



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Márcio Thomaz dos Santos Varjão

Potencial leishmanicida de produtos microbianos antárticos: avaliação farmacológica de extratos pigmentados bacterianos e revisão sistemática da atividade anti-*Leishmania* de metabólitos fúngicos

Maceió
2021

MÁRCIO THOMAZ DOS SANTOS VARJÃO

Potencial leishmanicida de produtos microbianos antárticos: avaliação farmacológica de extratos pigmentados bacterianos e revisão sistemática da atividade anti-*Leishmania* de metabólitos fúngicos

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Estudos Clínicos e Laboratoriais em Ciências Médicas.

Orientador: Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz

Coorientador: Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte e

Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

Maceió
2021

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

V313p Varjão, Márcio Thomaz dos Santos.
Potencial leishmanicida de produtos microbianos antárticos : avaliação farmacológica de extratos pigmentados bacterianos e revisão sistemática da atividade anti-*Leishmania* de metabólitos fúngicos / Márcio Thomaz dos Santos Varjão. – 2021.
147 f. : il.

Orientadora: Aline Cavalcanti de Queiroz.
Coorientador: Alysson Wagner Fernandes Duarte e Magna Suzana Alexandre Moreira.
Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Maceió, 2021.
Inclui produtos educacionais.

Bibliografia: f. 131-147.

1. Bioprospecção. 2. Extremófilos. 3. Produtos biológicos. 4. *Leishmaniose*. 5. Antiparasitários. I. Título.

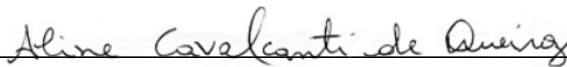
CDU: 615.283

Folha de Aprovação

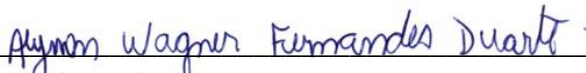
Márcio Thomaz dos Santos Varjão

Potencial leishmanicida de produtos microbianos antárticos: avaliação farmacológica de extratos pigmentados bacterianos e revisão sistemática da atividade anti-*Leishmania* de metabólitos fúngicos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas.



Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz
UFAL / Campus Arapiraca
Orientadora



Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte
UFAL / Campus Arapiraca
Coorientador

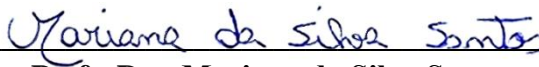


Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira
UFAL / Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS
Coorientadora

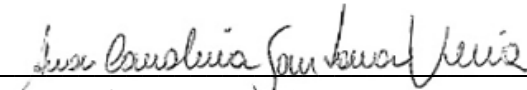
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Carolinne de Sales Marques
UFAL / Campus Arapiraca
Examinador interno



Profa. Dra. Mariana da Silva Santos
FEJAL / Centro Universitário CESMAC
Examinador externo



Profa. Dra. Ana Carolina Vieira
UFAL / Escola de Enfermagem - EENF
Examinador externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, irmão, familiares e amigos pelo apoio, incentivo e torcida para que eu conseguisse alcançar esse sonho.

À minha orientadora Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz, pela confiança depositada, e por todo conhecimento compartilhado com generosidade e paciência durante esse o processo.

Aos meus coorientadores, Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte e Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento dessa dissertação.

Da mesma forma, agradeço a todos os professores do Programa de Ciências Médica da UFAL, especialmente à coordenadora Dra. Michelle Jacintha Cavalcante Oliveira.

Agradeço, também, aos componentes das bancas de qualificação e defesa, Dra. Carolinne de Sales Marques, Dra. Mariana da Silva Santos e Dra. Ana Carolina Vieira por terem aceitado o convite e pelas sugestões e apontamentos para o enriquecimento do trabalho.

Aos meus companheiros de fluxo e amigos do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (UFAL / Campus A.C. Simões), os doutorandos: Amanda, Suellen, Flavio, Kaycke, Joice e Letícia; os mestrandos: Karoline, Diogo, Thiago, Éder, Lilyana e Hilda; e os ICs: Shakira, Izabelly e Alisson, que tornaram essa minha jornada muito mais leve e divertida.

Aos queridíssimos amigos, servidores do ICBS-UFAL, Anderson Leite e Ana Raquel que sempre me socorreram nos perrengues do dia a dia.

À Adriely, Raphaella, Sabrina, Hyandra, Kelly e todos os membros Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (UFAL/Campus Arapiraca), pelo acolhimento e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos, agradeço profundamente.

RESUMO

Doenças como a leishmaniose continuam negligenciadas pela indústria farmacêutica. Como consequência a isso, o tratamento para essa doença encontra-se defasado, deixando inúmeros indivíduos afetados desassistidos. Para reverter o impacto desse abandono, é imprescindível a busca por novos protótipos de fármacos mais seguros para o tratamento da leishmaniose. Diante disso, a bioprospecção de produtos naturais, especialmente os produtos microbianos, representa excelente fonte de partida. Sob essa perspectiva, o presente estudo investigou a atividade leishmanicida de extratos de bactérias isoladas da Antártica, bem como realizou uma revisão sistemática acerca da atividade leishmanicida de metabólitos fúngicos. No estudo experimental, oito isolados bacterianos obtidos de amostras de sedimento e líquens antárticos foram cultivados em caldo nutriente durante sete dias a 15 °C para produção de biomassa. Os metabólitos pigmentados intracelulares foram extraídos com metanol e posteriormente as soluções extrativas obtidas foram secas em dessecador sob vácuo. Esses extratos não apresentaram efeito citotóxico quando testados em macrófagos da linhagem J774.A1 no ensaio de MTT. Além disso, os extratos demonstraram atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, destacando os extratos de 14.AN.P1 (CI₅₀ = 63.04 ± 5.49 µg/mL), 2.ANUV.P4 (CI₅₀ = 91.19 ± 3.69 µg/mL), 14.UVAB.11 (CI₅₀ = 52.65 ± 2.91 µg/mL), 4.UVAB.12 (CI₅₀ = 36.83 ± 2.61 µg/mL) e 7.UVAB.14 (CI₅₀ = 78.10 ± 4.42 µg/mL). No entanto, nenhum extrato inibiu o crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Na revisão sistemática, conduzida a partir de buscas nas bases de dados PubMed, Lilacs e Scielo, foram incluídos 59 artigos, dos quais 39 (66,1%) apresentaram pelo menos um composto isolado com atividade leishmanicida, enquanto 20 (33,9%) avaliaram apenas extratos brutos ou frações semipurificadas. Os compostos ativos reportados foram produzidos principalmente por *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. As espécies de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) donovani* foram as mais avaliadas. Os resultados obtidos no estudo experimental, em conjunto com as evidências reportadas pelas publicações reunidas na revisão sistemática, indicam na prospecção de produtos microbianos um caminho promissor rumo ao desenvolvimento de novas entidades químicas para o combate à leishmaniose.

Palavras-chave: Bioprospecção. Extremófilos. Produtos naturais. Leishmaniose. Agentes Antiparasitários.

ABSTRACT

Diseases such as leishmaniasis remain neglected by the pharmaceutical industry. As a result, the treatment for this disease is outdated, leaving countless affected individuals unattended. To reverse the impact of this abandonment, it is essential to search for new prototypes of safer drugs for the treatment of leishmaniasis. Therefore, the bioprospecting of natural products, especially microbial products, represents an excellent starting point. From this perspective, this study investigated the leishmanicidal activity of extracts of bacteria isolated from Antarctica, as well as a systematic review of the leishmanicidal activity of fungal metabolites. In the experimental study, eight bacterial isolates obtained from sediment samples and Antarctic lichens were cultivated in nutrient broth for seven days at 15 °C for biomass production. The intracellular pigmented metabolites were extracted with methanol and then the extractive solutions obtained were dried in a desiccator under vacuum. These extracts did not show cytotoxic effect when tested on J774.A1 lineage macrophages in the MTT assay. Furthermore, the extracts demonstrated in vitro leishmanicidal activity against *L. (L.) chagasi* promastigote forms, highlighting 14.AN.P1 ($CI_{50} = 63.04 \pm 5.49 \mu\text{g/mL}$), 2.ANUV.P4 ($CI_{50} = 91.19 \pm 3.69 \mu\text{g/mL}$), 14.UVAB.11 ($CI_{50} = 52.65 \pm 2.91 \mu\text{g/mL}$), 4.UVAB.12 ($CI_{50} = 36.83 \pm 2.61 \mu\text{g/mL}$), and 7.UVAB.14 ($CI_{50} = 78.10 \pm 4.42 \mu\text{g/mL}$). However, no extract inhibited the growth of *L. (L.) amazonensis* promastigote forms. In the systematic review, conducted from searches in the PubMed, Lilacs and Scielo databases, 59 articles were included, of which 39 (66.1%) presented at least one isolated compound with leishmanicidal activity, while 20 (33.9%) evaluated only crude extracts or semi-purified fractions. The active compounds reported were mainly produced by *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. The species of *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) donovani* were the most evaluated. The results obtained in the experimental study, together with the evidence reported by the publications gathered in the systematic review, indicate a promising path towards the development of new chemical entities to combat leishmaniasis in the prospecting of microbial products.

