha de São Luís também responde por um importante parcela do número de casos da doença no estado. Em relação ao número de notificações da doença no estado, somente em 2017 foram confirmados 831 casos, acometendo principalmente crianças de 1-4 anos de idade seguido de indivíduos com faixa etária entre 20-39 anos (SINAN, 2018).

Os principais determinantes epidemiológicos da leishmaniose nos grandes centros são: convívio muito próximo homem/reservatório(cão), aumento da densidade do vetor, desmatamento acentuado e o constante processo migratório. Sendo importante destacar o conhecimento da doença uma área endêmica de leishmaniose, as taxas de infecção por *Leishmania* e as espécies parasitas circulantes na região (LISBOA et al., 2016).

O estudo publicado por Furtado et al. (2015) analisou a distribuição espaço-temporal dos casos de leishmaniose visceral no estado do Maranhão de 2000 a 2009, apontando o município de Caxias, Barra do Corda, Imperatriz e Presidente Vargas com as maiores

incidências. As informações foram coletadas a partir do banco de dados do Sistema de Informação de Agravos e notificação (SINAN) da Secretária de Estado da Saúde do Estado do Maranhão. Isso demonstra que as atuais medidas de controle estão sendo insuficientes, seja por controlar a LV nas áreas endêmicas, seja para prevenir a ativação ou reativação de focos em áreas até então consideradas endêmicas.

2.4 Leishmaniose Visceral

Dentre as manifestações clínicas, a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é caracterizada como uma doença infecciosa de caráter zoonótico, causada por *L. (L.) infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) (FERREIRA-PAES et al., 2020; GUALDA et al., 2015).

A LV resulta em uma infecção sistêmica e progressiva, o período de incubação do parasita varia dependendo da suscetibilidade do hospedeiro. Em humanos, ocorre de 10 a 24 meses acometendo o sistema retículo-endotelial e órgãos linfóides, como o baço, fígado e a medula óssea. Os sintomas clínicos incluem febre, anemia, leucopenia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e caquexia (Figura 5), podendo causar imunossupressão, tornando o hospedeiro susceptível as infecções secundárias e pode ser letal, se não tratada de forma adequada (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Em área endêmica, uma pequena proporção de indivíduos, geralmente crianças, podem apresentar um quadro clínico discreto, de curta duração, aproximadamente 15 dias, que frequentemente evolui para cura espontânea (forma oligossintomática) (Figura 5) (SUGAWARA;NIKAIDO, 2014).

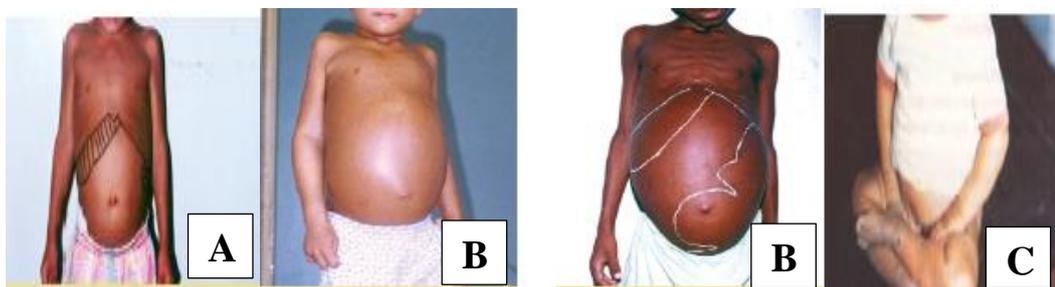


Figura 6: Sintomas da LV. (A) paciente em fase aguda; (B) paciente com hepatoesplenomegalia; (C) paciente com LV na forma oligossomática. Fonte: Ministério da Saúde, (2014).

Os determinantes para a manifestação clínica a espécie do parasito e o estado imunológico do hospedeiro. Em geral, pacientes imunossuprimidos, crianças e idosos tendem a ser afetados de forma mais intensa e são mais susceptíveis ao desenvolvimento da forma visceral da doença, mas a espécie e a cepa do parasito é um dos principais fatores que

determinam isso (SUNDAR et al., 2018), existindo inúmeros relatos de pacientes imunocomprometidos com leishmaniose, sendo a maioria dos casos descritos na literatura entre indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (HENN et al., 2018).

O vírus HIV e a *Leishmania* compartilham um mecanismo imunopatológico que compromete as células do sistema mononuclear fagocitário promovendo a replicação de ambos os patógenos (ANDREANI et al., 2012). Em geral, esses pacientes com HIV/LV respondem pouco ao tratamento e apresentam altas taxas de recidivas. Diante dessa realidade, percebe-se o aumento da vulnerabilidade do paciente à doença, aumentando o desafio para o tratamento adequado dos pacientes com as poucas opções terapêuticas disponíveis (LINDOSO et al., 2018).

2.5 Tratamento da Leishmaniose Visceral

Atualmente, não há vacina eficaz e protetora contra a leishmaniose. Assim, a quimioterapia é a principal forma de controle para o tratamento dessas doenças. No entanto, os medicamentos utilizados no tratamento apresentam baixo sucesso clínico, elevada toxicidade, inúmeros efeitos colaterais e alto custo (KEVRIC et al., 2015).

No Brasil, as drogas disponíveis para o tratamento da LV são o antimônio pentavalente (Sb^V) Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) e formulações de Anfotericina B (AmB). A escolha de cada um deles deverá considerar a faixa etária, presença de gravidez e comorbidades (BRASIL, 2017).

O Sb^V tem a vantagem de poder ser administrado em nível ambulatorial o que diminui os riscos relacionados a hospitalização. Os antimoniais pentavalentes atuam como pró-fármacos, devido a clivagem do composto pentavalente para trivalente no interior do macrófago. Estes interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo a glicólise e oxidação de ácidos graxos, entretanto, outros mecanismos ainda não compreendidos podem estar envolvidos (SINGH et al., 2014).

Os fármacos de segunda escolha incluem a Anfotericina B, Pentamidina, Paramonicina e Miltefosina. A AmB é um antibiótico poliênico, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, também utilizados em doenças fúngicas, e que se mostrou bastante eficaz contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (RATH et al., 2003). O medicamento possui, portanto, um mecanismo de ação em *Leishmania* intra e extracelular através de uma interferência no episterol precursor do ergosterol, causando danos à membrana plasmática do parasito. Porém, é bastante tóxica com vários efeitos colaterais como febre, vômitos, anemia e problemas cardíacos (MISTRO, 2016).

A AmB é a única opção no tratamento de gestantes, coinfectados com HIV e de pacientes que tenham contraindicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade, relacionada ao uso de Sb^v. A AmB convencional (desoxicolato) é significativamente mais eficaz que o Sb^v, mas está associada a altas taxas de nefrotoxicidade (MISTRO et al., 2016).

Dessa forma, o uso de formulações alternativas como a AmB lipossomal, que possui mecanismo de ação idêntico ao da AmB desoxicolato, porém com formulação encapsulada dentro de lipossomos. Esta droga é altamente eficaz, mas o custo é alto para ser uma opção viável de tratamento nos países em desenvolvimento, porém com meia-vida circulante mais curta e menos tóxica (ALMEIDA et al., 2017). O tratamento recomendado é de 1mg/Kg/dia com aplicação intravenosa ou intramuscular, o que exige internação do paciente (BRASIL, 2017).

Na América Latina, o tratamento realizado nem sempre resulta na cura clínica. Nos últimos anos, foram realizados estudos para avaliar a eficácia dos fármacos para o tratamento de LV. Os estudos demonstram baixa suscetibilidade para o antimônio pentavalente e anfotericina B *in vitro* e *in vivo* em *L. (L.) infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *L. donovani* (SUBBA et al., 2012; MAIA et al., 2013; KARIYAWASAN et al., 2019).

Porém, as estratégias atuais para controlar a LV ainda são ineficientes, apresentando resistência aos medicamentos que envolvem fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro, assim como aspectos da biologia do parasito, como a tolerância a uma determinada droga e o fenótipo de resistência (SERENO et al., 2019).

Por isso, a necessidade de buscar novas alternativas para uma possível combinação terapêutica que obtenha uma atividade antileishmanial promissora visando o uso de extratos naturais de cianobactérias e a diversidade de seus compostos bioativos em várias regiões inexploráveis.

2.6 Cianobactérias e seu amplo potencial biológico.

2.6.1 Cianobactérias

As cianobactérias são um grupo diverso de procariontes fotossintetizantes que apresentam estratégias celulares, mecanismos fisiológicos e adaptações que permitem a colonização de diversos ambientes aquáticos e terrestres. Diante disso, esses microrganismos assumem formas variadas e frequentemente habitats extremos como por exemplo, as fontes termais (CASSIER-CHAUVAT et al., 2017).

Estes microrganismos também são conhecidos como algas verde-azuladas e possuem a forma de células individuais, colônias ou filamentos, e mesmo sendo microscópicas, podem ser visualizadas quando estão aglomeradas com inúmeros indivíduos da mesma espécie (COSTA et al., 2018). Elas também estabelecem mecanismos celulares que as tornam adaptáveis a mudanças ambientais e obtêm um crescimento rápido, dependendo de variações nos níveis de nutrientes, fatores bióticos, mudanças climáticas ou aquecimento global (SUKENIK et al., 2012; PAERL et al., 2012; CATHERINE et al., 2013).

As cianobactérias são conhecidas pela produção de uma variedade de bioativos naturais. Os compostos bioativos são moléculas biologicamente ativas que afetam o organismo vivo, tecido ou célula de forma benéfica ou prejudicial (COSTA et al., 2018). Os extratos de cianobactérias contendo os compostos bioativos, como proteínas, lipídios, polissacarídeos, óleos, vitaminas, terpenos, polifenóis, carotenoides que exibem diversas propriedades com potenciais atividades biológicas (SINGH et al., 2011). Dentre estes, inclusive a presença de toxinas potentes, por exemplo, microcistinas, anatoxinas e saxitoxinas, que causam malefícios para a saúde humana, sendo assim alvo de monitoramento ambiental para controle de florações tóxicas (BURATTI et al., 2017; HUMBERT et al., 2017; PAERL et al., 2013), por outro lado estas toxinas representam oportunidade promissora para diversas aplicações, inclusive para o desenvolvimento de drogas (ZANCHETT et al., 2013).

Abordagens genômicas recentes têm sido importantes na elucidação das vias implicadas na biossíntese de produtos naturais por microrganismos fotossintetizantes; onde as numerosas vias biosintéticas desenvolvidas para produzir metabolitos remetem a sua ampla diversidade estrutural (CASSIER-CHAUVAT et al., 2017).

Grande parte das moléculas cianobacterianas ativas são consideradas como sendo produzidas através de peptídeos não ribossomais (NRP) ou das vias biosintéticas híbridas de policetídeo -NRP, ou pela síntese ribossomal de pró-peptídeos modificados pós – tradução (RiPP) (WASE e WRIGHT, 2008; MICALLEF et al., 2015). Estas análises genômicas demonstraram que a diversidade dos metabolitos conhecidos é apenas uma parte do verdadeiro potencial das cianobactérias.

2.6.6.1 Gênero *Nostoc*

O gênero *Nostoc*, pertencente a família Nostocaceae, foi inicialmente relatado no século 19, e ainda hoje apresenta uma taxonomia desafiadora. A natureza polifilética do mesmo resulta em frequentes revisões taxonômicas de espécies e a reclassificação em novos gêneros:

Mojavia, *Desmonostoc*, *Halotia*, *Aliinostoc*, *Komarekiella* e *Desikacharya*. (SINGH et al., 2020; KOMÁREK et al., 2014). Aproximadamente 300 espécies já foram descritas ao redor do mundo, apresentando uma considerável faixa de características morfológicas interessantes e adaptações ecológicas muito diversas (SINGH et al., 2020).

As cianobactérias do gênero *Nostoc*, de maneira simplificada, são filamentosas heterocitadas, caracterizadas por tricomas isopolares unisseriados, com células divididas perpendicularmente ao eixo do tricoma (KOMÁREK et al., 2014). Elas podem ser encontradas em diversas regiões geográficas como em áreas polares a tropicais, podendo colonizar desertos, semi-desertos, pastagens secas e superfícies rochosas (ABOAL et al., 2010). São encontradas nos solos ou em associações simbióticas com plantas e fungos (cianolíquens), mas também em ambientes aquáticos, de água doce ou marinhos, vivendo na forma livre ou associado a esponjas marinhas (FIDOR et al., 2019).

Os microrganismos fotossintetizantes do gênero *Nostoc* possuem a habilidade de fixação de carbono atmosférico e de nitrogênio. No solo, podem regular o pH, aumentar a concentração de carbono e nitrogênio, reduzir a quantidade de sódio em ambientes de alta salinidade, auxiliar na degradação de agrotóxicos e reduzir a contaminação por metais pesados como cobre (SINGH; PANDEY; SINGH, 2011). Alguns isolados são caracterizados como produtores de metabólitos secundários, incluindo peptídeos, policetídeos e alcalóides (DITTMANN et al., 2015). Diante da ampla diversidade taxonômica, genômica e química ainda por explorar, é possível a descoberta de um maior número de cianobactérias relacionadas a este gênero que possam apresentar compostos bioativos com benefícios para distintas atividades biológicas.

2.6.2 Propriedades dos compostos bioativos de cianobactérias.

Um grande número de compostos presentes em cianobactérias tem se destacado no mercado comercial, pois são aplicados em muitas atividades com fins diversos, tais como: enzimas, antioxidantes, biopigmentos, marcadores fluorescentes, exopolissacarídeos (são empregados gelificantes, emulsificantes, flocculantes e hidratantes), fármacos e diferentes nutrientes, como determinadas vitaminas e proteínas, minerais, lipídios e carboidratos (DEMAY et al., 2019; OTERO & VINCENZINI, 2003).

Outras possíveis aplicações terapêuticas com destaque comercial utilizando cianobactérias são diversificados, envolvendo a redução da hipercolesterolemia (HAMIDAH et al., 2009), efeito antidiabetogênico (CINGI et al., 2008), efeito anti-hipertensivo (LU et al.,

2010), modulador do sistema imunológico (RAVI et al., 2010), regulador da resposta alérgica (CINGI et al., 2008), aumento da absorção intestinal de vitaminas e minerais, aumento dos lactobacilos intestinais (BELAY et al., 1993), auxílio ao tratamento contra obesidade (ARAUJO et al., 2003) e redução da nefrotoxicidade e hepatotoxicidade por metais pesados e medicamentos (MOHAN et al., 2006).

A utilização destes microrganismos como alimento também possui importância por vários séculos, destacando-se algumas espécies do gênero *Nostoc*, na Ásia, e *Spirulina* na África pelos Kanembous, no México pelos astecas e também foi utilizada como fonte de alimento e suplemento primordial em programas espaciais da NASA – National Aeronautics and Space Administration – agência do Governo americano encarregada de pesquisa e desenvolvimento de exploração espacial (BERTOLDI et al., 2008; SHWETA et al., 2011; PONCE, 2014).

Em países desenvolvidos, o gênero *Spirulina* está sendo utilizada como ração animal, complementação alimentar e também na indústria cosmética (OLIVEIRA et al., 2013). O gênero *Nostoc* possui uma tradição milenar para habitantes dos Andes, fornecendo um ótimo suplemento nutricional, sendo usado em países como Equador, Peru e Bolívia, inclusive no Norte do Chile. Além disso, em regiões semiáridas da China e Mongólia foi considerada uma iguaria, mas devido a exploração excessiva e alta procura diminuíram sua comercialização (PONCE, 2014).

Além de fins nutricionais e terapêuticos, as cianobactérias são reconhecidas por sua importante fonte de metabólitos secundários com atividades biológicas descritas na literatura, como atividades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígena e imunossupressora, anti-inflamatória e atividades citotóxicas (GUPTA et al., 2013; SHAH et al., 2017). Além de apresentarem propriedades inibitória de proteases e de canais de íons de cálcio, como lipopeptídeos, aminoácidos, ácidos graxos, macrolídeos e antiprotozoaria (SINGH et al., 2011; COSTA et al., 2014).

Esses mesmos metabólitos secundários podem estar relacionados com a tolerância ambiental, interações biológicas, saúde humana (antioxidantes, vitaminas, antibacterianos, antifúngico, antiviral, toxinas) (NARAINSAMY et al., 2016; SALVADOR-REYER e LUESCH, 2015).

Dentre estes compostos bioativos são isolados dos grupos de Oscillatoriales (49%), seguidos por Nostocales (26%), Chroococcales (16%), Pleurocapsales (6%) e Estigonematales (4%). As cianobactérias como *Anabaena*, *Nostoc*, *Microcystis*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium* e *Spirulina* são responsáveis pela produção de inúmeros compostos de alto valor, como peptídeos, policetídeos, alcalóides, carotenóides, ácidos graxos, lipopeptídeos,

polissacarídeo, terpenos e outros compostos bioativos com atividades biológicas variadas (OFTEDAL et al., 2010; SHAH et al., 2017) (TABELA 1).

Tabela 1. Grupos de cianobactérias com descrição na literatura de importantes atividades biológicas na área das Ciências da Saúde.

Cianobactérias	Bioatividade	Referência
<i>Allinostoc sp.</i>	Cicatrizante	DEMAY et al., 2021
<i>Anabaena cylindrica</i>	Antifúngico	VESTOLA et al., 2014
<i>Aulosira sp.</i>	Antifúngico	SHISHIDO et al., 2020
<i>Caldora penicilata</i>	Antitumoral	GUNASEKERA et al., 2016
<i>Cyanobium sp.</i>	Antioxidante	PAGELS et al., 2020
	Anti-inflamatório	
	Não citotóxico	
<i>Fischerella sp.</i>	Anticâncer	SILVA- STENICO et al., 2013
	Antibacteriana antimicrobiana	SHISHIDO et al., 2020
<i>Leptolyngbya sp.</i>	Antiprotozoaria	VINING et al., 2015
<i>Lyngbya majuscula</i>	Citotoxicidade	GUNASEKERA et al., 2008
	Antifúngico	TAN et al., 2010
<i>Nostoc sp.</i>	Antileishmanial	SANCHEZ et al., 2010
	Antiprotozoaria	SHISHIDO et al., 2019
	Anticâncer	
	Anti-inflamatório	
Combate a psoríase		
<i>Nodosilinea (Leptolyngbya) antarctica</i>	Combate a psoríase	LOPES et al., 2020
<i>Oscillatoria sp.</i>	Antibacteriana	SILAMBARASAN e ABRAHAM et al., 2011
	Antiprotozoaria	OGAWA et al., 2017
<i>Spirulina platensis</i>	Aumento da absorção de vitaminas e minerais	BELAY et al., 1993
	Melhora do sistema imune Regulação da resposta alérgica	CINGI et al., 2008

Estudos relatam a utilização de cianobactérias do gênero *Lyngbya* produzindo lipopeptídeos com atividade citotóxica e antimitótica (GUNASEKERA et al., 2008), além de atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos hidrofóbicos de cianobactérias filamentosas dos gêneros *Oscillatoria*, *Lyngbya* e *Phormidium* (SILAMBARASAN e ABRAHAM et al., 2011).

Vários compostos isolados de cianobactérias, mostraram uma atividade potente contra várias linhagens de células cancerígenas, como por exemplo a milnamida B (IC50= 0,15 ng/ mL contra MDA -MB – 435), apratoxina F (IC50= 2 nM contra H – 460), apratoxina E (IC50= 21, 72 e 59 nM contra HT29, HeLa e U29S, respectivamente) e outros (NEGI et al, 2017). E extratos de *Cyanobium* sp., *Nostoc* sp. e *Oxynema* sp. já foram previamente descritos como tendo atividade anticâncer em diversos tipos de células e também para induzir apoptose da linhagem de células leucêmicas (SILVA- STENICO et al., 2013; SHISHIDO et al., 2019).

Em um esforço para encorajar o desenvolvimento de tratamentos eficaz e acessível para as doenças negligenciadas, incluindo a leishmaniose, o Grupo de Biodiversidade Cooperativa Internacional do Panamá (ICBGa) obteve o isolamento de cinco classes de compostos antiprotozoários de cianobactérias. Dentre esses, o inibidor de protease nostocarbolina, um alcalóide isolado de *Nostoc* sp. Que apresentou atividade contra *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *L. donovani* e *Plasmodium falciparum* com valores de IC50 variando de 0,5 a 0,194mM (SANCHEZ et al., 2010).

Kumar et al., (2013) selecionaram dois extratos brutos de cianobactérias de diferentes habitats com atividades antifúngicas e antileishmanial. Os resultados obtidos indicaram alterações na morfologia celular e na motilidade, sendo o extrato bruto natural, potente contra as formas amastigotas da *L. donovani*, por isso o conhecimento de recurso de microrganismos pode levar a uma descoberta de biomoléculas de interesse.

Conforme as informações relatadas, torna-se interessante a investigação de novos compostos naturais provenientes de cianobactérias oriundas da região maranhense, com possíveis potenciais antileishmaniais, visando contribuir para uma quimioterapia, devido ao surgimento de isolados clínicos de *Leishmania* sp. com resistência medicamentosa, principalmente em áreas endêmicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Testar a atividade antileishmanial do extrato de cianobactéria *Nostoc sp.* e avaliar a sensibilidade à fármacos em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* obtidos de pacientes com LV do estado Maranhão.

3.2 Específicos

- ❖ Obter e identificar as cepas de *Leishmania spp.* a partir de isolados clínicos dos pacientes com LV;
- ❖ Avaliar a sensibilidade *in vitro* ao antimônio pentavalente e anfotericina B nas formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*;
- ❖ Avaliar a atividade antileishmanial do extrato bruto de cianobactéria do gênero *Nostoc* nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*;
- ❖ Avaliar a atividade citotóxica do extrato bruto de cianobactéria do gênero *Nostoc sp.* em macrófagos murinos.

REFERÊNCIAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

ABOAL, M.; CRISTOBAL, C. J.; MARIN-MURCIA, J. P. About the presence of *N. commune* var *flagelliforme* (Nostocaceae, Cyanophyceae) on clay soils from arid regions of south east Spain. *Acta Bot. Malacit.* v. 35, 156–161. 2010.

AGUIAR, P F, RODRIGUES R. K. Visceral Leishmaniasis in Brazil: review article. *Revista Unimontes Científica.* Montes Claros 2017; 19: 1: 16 – 21.

ALMEIDA, L, FUJIMURA, A. T, CISTIA, M. L. D, FONSECA-SANTOS, B, IMAMURA, K. B, MICHELS, P. A. M., CHORILLI, M, GRAMINHA, M. A. S. Nanotechnological strategies for treatment of leishmaniasis—a review. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2017; 13. 117-133.

ANDREANI G, LODGE R, RICHARD D, TREMBLAY M J. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS.* 2012; 7; 276–282.

ARAÚJO K G L, FACCHINETTI A D, SANTOS C P. Influência da ingestão de biomassas de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2003;23(1):6-9.

BATES, P. A., J. DEPAQUIT, E. A. GALATI, S. KAMHAWI, M. MAROLI, M. A. MCDOWELL, A. PICADO, P. D. READY, O. D. SALOMON, J. J. SHAW, Y. M. TRAUB-CSEKO AND A. WARBURG. "Recent advances in phlebotomine sand fly research related to Leishmaniasis control. *Parasit Vectors* 2015; 16 -25.

BELAY A, O T A Y, MIYAKAWA K, SHIMAMATSU H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J Appl Phycol.* 1993;5(2):235-41.

BERTOLDI F C, SANT'ANNA E, OLIVEIRA J L B. Revisão: biotecnologia de microalgas. *B Ceppa.* 2008;26(1):9-20.

BRASIL, Ministério da Saúde (<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>). Acesso 28 Fev de 2020.

BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BURATTI, F.M.; MANGANELLI, M.; VICHI, S.; STEFANELLI, M.; SCARDALA, S.; TESTAI, E.; FUNARI, E. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 2017, 91, 1049–1130.

CASSIER-CHAUVAT, C., DIVE, V. & CHAUVAT, F. Cyanobacteria: photosynthetic factories combining biodiversity, radiation resistance, and genetics to facilitate drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017.101, 1359–1364.

CATHERINE Q, SUSANNA W, ISIDORA ES, MARK H, AURÉLIE V, JEAN-FRANÇOIS H. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria--ecology, toxin production and risk management. *Water Res.* 2013. Oct 1;47(15):5464-79.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews microbiology*, v. 5, n. 11supp, p. S7, 2007.

CINGI C, CONK-DALAY M, CAKLI H, BAL C. The effects of spirulina on allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008.

COSTA M; COSTA – RODRIGUES, J; FERNANDES, M H; BARROS, P; VASCONCELOS, V; MARTINS, R. Marinecyanobacteria isolated from the portuguese coast: high potencial as a source of anticâncer compound. *Marine Drugs.* 2014. 12. 98 – 114.

COSTA, J. A. V., MOREIRA, J. B., LUCAS, B. F., BRAGA, V. DA S., CASSURIAGA, A. P. A., & MORAIS, M. G. DE. (2018). Recent Advances and Future Perspectives of PHB Production by Cyanobacteria. *Industrial Biotechnology*, 14(5), 249–256.

COUTINHO A C, SILVA E L, CALDAS, AJM. Análise dos casos e óbitos por leishmaniose visceral no estado do Maranhão, no período de 2000 a 2008. *Revista de Pesquisa em Saúde;* 13:11-15. 2012.

DEMAY J, BERNARD C, REINHARDT A, MARIE B. Natural Products from Cyanobacteria: Focus on Beneficial Activities. *Mar Drugs.* May. 2019. 30;17(6):320.

DITTMANN, E.; GUGGER, M.; SIVONEN, K.; FEWER, D. P. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends in Microbiology* v. 23, 642-652. 2015.

FERREIRA-PAES T, CHARRET KDS, RIBEIRO MRDS, RODRIGUES RF, LEON LL. Comparative analysis of biological aspects of *Leishmania infantum* strains. PLoS One. 2020 Dec 3;15(12).

FIDOR A, KONKEL R, MAZUR-MARZEC H. Bioactive Peptides Produced by Cyanobacteria of the Genus *Nostoc* : A Review. Mar Drugs . 2019; 17 (10): 561.

FRAGA J, VELAND N, MONTALVO A M, PRAET N, BOGGILD A K. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of New World. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.2012; 74:142- 150.

FURTADO A S, NUNE F B B, SANTOS A M, CALDAS A J M. Análise espaço-temporal da leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil. Ciência & Saúde Coletiva. 2015; 20; 3935-3942.

GUALDA KP, MARCUSSI LM, NEITZKE-ABREU HC, ARISTIDES SM, LONARDONI MV, CARDOSO RF, SILVEIRA TG. New primers for detection of leishmania infantum using polymerase chain reaction. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015 Sep-Oct;57(5):377-83.

GUNASEKERA, S P; ROSS, C; PAUL, V J; MATTHEW, S; LUESCH, H. Dragonamides C and D, Linear lipopeptides from the marine cyanobacterium brown *Lyngbya polychroa*. Journal of Natural Products, 2008. 71. 887 – 890.

GUPTA, V.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) —Prospects and challenges. Algal Reseach 2013. 2 79-97.

HAMIDAH A, RUSTAM Z A, TAMIL A M, ZARINA L A, ZULKIFLI Z S, JAMAL R. Prevalence and parental perceptions of complementary and alternative medicine use by children with cancer in a multi-ethnic Southeast Asian population. Pediatr Blood Cancer. 2009 Jan;52(1):70-4.

HENN G. A. L, JUNIOR A. N. R, COLARES J. K. B, MENDES L. P, SILVEIRA J. G. C, LIMA A. A. F, AIRES B. P, FAÇANHA M. C. Is Visceral Leishmaniasis the same in HIV-coinfected adults? Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2018; 22; 92-98.

HUMBERT, J.-F.; Törökné, A. New Tools for the Monitoring of Cyanobacteria in Freshwater Ecosystems. In Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis; JohnWiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2017; pp. 84–88.

KARIYAWASAM R, CHALLA P, LAU R, BOGGILD A K. Susceptibility testing of *Leishmania* spp. against amphotericin B and fluconazole using the Sensititre™ YeastOne™ YO9 platform. BMC Infect Dis. 2019. Jul 8;19(1):593.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. Dermatologic Clinics. 2015; 33; 579-593.

KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J.; MARES, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia v. 86, 295-335. 2014.

KUMAR M., TRIPATHI .M K., SRIVASTAVA A., GOUR J. K., SINGH R. K., TILAK R., ASTHANA R. K. Cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii* and *Aphanothece bullosa* as antifungal and antileishmanial drug resources. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2013; 3: 458-463.

LINDOSO J A L, MOREIRA C H V, CUNHA M A, QUEIROZ I T. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. HIV AIDS (Auckland, Nova Zelândia). 2018; 10:193–201.

LISBOA, A. R. PINHEIRO, A. A. V, DANTAS, A. E. F, OLIVEIRA, I. B, EVANGELISTA T. R, PEREIRA, K. K. E. A. Leishmaniose visceral: uma revisão literária. REBES (Revista Brasileira de Educação e Saúde); 6; 35-43. 2016.

LU J, REN DF, XUE YL, SAWANO Y, MIYAKAWA T, TANOKURA M. Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*. J Agric Food Chem. 2010; 58(12):7166–1171.

MAIA C, NUNES M, MARQUES M, HENRIQUES S, ROLÃO N, CAMPINO L. In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. Experimental Parasitology. 2013. 135. 36–41.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. QJM (An International Journal of Medicine). 2014; 107: 7–14.

MICALLEF, M. L.; D'AGOSTINO, P. M.; AL-SINAWI, B.; NEILAN, B. A.; MOFFITT, M. C. Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways. Marine Genomics. 2015. v. 21, 1-12.

MISTRO S, RODRIGUES M, ROSA L, CAMARGO M, BADARÓ R. Liposomal Amphotericin B drug access for the treatment of leishmaniasis in Brazil. Tropical Medicine and International Health. 2016; 21: 692 – 693.

MOHAN I K, KHAN M, SHOBHA J C, NAIDU M U R, PRAYAG A, KUPPUSAMY P, KUTALA V K. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by Spirulina in rats. Cancer Chemother Pharmacol. 2006;58(6):802–8.

NARAINSAMY K, FARCI S, BRAUN E, JUNOT C, CASSIER-CHAUVAT C, CHAUVAT F (2016) Oxidative-stress detoxification and signalling in cyanobacteria: the crucial glutathione synthesis pathway supports the production of ergothioneine and ophthalmate. Molecular Microbiol

OFTEDAL L, SELHEIM F, WAHLSTEN M, SIVONEN K, DØSKELAND SO, HERFINDAL L. Marine benthic cyanobacteria contain apoptosis-inducing activity synergizing with daunorubicin to kill leukemia cells, but not cardiomyocytes. Mar Drugs. 2010. 8:2659–2672.

OPAS/OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.

OTERO A, VINCENZINI M. Síntese de polissacarídeo extracelular por cepas de *Nostoc* afetadas pela fonte de N e intensidade de luz. J Biotechnol. 2003; 102 (2): 143-152.

PAERL, H.W.; OTTEN, T.G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. Microb. Ecol. 2013, 65, 995–1010.

PAERL, HW; PAUL, VJ Climate change: Links to global expansion of prejudicial cyanobacteria. Water Res. 2012, 46, 1349–1363.

PAGELS F; SALVATERRA D; AMARO H M; LOPES G; SOUSA-PINTO I; VASCONCELOS V; GUEDES A C. Bioactive potential of *Cyanobium* sp. pigment-rich extracts. *Journal of Applied Phycology*. 2020.

PONCE, E. *Nostoc*: un alimento diferente y su presencia en la precordillera de Arica. *Idesia, Arica* , v. 32, n. 2, p. 119-121, mayo 2014 .

RATH S, TRIVELIN L A, IMBRUNITO T R, TOMAZELA D M, JESÚS M N, MARZAL P C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*. 2003; 26; 550-555.

RAVI M, DE S L, AZHARUDDIN S, PAUL S F D. The beneficial effects of *Spirulina* focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutr and Diet Suppl*. 2010; 2:73–83.

REY, L. *Leishmania* e Leishmaníases. In: *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4; 2016.

REY, L. O complexo “*Leishmania donovani*” e a Leishmaniose Visceral. In.: *Parasitologia. parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3; 2001.

SALVADOR-REYES LA, LUESCH H. Biological targets and mechanisms of action of natural products from marine cyanobacteria. *Nat Prod Rep*. 2015. 32(3):478–503.

SANCHEZ L M, LOPEZ D, VESELY B A, DELLA TOGNA G, GERWICK W H, KYLE D E, LININGTON R.G. Almiramides A-C: discovery and development of a new class of leishmaniasis lead compounds. *Journal Medicinal Chemistry*. 53; 4187-4197; 2010.

SERENO D, HARRAT Z, EDDAIKRA N. Meta-analysis and discussion on challenges to translate *Leishmania* drug resistance phenotyping into the clinic. *Acta Tropica*. 2019; 191; 204–211.

SHAH, S.A.A.; AKHTER, N.; AUCKLOO, B.N.; KHAN, I.; LU, Y.; WANG, K.; WU, B.; GUO, Y.-W. Structural Diversity, Biological Properties and Applications of Natural Products from Cyanobacteria. A Review. *Mar. Drugs* 2017, 15, 354.

SHISHIDO T K, HUMISTO A, JOKELA J, LIU L, WAHLSTEN M, TAMRAKAR A, FEWER D.P, PERMI P, ANDREOTE A.P.D, FIORE M. F, SIVONEN K. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. *Mar Drugs*. 2015; 13; 2124-2140.

SHISHIDO, TK, POPIN, RV, JOKELA, J., WAHLSTEN, M., FIORE, MF, FEWER, DP, HERFINDAL, L., & SIVONEN, K. Dereplication of Natural Products with Antimicrobial and Anticancer Activity from Brazilian Cyanobacteria. *Toxins*, 2019. 12 (1), 12.

SHWETA J, SHIKHA M, SAMUEL G S. Potentiality of *Petha (Benincasa hispida)* waste for the growth of *Spirulina platensis*. *Res J of Agric Sci*. 2011;2(1):133-5.

SILAMBARASAN, R C; ABRAHAM, J. Biodiversity of marine cyanobacteria and its antibacterial activity. *IJPI's Journal of Biotechnology and Biotherapeutics*. 2011. 4. 17 – 19.

SILVA, E.S., GAIOSO, A.C.L. Leishmaniose visceral no estado do Pará / Visceral leishmaniasis in Pará state. *Revista paraense de medicina Belém, Pará, Brasil*. 2013; 27; 2.

SILVA-STENICO M.E., KANENO R., ZAMBUZI F.A., VAZ M.G.M.V., ALVARENGA D.O., FIORE M.F. Natural products from cyanobacteria with antimicrobial and antitumor activity. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2013; 14:820–828.

SINAN. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral – situação epidemiológica. 2018. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvma.def>>. Acesso em: 21. Abr.2019.

SINGH P S, KUMAR M; Current treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar): an overview. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2014; 3; 13 -21.

SINGH R. K, TIWARI S. P, MOHAPATRA T. M, Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *Journal Antibiotics*. 2011; 64; 401-412.