Keywords: Bioprospecting. Extremophiles. Natural products. Leishmaniasis. Antiparasitic Agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Número de pessoas precisando de tratamento e cuidado para doenças negligenciadas em 2016 segundo a Organização Mundial da Saúde	17
Figura 2 – Taxonomia de <i>Leishmania</i> spp.	19
Figura 3 – Status endêmico da leishmaniose cutânea (A) e visceral (B) no mundo, 2018	20
Figura 4 – Casos de leishmaniose visceral nos países das Américas (2001-2019)	21
Figura 5 – Casos de leishmaniose cutânea Região das Américas e sub-regiões	22
Figura 6 – Estratificação de risco da leishmaniose visceral (A) e tegumentar (B) por município de infecção no Brasil, 2017 a 2019.	23
Figura 7 – Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	24
Figura 8 – Etapas do ciclo de vida do <i>Phlebotomus</i> spp. (A). Flebótomos fêmeas adultas durante o repasto sanguíneo (B).	25
Figura 9 – Ciclo de desenvolvimento e transmissão da <i>Leishmania</i> spp.	26
Figura 10 – Principais autores da resposta imune inata e adaptativa durante a patogenia da leishmaniose	29
Figura 11 – Principais moléculas envolvidas no reconhecimento da <i>Leishmania</i> spp.....	33
Figura 12 – Classificações e manifestações clínicas da leishmaniose.....	35
Figura 13 – Estrutura química das principais drogas atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose.....	39
Figura 14 – Estratégias para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais	45
Figura 15 – Mapa da Antártica, destacando o manto de gelo e as áreas de rocha exposta	48
Figura 16 – Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF)	49
Figura 17 – Cultivo bacteriano em meio líquido	55
Figura 18 – Diferentes estágios de extração dos pigmentos.....	56
Figura 19 – Etapas da extração dos pigmentos.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Doenças tropicais negligenciadas reconhecidas pela OMS.....	18
Quadro 2 – Classificação Clínica das leishmanioses e principais espécies causadoras	34
Quadro 3 – Via de administração, efeito colateral/adverso e contraindicação dos principais fármacos usados no tratamento da leishmaniose.....	44
Quadro 4 – Bactérias isoladas do ambiente antártico.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (incubadora)
C3b	Fragmento de Componente 3 do Complemento
CD	Grupo de diferenciação (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
CR1, CR3	Receptor do Complemento Tipo 1 e Tipo 3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
DUDH	Declaração Universal dos Direitos Humanos
EACF	Estação Antártica Comandante Ferraz
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção enzimática
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fc γ Rs	Receptores para a porção Fc de IgG
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOANTAR	Projeto Fiocruz na Antártica
FnRs	Receptores de fibronectina
G0/G1/S	Fase de repouso / intermediária 1 / síntese do ciclo celular
G2 / M	Fase intermediária 2 do ciclo celular / fase de Mitose
gp63	Glicoproteína 63
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
<i>L. (L.)</i>	<i>Leishmania</i> do subgênero <i>Leishmania</i>
<i>L. (V.)</i>	<i>Leishmania</i> do subgênero <i>Viannia</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LC3	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
LDPC	Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar

LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
M1	Macrófago Classicamente Ativado
M2	Macrófago Alternativamente Ativado
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe 2
MPO	Mieloperoxidase
MR	Receptor de Manose
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NE	Elastase de Neutrófilos
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NLR	Receptores do tipo NOD (do inglês, <i>Nod Like Receptor</i>)
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPERANTAR	Operação Antártica Brasileira
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PBS	Tampão Fosfato-Salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PI3K/AKT	Via do fosfatidilinositol-3-quinase / Proteína Quinase B
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro
PSG	Gel Secretado Por Promastigotas
rDNA	DNA Recombinante
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Sb ⁵⁺	Antimoniais Pentavalentes
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutase
T _H	Linfócito T auxiliar (do inglês, <i>T helper</i>)
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
T _{reg}	Linfócito T Reguladores
TLR	Receptor tipo Toll (do inglês, <i>Toll-like Receptor</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Doença tropicais negligenciadas.....	16
3.2 Aspectos Gerais da leishmaniose.....	19
3.2.1 Epidemiologia da leishmaniose nas Américas.....	21
3.2.2 Agente etiológico e vetor da leishmaniose.....	24
3.2.3 Ciclo de Transmissão.....	26
3.2.4 Imunopatogênese.....	28
3.2.5 Classificação Clínica.....	34
3.2.6 Farmacoterapia.....	38
3.3 Pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos.....	45
3.4 Antártica – características ambientais e potencial biotecnológico.....	48
3.4.1 Metabólitos microbianos com atividade biológica de importância clínica.....	51
4 METODOLOGIA.....	54
4.1 Estudo experimental: Produção dos extratos bacterianos e ensaios farmacológicos....	54
4.1.1 Obtenção dos produtos naturais oriundos de bactéria antárticas.....	54
4.1.2 Cultivo e produção de biomassa.....	55
4.1.3 Extração de pigmentos intracelulares bacterianos.....	56
4.1.4 Manutenção da linhagem macrófagos.....	58
4.1.5 Determinação da viabilidade celular.....	58
4.1.6 Ensaio de viabilidade de promastigotas de <i>Leishmania</i>	58
4.1.7 Análise estatística.....	59
4.2 Estudo da literatura: Bioprodutos fúngicos com atividade leishmanicida – avaliação do estado da arte.....	59
5 PRODUTOS.....	60
5.1 PRODUTO 1.....	61
5.2 PRODUTO 2.....	75
REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica mundial passa por importantes transformações estruturais gerada por alterações demográficas e na carga de incidência das doenças (transição epidemiológica). Em países desenvolvidos observa-se um predomínio de doenças crônicas não transmissíveis, resultando em um processo de forte incentivo para o desenvolvimento de medicamentos destinados a esse mercado. Em contraste, na maioria dos países não desenvolvidos verifica-se a persistência de alta taxa de prevalência de doenças infecciosas associadas à condições de vulnerabilidade social. Nesse último cenário, como as perspectivas de retorno financeiro são baixas, o setor farmacêutico desloca ínfimos investimentos em pesquisa e desenvolvimento para atender às necessidades médicas dessas regiões (BERMUDEZ; COSTA; NORONHA, 2020; REIS; BARBOSA; PIMENTEL, 2016; TROUILLER et al., 2002).

O acesso a medicamentos representa um dos componentes vitais do direito à saúde, haja vista que eles constituem uma intervenção terapêutica valiosa para assegurar a melhoria das condições de saúde das populações, pois podem prevenir, curar, controlar ou reduzir a morbimortalidade associada a doenças e agravos (BERMUDEZ, 2014; BERMUDEZ; COSTA; NORONHA, 2020). Entretanto, a saúde global é marcada por uma notória iniquidade no acesso à assistência farmacêutica que afeta sobremaneira os países economicamente vulneráveis, o que acaba refletindo em uma distribuição desigual das formas de adoecimento ou morte ao redor do mundo (FORTES; RIBEIRO, 2014).