SINGH, R K; TIWARI, S P; RAI A K; MOHAPATRA, T M. Cyanobacteria: na emerging source for drug Discovery. *The Journal of Antibiotics*. 2011. 64. 401 – 412.

SOUSA E P, FREITAS A J S, PAZ F A N, OLIVEIRA E H. Evolución de la leishmaniasis visceral em São Luís, Maranhão: un análise epidemiológico y temporal de casos. *Reasearch Society and Development*; 9:1-18. 2020.

SOUSA, R C. Caracterização Polifásica de Microrganismos Fotossintetizantes da Chapada das Mesas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. São Luís – MA, 68f., 2019.

SPATH, G. F. et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 16, p. 9258–9263, 2000.

SUBBA RAJU B V, GURUMURTHY S, KUHL S K, BHANDARI V, SCHNONIAN G, SALOTRA P. Genetic typing reveals monomorphism between antimony sensitive and resistant *Leishmania donovani* isolates from visceral leishmaniasis or post kala-azar dermal leishmaniasis cases in India. Parasitol Res. 2012 Oct;111(4):1559-68.

SUGAWARA E, NIKAIIDO H. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Antimicrobial agents and chemotherapy (Ministério da Saúde). 58; 7250-7; 2014.

SUKENIK, A., HADAS, O., KAPLAN, A., & QUESADA, A. (2012). Invasão de Nostocales (cianobactérias) para lagos de água doce subtropicais e temperados - forças propulsoras fisiológicas, regionais e globais. Frontiers in Microbiology, 3.

SUNDAR, S., & SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. Parasitology. 2018; 145; 481–489.

WASE, N. V.; WRIGHT, P. C. Systems biology of cyanobacterial secondary metabolite production and its role in drug discovery. Expert Opin Drug Discov v. 3, 903-929. 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire. N° 25. 95. 265–280. 2020.

WHO/PAHO Department of Neglected Infectious Diseases. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. n°7, P 7, march 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO. 201; 2017.

ZANCHETT, G.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins* 2013, 5, 1896–1917.

CAPÍTULO I

(American Journal of Natural Products -Qualis A2 em Medicina 1 e FI (4.050))

Atividade antileishmanial em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* pelo extrato bruto de *Nostoc* sp. GBBB01 do bioma Cerrado, Brasil.

Karina Cristina Silva Torres [1,2], Juliana Mendes Sousa [1], André Alvares Marques Vale [2], Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos [2], Leonardo Teixeira Dall' Agnol [1,3], Mayara Ingrid Sousa Lima *[1,2,3], Hivana Patricia Melo Barbosa Dall' Agnol *[2,4].

1 Laboratório de Genética e Biologia Molecular. Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

2 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

4 Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

Autores correspondentes:

Hivana Patricia Melo Barbosa Dall' Agnol. Laboratório de Genética e Biologia Molecular. Departamento de Biologia. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil. CEP 65080-805. E-mail: hivana.barbosa@ufma.br

Mayara Ingrid Sousa Lima. Laboratório de Genética e Biologia Molecular. Departamento de Biologia. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil. CEP 65080-805. E-mail: mayara.ingrid@ufma.br

Resumo

Leishmaniose é uma doença endêmica em vários países tropicais, sendo a quimioterapia a principal medida de controle. Essa se baseia em um número restrito de medicamentos, com alta toxicidade e variação da resposta entre pacientes. Diante disso, identificar novos compostos naturais com ação antileishmanial tem sido foco de muitas pesquisas, incluindo cianobactérias como organismos fotossintetizantes, responsáveis pela produção de compostos bioativos com atividade antiparasitária. Desse modo, o presente estudo avaliou o potencial antileishmanial e citotóxico do extrato bruto de cianobactéria do gênero *Nostoc* sp. GBBB01 proveniente da região da Chapada das Mesas, Cerrado, Maranhão, Brasil. A citotoxicidade do extrato foi avaliada por tratamento *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos, sendo a resposta medida por citometria de fluxo. Já a atividade antileishmanial foi testada em formas

promastigotas e amastigotas de cepa referência e isolados clínicos de *Leishmania (Leishmania) infantum*, utilizando concentrações crescentes do extrato bruto, sendo efeito mensurado por contagem direta, alterações morfológicas do parasito e citometria de fluxo. Os resultados indicaram que o extrato não induziu efeito citotóxico em macrófagos peritoneais nas condições testadas. Na avaliação por citometria de fluxo da atividade antileishmanial do extrato bruto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos tratados em relação ao controle sem tratamento. Entretanto, na análise por contagem direta do parasito, houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com redução no número de parasitos quando tratada com extrato bruto, em comparação ao controle sem tratamento, especialmente nas maiores concentrações testadas. Esse resultado foi confirmado com a análise dos parâmetros morfológicos do parasito, onde observou-se visualmente uma diminuição na quantidade de parasitos, rosetas (aglomerados de *Leishmania infantum*) e a presença de formas arredondadas do parasito nas maiores concentrações testadas do extrato. Em relação a atividade antileishmanial em amastigotas intracelulares somente para o isolado clínico MHOM/BR/20018/ASFF-MA foi possível obter um valor de IC_{50} ($488.2\mu\text{g/mL}$), demonstrando atividade antileishmanial do composto natural testado. Dessa forma, pode-se destacar que o extrato bruto de cianobactéria do gênero *Nostoc* sp. GBBB01 apresentou atividade antileishmanial, no entanto será preciso obter informações sobre o tipo de morte celular induzido pelo mesmo, para direcionar o ensaio e assim avaliar sua bioatividade. O extrato também não apresentou atividade citotóxica, podendo assim, ser testado para avaliar outras atividades biológicas. Este é o primeiro relato de ausência de citotoxicidade e atividade antileishmanial de um extrato bruto de cianobactéria proveniente do Cerrado Maranhense.

Palavras-chaves: cianobactérias, Leishmaniose visceral, Maranhão.

Introdução

A leishmaniose visceral (LV) nas américas é causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinônimo de *L. chagasi*), configurando-se como uma doença tropical negligenciada, potencialmente fatal ao homem caso não tratada [1]. No continente americano, a maioria dos casos acontece no Brasil, ocorrendo nas cinco regiões do país, incluindo o Maranhão, área de importante endemia [2].

O controle da doença se dá atualmente através da quimioterapia, contudo assim como em outras doenças tropicais, o arsenal terapêutico é bastante limitado [3]. No Brasil, a droga de primeira escolha utilizada para o tratamento da LV é o Antimoniato de Meglumina e Anfotericina B, como segunda escolha, nos casos com comorbidades específicas [4,5]. Esses medicamentos apresentam alta toxicidade, além da descrição de pacientes não responsivos, que pode ser devido a diferença de sensibilidade do parasito aos fármacos [6,7]. Dessa forma,

tornou-se necessário buscar e identificar novos compostos naturais com ação antileishmanial [8,9].

Dentre os compostos naturais, podemos destacar aqueles produzidos por cianobactérias, organismos procariontes fotossintetizantes, produtores de um grande número de metabólitos bioativos naturais, tais como: alcaloides, carotenoides, lipopeptídeos, terpenos e outros com inúmeras atividades biológicas [10]. Os compostos bioativos de organismos do gênero *Nostoc* sp. apresentam diferentes atividades biológicas, tais como: anticâncer, anti-inflamatório, cicatrizante e antiprotozoaria [11,12,13,14], sendo esse grupo promissor na investigação de biomoléculas ativas que podem ser utilizadas para fins terapêuticos.

O Bioma Cerrado presente no Maranhão, Brasil abriga uma enorme diversidade de cianobactérias [15] com potencial *in silico* para produção de compostos que poderão ser utilizados na terapia de doenças tropicais, particularmente leishmaniose, mas ainda muito pouco explorada [16]. Nesse sentido, e até o momento, não existem estudos correlacionando o extrato de cianobactérias da região com possíveis atividades biológicas.

Dessa forma, neste trabalho, avaliamos o potencial antileishmanial do extrato bruto de cianobactérias do gênero *Nostoc* sp., do Bioma Cerrado, Maranhão, Brasil em uma cepa de referência e isolados clínicos de *L. (L.) infantum* provenientes de pacientes com Leishmaniose visceral (LV) dessa mesma região, visando contribuir com alternativas para a quimioterapia da doença, principalmente em áreas endêmicas.

Metodologia

Aspectos éticos e obtenção dos isolados clínicos

Os isolados clínicos de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral, provenientes de um Centro de Referência em Doenças Infectocontagiosas, São Luís, MA, foram obtidos através de aspirado de medula óssea. Todos os isolados eram oriundos de pacientes que não foram expostos ao tratamento prévio. Os parasitos foram isolados através de diluição seriada do aspirado em placa de 24 poços e em seguida foram congelados a -80°C para posterior utilização. Os isolados estão disponíveis no biorrepositório do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM/UFMA) e o projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU/UFMA) sob N° 2.793.599.

Cianobactéria e Obtenção dos Extratos Brutos

Nostoc spp.GBBB01 foi isolada de uma cachoeira no Parque Nacional da Chapada das Mesas, região de Carolina, Maranhão – MA (S07°02.6575 W047°30.4508), e faz parte da coleção de microrganismos do Grupo de Pesquisa em Biodiversidade, Bioprospecção e Biotecnologia (GB3, isolados GBBB) do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Maranhão. A linhagem utilizada possui cadastro no SISGEN (AACCEC6D).

O preparo do extrato bruto foi realizado segundo protocolo adaptado de (Shishido et al., 2015) [17] para organismos fotossintetizantes. Para um tubo plástico de 2mL foi transferido 100mg de células liofilizadas, *beads* de vidro (0,5 mm glassbeads. Scientific Industries INC, part SI-BG05) e adicionado 1mL de metanol (MeOH 100%). Homogeneizou-se as amostras por 5 minutos à 3000 rpm em temperatura ambiente usando um shaker (Multi Mixer KASVI k40 – 10208).

As amostras foram então centrifugadas (Hsiangtai-DCD 2000) novamente a 10.000rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi coletado em um tubo Eppendorf de 1,5 mL, e sonicado por 2min a 40 kHzertz (Sonicador Ultracleaner 1400 A), e em seguida congelados com nitrogênio líquido. Como etapa final as amostras foram liofilizadas (Liofilizador k105 LIOTOP) por 72 horas. As amostras, agora denominadas extrato bruto, foram solubilizadas em DMSO para preparo de uma solução estoque com concentração final de 100 mg/mL (100mg de células secas por mL de DMSO absoluto).

Atividade do extrato do gênero *Nostoc* sp. sob formas promastigotas da cepa referência de *L. (L.) infantum* por citometria de fluxo

A atividade do extrato contra a cepa referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) foi avaliada utilizando a citometria de fluxo. O protocolo utilizado foi previamente descrito por Aliança et al., (2014) [18]. Em uma placa de 96 poços, os parasitos com meio de cultura foram adicionados em uma densidade de 2×10^6 promastigotas por poço, em uma série com concentrações decrescentes do extrato bruto de *Nostoc* sp. (GBBB01), com a adição da solução estoque para concentração final de 500 $\mu\text{g/mL}$ (0,5%), 250, 125, 62.50, 31.25, 15.60, 7.81 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 horas a 25°C.

Como controle negativo, foram utilizadas *Leishmanias* suspensas em meio de cultura marcadas com iodeto de propídeo (PI). Para controle positivo, parasitas foram marcados após serem inativados com metanol gelado, e um segundo controle positivo foi utilizado com a adição de 250mM de Anfotericina B. Poços contendo apenas parasitas não marcados foram

usados para calibração do citômetro de fluxo Guava® easyCyte™ HT System (modelo easyCyte™ 8 (Luminex, Índia).

Após o período de incubação do bioensaio, o conteúdo de cada poço foi transferido para microtubos 1,5mL e levados para a centrífuga (Eppendorf 5804 R) a 2000xg por 10 minutos a 4°C. Logo depois, foram ressuspensas em 80 uL de PBS 1X e foi adicionado aos poços 20uL de iodeto de propídeo (IP, 50ug/mL) – concentração final no poço de 10ug/mL) e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, adicionou-se aos poços 100 uL de PBS 1X e todas amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços compatíveis com o citômetro de fluxo.

Para análise das amostras no equipamento, foi feito um *gate* na região referente aos parasitas com captura de 10.000 eventos por poço. A taxa de morte foi analisada pela fluorescência vermelha emitida pelo IP complexado ao DNA das células mortas ao ser excitado pelo laser azul (488nm). Todos os testes foram realizados em triplicata e os experimentos repetidos no mínimo duas vezes.

Atividade do extrato do gênero *Nostoc* sp. (GBBB01) sob formas promastigotas da cepa referência de *L. (L.) infantum* por contagem direta

A atividade do extrato contra a cepa referência de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) foi avaliada utilizando a contagem direta. O protocolo utilizado foi previamente descrito por Fumarola et al (2004) [19]. Os parasitos foram plaqueados a uma densidade de 2×10^6 promastigotas/poço e incubados em uma série crescente do extrato bruto de *Nostoc* sp. (GBBB01) (500, 250, 125, 62.50, 31.25, 15.60, 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas a 25°C, utilizando como droga controle a anfotericina B.

Após o período de incubação, a viabilidade dos parasitos foi determinada através da contagem direta das formas promastigotas viáveis em câmara de Neubauer e visualização no microscópio óptico invertido Axiostar plus (Zeiss). Todos os testes foram realizados em triplicata e os experimentos repetidos no mínimo duas vezes.

Simultaneamente, também foram analisados alguns parâmetros morfológicos do parasito tratado em diferentes concentrações do extrato (500 a 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em comparação ao parasito sem tratamento. Após 24 horas de tratamento, foi realizado a diluição 1:10 de cada poço em câmara de Neubauer, com a definição de alguns parâmetros morfológicos, como motilidade, preservação das formas alongadas, formas arredondadas, formação de rosetas, aglomerados de parasitas mortos. A visualização foi feita no microscópio óptico invertido Axiostar plus (Zeiss)

e as imagens obtidas em câmera digital modelo AxioCam ERc 5s no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - LabGeM/UFMA.

Citotoxicidade do extrato bruto de *Nostoc sp.* (GBBB01) em macrófagos murinos

Foram obtidos macrófagos murinos de camundongos *Swiss* doados de animais excedentes do biotério (descarte de carcaças), seguindo as diretrizes do CONCEA (Diretrizes de Eutanásia e DBCA). Os macrófagos foram coletados por lavagem peritoneal e transferido para um tubo de centrifugação de 50mL refrigerado. Os macrófagos foram centrifugados a 4°C, 1500 rpm por 15 minutos e o *pellet* suavemente ressuspenso em 10mL de meio RPMI 1640 suplementado. As células foram plaqueadas a uma densidade de 4×10^5 de macrófagos/poço em placa de 96 poços contendo 100 μ L de volume final. Logo após, foram incubados a 37°C, a 5% CO₂. As células foram deixadas por 24 horas para adesão das células em placa.

Após o período de incubação, a placa foi tratada com diferentes concentrações de extrato de *Nostoc sp.* (GBBB01) (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 μ g/mL) e incubada por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos Eppendorf 1,5mL e levados para a centrífuga (Eppendorf 5804 R) a 2000xg por 10 minutos a 4°C. Logo depois, foram ressuspendidas em 80 μ L de PBS 1x e foi adicionado aos poços 20 μ L de iodeto de propídeo ([50 μ g/mL] – concentração final no poço de 10 μ g/mL) incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Foi utilizado o mesmo procedimento para o azul de tripan ([solução 0,4%] - concentração final no poço de 0,002%).

Utilizou-se como controle negativo, macrófagos em meio de cultura marcados com iodeto de propídeo (PI), para o controle positivo os macrófagos foram marcados após serem inativados com metanol gelado e também foi utilizado poços contendo apenas macrófagos não marcados para calibração do citômetro de fluxo Guava® easyCyte™ HT System (modelo easyCyte™ 8). Em seguida, adicionou-se aos poços 100 μ L de PBS 1X e todas as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços compatíveis com o citômetro de fluxo. Para análise das amostras no equipamento, foi feito um gate na região referente aos macrófagos com captura de 10.000 eventos por poço. A taxa de morte foi analisada pela fluorescência vermelha emitida pelo IP complexado ao DNA das células mortas ao ser excitado pelo laser azul (488nm). Os resultados foram avaliados com a redução do número de parasitas em comparação com os poços de controle.

Atividade do extrato bruto da *Nostoc sp.* (GBBB01) em amastigotas intracelulares de *L. infantum*

Para o experimento foram utilizados macrófago murinos obtidos conforme já descrito no tópico anterior. As células foram deixadas por 24 horas para aderir às lâminas antes da infecção com os parasitas.

Após esse período, foi realizada a infecção com as formas promastigotas de *L. infantum*, utilizando a cepa padrão (MHOM/BR/74/PP75) e isolados clínicos (MHOM/BR/2018/LCS-MA, MHOM/BR/2018/ASFF-MA, MHOM/BR/2019/AAS1-MA e MHOM/BR/2019/FCMS-MA). Sendo suspenso no mesmo meio 100uL de parasitas, e adicionados na densidade de 5×10^5 células por poço, na proporção de 10 amastigotas: 1 macrófago. Após mais 24 horas de incubação a 37°C em 5% de CO₂, antes iniciar o tratamento com o extrato bruto, o slide controle de 24 horas foi fixado com metanol puro e corada com Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para determinar a taxa de infecção, sendo de no mínimo 60% para espécie *L. infantum*.