A leishmaniose exemplifica esse quadro de negligenciamento e iniquidade. Essa doença é uma antropozoonose (doença própria de animais, que pode ser acidentalmente transmitida aos seres humanos) provocada por protozoários do gênero *Leishmania*, com transmissão vetorial feita por diferentes espécies de flebotomíneos. A leishmaniose no passado ocorria de forma endêmica, principalmente em áreas rurais, porém, ao final da década de 1970 ela reemerge, aumentando sua incidência e ampliando sua área de transmissão para regiões urbanas, anteriormente consideradas incólumes, estando no presente, distribuída amplamente no mundo, e em especial afetando populações pobres (AKHOUNDI et al., 2016; RIFFEL; DE OLIVEIRA VAZ, 2018).

As manifestações clínicas da leishmaniose variam de lesões cutâneas a acometimento visceral, que podem apresentar elevada letalidade quando não tratada devido ao comprometimento de órgãos vitais e possíveis infecções secundárias. A luta contra a leishmaniose é uma tarefa difícil, pois os tratamentos atuais são longos, caros, requerem

hospitalização, no qual os pacientes são submetidos a dolorosas injeções, podendo gerar graves efeitos colaterais devido à toxicidade. Esses fatores contribuem para inviabilidade ou abandono do tratamento. Perceber, portanto, a importância de aprimorar os tratamentos para leishmaniose atualmente disponíveis, visto que estão longe do ideal no que diz respeito à segurança e eficácia. (DNDI, 2019b).

Nesse contexto, a busca por novas e eficientes moléculas bioativas se tornou um ponto focal de interesse para a modernização da farmacoterapia de doenças infecciosas. Para este propósito, a bioprospecção em ambientes subexplorados, como a Antártica, tem sido reconhecida como uma ferramenta promissora para a descoberta de substâncias com diferentes aplicações biotecnológicas e medicamento úteis (DANILOVICH et al., 2018; GIUDICE; FANI, 2016; LIU et al., 2013).

Diante disso tudo, o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (UFAL / Campus A.C. Simões) em colaboração com o Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (UFAL / Campus Arapiraca), têm buscado identificar novos candidatos a fármacos que atendam às necessidades de inovação na saúde pública brasileira em consonância com agenda global. Nesse sentido, o presente estudo visou investigar a atividade leishmanicida de extratos de bactérias isoladas da antártica, diante do potencial biotecnológico e farmacológico desses produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade de candidatos a protótipo de fármacos leishmanicidas à base de extratos de bactérias antárticas isoladas de líquens e sedimento, que constituam opções terapêuticas mais seguras ao tratamento da leishmaniose. Realizar uma revisão sistemática acerca do potencial leishmanicida de metabólitos fúngicos.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar bactérias isoladas de solo e líquens da antártica;
- Produzir extratos pigmentados a partir da biomassa das bactérias cultivadas;
- Determinar a citotoxicidade dos produtos naturais para a célula hospedeira (macrófagos);
- Verificar a ação dos mesmos sobre promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* e *(L.) amazonensis*;
- Identificar a seletividade dos produtos naturais para diferentes espécies do gênero *Leishmania*;
- Realizar uma revisão sistemática acerca do potencial leishmanicida de metabólitos fúngicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença tropicais negligenciadas

A organização Médicos sem Fronteiras (2001) propõe uma classificação para as doenças, agrupando-as em três categorias: Doenças Globais (aquelas que ocorrem em todo o mundo); Doenças Negligenciadas (mais prevalentes nos países em desenvolvimento); e Doenças Extremamente Negligenciadas (exclusivas dos países em desenvolvimento). Essas duas últimas categorias são representadas por um grupo de diversas doenças transmissíveis causadas por diferentes patógenos como bactérias, fungos, protozoários e vírus, que afetam predominantemente cerca de 159 países emergentes e subdesenvolvidos em regiões tropicais. Devido a essas características, tem-se convencionado chamar esse grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) (WHO, 2017).

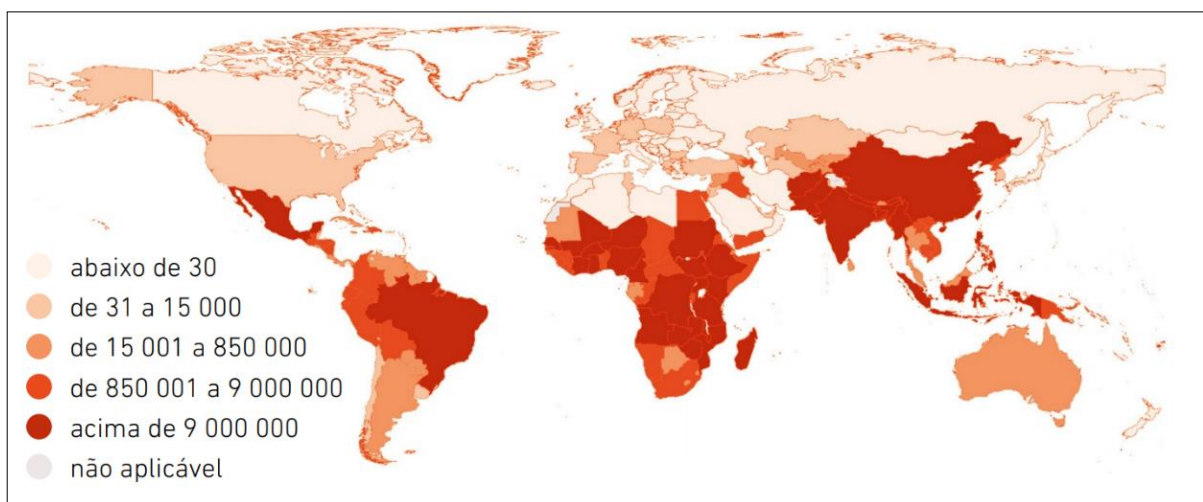
Essas doenças variam em sua epidemiologia e impacto na saúde pública, porém, possuem em comum, a forte relação com condições de pobreza numa conjuntura de baixo índice de desenvolvimento humano (IDH) e de deterioração ambiental e sanitária. Por essa razão, é possível encontrar na literatura científica a terminologia “doenças infecciosas da pobreza” como sinônimo de DTNs (ANDRADE, 2015).

Mais recentemente, uma nova visão tem emergido nas discussões a respeito das doenças tropicais, nessa perspectiva mais contemporânea elas são tidas como “doenças promotoras da pobreza”, haja vista que tais doenças geram diversos agravos como: desnutrição, deficiências físicas, estigma social e discriminação, o que e muitas vezes inabilita os indivíduos para atividades laborais e reduz a taxa de escolarização, acarretando consequências econômicas e sociais que afetam negativamente as famílias e comunidades. Portanto, essas doenças promovem a perpetuação do ciclo de pobreza, constituindo um entrave ao desenvolvimento humano dos países acometidos (ANDRADE, 2015; DNDI, 2018; MITRA; MAWSON, 2017).

Por muito tempo as doenças negligenciadas não foram exclusividade dos países tropicais. Elas estiveram altamente prevalentes em grande parte do mundo, entretanto, ao longo do tempo, a gradual mudança nos padrões de saúde dos países do hemisfério norte, caracterizada por melhora nas condições de moradia, alimentação e saneamento básico, resultou em uma transformação epidemiológica evidenciada pelo progressivo desaparecimento das doenças infecciosas e parasitárias, que hoje em dia permanecem endêmicas nos países tropicais, compondo as DTNs (VON PHILIPSBORN et al., 2015; WHO, 2017).

Os países da África, Ásia, América Latina e Caribe são os mais atingidos (**Figura 1**). Esses países possuem população com baixo poder aquisitivo e, portanto, não respondem ao anseio de retorno financeiro do setor farmacêutico, o que gera uma distribuição desigual entre os países desenvolvidos e os não-desenvolvidos no acesso a recursos de cuidados em saúde (diagnóstico, medicamentos, vacinas) (WHO, 2015, 2017).

Figura 1– Número de pessoas precisando de tratamento e cuidado para doenças negligenciadas em 2016 segundo a Organização Mundial da Saúde.



Fonte: Adaptado de DNDI, 2018, p.2.

As DTNs afetam mais de 1,5 bilhão de pessoas e cerca de 3 bilhões estão expostas ao risco de adquirir uma ou mais dessas doenças em todo o mundo (WHO, 2017). Em conjunto, as DTNs provocam, anualmente, cerca de meio milhão de mortes no mundo (HOTEZ et al., 2006, 2014). Até mesmo as doenças consideradas relativamente simples e que possuem tratamento cujo valor não chega à um dólar por dia, geram inúmeras mortes (CDC, 2018; IQVIA, 2019).

Nos primeiros relatórios da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas (WHO 2010, 2013, 2015) 17 enfermidades eram classificadas como DTNs, porém, em 2017 a cromoblastomicose e outras micoses profundas, a sarna e outros ectoparasitas e o envenenamento por picada de cobra foram adicionados à lista. Portanto, atualmente 20 DTNs são reconhecidas pela OMS (WHO, 2017). Todas elas estão elencadas no **Quadro 1**.

Quadro 1– Doenças tropicais negligenciadas reconhecidas pela OMS.

Categoria	Doenças
Infecções por protozoários	1. Doença de Chagas 2. Doença do sono (tripanossomíase humana africana) 3. Leishmaniose
Infecções helmínticas	4. Teníase e neurocisticercose 5. Dracunculíase (doença do verme-da-guiné) 6. Equinococose 7. Trematodíases de origem alimentar 8. Filariose linfática (elefantíase) 9. Oncocercose (cegueira dos rios) 10. Esquistossomose (barriga d'água) 11. Helmintíases transmitidas pelo solo (ascaridíase, ancilostomíase, tricuriíase, estrogiloidíase)
Infecções bacterianas	12. Úlcera de buruli 13. Hanseníase; 14. Tracoma 15. Boubá
Infecções virais	16. Dengue e Chikungunya 17. Raiva
Infecções fúngicas	18. Micetoma, Romblastomicose e outras micoses profundas
Infecções ectoparasitárias	19. Escabiose, Miíase e outras doenças causadas por ectoparasitas
Veneno	20. Envenenamento por picada de cobra

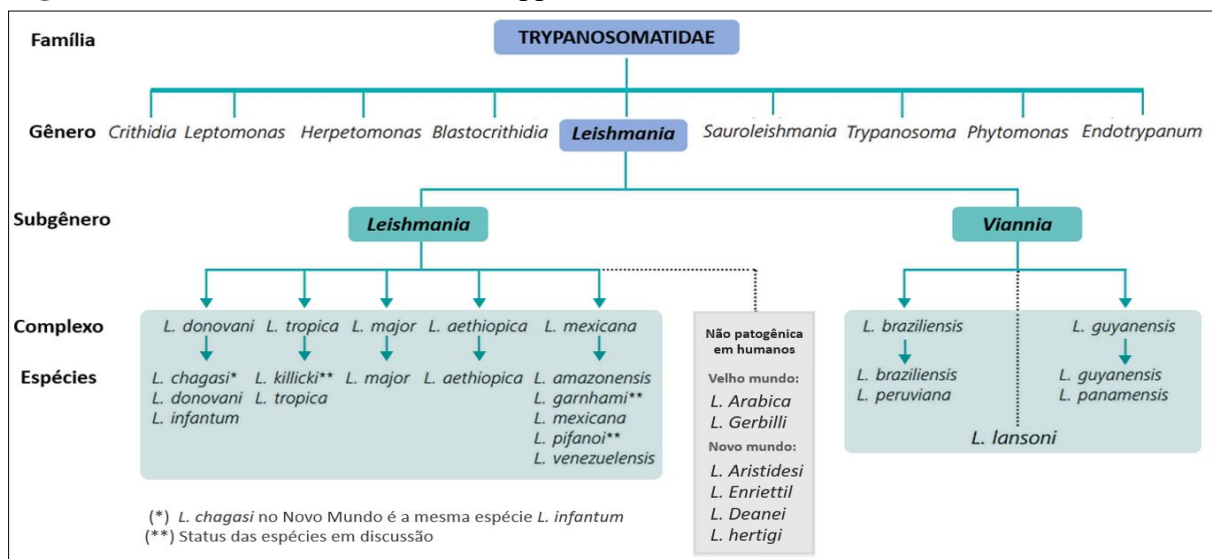
Fonte: Adaptado de ADDISU et al., 2019, p. 2.

A partir desta perspectiva, é possível perceber que ainda há falhas nas políticas públicas de controle e eliminação das DTNs, acarretando um permanente panorama de altas taxas de prevalência e incidência dessas doenças. A incompreensão da complexidade e multicausalidade das DTNs estão entre os principais motivos que levam ao insucesso dessas políticas. O predomínio de soluções pautadas majoritariamente no campo biomédico como ênfase na doação de medicamentos é uma estratégia equivocada, pois para que esses medicamentos cheguem aos pacientes, primeiramente é necessário o fortalecimento dos sistemas de cuidados de saúde primária dos países vulneráveis (COHEN et al., 2016; HOTEZ, 2018).

3.2 Aspectos Gerais da leishmaniose

A leishmaniose é uma parasitose, de caráter antroponóico (doença primária de animais que pode ser transmitida ao homem), causada por protozoários pertencentes a ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Em mamíferos, mais de 25 espécies de *Leishmania* já foram descritas, dentre elas, 19 são infecciosas para humanos (OPS, 2019a). Inicialmente a diferenciação de espécies era baseada na distribuição geográfica ou apresentação clínica, contudo, atualmente, a taxonomia da *leishmania* é feita por meio de análises de material genético com técnicas de biologia molecular (AKHOUNDI et al., 2016). A **figura 2** representa uma proposta taxonômica do gênero *Leishmania*.

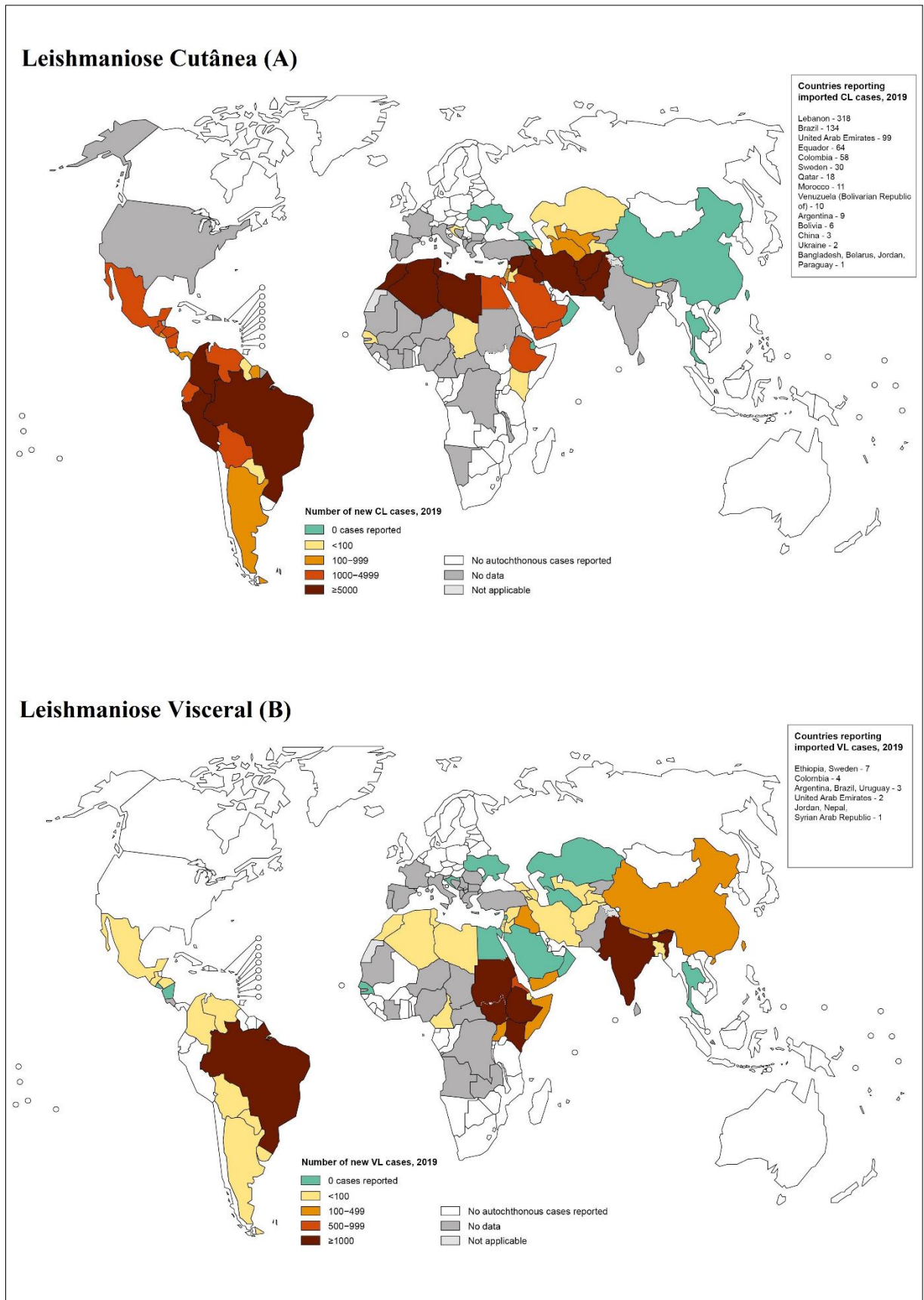
Figura 2 – Taxonomia de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de OPS, 2019a, p. 17.