Em seguida, as lâminas de cultura infectadas com *L. infantum* foram tratadas em diferentes concentrações do extrato de *Nostoc sp.* (GBBB01) (500, 166, 55.5, 18.5 µg/mL), sendo incubadas a 37°C em 5% de CO₂. Após 72hs de tratamento (Anfotericina B e extrato Bruto) de tratamento as lâminas foram fixadas em metanol 100% e coradas com solução de Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O percentual de inibição para encontrar o IC50 foi determinada por contagem direta, em microscópio óptico, do número de macrófagos infectados no total de 100 macrófagos, sendo realizados dois experimentos independentes em quadruplicata, verificando a presença ou não de macrófagos infectados e posteriormente analisados.

Para o teste de infecção, o tratamento foi realizado nas mesmas concentrações e condições descritas acima, a contagem foi da quantidade de amastigotas presentes em cada macrófagos infectados, e calcular-se a taxa de infecção com seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de infecção} = \% \text{ de macrófagos infectados} \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de amastigotas}}{\text{n}^\circ \text{ total de macrófagos}}$$

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 7.0, CA, EUA. O teste de variância *One-Way* ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para analisar diferenças entre os valores de IC₅₀ dos isolados. . Para as análises envolvendo citometria de fluxo foram analisados por MS excel™, FlowJo, LLC®.

Resultados

Atividade antileishmanial das formas promastigotas da cepa referência de *L. (L.) infantum* ao extrato de cianobactéria do gênero *Nostoc* sp. GBBB01

De acordo com as concentrações testadas para determinar o valor inibitório de 50% da viabilidade parasitária pelo método da citometria de fluxo, o extrato bruto não apresentou atividade antileishmanial considerando 24 horas de tratamento. Apesar de haver uma redução na viabilidade dos parasitas nas concentrações testadas, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 1A).

Entretanto, em análises realizadas pelo método da contagem direta do parasito nas mesmas condições anteriores, observou-se diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com redução no número de parasitos ao serem tratadas com o extrato bruto, em comparação ao controle sem tratamento, como está representado na Figura 1B.

Foram observadas alterações morfológicas das formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, após o tratamento com o extrato bruto do gênero *Nostoc* sp. Promastigotas sem tratamento apresentaram morfologia típica, com corpo alongado e a presença de inúmeras rosetas (Figura 2A).

Em comparação com as promastigotas tratadas com 250 e 500 µg/mL do extrato, apresentaram uma diminuição na quantidade de rosetas(aglomerados de *Leishmania*)(Figura 2B) e a presença de formas arredondadas do parasito (Figura 2C).

Ausência de Citotoxicidade do extrato bruto de cianobactérias do gênero *Nostoc* sp. GBBB01

O extrato bruto de cianobactérias do gênero *Nostoc* sp. não induziu efeito citotóxico sobre macrófagos peritoneais em ambos os métodos avaliados e nas concentrações testadas em comparação ao grupo sem tratamento como observado na Figura 3.

Atividade do extrato bruto de *Nostoc* sp. contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*

Em macrófagos infectados com amastigotas da cepa referência (MHOM/BR/74/PP75) tratados com a droga controle (Anfotericina B) foi obtido o valor de IC₅₀ (concentração que

inibe o crescimento de 50%) de 0.184 μ M. Em comparação ao tratamento com o extrato bruto do gênero *Nostoc* sp. GBBB01 o valor do IC₅₀ é superior a maior concentração testada (500 μ g/mL).

Em relação aos isolados clínicos, foi observada atividade antileishmanial, sendo possível calcular a IC₅₀ (488,2 μ g/mL), tendo, portanto, uma redução significativa no número de macrófagos infectados com o parasito. Entretanto, não foi possível determinar a IC₅₀ para os outros isolados clínicos avaliados, considerando baixa ou nenhuma redução no número de macrófagos infectados (Figura 4).

Os dados referentes a taxa de infecção demonstraram resultados semelhantes, não havendo redução no percentual de infecção ao comparar-se macrófagos infectados com a cepa referência de *L. (L.) infantum* e tratados com o extrato bruto de *Nostoc* sp., em diferentes concentrações, ao grupo controle sem tratamento. Contudo, observou-se diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao isolado MHOM/BR/2018/ASFF-MA, mostrando uma diminuição relevante na taxa de infecção, especialmente na maior concentração testada (Figura 5).

Discussão

O estado do Maranhão destaca-se como endêmico para LV, uma vez que está presente em todas as mesorregiões do estado, com elevado número de municípios que evidencia a intensa transmissão da doença[20]. Esta enfermidade torna-se um grande problema de saúde pública, pois apresenta altas taxas de letalidade[21].

O antimoniato de meglumina (Glucantime®) é droga de primeira linha e a anfotericina B a droga de segunda linha para tratamento da LV no Brasil[22]. Mas, devido a variação da resposta dos pacientes torna-se necessário a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença[23]. Devido a escassez de dados referentes a compostos bioativos de cianobactérias do gênero *Nostoc* sp. da região maranhense, o presente trabalho foi desenvolvido, sendo realizado um estudo inicial com a cepa referência de *L. (L.) infantum* e 4 isolados clínicos.

O extrato bruto da cianobactéria do gênero *Nostoc* sp. GBBB01 foi avaliado segundo sua caracterização química em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa. Costa (2020) [24], avaliou o perfil químico e potencial antioxidante, sendo encontrado em maiores concentrações a clorofila e carotenoides em sua composição. Os carotenoides realizam um papel importante na proteção e inibição de doenças graves como câncer, degeneração macular, esclerose múltipla, doenças degenerativas e doenças cardiovasculares [25,26]. Além da presença da

clorofila já ser esperada, esses compostos fitoquímicos possuem efeito antimutagênico, propriedades antígeno-tóxicas e capacidade antioxidante [27]. Neste mesmo trabalho, o potencial antioxidante de *Nostoc* sp. GBBB01 foi também avaliado. Destacou-se por atingir potencial antioxidante elevado. Estes antioxidantes são sequestradores de radicais que interagem com os carotenoides, podendo ter diferentes atividades dependendo do tipo de carotenoides presente nas análises [28,29].

O extrato do gênero *Nostoc* sp. GBBB01 não demonstrou efeito citotóxico em nenhuma das concentrações e condições testadas. Para o teste de citotoxicidade, a utilização de azul de tripam e corantes fluorescentes, incluindo o iodeto de propídeo, foi concordante e complementar, pois ambos são excluídos de células viáveis com membrana celular funcional, mas o primeiro não fornece informações sobre o tipo de morte celular, enquanto o segundo penetra em membranas danificadas por apoptose [30].

Outras espécies de cianobactérias apresentaram resultados semelhantes, como o estudo de Pagels et al., (2020) [31] utilizou o extrato de *Cyanobium* sp. com concentrações até de 750 µg/mL e não houve atividade citotóxica, podendo ser usado como fonte de compostos bioativos, pois obteve um extrato não citotóxico, com ação antioxidante e anti-inflamatória. Contudo o trabalho de Herrera et al., (2018) [32], ao analisar três diferentes cianobactérias isoladas na Colômbia, avaliou o efeito em células do fígado e não observou efeito citotóxico no período de 24 horas, porém tal efeito foi observado no período de 48 horas, podendo ser explicado pelo longo tempo em exposição ao composto.

No presente estudo, observou-se a ausência de atividade antileishmanial nas formas promastigotas da cepa referência de *L. (L.) infantum* nas diferentes concentrações testadas do extrato bruto da cianobactéria do gênero *Nostoc* GBBB01 pelo método de citometria de fluxo. Contudo, em comparação ao método da contagem direta do parasito nas mesmas condições, observou-se diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) nas concentrações de 500 µg/mL a 62.50 µg/mL em comparação ao controle. Observou-se dados semelhantes ao estudo de Jensen et al., (2017)[33] que obteve uma redução no crescimento de promastigotas pelo método da contagem direta de *L. amazonensis* nas concentrações de 500 µg/mL e 250 µg/mL e na concentração de 500 µg/mL para a espécie de *L. guyanensis* do extrato de *Tanacetum vulgare*.

O não conhecimento do mecanismo de ação do extrato bruto, bem como o desconhecimento do composto de interesse, que levaria a atividade antileishmanial, dificulta a escolha de metodologias de análises dos bioensaios, o que poderia explicar a discordância observada na citometria de fluxo com IP (que detecta apenas morte celular por apoptose) e contagem direta das formas promastigotas. De maneira semelhante, Scariot et al., 2019 [34]

observou que um composto, provavelmente um diterpeno pouco solúvel, isolado de *Cupressus lusitanica* mostrava uma promissora atividade contra *L. infantum*, para melhorar a entrega do composto foi utilizado um veículo de fungo, e para ampliar o espectro; o emprego de diferentes metodologias de detecção da atividade permitiu evidenciar que o composto sozinho induzia morte celular do parasita por autofagia, enquanto que ligado ao veículo induzia necrose em baixas concentrações.

Do mesmo modo, outro composto utilizado para teste antileishmania, também de natureza terpenoide, induziu necrose de células de *L. mexicana*, onde foi evidenciada por microscopia de luz e de transmissão mudanças morfológicas drásticas (Chacón-Vargas et al., 2018) [35]. Os mecanismos de morte de Leishmania, assim como de outros parasitos, ainda não é um mecanismo totalmente elucidado (Proto et al., 2012) [36]. E no caso de nosso trabalho o tipo de morte celular seria um limitante na detecção da atividade antileishmania do extrato por citometria.

O gênero *Nostoc* é conhecido como produtor de dezenas de metabólitos secundários, de diversas classes químicas como fenólicos, ficocianina, aminoácidos triterpenóides, ácidos graxos poliinsaturados, sulfatos, polissacarídeos, carotenoides etc. (Rimsha et al., 2014) [37]. A linhagem GBBB01 teve seu genoma sequenciado recentemente, e a análise realizada pela ferramenta antiSMASH 5.0, resultou na identificação de 24 grupos de genes biossintéticos para, destes, quatro eram possivelmente agrupamentos de terpeno (ROCHA, 2021) [38].

As observações ao microscópio óptico mostraram que o tratamento com o extrato do gênero *Nostoc* sp. nas concentrações de 500 e 250µg/mL apresentou uma diminuição na quantidade de rosetas (aglomerados de *Leishmania*) e a presença de formas arredondadas do parasito de *L. (L.) infantum* nas maiores concentrações testadas do extrato bruto. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Silva et al., (2015) [39] com alterações morfológicas significativas na concentração de 50µg/mL e 100µg/mL do extrato de *Physalis angulata* contra *L. (L.) amazonensis*, apresentando formas arredondadas e redução do corpo celular em comparação ao controle sem tratamento. Este mesmo autor ao comparar as alterações observadas na microscopia óptica com a microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, pode confirmar mais detalhes das estruturas internas e membrana do parasito sobre; a aparência arredondada, flagelo encurtado, alterações da membrana flagelar, cinetoplasto, material genético e divisão celular. Análises por microscopia eletrônica, de transmissão ou varredura, poderiam aqui neste estudo também revelar significantes achados.

Dentre os diferentes métodos em busca de novas moléculas com potencial antileishmanial, a contagem de formas intracelulares (amastigotas) se torna eficaz, por utilizar

o estágio clinicamente relevante do parasito, responsável pela infecção de células do hospedeiro vertebrado (mamífero) [40].

Nos experimentos *in vitro* com as formas amastigotas da cepa referência de *L. (L.) infantum*, não foi possível obter a concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitos testados para o extrato do gênero *Nostoc* sp. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Allmendinger et al., (2010) [41] analisando a potencial antiprotozoaria e citotoxicidade do extrato de *Porphyra leucosticta* em uma cepa referência de *L. donovani*. Utilizando a maior concentração, o autor destacou a ausência atividade antileishmanial e também não houve ação citotóxica.

Em relação aos isolados clínicos da espécie *L. (L.) infantum* nas formas amastigotas tratadas com o extrato de cianobactéria do gênero *Nostoc* sp., apenas o isolado clínico MHOM/BR/2018/ASFF-MA apresentou um percentual de inibição na maior concentração testada (500µg/mL), com a determinação da IC50. Vale ressaltar que esse isolado clínico também é o mais sensível quando tratado com o fármaco controle, demonstrando que o extrato bruto tem uma maior atividade antileishmanial sob o mesmo, provavelmente pelo fato desse apresentar uma sensibilidade natural aos compostos leishmanias.

Ao comparar a taxa de infecção do isolado clínico MHOM/BR/2018/ASFF-MA em macrófagos também houve redução no percentual de infecção na maior concentração testada (500µg/mL). Estudo semelhante de Mahmoudvand et al., (2015) [42] utilizando a cepa de *L. infantum* e *L. tropica* tratadas com o extrato de *Nigella sativa* mostraram inibição expressiva na taxa de infecção, assim também como o estudo de Mahmoudvand et al., (2014)[43] com o extrato de *Berberis vulgaris* utilizando também as cepas de *L. infantum* e *L. tropica*, apresentando inibição significativamente ($p < 0,05$) sua invasão as células de macrófagos nas concentrações testadas.

Sendo assim, o extrato bruto de cianobactéria de *Nostoc* sp. conseguiu possuir atividade antileishmanial neste isolado clínico, mas possivelmente seja necessário um aumento nas concentrações testadas para que esse efeito seja observado em cepas mais tolerantes.

O estudo apresenta limitações baseados na necessidade de uma comparação destes resultados nas formas promastigotas no período de tratamento de 24 horas com os períodos de 48 e 72 horas para uma exposição a longo prazo do extrato bruto de cianobactérias do gênero *Nostoc* sp. Além disso, destacamos a necessidade de análises futuras com outras metodologias que possam detectar o tipo de morte celular.

Conclusão

O extrato bruto de cianobactérias do gênero *Nostoc* sp. GBBB01 apresentou atividade antileishmanial, sendo necessário o esclarecimento do tipo de morte celular induzido pelo mesmo, possibilitando assim a melhor escolha do tipo de ensaio para avaliar sua bioatividade, bem com a caracterização de que composto(s) seriam os responsáveis por tal atividade observada no extrato bruto.

Esse extrato não possui atividade citotóxica, o que reforça a utilização do mesmo em ensaios que busquem avaliar outras atividades biológicas. Este é o primeiro relato de ausência de citotoxicidade e atividade antileishmanial de um extrato bruto de cianobactéria proveniente do Cerrado Maranhense.

Fomento

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA.

Referências

- [1] FERREIRA-PAES T, CHARRET KDS, RIBEIRO MRDS, RODRIGUES RF, LEON LL. Comparative analysis of biological aspects of *Leishmania infantum* strains. PLoS One. Dec 3;15(12). 2020.
- [2] BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- [3] KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. Dermatologic Clinics. 33; 579-593. 2015.
- [4] BRASIL, Ministério da Saúde (<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>). Acesso 28 Fev de 2020.
- [5] MAIA C, NUNES M, MARQUES M, HENRIQUES S, ROLÃO N, CAMPINO L. In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. Experimental Parasitology 135. 36–41. 2013.
- [6] RATH S, TRIVELIN L A, IMBRUNITO T R, TOMAZELA D M, JESÚS M N, MARZAL P C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química Nova.; 26; 550-555. 2003.
- [7] KARIYAWASAM, R., CHALLA, P., LAU, R. et al. Susceptibility testing of *Leishmania* spp. against amphotericin B and fluconazole using the Sensititre™ YeastOne™ YO9 platform. BMC Infect Dis 19, 593. 2019.

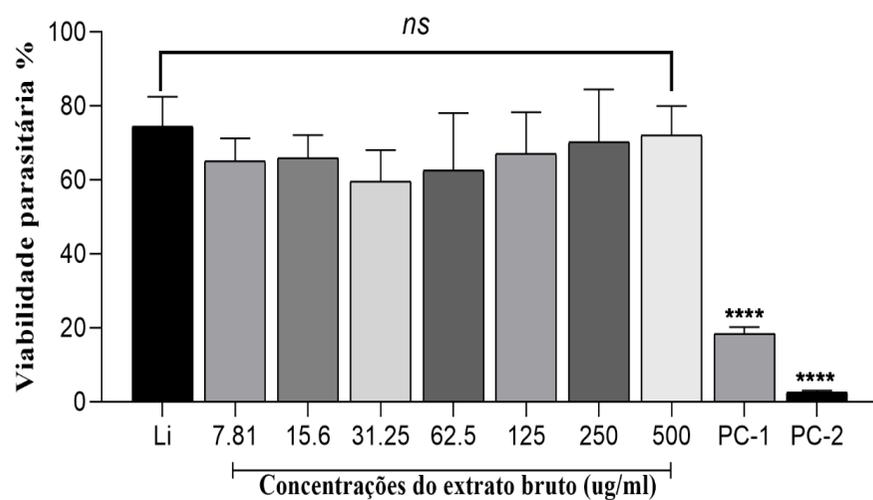
- [8] DEMAY J, BERNARD C, REINHARDT A, MARIE B. Natural Products from Cyanobacteria: Focus on Beneficial Activities. *Mar Drugs*. May 30;17(6):320. 2019.
- [9] SHAH, S.A.A.; AKHTER, N.; AUCKLOO, B.N.; KHAN, I.; LU, Y.; WANG, K.; WU, B.; GUO, Y.-W. Structural Diversity, Biological Properties and Applications of Natural Products from Cyanobacteria. A Review. *Mar. Drugs*, 15, 354. 2017.
- [10] COSTA M; COSTA – RODRIGUES, J; FERNANDES, M H; BARROS, P; VASCONCELOS, V; MARTINS, R. Marine cyanobacteria isolated from the portuguese coast: high potencial as a source of anticâncer compound. *Marine Drugs*. 12. 98 – 114. 2014.
- [11] SHISHIDO, TK, POPIN, RV, JOKELA, J., WAHLSTEN, M., FIORE, MF, FEWER, DP, HERFINDAL, L., & SIVONEN, K. Desrepliação de produtos naturais com atividade antimicrobiana e anticâncer de cianobactérias brasileiras. *Toxinas*, 2019.
- [12] DEMAY J, HALARY S, KNITTEL-OBRECHT A, VILLA P, DUVAL C, HAMLAOUI S, ROUSSEL T, YÉPRÉMIAN C, REINHARDT A, BERNARD C, MARIE B. Propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e cicatrizantes de cianobactérias das térmicas Mud of Balaruc-Les-Bains, França: A Multi-Approach Study. *Biomoléculas*. 2021.
- [13] SANCHEZ L M, LOPEZ D, VESELY B A, DELLA TOGNA G, GERWICK W H, KYLE D E, LININGTON R.G. Almiramides A-C: discovery and development of a new class of leishmaniasis lead compounds. *Journal Medicinal Chemistry*. 53; 4187-4197; 2010.
- [14] KUMAR M., TRIPATHI .M K., SRIVASTAVA A., GOUR J. K., SINGH R. K., TILAK R., ASTHANA R. K. Cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii* and *Aphanothece bullosa* as antifungal and antileishmanial drug resources. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013; 3: 458-463.
- [15] FERREIRA, L. S. D. S., BUTARELLI, A. C. D. A., SOUSA, R. D. C., OLIVEIRA, M. A. D., MORAES, P. H. G., RIBEIRO, I. S., SOUSA, P. F. R., DALL'AGNOL, H. M. B., LIMA, A. R. J., GONCALVES, E. C., SIVONEN, K., FEWER, D., RIYUZO, R., PIROUPO, C. M., DA SILVA, A. M., SETUBAL, J. C., & DALL'AGNOL, L. T. High-Quality Draft Genome Sequence of *Pantanalinema* sp. GBBB05, a Cyanobacterium From Cerrado Biome. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2021.
- [16] SINGH, R., TIWARI, S., RAI, A. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *J Antibiot* 64, 401–412. 2011.
- [17] SHISHIDO T K, HUMISTO A, JOKELA J, LIU L, WAHLSTEN M, TAMRAKAR A, FEWER D.P, PERMI P, ANDREOTE A.P.D, FIORE M. F, SIVONEN K. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. *Mar Drugs*. 13; 2124-2140. 2015.
- [18] ALIANÇA, A S S; ANJOS, K F L; REIS, T N V; HIGINO T M M; BRELAZ – DE - -CASTRO M C A; BIANCO E M; FIGUEIREDO R C B Q; The in Vitro Biological Activity of the brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*. 2014.
- [19] FUMAROLA L, SPINELLI R, BRANDONISIO O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res Microbiol*. May;155(4):224-30. 2004.

- [20] BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- [21] BRASIL. Manual de recomendações para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- [22] BRASIL, Ministério da Saúde (<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>). Acesso 28 Fev de 2020.
- [23] TORRES, D. C. et al. Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Acta tropica*, v. 126, n. 2, p. 132–141, 2013.
- [24] COSTA M C. Caracterização química e atividade antioxidante de extrato bruto de microrganismos fotossintetizantes do “Parque Nacional da Chapada das Mesas”, Cerrado Brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação. São Luís – MA. 2020.
- [25] ZHANG, J., SUN, Z., SUN, P., CHENA, T., E CHEN, F. Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health. *Food and Function*. 3: 413–425.2014.
- [26] MEZZOMO N, FERREIRA S R.S. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: A review. *Journal of Chemistry*, 2016: 1-16, 2016.
- [27] AMRANI-ALLALOU, H., BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L., MAPELLI-BRAHM, P., SAIT. A., TENORES, G, C., BENMEZIANE, A., KADRI, N., MADANI, K., MARTÍNEZ, A. J. M. Antioxidant activity, carotenoids, chlorophylls and mineral composition from leaves of *Pallenis spinosa*: an Algerian medicinal plant. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2019.
- [28] JEREZ-MARTEL, I. GARCÍA-POZA, S., RODRÍGUEZ-MARTEL, G., RICO, M., AFONSO-OLIVARES, C., GÓMEZ-PINCHETTI, J. L. Phenolic profile and antioxidant activity of crude extracts from microalgae and cyanobacteria strains. *Journal of Food Quality*. 2017.
- [29] YOUNG, A. J. E LOWE, G. L. YUCHAROEN, R., SRISUKSOMWONG, P., TRAGOOLPUA, Y. CAROTENOIDS—ANTIOXIDANT PROPERTIES. *ANTIOXIDANTS*. Science and Technology Communications Science and Technology Communications. 2:182–183. 2015.
- [30] STROBER W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. May;Appendix 3:Appendix 3B. 2001.
- [31] PAGELS F; SALVATERRA D; AMARO H M; LOPES G; SOUSA-PINTO I; VASCONCELOS V; GUEDES A C. Bioactive potential of *Cyanobium* sp. pigment-rich extracts. *Journal of Applied Phycology*. 2020.
- [32] HERRERA N; HERRERA C; ORTÍZ I; LUZ S O; ROBLEDO S; AGUDELO D; ECHEVERRI F. Genotoxicity and cytotoxicity of three microcystin-LR containing cyanobacterial samples from Antioquia, Colômbia. *Toxicon*. v 154. Pg 50-59. 2018.

- [33] JENSEN, B B; BARROS A M C; SOARES F V; GRAFOVAC I; GRAFOV A; FRANCO A M R. Avaliação da atividade antileishmania in vitro de *Tanacetum vulgare* (Asteraceae). Acta Brasiliensis, v. 1, n. 2, pág. 33-37, 2017.
- [34] SCARIOT D B, VOLPATO H, FERNANDES N S, SOARES E F P, UEDA-NAKAMURA T, DIAS-FILHO B P, DIN ZU, RODRIGUES-FILHO E, RUBIRA A F, BORGES O, SOUSA M D C, NAKAMURA C V. Activity and Cell-Death Pathway in *Leishmania infantum* Induced by Sugiol: Vectorization Using Yeast Cell Wall Particles Obtained From *Saccharomyces cerevisiae*. Front Cell Infect Microbiol. Jun 14;9:208. 2019.
- [35] CHACÓN-VARGAS K F, ANDRADE-OCHOA S, NOGUEDA-TORRES B, JUÁREZ-RAMÍREZ D C, LARA-RAMÍREZ E E, MONDRAGÓN-FLORES R, MONGE A, RIVERA G, SÁNCHEZ-TORRES L E. Isopropyl quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives induce regulated necrosis-like cell death on *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Parasitol Res. Jan;117(1):45-58. 2018.
- [36] PROTO, W., COOMBS, G. & MOTTRAM, J. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental?. Nat Rev Microbiol 11, 58–66. 2013.
- [37] RIMSHA R, RICHA J, SHEELA K, SHRIVASTAVA P N AND MANJU J: Bioactive substances of cyanobacteria (*Nostoc muscorum*): a review. International Journal of Pharma Sciences and Research
- [38] ROCHA I K B S. Caracterização genômica e prospecção *in silico* de metabólitos secundários da cianobactéria *Nostoc gbbb01* do parque nacional da Chapada das Mesas-MA Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. São Luís – MA. 2021.
- [39] DA SILVA R R, DA SILVA B J, RODRIGUES A P, FARIAS L H, DA SILVA M N, ALVES D T, BASTOS G N, DO NASCIMENTO J L, SILVA E O. In vitro biological action of aqueous extract from roots of *Physalis angulata* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. BMC Complement Altern Med. 2015.
- [41] ALLMENDINGER A, SPAVIERI J, KAISER M, CASEY R, HINGLEY-WILSON S, LALVANI A, GUIRY M, BLUNDEN G, TASDEMIR D. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of twenty-three British and Irish red algae. Phytother Res. 2010.
- [42] MAHMOUDVAND H, TAVAKOLI R, SHARIFIFAR F, MINAIE K, EZATPOUR B, JAHANBAKHS S & SHARIFI I. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone, Pharmaceutical Biology, 53:7, 1052-1057, 2015.
- [43] MAHMOUDVAND H, SHARIFIFAR F, SHARIFI I, EZATPOUR B, FASIHI HARANDI M, MAKKI MS, ZIA-ALI N, JAHANBAKHS S. In Vitro Inhibitory Effect of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and Its Main Component, Berberine against Different *Leishmania* Species. Iran J Parasitol. Mar;9(1):28-36. 2014.

Figuras do artigo

A



B

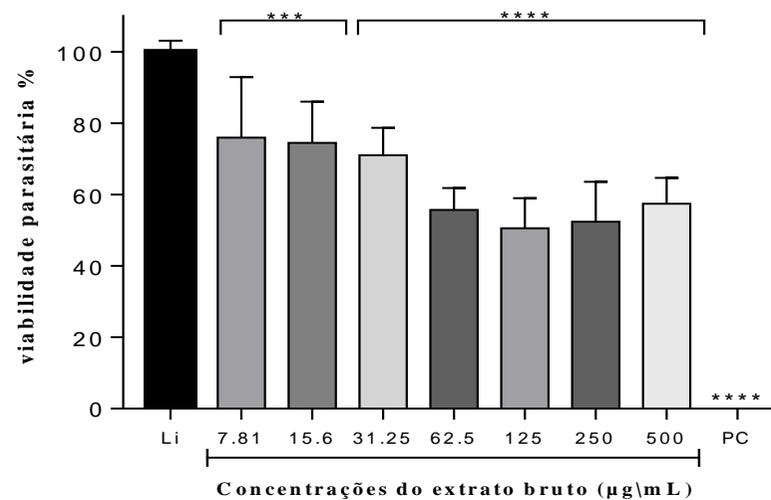


Figura 1: (A) Viabilidade celular de promastigotas da cepa de referência MHOM/BR/74/PP75 de *Leishmania (L) infantum* tratados com extrato bruto da cianobactéria *Nostoc sp* (A) Pelo método de citometria de fluxo; (B) Pelo método da contagem direta. PC-1 (controle positivo-1): parasitos tratados com Anfotericina B (2.5 μ M “top concentration”). PC-2 (controle positivo-2): parasitos tratados com Metanol 60%. IC50 (concentração inibitória de 50%). **** $p < 0.001$; ns: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

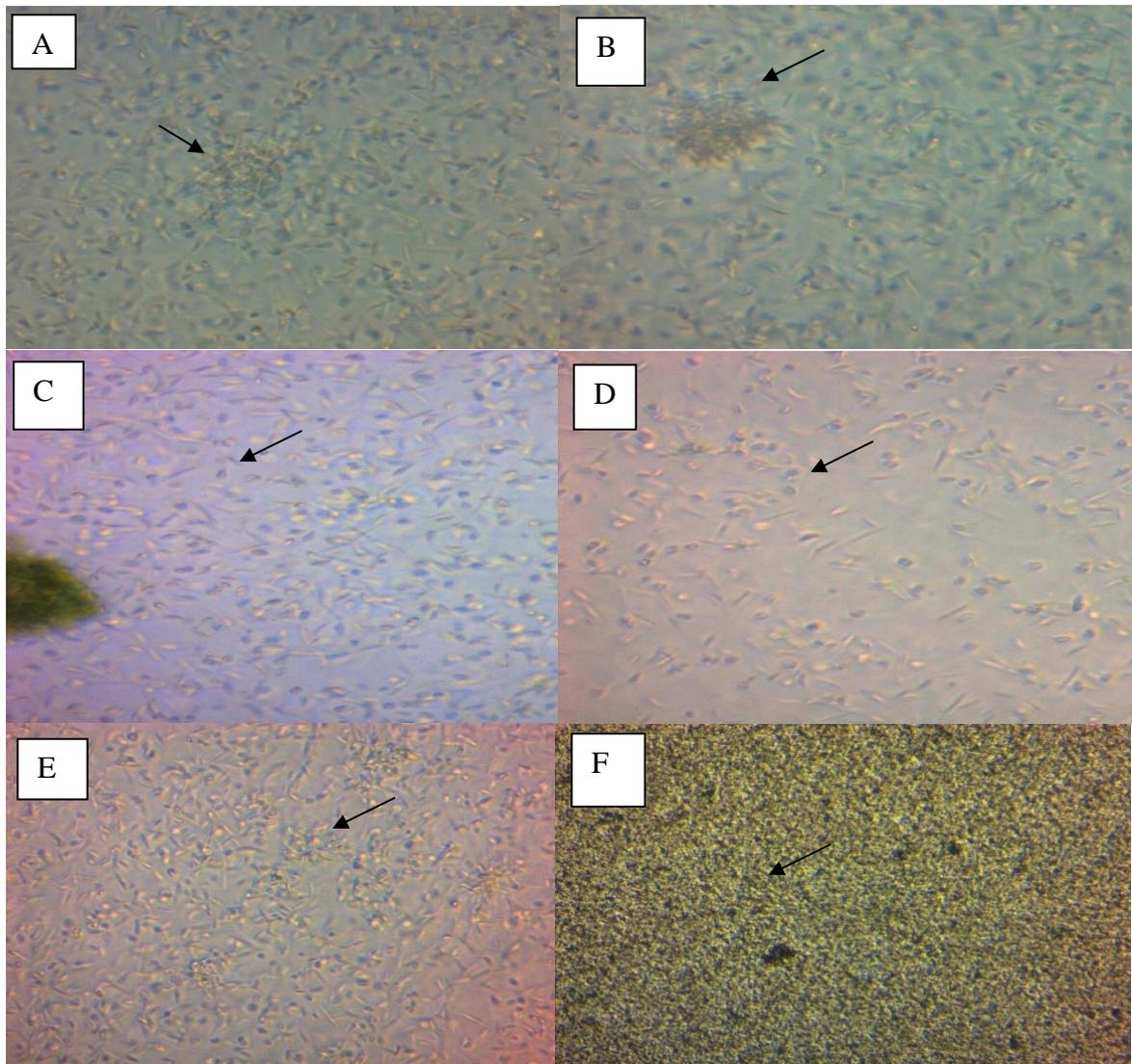


Figura 2: Alterações morfológicas das formas promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com o extrato bruto de cianobactéria do gênero *Nostoc* sp. por 24 horas. Aumento 40x. Em “A” e “B” o controle negativo apresentando morfologia típica com o corpo alongado e um aglomerado de parasitas com formação de rosetas. Em “C” promastigotas tratadas com 500 µg/mL com ausência de rosetas (aglomerados de parasitas). Em “D” promastigotas tratadas com 250µg/mL com aumento das formas arredondadas. Em “E” parasitas tratadas com 7.81µg/mL com corpo alongado e aglomerado de parasitas. Em “F” promastigotas na concentração de 2500nM da droga controle (Anfotericina B).

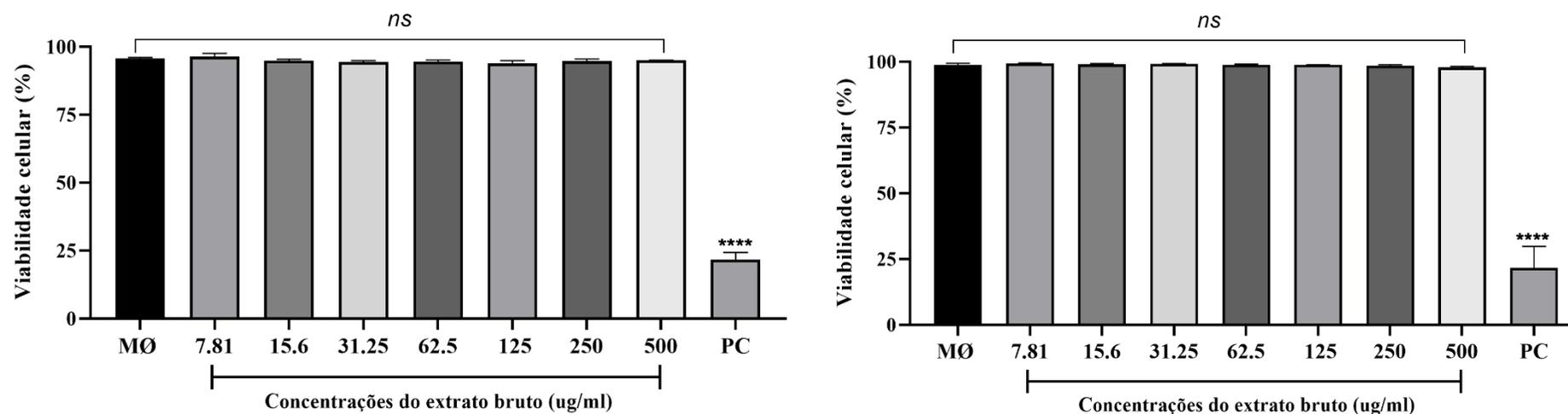


Figura 3: Viabilidade celular de macrófagos murinos peritoneais tratados com extrato bruto da cianobactéria *Nostoc sp.* Em “A” análise por Iodeto de Propídeo e em “B” por Azul de Tripán. PC (controle positivo): células tratadas com Metanol 60%. MØ: macrófagos sem tratamento. **** $p < 0.001$; ns: não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