A leishmaniose possui ampla distribuição geográfica, como mostra a **figura 3**. Estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco e que haja incidência de 1,3 milhões infecções anualmente, em todo o mundo. Essa doença é considerada endêmica em mais de 100 países sendo responsável por 20.000 a 30.000 mortes por ano, principalmente de indivíduos de populações pobres de regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, América Latina e Mediterrâneo (OPS, 2019a). Por prevalecer em condições de vulnerabilidade socioeconômica e não despertar o interesse das indústrias farmacêuticas a OMS classifica a leishmaniose como uma doença negligenciada (WHO, 2016).

Figura 3 – Status endêmico da leishmaniose cutânea (A) e visceral (B) no mundo, 2019.

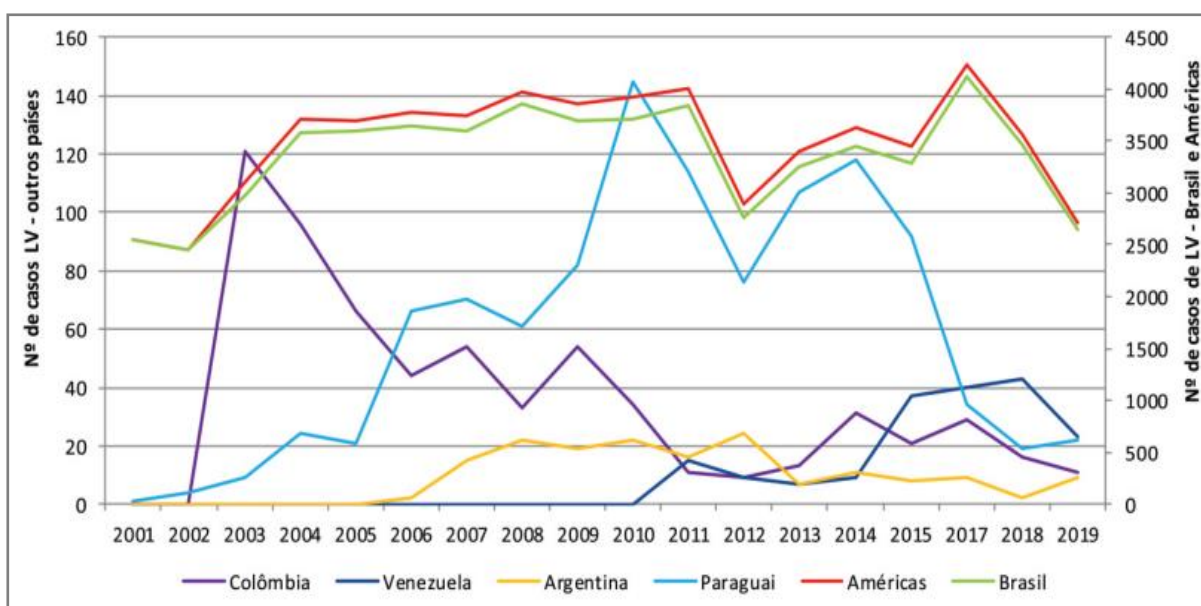


Fonte: Adaptado de WHO, 2021.

3.2.5 Epidemiologia da leishmaniose nas Américas

A leishmaniose visceral é endêmica em 13 países das Américas. Nessa região, entre os anos de 2001 a 2019, foram registrados 65.934 casos novos de LV (**Figura 4**). Em 2019, o Brasil representou 97,16% do total de registros com 2.529 casos, os demais foram notificados na Venezuela (23); Paraguai (22); Colômbia (11); Argentina (9); Honduras (3); Uruguai (3); Bolívia (1); Guatemala (1); México (1). A incidência de LV nas Américas em 2019 foi de 0,47 casos por 100.000 habitantes com letalidade de 7,7%. Do total de casos, 68,2% evoluíram para cura. Somente o Brasil, Colômbia, Guatemala, Honduras e Venezuela apresentarão redução no número de casos (OPAS, 2020).

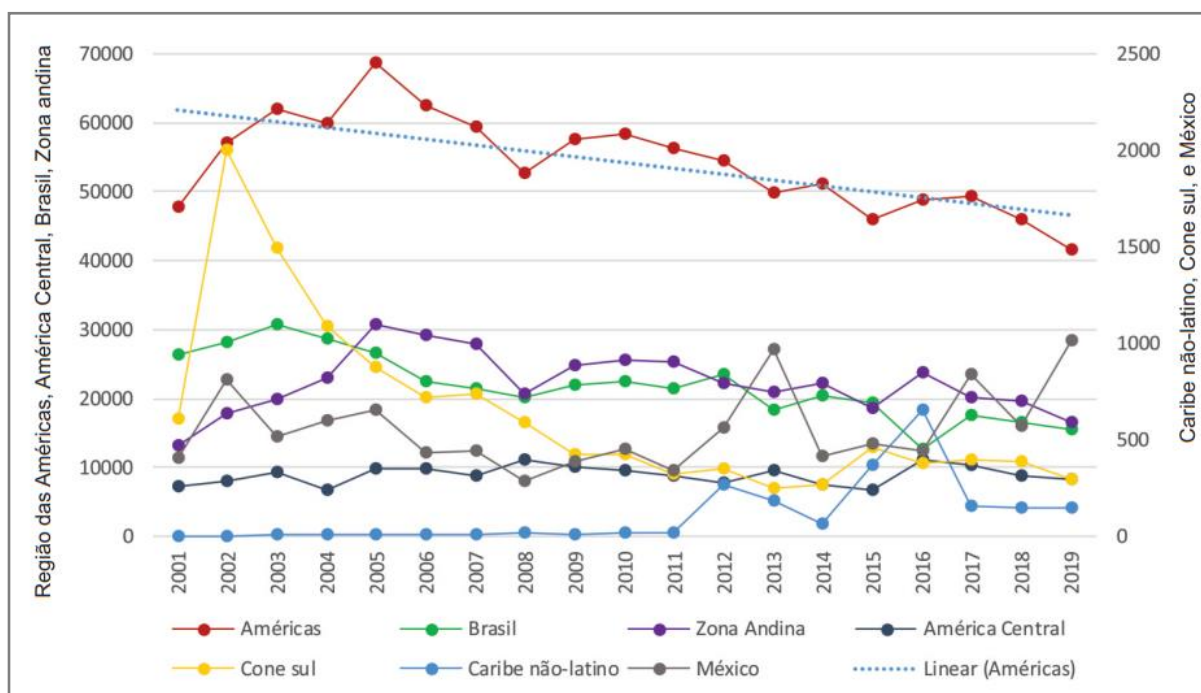
Figura 4 – Casos de leishmaniose visceral nos países das Américas (2001-2019)



Fonte: OPAS, 2020, p.5.

Nas Américas a leishmaniose cutânea/mucosa apresenta números vultuosos de registros. De 2001 a 2019, 18 países endêmicos notificaram à OPAS uma média de 54.108 casos por ano, totalizando 1.028.054 casos nesse período. Em 2019 a taxa de incidência foi de 18,78 casos por 100.000 habitantes. O Brasil segue sendo o país com maior número de casos com 15.484 notificações. Desde 2015, as Américas têm apresentado uma tendência de decréscimo nos casos de leishmaniose cutânea/mucosa (**Figura 5**), apesar disso, houve uma expansão geográfica da doença (OPAS, 2020).

Figura 5 – Casos de leishmaniose cutânea Região das Américas e sub-regiões (2001-2019).

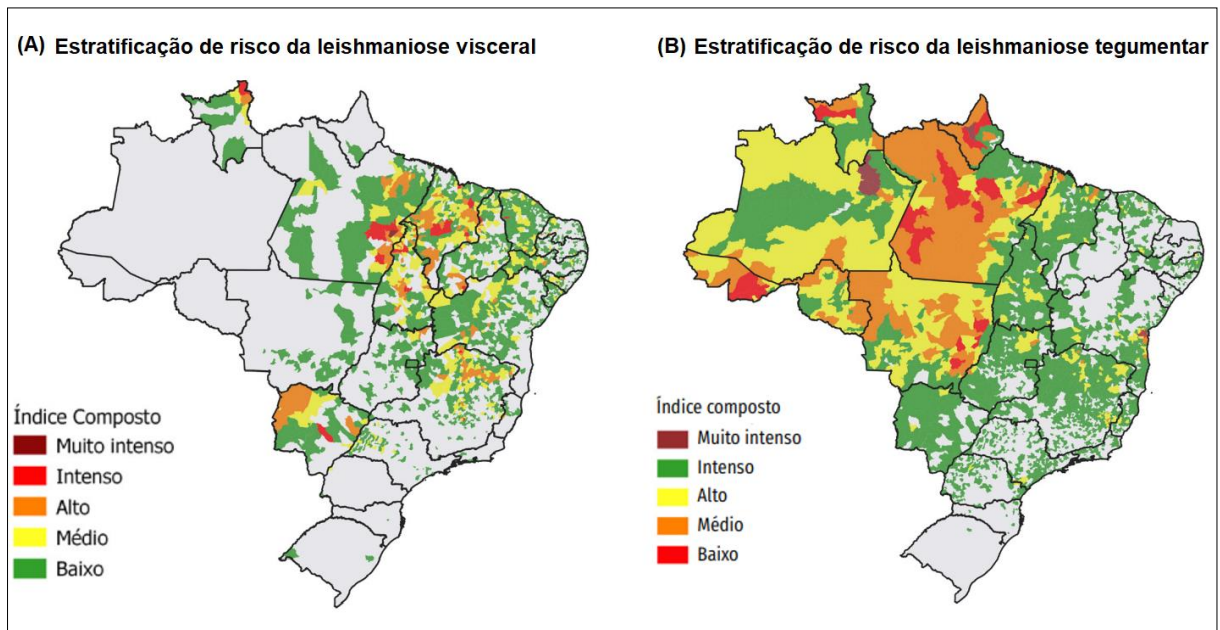


Fonte: OPAS, 2020, p.2.

A dificuldade para erradicação da leishmaniose está associada principalmente a baixos investimentos em recursos de combate à miséria e promoção do acesso à assistência médica/farmacêutica de populações vulneráveis, e ações de contenção da disseminação da doença, essencialmente, no que diz respeito ao controle vetorial (OPS, 2017). Nesse contexto a América Latina tem enfrentado muitos desafios, porém cada país apresenta diferentes perfis de avanços ou retrocessos no combate das leishmanioses (OPAS, 2020).

O Brasil no âmbito da Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde), desde 2017, utiliza o Índice Composto de Leishmaniose (ICL) para realizar a classificação epidemiológica dos municípios com transmissão da leishmaniose. Esse indicador, desenvolvido pela OPAS, toma como base o número absoluto de casos novos e a taxa de incidência da doença nos últimos três anos, para estratificar os municípios em cinco categorias de transmissão: muito intenso, intenso, alto, médio e baixo (BRASIL, 2021). A estratificação de risco da leishmaniose no Brasil em 2019 utilizando o ICL é demonstrado na **figura 6**.

Figura 6 – Estratificação de risco da leishmaniose visceral (A) e tegumentar (B) por município de infecção no Brasil, 2017 a 2019.



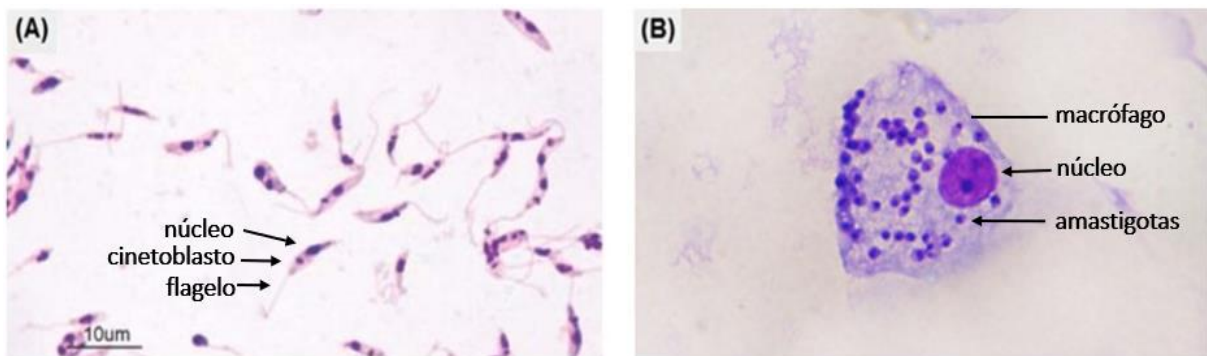
Notas: Dados obtidos no Sinan / Ministério da Saúde. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2021.

Em 2019, o Brasil apresentou uma taxa de incidência de 1,2 casos de LV a cada 100 mil habitantes com 9% de letalidade (a pior marca da última década). A região Nordeste foi responsável pelo maior registro de casos do país com 49,1% dos 2.529 casos novos confirmados. Um agravante preocupante é o aumento em todo país dos registros de coinfeção *Leishmania*/HIV, chegando em 2019 a 11,1% do total de casos de LV. No mesmo ano, foram confirmados 15.484 casos novos de LT no Brasil, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a cada 100 mil habitantes, no qual os maiores percentuais de registros ocorreram na região Norte (42,8%). Do total de pacientes notificados no país (15.484 casos) 67,1% evoluíram para cura clínica, sendo registrados 19 óbitos (BRASIL, 2021).

3.2.2 Agente etiológico e vetor da leishmaniose

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida heteróximo (digenético), que envolve um hospedeiro vertebrado (humanos e outros animais) e um hospedeiro invertebrado (flebotomos). Durante o ciclo os parasitos apresentam duas formas evolutivas. A forma promastigota, que se desenvolve no tubo digestivo do flebotomo, possui corpo celular afunilado que mede cerca de 10 μm , núcleo, cinetoplasto e flagelo (**Figura 7A**). A amastigota é a forma aflagelada, ela possui corpo ovóide que mede 2,5 a 3,5 μm e se desenvolve intracelularmente nos fagócitos do hospedeiro vertebrado (**Figura 7B**) (SUNTER; GULL, 2017; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

Figura 7 – Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: (A) adaptado OPS, 2019a, p. 18, (B) adaptado de FIOCRUZ, 2008.

Os vetores responsáveis pela transmissão da leishmaniose em humanos, são dípteros (insetos) nematóceros de diferentes espécies dos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) que pertencem à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (AKHOUNDI et al., 2016; SADLOVA et al., 2013).