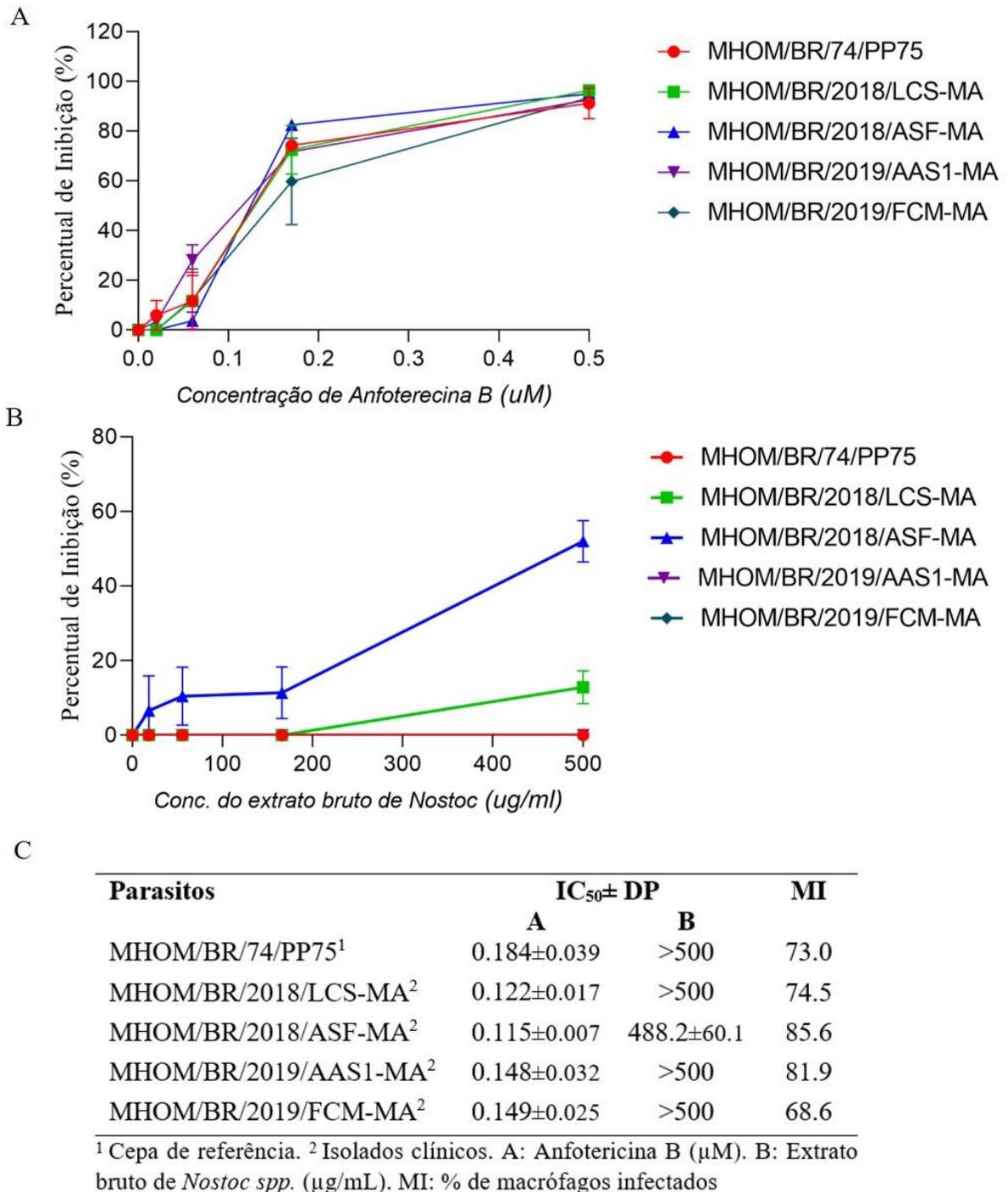


Figura 4: Estimativa da IC₅₀ do tratamento com Anfotericina e extrato bruto de *Nostoc* sp. baseado na contagem do número de macrófagos infectados por isolados clínicos de *L. (L.) infantum*

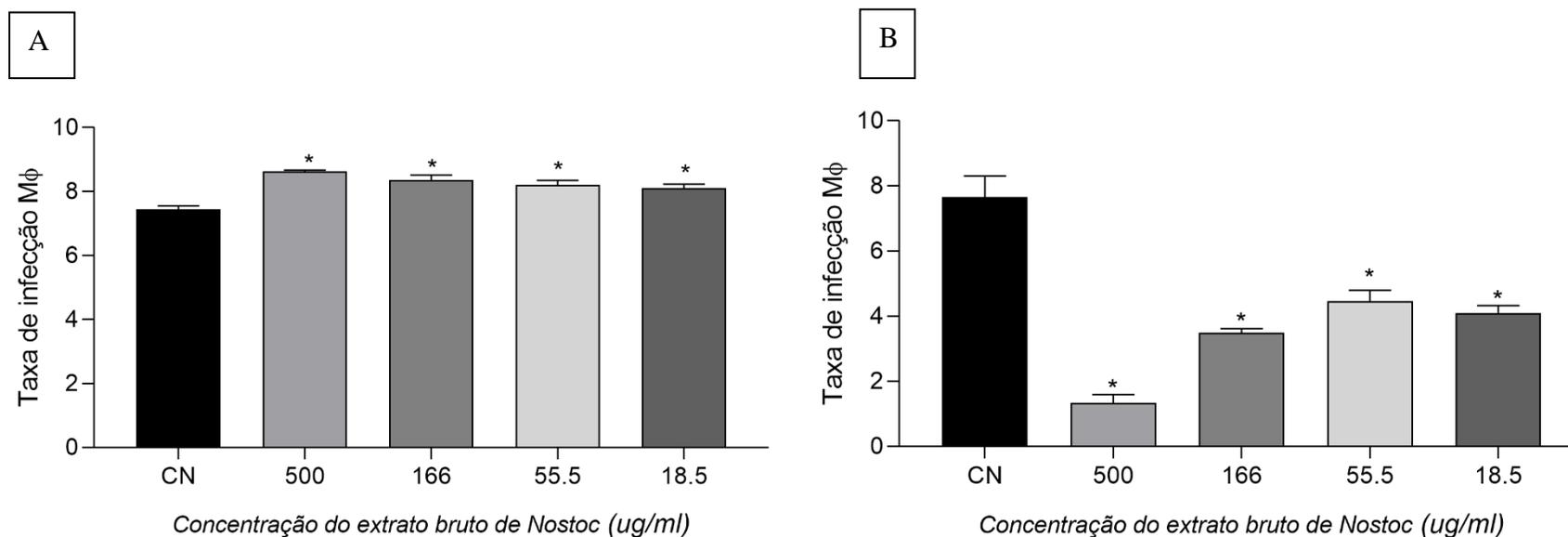


Figura 5: Taxa de infecção de macrófagos em formas amastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com extrato bruto da cianobactéria *Nostoc sp.* Em “A” cepa referência MHOM/BR/74/PP75 de *Leishmania (L.) infantum* e em “B” isolado clínico MHOM/BR/LV/ASFF-MA. CN (controle negativo): células infectadas sem tratamento MØ: macrófagos. * p<0.005

Anexo – artigo submetido

(American Journal of Tropical Medicine and Hygiene -Qualis B1em Medicina 1 e FI (2.345))

Nota: Esse artigo apresenta os dados dos testes de susceptibilidade *in vitro* ao Antimônio Pentavalente e Anfotericina B em em amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum*, bem como a identificação da espécie do parasito realizados diretamente pela autora dessa dissertação. Esses resultados foram somados a dados complementares (ensaios em promastigotas e expressão gênica) produzidos por alunos de iniciação científica do grupo, com a finalidade de garantir uma robustez nas análises e possibilitar a submissão em uma revista científica de bom impacto na área de estudo.

1 ***Leishmania (Leishmania) infantum* isolates from the state of Maranhão, northeastern**
2 **Brazil: phenotypic and molecular evidence on drug susceptibility**

3

4 Gustavo Henrique Corrêa Soares¹, Robson Pontes de Oliveira¹, Karina Cristina Silva Torres^{1,2},
5 Juliana Mendes Sousa¹, Vanessa Ribeiro Moreira¹, Uiara Regina Silva de Lima², Katrien Van
6 Bocxlaer³, Camila Freitas de Andrade Rodrigues², Conceição de Maria Pedrozo e Silva de
7 Azevedo^{2,4}, Hivana Patricia Melo Barbosa Dall' Agnol^{1,2,5}, Mayara Ingrid Sousa Lima^{1,2,6*}.

8

9 ¹Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of
10 Maranhão, São Luís, Brazil; ²Postgraduate Program on Health Sciences, Federal University of
11 Maranhão, São Luís, Brazil; ³Department of Biology, York Biomedical Research Institute,
12 University of York, York, UK; ⁴Department of Medicine, Federal University of Maranhão, São
13 Luís, Brazil;⁵ Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil
14 ⁶Postgraduate Program on Health and Environment, Federal University of Maranhão, São Luís,
15 Brazil.

16

17 **Keywords:** visceral leishmaniasis, chemotherapy, antimony, amphotericin B, clinical isolates

18 **Number of figures:** 2

19 **Number of tables:** 3

20 **Word counts for the abstract:** 187

21 **Word counts for the text:** 3,421

22

23 ***Corresponding Author:** Mayara Ingrid Sousa Lima. email: mayara.ingrid@ufma.br
24 Department of Biology. Federal University of Maranhão. Avenida dos Portugueses, 1966, Vila
25 Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil, Zipcode: 65080-805.

26

27

28

29

30

31

32
33
34

35 **Abstract**

36 *Leishmania (Leishmania) infantum* is the etiological agent of visceral leishmaniasis (VL), a
37 fatal clinical form if left untreated. In Brazil, available treatments for VL are limited to
38 meglumine antimoniate (MA) and amphotericin B (AmB). These drugs have several
39 limitations, such as variable clinical response rates that can be attributed to differences in
40 parasite susceptibility to these drugs. Here, we assessed the *in vitro* susceptibility for MA and
41 AmB of five *L. (L.) infantum* isolates recovered from VL patients in Maranhão, a region in the
42 Northeast of Brazil. The half-effective concentration (EC₅₀) of antimony against promastigotes
43 and intracellular amastigotes ranged from 66.7 to 155.2 µM and 16.1 to 39.3 µM, respectively.
44 The EC₅₀ of AmB varied from 118.9 to 243.5 nM against promastigotes and from 90 to 180
45 nM against amastigotes. Furthermore, we investigated the gene expression profiling of
46 molecular markers relating to drug resistance. The data revealed different gene expression
47 patterns for the *mapk1*, *mdr1*, *calc*, *mrpa* and *apq1* targets. Our results show a variable
48 susceptibility to the drugs analyzed and suggest five gene targets as potential molecular
49 markers to detect antimony resistant *L. (L.) infantum* isolates.

50

51 **Introduction**

52 Leishmaniasis is a complex of diseases caused by the protozoan parasites of the genus
53 *Leishmania* and transmitted to the vertebrate host by the bite of the phlebotomine sandfly [1].
54 In the New World, *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *L. (L.) chagasi*) is the causative
55 agent of visceral leishmaniasis (VL), a fatal clinical form in untreated patients [2]. VL affects
56 mainly people living in economically vulnerable areas and remains a serious health problem in
57 tropical and subtropical regions. It is estimated that there are 300,000 cases of VL occurring

58 each year worldwide. In Latin America, 97% of the VL cases are from Brazil [3]. Despite
59 continuous efforts to control the disease, the Northeast region is particularly affected by VL
60 representing approximately 52.3% of cases in the country. The highest incidence, 1,757 cases
61 reported over the last three years, is found in the state of Maranhão reiterating the severity of
62 this public health problem [4]. In addition, another concern in this state is the increased
63 incidence of VL/HIV coinfection [5].

64 Chemotherapy represents the main tool for controlling the disease. In Brazil, the drugs
65 approved against VL are unsatisfactory and limited to the use of meglumine antimoniate (MA)
66 and amphotericin B (AmB) [6]. MA is a pentavalent antimonial and is still used as first-line
67 treatment for VL. Whereas, AmB is more reserved for the treatment of VL/HIV coinfection
68 cases [7]. In general, both drugs are expensive, cause adverse effects and show variations in
69 the clinical response rate [6, 8]. Even though randomized controlled trials are lacking making
70 it difficult to interpret and compare treatments, some studies have shown a therapeutic failure
71 rate of over 30% in patients with tegumentary leishmaniasis from different regions of Brazil
72 when treated with MA [9-11]. Similar information about the response rates in Brazilian patients
73 with VL is currently lacking for AmB. However, some cases of VL patients unresponsive to
74 this drug have been reported in Africa and Asia [12, 13].

75 Variations in the clinical response can be explained by differences in the susceptibility
76 of *Leishmania* strains to these drugs [6, 14]. In Brazil, a few studies have investigated the
77 potency of the antileishmanial drugs MA and AmB against *Leishmania* isolates from patients
78 *in vitro*. The first study compared the susceptibility of *L. braziliensis* isolates from successfully
79 treated and relapsed patients to MA [15]. In a second study, the *in vitro* activity of AmB was
80 evaluated using promastigotes, whereas the potency of MA was evaluated against intracellular
81 amastigotes of *L. braziliensis* and *L. amazonensis* isolates [16]. In both studies, the data
82 showed a variable susceptibility across the isolates [15, 16].

83 The molecular mechanisms associated with drug resistant phenotypes in *Leishmania*
84 are partially understood and several genes were shown to be involved [17, 18]. For example,
85 in antimony-resistant *Leishmania* field isolates the expression of genes related to cell death
86 pathways, such as mitogen-activated protein kinase-1 (*mapk1*) and calcineurin (*calc*) were
87 found altered [19,20]. Other parasite strategies associated with drug resistance involved drug
88 transport modulation either through decreasing the drug uptake or increasing the drug efflux.
89 [21-23]. For example, the multidrug resistance protein-1 (*mdr1*) is a protein involved in the
90 efflux of several antileishmanial drugs and upregulation of the *mdr1* gene expression
91 correlated with antimony resistance [21]. In contrast, the aquaglyceroporin-1 (*aqp1*) protein
92 was found reduced in the uptake of antimony in *Leishmania*. The gene encoding this protein is
93 one of the best molecular markers associated with resistance to antimony [23]. Another
94 mechanism of resistance observed in laboratory induced antimony-resistant *Leishmania*
95 parasites is the inactivation of antimonial drugs through intracellular sequestration by
96 multidrug-resistance protein A (*mrpa*). MRPA is the most studied ATP-binding cassette
97 (ABC) protein in *Leishmania* and its increase contributes significantly to the resistance profile
98 [18, 24]. Nevertheless, the role of all these genes in drug resistance is not entirely clear in *L.*
99 *infantum* isolates.

100 To investigate if treatment failure in Maranhão, an area of high endemicity for VL, is
101 related to inherent drug susceptibility differences or drug resistance, we characterized for the
102 first time the phenotypic susceptibility of five *L. (L.) infantum* strains to the antileishmanial
103 drugs MA and AmB against the clinically relevant intracellular amastigote form. Molecular
104 markers previously related to MA and AmB drug resistance are equally evaluated to confirm
105 phenotypic screen output.

106

107 **Materials and methods**

108 Ethics statement

109 The Research Ethics Committee of the University Hospital of the Federal University of
110 Maranhão (approval ID 2.793.599) and the Research Ethics Committee of the Federal
111 University of Maranhão (approval ID 3.921.086) approved the procedures involving the
112 patients.

113 Parasite isolation

114 Parasites were isolated from spinal fluid through myelogram performed as part of the
115 diagnostic procedure for VL [7]. The general informations about of each patient is indicated
116 in [Table 1](#).

117 Drugs

118 For *in vitro* drug assays, stock solutions of potassium antimonyl tartrate trihydrate
119 (Sb^{III}) (50 mM [aq]) and amphotericin B (AmB) (10 mM [aq]) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
120 USA) were prepared and kept at -20 °C until use. Meglumine antimoniate (Glucantime[®],
121 Sanofi-Aventis) was kindly donated by the Reference Hospital for Infectious Diseases of
122 Maranhão, São Luís, Brazil. Aliquots of 20mM ([aq]) were stored at 4°C.

123 Parasites

124 Promastigotes of the reference strain *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) and the
125 clinical isolates were grown at 25 °C in Schneider medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
126 USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco[®]), 10 U/mL
127 of penicillin and 10 µg/mL of streptomycin. The isolates were typed by means of PCR using
128 ribosomal RNA coding region internal transcribed spacer-1 (ITS-1), as previously described
129 [25, 26].

130

131

132 Drug susceptibility of the *L. (L.) infantum* promastigotes to SbIII and AmB

133 The activity of SbIII and AmB against promastigotes was evaluated using the MTT
134 colorimetric assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), as
135 previously described [16]. Briefly, 100 μ l of Schneider medium containing 2×10^6 log-phase
136 parasites were transferred to a 96-well plate and incubated at 25°C in presence of trivalent
137 antimony (15.6 μ M – 1mM) for 48 hours or AmB (39nM – 2.5 μ M) for 24 hours [27]. After the
138 incubation, 30 μ L of MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added and
139 the plates were further incubated for 3 hours. The reaction was stopped using 50 μ L of 20%
140 sodium dodecyl sulfate (SDS). The absorbance was determined by means of a
141 spectrophotometer (Epoch™, BioTek®) with a reference wavelength of 690 nm and a test
142 wavelength of 595 nm. Each drug concentration was tested in triplicate and the assay was
143 repeated twice. Untreated control and the medium only blank to remove the background were
144 used in the assays. The 50% effective concentration (EC₅₀) was calculated using sigmoidal
145 regression curve simulation using Graph Pad Prism 7.0 software (GraphPad Software, Inc., La
146 Jolla, CA) and the activity index (AI) was obtained by the ratio between EC₅₀ isolate/EC₅₀
147 reference strain (MHOM/BR/74/PP75).

148 **Drug susceptibility of SbV and AmB against the intracellular amastigotes of *L. (L.)***
149 ***infantum***

150 To determine the susceptibility to drugs of intracellular amastigotes of *L. (L.) infantum*,
151 peritoneal macrophages (PEMs) s were retrieved from the peritoneum of Swiss mice donated
152 the Animal Facility of the Federal University of Maranhão. PEMs were plated at a density of
153 4×10^5 cells per well in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, on 16-well chamber
154 slides (Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™, USA), and were incubated in a 5% CO₂
155 atmosphere for 24 hours at 37°C. The PEMs were then exposed to stationary-phase
156 promastigotes of *L. (L.) infantum* at a ratio of 10:1 (parasite: macrophage) in a 5% CO₂
157 atmosphere for 24 hours at 34 °C. After infection, non-internalized parasites were removed by

158 washing with RPMI-1640 medium. The infected PEMs were cultivated in fresh RPMI-1640
159 medium containing increasing concentrations of MA (3.3 - 90 μ M) for 5 days and AmB (0.02
160 - 0.5 μ M) for 3 days [28]. Untreated control was also used in the assay. The slides were washed
161 with RPMI-1640, fixed in methanol and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
162 USA). Each concentration was evaluated in quadruplicate and two independent assays were
163 performed. The percentage of infected PEMs and the number of intracellular amastigotes were
164 determined by counting 100 macrophages. The EC₅₀ was determined using the values of the
165 infectivity index, through a nonlinear dose-response sigmoidal model, using the GraphPad
166 Prism 7.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

167 **Gene expression of drug resistance markers**

168 Total RNA from log-phase promastigotes was obtained using the TRIzol™ method
169 (Thermo Fisher, MA, USA), in accordance with the protocol provided by the manufacturer.
170 cDNA synthesis was performed using the high-capacity cDNA Reverse Transcription kit
171 (Thermo Fisher, MA, USA), with the random hexamer primers. To evaluate the expression of
172 genes relating to drug resistance ([Table S1](#)), real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was
173 performed using the GoTaq® qPCR Master Mix (Promega™, MA, USA). For each reaction,
174 100 ng of synthesized cDNA was used as a template. The following program was used: an
175 initial cycle of 10 min at 95 °C as the denaturation step, followed by 50 cycles of amplification
176 at 95 °C for 3 min, annealing at 53 °C for 30 s and extension at 72 °C for 10 s. The threshold
177 cycle (Ct) obtained for each gene was normalized using the Ct of the housekeeping
178 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (*gapdh*). The pair of primers used were
179 GAPDH-F (5'-GAAGTACACGGTGGAGGCTG-3') and GAPDH-R (5'-
180 CGCTGATCACGACCTTCTTC-3') [29]. The 2^{-ΔΔCt} equation was calculated to determine
181 the relative expression genes [30]. The criteria used to consider that genes were differentially
182 expressed were the following: *mapk1* 0.84 < *fold change* > 1.17; *mdr1* 0.86 < *fold change* >

183 1.14; *calc* 0.64 < fold change > 1.54; *mrpa* 0.55 < fold change > 1.80; and *aqp1* 0.63 < fold
184 change > 1.57.

185 **Data analysis**

186 Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism v.7.0 software
187 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). All experimental parameters of the
188 susceptibility assays were analyzed for statistical significance by means of the one-way
189 ANOVA test followed by Tukey's post-test. P-values of $p < 0.05$ were considered statistically
190 significant.

191

192 **Results**

193 **Molecular identification of *Leishmania* isolates**

194 PCR-ITS1 assay allows accurate identification of the infective *Leishmania* species in
195 VL patients [31]. The clinical isolates of this study were typed by means of restriction digestion
196 using the *Hae*III enzyme. The five clinical isolates produced the expected profile for *L. (L.)*
197 *infantum* and, as a non-correlated control, we used *L. (L.) amazonensis* DNA ([Figure 1](#)).

198 ***In vitro* susceptibility to MA and AmB of the reference strain and clinical isolates of *L.*** 199 ***infantum***

200 Of the five isolates recovered from patients with VL, four clinical isolates were isolated
201 before the treatment meaning there was no exposure to any chemotherapy. Only one isolate
202 (ASFF-MA) was recovered from a patient who had started MA treatment, but with an
203 unsatisfactory response ([Table 1](#)). We firstly determined the sensitivity of promastigote forms
204 of the reference strain and clinical isolates to antimony and AmB. We used the trivalent antimony
205 to assess the sensitivity of the parasites, since Sb^V does not have a leishmanicidal activity against
206 the promastigote stages of the parasites [32, 33]. The EC_{50} of reference strain PP75 was $66.7 \pm$
207 $1.5 \mu M$ which indicated it was significantly more susceptible to Sb^{III} when compared to clinical

208 isolates ($p < 0.05$ ANOVA and Tukey's multiple comparison test) ([Table 2](#)). The clinical isolates
209 showed a higher variation in sensitivity against Sb^{III} with EC_{50} values ranging from 94.7 ± 0.8 to
210 $155.2 \pm 3.6 \mu M$ ([Table 2](#)). The AI of the FCM and AAS1 isolates were around 2-fold higher
211 indicating a higher tolerance compared to the reference strain ([Table 2](#)).

212 When we evaluate the susceptibility of AmB against the reference strain and clinical
213 isolates, we observed significantly higher sensitivity when compared to Sb^{III} . In promastigotes,
214 the EC_{50} for the strain PP75 was 175.8 ± 3.7 nM and the EC_{50} of the isolates ranged from 118.9
215 to 269.9 nM ([Table 2](#)). The AI values indicated that the AAS1 and LFF isolates were the most
216 sensitive and the most tolerant to AmB, respectively ([Table 2](#)).

217 The EC_{50} values of MA and AmB against the reference strain is $16.1 \pm 2.2 \mu M$ and 0.18
218 $\pm 0.03 \mu M$ and ranges from 18.5 to 39.3 μM and 0.09 to 0.14 μM for the clinical isolates,
219 respectively. The AI value showed that LCS isolate was the least susceptible and the AAS1 was
220 the most susceptible isolate. Furthermore, significant differences were observed between the
221 EC_{50} values of the clinical isolates ($p < 0.05$ ANOVA and Tukey's multiple comparison test)
222 ([Table 2](#)).

223 **Screening for genes related with drug resistance**

224 The relative gene expression of five target genes associated with drug resistance was
225 evaluated in promastigotes of the clinical isolates by RT-qPCR and compared to the reference
226 strain (PP75) ([Figure 2](#)). We observed high expression of the *aqp1* gene in the FCMS isolate
227 (3.59-fold). On the other hand, the expression profile of this gene was lower in the LFSS (0.50-
228 fold) and ASFF (0.39-fold) isolates. Furthermore, the isolates LCS and AAS1 did not exhibit
229 significant changes, compared with the reference strain ([Figure 2](#)). The expression of the *mdr1*
230 gene was upregulated in the isolates AAS1 (1.41-fold) and FCMS (2.30-fold), while it was lower
231 in LFSS (0.48-fold) and LCS (0.72-fold). There was no significant change in the expression of
232 this gene in the ASFF isolate ([Figure 2](#)). Regarding the *mrpa* gene, it was downregulated in the

233 isolates LFSS (0.42-fold) and ASFF (0.22-fold). In the other clinical isolates, the expression of
234 *mrpa* did not change ([Figure 2](#)).

235 The analysis on expression of the *calc* gene showed that it was upregulated in the AAS1
236 (1.72-fold) and FCMS (2.52-fold) isolates, while it did not change in the remaining clinical
237 isolates ([Figure 2](#)). Curiously, the *mapk1* gene was upregulated in most clinical isolates except
238 in FCMS (0.18-fold), which showed low levels of RNA expression ([Figure 2](#)).

239

240 Discussion

241 This study evaluated the *in vitro* susceptibility to MA and AmB in five clinical isolates
242 of *Leishmania* recovered from VL patients in an endemic area of Brazil. Epidemiological data
243 point to a public health emergency in the state of Maranhão due to the high numbers of new cases
244 and deaths caused by this disease in the last decade [4].

245 In Brazil, MA and AmB have been used for many years for treating this clinical form.
246 However, neither of these drugs guarantee successful treatment of all patients [6]. In fact, these
247 drugs have been associated with variable clinical response rates and an increase in the number of
248 therapeutic failures to these drugs have been demonstrated in Brazilian patients [9-11].
249 Differences in treatment outcomes may be explained through differences in the intra- and
250 interspecies susceptibility of *Leishmania* to these drugs [14]. Therefore, the *in vitro* susceptibility
251 to antimony and AmB were determined in promastigotes and intracellular amastigotes of these
252 *L. (L.) infantum* isolates.

253 For the antimonial drug (Sb^{III}), intraspecies susceptibility variation was identified in our
254 panel of *L. (L.) infantum* isolates. The EC₅₀ varied from 66.7 to 155.2 µM, or 2.3-fold, between
255 the least and most susceptible isolate. Azeredo-Coutinho et al. [15] established the EC₅₀ values
256 for antimony in a panel of clinical isolates from different *Leishmania* species from patients with
257 tegumentary leishmaniasis. They demonstrated that promastigotes of *L. (V.) braziliensis* isolates

258 were more susceptible (0.8 to 9.5 mg/mL) to antimony than other dermatropic *Leishmania*
259 species (10 to 58 mg/mL). Although these values were an order of magnitude higher than those
260 established in our study, high variability in clinical isolates was confirmed in relation to MA.
261 This can be due to experimental design differences or the drug formulation used to complete
262 these assays. Similar susceptibility variations amongst the isolates were also observed when
263 using the intracellular amastigote model. In a panel of isolates of *L. (L.) infantum* from the
264 Western Mediterranean area, a significant variation in susceptibility (7.5 µg/mL to > 60 µg/mL)
265 among the amastigotes of these isolates was described [34].

266 Compared to Sb^{III}, the susceptibility differences for AmB across our isolates were modest
267 with AI values ranging from 0.8 to 1.5 µM for promastigotes and 0.5 to 0.7 µM for amastigotes.
268 These data reveal little intraspecific variation to AmB susceptibility in these clinical isolates.
269 *Leishmania* susceptibility to AmB seems to be species-dependent, showing wide variation in
270 susceptibility depending on the species and among published studies [16, 35-37]. In *L. (L.)*
271 *donovani* isolates from an area with various levels of antimony resistance, susceptibility to AmB
272 was shown to be quite variable [38]. However, in *L. (L.) major* isolates this variation was not
273 observed [37]. In our study, we observed higher variation in susceptibility of clinical isolates to
274 antimony formulations than to AmB.

275 Due to the variation in susceptibility to antimony, we investigated the gene expression
276 profiling of markers associated with antimony resistance. In *Leishmania*, antimony resistance is
277 a multifactorial process involving several pathways, such as uptake, metabolism, efflux and
278 sequestration of the drug [39, 40]. Here, the first target gene analyzed in the clinical isolates was
279 *mapk1*. It has been reported that downregulation of this gene could be one of the mechanisms of
280 antimonial resistance in *L. (L.) donovani* field isolates [19]. Curiously, only the FMCS isolate
281 showed downregulation for this gene, while the other isolates were upregulated.

282 Next, we assessed the profile expression the gene encoding the *mdr1*. In our study,
283 overexpression of this gene was observed in the ASS1 and FMCS isolates and, interestingly,
284 these were the same isolates that showed the highest AI values (2.3 and 2.1-fold). Overexpression
285 of this gene has already been shown to confer resistance in *Leishmania* [21, 41, 42]. The other
286 target investigated in this study was the *calc* gene. Downregulation of this gene has been reported
287 in antimony-resistant *L. (L.) infantum* isolates [20]. In our clinical isolates, this gene expression
288 profiling was not observed. On the contrary, two of the five isolates (ASS1 and FMCS) were
289 upregulated.

290 The gene expression profiling of *mrpa* was downregulated in two clinical isolates (LFFS
291 and ASFF). Overexpression of *mrpa* is associated with antimony-resistant isolates and has been
292 reported in *L. (L.) donovani* [43] and *L. (L.) tropica* [44, 45]. Lastly, we analyzed the gene
293 expression of *aqp1* and we observed downregulation in the LFFS and ASFF isolates.
294 Overexpression of *aqp1* induces hypersensitivity, while downregulating this gene makes the
295 parasite resistant to the drug [23]. Some studies have evaluated resistance to antimony in *L. (L.)*
296 *donovani* isolates [46, 47] and *L. (L.) major* [48] and demonstrated a correlation between this
297 phenotype and low expression of the *aqp1* gene.

298 The correlation between the phenotypic susceptibility and gene expression of markers
299 associated with drug resistance was not found in all clinical isolates. However, these data follow
300 as expected due to the existence of different drug resistance mechanisms. Furthermore, we
301 suggest the investigation of other molecular targets. In summary, we found variable susceptibility
302 among the *L. (L.) infantum* isolates more pronounced for the antimony formulations compared
303 to AmB. Our results suggest that gene targets (e.g. *mdr1* and *aqp1*) can be used as potential
304 markers for screening for drug resistance in areas endemic for VL. Our results also suggest that
305 susceptibility of the species is reduced compared to the reference strain - further investigations

306 are required to explore the impact of the observed susceptibility differences across the clinical
307 isolates on the overall treatment outcome.

308 **Funding:** This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento
309 Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA). GHCS was supported by a FAPEMA
310 fellowship (grant numbers BIC 05488/16 and 04753/17). KCST was supported by a FAPEMA
311 fellowship (grant number BM 01716/19). This work was also supported by Coordenação de
312 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (finance code 001). MISL and
313 CMPSA received funding from CAPES (grant number PROCAD-Amazônia 001-21/2018,
314 under finance code 001).

315 **Declaration of competing interest:** The authors of this study declare that they did not have
316 any conflict of interest.

317 **Acknowledgements:** We are grateful to the staff of the Reference Hospital for Infectious
318 Diseases of Maranhão, São Luís, Brazil, for providing outstanding patient care to the
319 individuals involved in this study.

320 **Authors' addresses:** Gustavo Henrique Corrêa Soares, Robson Pontes de Oliveira, Karina
321 Cristina Silva Torres, Juliana Mendes Sousa, Vanessa Ribeiro Moreira, Hivana Patricia Melo
322 Barbosa Dall' Agnol and Mayara Ingrid Sousa Lima, Laboratory of Genetics and Molecular
323 Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, email:
324 gustavocsoares@usp.br, robsonpontes@ime.usp.br, karina.cristina@discente.ufma.br,
325 juliana.ms@discente.ufma.br, more_nessa@yahoo.com.br, hivana.barbosa@ufma.br,
326 mayara.ingrid@ufma.br; Uiara Regina Silva de Lima and Camila Freitas de Andrade
327 Rodrigues, Postgraduate Program in Health Sciences, Center for Biological and Health
328 Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, email: uiarasilva07@gmail.com,
329 camila.freitas1101@gmail.com; Katrien Van Bocxlaer, Department of Biology, York

330 Biomedical Research Institute, University of York, York, UK, email:
 331 katrien.vanbocxlaer@york.ac.uk; Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo,
 332 Department of Medicine, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, email:
 333 conceicao.pedrozo@ufma.br.

334

335 **Legends:**

336 **Figure 1:** Molecular typing of clinical isolates used in this study. ITS1 was digested with
 337 *Hae*III and the restriction profile was evaluated on 2% agarose gel. M - molecular marker (100
 338 bp). I- Negative control of *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); II- Positive control of
 339 *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75); Clinical isolates: 1- MHOM/BR/2018/LCS-MA; 2-
 340 MHOM/BR/2018/ASFF-MA; 3- MHOM/BR/2019/AAS1-MA; 4- MHOM/BR/2019/FCMS-
 341 MA; 5- MHOM/BR/2018/LFFS-MA.

342

343 **Figure 2:** Relative expression pattern of target genes in *L. infantum* isolates. Blocks highlighted
 344 in dark gray were designated as significant upregulation. Blocks highlighted in light grey were
 345 designated as significant downregulation. Clear block was designated as no significant
 346 difference. * Reference strain (MHOM/BR/74/PP75).