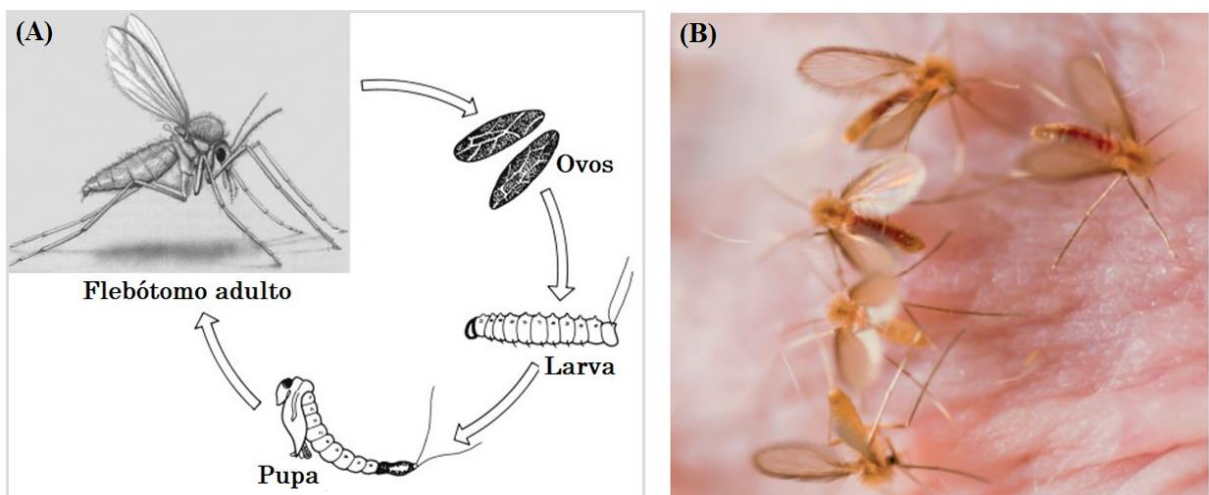
Os flebotomíneos são holometábolos, as etapas do seu ciclo de vida (**Figura 8A**) compreendem a fase de ovo que eclodem de 7 a 10 dias após a postura, dando origem a fase larval com quatro estádios de desenvolvimento que após em média de 20 a 30 dias, transformam-se em pupas permanecendo imóveis por volta de 15 dias. Na fase adulta (**Figura 8B**), o flebotomíneo mede 1 a 3 mm de comprimento, possui pernas longas e delgadas, corpo e as asas cobertos de cerdas de coloração que varia do amarelo ao castanho claro, seu aparelho bucal apresenta uma probóscide adaptada para picar e sugar. Os machos e fêmeas adultos de

flebotomíneos possuem como fonte primária de energia, néctar e seiva de plantas, porém as fêmeas necessitam se nutrir com sangue de vertebrados (hematofagia) para a maturação dos seus ovos, portanto, somente as fêmeas atuam como vetores da leishmaniose (BRASIL, 2014; BRAZIL; RODRIGUES; ANDRADE FILHO, 2015).

O habitat natural dos flebotomíneos originalmente são regiões silvestres, entretanto, devido à ação antrópica de degradação ambiental ligada à atividade agrícola e expansão urbana, muitas espécies de flebotomíneos têm se adaptados a áreas menos florestadas, especialmente espaços peridomiciliares, estabelecendo, desse modo, um maior contato com humanos (LAINSON; RANGEL, 2005; RANGEL; LAINSON, 2009).

Os flebotomíneos são popularmente conhecidos como mosquito-palha, birigui, mosca de areia (*sand fly* - em inglês), entre outros nomes (BRASIL, 2014; MAROLI et al., 2013). Esses insetos vivem preferencialmente no nível do solo, sua atividade é maior durante o crepúsculo e a noite, período em que procuram alimentos realizando pequenos voos saltitantes. Durante o dia, eles se abrigam em locais escuros e protegidos, como troncos de árvores, folhas caídas no solo, fendas de rochas, grutas, tocas de animais (DIAS et al., 2011; SILVA et al., 2008; SUCEN, 2006).

Figura 8 – Etapas do ciclo de vida do *Phlebotomus* spp. (A). Flebótomos fêmeas adultas durante o repasto sanguíneo (B).



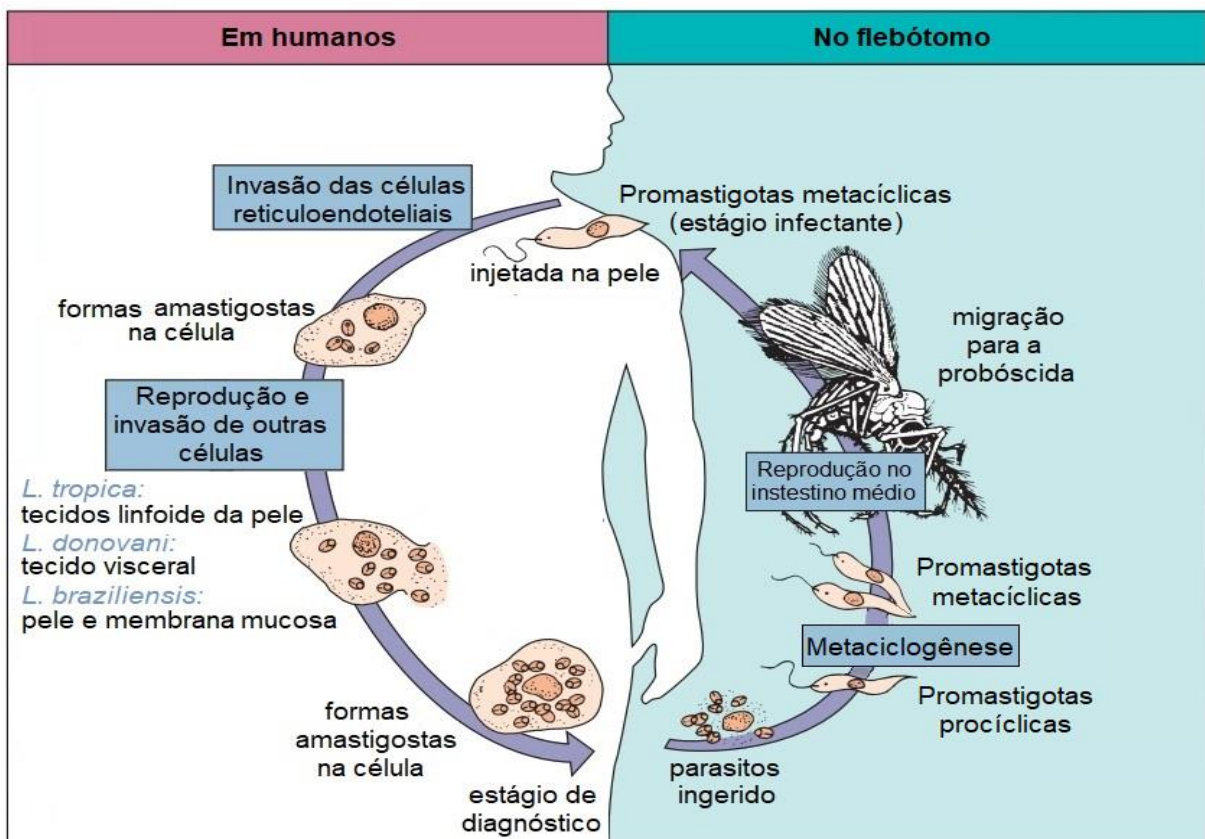
Fonte: (A) Adaptado de BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2019, p. 343. (B) DENLINGER et al., 2016, p. 3.

3.2.3 Ciclo de Transmissão

O ciclo de transmissão da leishmaniose ocorre em diferentes padrões epidemiológicos a depender da espécie de *Leishmania*, dos fatores ambientais e dos hábitos das populações humanas das regiões acometidas. Nas Américas, a leishmaniose é uma zoonose de zonas rurais e urbanas que acomete roedores, marsupiais, primatas, canídeos silvestres, cães domésticos e humanos (AKHOUNDI et al., 2016) Na Índia, a leishmaniose é uma zoonose urbana, cuja transmissão é mantida predominantemente entre indivíduos adultos (MUNIARAJ, 2014).

O ciclo de transmissão da leishmaniose inicia-se com o repasto sanguíneo, de fêmeas de flebotomos infectadas com *Leishmania*, que acabam inoculando formas promastigotas metacíclicas do parasito na pele do hospedeiro vertebrado, instaurando, dessa forma, a infecção (CDC, 2020; PIMENTA et al., 2018). A **Figura 9** ilustra as diferentes etapas do ciclo de transmissão da *Leishmania*.

Figura 9 – Ciclo de desenvolvimento e transmissão da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de MURRAY et al., 2015, p.742.