347

348 **References**

- 349 [1] Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D, 2016. A
 350 Historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and
 351 sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6): e0004770.
- 352 [2] Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L, 2008. Canine
 353 leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*
 354 24(7): 324-30.
- 355 [3] World Health Organization, 2021. Leishmaniasis. Available at:
 356 <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>> . Accessed October, 2021.
- 357 [4] Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021. *Casos de*
 358 *leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2019*. Brasília:
 359 Ministério da Saúde. Available at: <

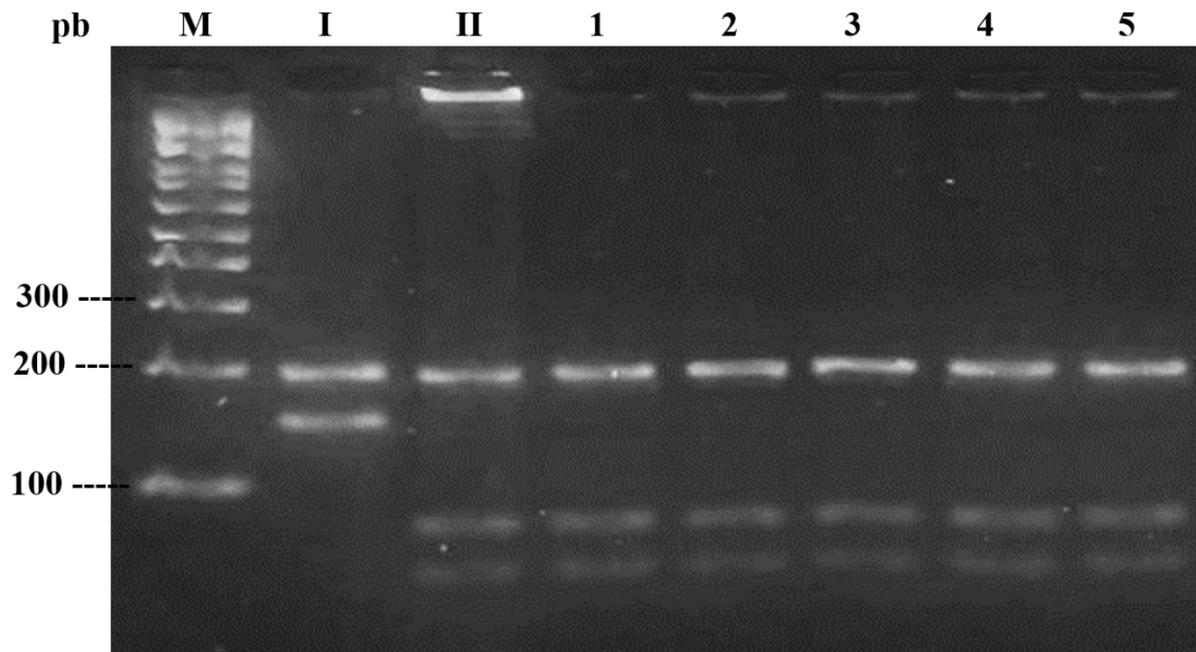
- 360 <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LV-Casos.pdf> >. Accessed October,
361 2021.
- 362 [5] Lima URS, Vanolli L, Moraes EC, Ithamar JS, Silva de Azevedo CMP, 2019. Visceral
363 leishmaniasis in Northeast Brazil: What is the impact of HIV on this protozoan infection? *PLoS*
364 *One* 14(12): e0225875.
- 365 [6] Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC, 2018. Chemotherapy of leishmaniasis: present
366 challenges. *Parasitol* 145(4):464-80.
- 367 [7] Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014. *Manual de Vigilância*
368 *e Controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde. Available at:
369 <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visce
370 [ral_1edicao.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visce)> . Accessed October, 2021.
- 371 [8] Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH, 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol*
372 *Rev* 19:111-526.
- 373 [9] Oliveira-Neto MP, Schubach A, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C, 1997. A low-dose
374 antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-
375 up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 57(6): 651–55.
- 376 [10] Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO, 2001. Comparison of cutaneous
377 leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil:
378 therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65(5):456-65.
- 379 [11] Teixeira AC, Paes MG, Guerra JO, Prata A, Silva-Vergara ML, 2008. Failure of both
380 azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Rev Inst*
381 *Med Trop S Paulo* 50(3): 157-60.
- 382 [12] Mueller M, Ritmeijer K, Balasegaram M, Koummuki Y, Santana MR, Davidson RN,
383 2007. Unresponsiveness to AmBisome in some Sudanese patients with kala-azar. *Trans R Soc*
384 *Trop Med Hyg* 101(1):19-24.
- 385 [13] Kumar D, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P, 2008. In vitro susceptibility of field isolates
386 of *Leishmania donovani* to miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony
387 gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrob*
388 *Agents Chemother* 53(2):835-8.
- 389 [14] Inocência da Luz R, Vermeersch M, Dujardin JC, Cos P, Maes L, 2009. In Vitro sensitivity
390 testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances
391 infectivity for macrophage host cells. *Antimicrob Agents Chemother* 53(12):5197-5203.
- 392 [15] Azeredo-Coutinho RBG, Mendonça SCF, Callahan H, Portal AC, Grogl M, 2007.
393 Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (Glucantime)

- 394 is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in
395 American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol* 93(3):688-93.
- 396 [16] Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka J, Pereira L, Pelli de Oliveira
397 MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SRB, 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia)*
398 *braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine
399 antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health* 15(1):68-76.
- 400 [17] Fairlamb AH, Gow NA, Matthews K, Waters AP, 2016. Drug resistance in eukaryotic
401 microorganisms. *Nat Microbiol* 1:16092.
- 402 [18] Jeddi F, Piarroux R, Mary C, 2011. Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on
403 experimental research. *J Trop Med* 2011:695382.
- 404 [19] Ashutosh, Garg M, Sundar S, Duncan R, Nakhasi HL, Goyal N, 2011. Downregulation of
405 mitogen-activated protein kinase 1 of *Leishmania donovani* field isolates is associated with
406 antimony resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 56(1):518-25.
- 407 [20] Khadem Erfan MB, Mohebbi M, Kazemi-Rad E, Hajjarian H, Edrissian GH, Mamishi S,
408 Saffari M, Raoofian R, Heidari M, 2013. Downregulation of calcineurin gene is associated with
409 Glucantime® resistance in *Leishmania infantum*. *Iranian J Parasitol* 8(3):359-66.
- 410 [21] Gueiros-Filho F, Viola J, Gomes F, Farina M, Lins U, Bertho AL, Wirth DF, Lopes UG,
411 1995. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is
412 associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a
413 *Leishmania mdr1* gene. *Exp Parasitol* 81(4):480-90.
- 414 [22] Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M,
415 Madhubala R, 2007. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase
416 and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J*
417 *Antimicrob Chem* 59(2):204–11.
- 418 [23] Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP,
419 Mukhopadhyay, 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an
420 aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 279(30):31010-7.
- 421 [24] Légaré D, Cayer S, Singh AK, Richard D, Papadopoulou B, Ouellette M. ABC proteins
422 of *Leishmania*. *J Bioenerg Biomembr* 33(6):469-74.
- 423 [25] El Tai NO, Fari ME, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, Safi SH, Presber WH, Schönian G,
424 2001. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by
425 PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol* 97(1):35-44.

- 426 [26] Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schalling HD, Presber WH, Jaffe
427 CL, 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical
428 samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47(1):349-58.
- 429 [27] Sadeghi S, Seyed N, Etemadzadeh MH, Abediankenar S, Rafati S, Taheri T, 2015. In
430 Vitro infectivity assessment by drug susceptibility comparison of recombinant *Leishmania*
431 *major* expressing enhanced green fluorescent protein or EGFP-Luciferase fused genes with
432 wild-type parasite. *Korean J Parasitol* 53(4):385-94.
- 433 [28] Van Bocxlaer K, Caridha D, Black C, Vesely B, Leed S, Sciotti RJ, Wijnant GJ, Yardley
434 V, Braillard B, Mowbray CE, Ioset JR, Croft S, 2019. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist*
435 11:129-38.
- 436 [29] Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Légaré D, Corbeil J, Melo MN, Frézard F,
437 Ouellette M, 2011. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony
438 resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 5(5):e1167.
- 439
- 440 [30] Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time
441 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25(4):402-8.
- 442 [31] Koltas IS, Eroglu F, Uzun S, Alabaz D, 2016. A comparative analysis of different
443 molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. *Exp Parasitol* 164:43-
444 8.
- 445 [32] Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D, 1999. Stage-specific activity
446 of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents*
447 *Chemother* 43(2):278-82.
- 448 [33] Bilbao-Ramos P, Dea-Ayuela MA, Cardenas-Alegría O, Salamanca E, Santalla-Vargas
449 JA, Benito C, Flores N, Bólas-Fernández F, 2017. Leishmaniasis in the major endemic region
450 of Plurinational State of Bolivia: species identification, phylogeography and drug susceptibility
451 implications. *Acta Trop* 176:150-161.
- 452 [34] Jeddi F, Mary C, Aoun K, Harrat Z, Bouratbine A, Faraut F, Benikhlef R, Pomares R,
453 Pralong F, Marty P, Piarroux R, 2014. Heterogeneity of molecular resistance patterns in
454 antimony-resistant field isolates of *Leishmania* species from the Western Mediterranean area.
455 *Antimicrob Agents Chemother* 58(8): 4866-74.
- 456 [35] Yardley V, Croft S, 1997. Activity of liposomal amphotericin B against cutaneous
457 leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 41:752-56.

- 458 [36] Di Giorgio C, Faraut-Gambarelli F, Imbert A, Minodier P, Gasquet M, Dumon H, 1999.
459 Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates
460 from patients with visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 44:71-76.
- 461 [37] Escobar P, Matu S, Marques C, Croft S, 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to
462 hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta*
463 *Trop* 81:151-57.
- 464 [38] Kumar D, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P, 2009. In vitro susceptibility of field isolates
465 of *Leishmania donovani* to miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony
466 gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrob*
467 *Agents Chemother* 53(2):835-38.
- 468 [39] Jeddi F, Piarroux R, Mary C, 2011. Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on
469 experimental research. *J Trop Med* 2011:1-15.
- 470 [40] Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barret M, López-Vélez R, García-Hernández R,
471 Pountain A, Mwenechanya R, Papadopoulou B, 2017. Drug resistance and treatment failure in
472 leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 11(12): e0006052.
- 473 [41] Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B, 1992.
474 Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene
475 homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 12(6): 2855–65.
- 476 [42] Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Bannerjee B, Chowdhury S, Mukherjee S, Naskar K,
477 Allam US, Chakravorty D, Sundar S, Dujardin JC, Roy S, 2013. Antimony-resistant but not
478 antimony-sensitive *Leishmania donovani* up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-
479 resistant protein 1. *PNAS* 110(7):E575-82.
- 480 [43] Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M,
481 Madhubala R, 2007. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and
482 ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J*
483 *Antimicrob Chem* 59(2):204–11.
- 484 [44] Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Khadem-Erfan MB, Saffari M, Raoofian R, Hajjaran H,
485 Hadighi R, Khamesipour A, Rezaie S, Abedkhozasteh H, Heidari M, 2013. Identification of
486 antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP
487 approach. *Exp Parasitol* 135(2):344–49.
- 488 [45] Mohebbali M, Kazemirad E, Hajjaran H, Kazemirad E, Oshaghi MA, Raoofian R, Teimouri
489 A, 2018. Gene expression analysis of antimony resistance in *Leishmania tropica* using
490 quantitative real-time PCR focused on genes involved in trypanothione metabolism and drug
491 transport. *Arch Dermatol* 311(1):9-17.

- 492 [46] Decuypere S, Rijal S, Yardley V, De Doncker, Laurent T, Khanal B, Chappius F,
493 Dujardin JC, 2005. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in
494 *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* 49(11): 4616–21.
- 495 [47] Mandal S, Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R, 2010. Assessing
496 aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and-resistant
497 clinical isolates of *Leishmania donovani* from India. *J Antimicrob Chem* 65(3):496–507.
- 498 [48] Eslami G, Zarchi MV, Moradi A, Hejazi SH, Sohrevardi SM, Vakili M, Khamesipour A,
499 2016. Aquaglyceporin-1 gene expression in antimony resistance and susceptible *Leishmania*
500 *major* isolates. *J Vector Borne Dis* 53(4):370-74.
- 501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525



526

527 **Figure 1:** Molecular typing of clinical isolates used in this study. ITS1 was digested with
 528 *Hae*III and the restriction profile was evaluated on 2% agarose gel. M - molecular marker (100
 529 bp). I- Negative control of *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); II- Positive control of
 530 *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75); Clinical isolates: 1- MHOM/BR/2018/LCS-MA; 2-
 531 MHOM/BR/2018/ASFF-MA; 3- MHOM/BR/2019/AAS1-MA; 4- MHOM/BR/2019/FCMS-
 532 MA; 5- MHOM/BR/2018/LFFS-MA.

533

534

535

536

537

	<i>mapk1</i>	<i>mdr1</i>	<i>calc</i>	<i>mrpa</i>	<i>aqp1</i>
MHOM/BR/74/PP75	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MHOM/BR/2018/LFFS-MA	7.15	0.48	0.88	0.42	0.50
MHOM/BR/2018/LCS-MA	48.23	0.72	1.35	1.43	1.10
MHOM/BR/2018/ASFF-MA	4.21	0.97	1.15	0.22	0.39
MHOM/BR/2019/AAS1-MA	4.08	1.41	1.72	0.95	1.55
MHOM/BR/2019/FCMS-MA	0.18	2.30	2.56	1.25	3.59

538

539 **Figure 2:** Relative expression pattern of target genes in *L. infantum* isolates. Blocks highlighted
 540 in dark gray were designated as significant upregulation. Blocks highlighted in light grey were
 541 designated as significant downregulation. Clear block was designated as no significant
 542 difference. * Reference strain (MHOM/BR/74/PP75).

543

544 **Table 1:** General informations of the patients with VL where were obtained of the clinical
 545 isolates

Isolate code	Origin (City)	Gender/ age	HIV serological test	Previous treatment	Treatment after sample collection	Treatment failure
MHOM/BR/2018/LFFS-MA	São Luís	M/ 39	Negative	None	MA	None
MHOM/BR/2018/LCS-MA	São Luís	F/ 35	Positive	None	AmB	None
MHOM/BR/2018/ASFF-MA*	São Luís	M/ 44	Positive	MA	AmB	Yes
MHOM/BR/2019/AAS1-MA	São Vicente Ferrer	M/ 45	Negative	None	MA	None
MHOM/BR/2019/FCMS-MA	Anapurus	M / 32	Negative	None	AmB	None

546

547 * This patient started treatment with MA, but with an unsatisfactory response (treatment failure). The second treatment cycle was AmB. The sample was obtained between the first (MA) and second (AmB) treatment cycle.

548

549

550

551

552

553
554

Table 2: *In vitro* susceptibility of promastigotes and intracellular amastigotes of the reference strain and clinical isolates of *Leishmania infantum* to antimony formulations and amphotericin B.

Strain/clinical isolate	Promastigotes				Intracellular amastigotes				
	Sb ^{III} EC ₅₀ (μM)	AI	AmB EC ₅₀ (nM)	AI	Sb ^V EC ₅₀ (μM)	AI	AmB EC ₅₀ (μM)	AI	72 h infection rate
MHOM/BR/74/PP75 (ref strain)	66.7 ± 1.6	----	175.8 ± 3.7	----	16.1 ± 2.2	----	0.18 ± 0.03	----	73%
MHOM/BR/2018/LFFS-MA	120 ± 5.3 *	1.8	269.9 ± 2.2 *	1.5	26.4 ± 3.9 *	1.6	0.09 ± 0.01*	0.5	85%
MHOM/BR/2018/LCS-MA	94.7 ± 0.8	1.4	146.9 ± 30.5	0.8	39.3 ± 5.7 *	2.4	0.12 ± 0.01*	0.6	74%
MHOM/BR/2018/ASFF-MA	109.2 ± 6.2 *	1.6	243.5 ± 21.3	1.4	22.3 ± 4.4	1.4	0.11 ± 0.01*	0.6	86%
MHOM/BR/2019/AAS1-MA	155.2 ± 3.6 *	2.3	118.9 ± 14.7	0.7	18.5 ± 3.1	1.1	0.14 ± 0.03	0.7	82%
MHOM/BR/2019/FCMS-MA	142.4 ± 6.0 *	2.1	233.1 ± 27.3	1.3	33.1 ± 5.6 *	2.0	0.14 ± 0.02	0.7	69%

555
556
557

* The asterisk indicates there was a statistically significant difference in the EC₅₀ value of the clinical isolate in relation to the reference strain (p < 0.05). AI: activity index

558
559
560
561
562
563
564



Leishmania (Leishmania) infantum isolates from the state of Maranhão, northeastern Brazil: phenotypic and molecular evidence on drug susceptibility

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine & Hygiene</i>
Manuscript ID	AJTMH-21-1252
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	01-Dec-2021
Complete List of Authors:	Soares, Gustavo Henrique; University of São Paulo Institute of Biomedical Sciences, Parasitology; Federal University of Maranhao, Biology Oliveira, Robson ; Federal University of Maranhao, Biology Torres, Karina ; Federal University of Maranhao, Biology Sousa, Juliana ; Federal University of Maranhao, Biology Moreira, Vanessa ; Federal University of Maranhao, Biology Lima, Uiara; Universidade Federal do Maranhao, Postgraduate Program on Health Sciences Rodrigues, Camila ; Federal University of Maranhao, Postgraduate Program in Health Sciences Van Bocxlaer, Katrien ; University of York, Department of Biology, York Biomedical Research Institute Azevedo, Conceição; Universidade Federal do Maranhao, Medicine I Dall'Agnol, Hivana Patricia ; Universidade Federal do Maranhao, Pathology Lima, Mayara Ingrid; Federal University of Maranhao, Biology
Key Words:	visceral leishmaniasis, chemotherapy, antimony, amphotericin B, clinical isolates

1 ***Leishmania (Leishmania) infantum* isolates from the state of Maranhão, northeastern**
2 **Brazil: phenotypic and molecular evidence on drug susceptibility**

3

4 Gustavo Henrique Corrêa Soares¹, Robson Pontes de Oliveira¹, Karina Cristina Silva Torres^{1,2},
5 Juliana Mendes Sousa¹, Vanessa Ribeiro Moreira¹, Uiara Regina Silva de Lima², Katrien Van
6 Bocxlaer³, Camila Freitas de Andrade Rodrigues², Conceição de Maria Pedrozo e Silva de
7 Azevedo^{2,4}, Hivana Patricia Melo Barbosa Dall' Agnol^{1,2,5}, Mayara Ingrid Sousa Lima^{1,2,6*}.

8

9 ¹Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of
10 Maranhão, São Luís, Brazil; ²Postgraduate Program on Health Sciences, Federal University of
11 Maranhão, São Luís, Brazil; ³Department of Biology, York Biomedical Research Institute, University
12 of York, York, UK; ⁴Department of Medicine, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil;⁵
13 Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil ⁶Postgraduate Program on
14 Health and Environment, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil.

15

16 **Keywords:** visceral leishmaniasis, chemotherapy, antimony, amphotericin B, clinical isolates

17 **Number of figures:** 2

18 **Number of tables:** 3

19 **Word counts for the abstract:** 187

20 **Word counts for the text:** 3,421

21

22 ***Corresponding Author:** Mayara Ingrid Sousa Lima. email: mayara.ingrid@ufma.br
23 Department of Biology. Federal University of Maranhão. Avenida dos Portugueses, 1966, Vila
24 Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil, Zipcode: 65080-805.

25

26

27

28

29

30

31

32