Após a inoculação, os parasitos são reconhecidos e internalizados por diferentes células fagocíticas, sendo aprisionados em compartimentos intracelulares, que sofrem fusões com organelas endocíticas, lisossomos e vesículas autofágicas resultando em compartimentos ácido semelhantes a fagolisossomos chamados de vacúolos parasitóforos. No interior desses vacúolos especializados, as formas promastigotas metacíclicas sofrem mudanças morfológicas e fisiológicas diferenciando-se em amastigotas que estabelecem uma residência intracelular e se multiplicam por divisão binária, provocando a lise das células hospedeiras com a liberação dos parasitos, que poderão, então, ser interiorizada por novos fagócitos (PIMENTA et al., 2018; REAL; MORTARA, 2012). Porém a disseminação das formas amastigotas não ocorre apenas mediante eventos citolíticos, mas também, por meio de fenômeno de transferências no qual macrófagos infectados promovem a extrusão de amastigotas dentro de estruturas zeióticas que são então resgatados seletivamente por outros macrófagos adjacentes. Esse comportamento representa um escape do sistema imunológico do hospedeiro, pois permite a migração sem exposição ao meio extracelular. Por esses diferentes meios, os parasitos podem atingir outros locais do corpo, como tecidos cutâneos, mucosos e órgãos viscerais (fígado e baço), gerando distintas formas clínicas da doença (REAL et al., 2014).

Para que haja a continuidade do ciclo, é necessário que o flebótomo pique um indivíduo infectado, ingerindo formas amastigotas livres no sangue ou presentes no interior das células. No intestino médio do vetor (ambiente com maior pH e menor temperatura), os parasitos se transformam em promastigotas procíclicas que irão atingir a maturação remodelando sua arquitetura celular e propriedades fisiológicas, em um processo chamado de metaciclogênese, transformando-se em promastigotas metacíclicas (ROSSI; FASEL, 2017).

Durante essa diferenciação, as promastigotas de *Leishmania* secretam um gel rico em proteofosfoglicanos (PSG). Esta matriz densa forma um tampão que obstrui o intestino médio do flebótomo. No decurso desse processo as promastigotas metacíclicas sofre modificações bioquímicas em sua superfície perdendo a capacidade de aderirem ao epitélio do intestino médio do flebótomo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se e migram para a probóscida do flebótomo onde são regurgitadas durante um novo repasto sanguíneo e desse modo, novos indivíduos podem ser infectados (GIRAUD et al., 2019; ROGERS, 2012).

3.2.4 Imunopatogênese

A patogenia da leishmaniose é ditada em grande parte pelo tipo e magnitude da resposta imunológica do hospedeiro que envolve mecanismos do sistema imune inato (células fagocitárias, sistema complemento e células *Natural Killer* - NK) e adquirido (linfócitos T e B). Além disso, a suscetibilidade ou resistência à infecção é determinada pela espécie de *Leishmania* e influenciada por fatores vetoriais (KHADEM; UZONNA, 2014; SCOTT; NOVAIS, 2016).

A fêmea de flebotomíneo, para realizar a hematofagia, introduz suas peças bucais na pele do hospedeiro até chegar às camadas superficiais da derme, onde cortam tecidos e dilaceram capilares formando um pequeno poço subcutâneo de sangue (estratégia denominada telmatofagia ou *pool-feeder*). Esse processo ativa o sistema imunológico e hemostático do hospedeiro, prejudicando o repasto sanguíneo. Para superar esses obstáculos, o flebotomíneo secreta saliva na derme com inúmeros componentes farmacologicamente ativos com propriedades imunomoduladora, anti-inflamatórias, anticoagulantes, antiplaquetárias e vasodilatadoras (ANDRADE et al., 2007; GOMES; OLIVEIRA, 2012; MARTINS, 2015).

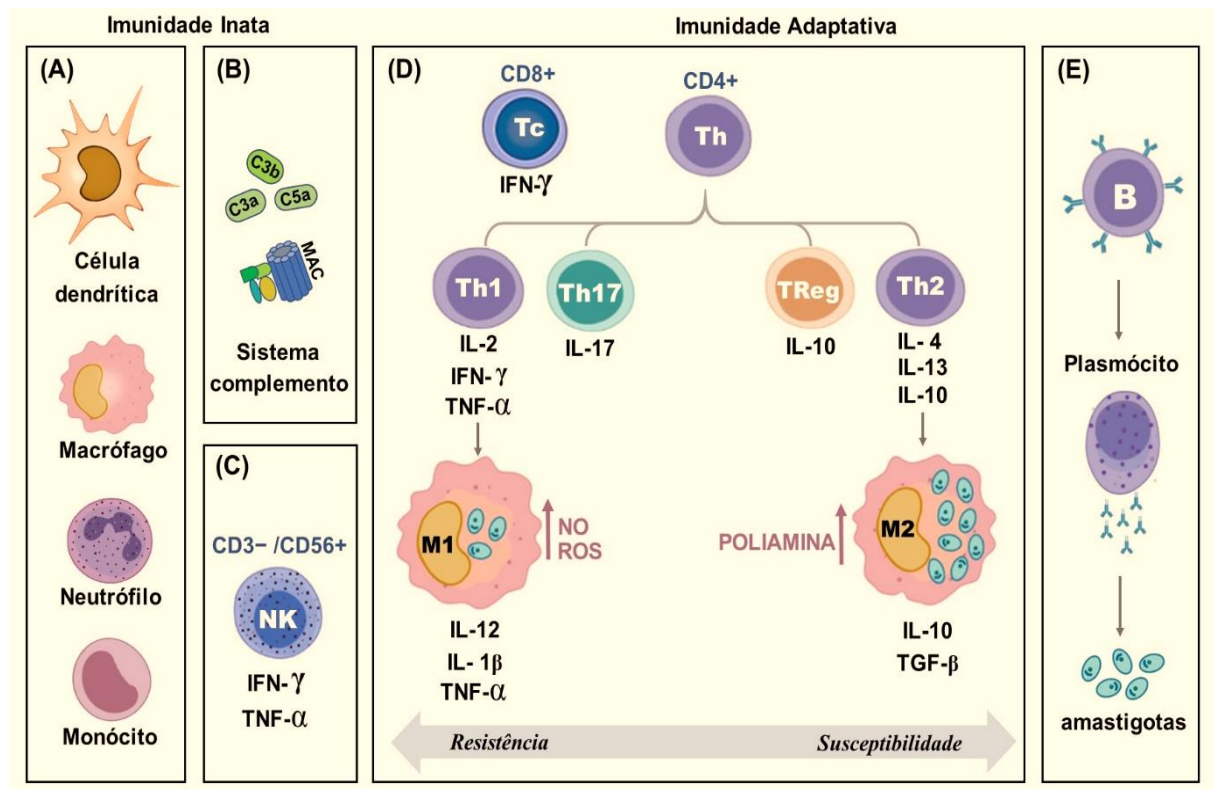
Durante a telmatofagia de um flebotomíneo infectado, as promastigotas de *Leishmania* são coinoculadas com a saliva, no local de alimentação. Os parasitos, então, se beneficiam das alterações imunológicas promovidas pelos componentes salivares. Desse modo, a saliva do vetor exerce um efeito potencializador da infecção por *Leishmania* (ABDELADHIM; KAMHAWI; VALENZUELA, 2014; DE CASTRO et al., 2017; LESTINOVA et al., 2017).

Os primeiros eventos da infecção são caracterizados pelo reconhecimento e captação dos parasitos por diferentes células apresentadoras de antígenos (APCs) como células dendríticas dérmicas e macrófagos residentes, entretanto essas células sentinelas não são suficientemente capazes de conter a infecção, o que resulta no recrutamento de neutrófilos, monócitos e macrófagos (**Figura 10A**) para o local da inoculação (SCOTT; NOVAIS, 2016; TIBÚRCIO et al., 2019).

Os neutrófilos são os primeiros leucócitos que migram para o local da infecção. Essas células possuem grânulos contendo proteínas antimicrobianas como elastase de neutrófilos (NE) e mieloperoxidase (MPO), produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) e podem capturar e destruir parasitos extracelulares liberando estruturas chamadas "armadilhas extracelulares de neutrófilos" (NETs), compostas de cromatina com proteínas citosólicas e granulares. Em contrapartida, algumas espécies de *Leishmania* desenvolveram mecanismos

para resistir aos neutrófilos, como interferir no processo de fusão dos grânulos com o fagossomo contendo os parasitos. Dessa forma a *Leishmania* transforma os neutrófilos em hospedeiros temporários, pois essas células possuem vida curta e acabam por sofrer apoptose espontânea liberando corpos apoptóticos infecciosos que protegem os parasitos da resposta imune humoral e facilita a internalização em APCs de forma silenciosa, inibindo o reconhecimento e ativação de mecanismos microbicida desses fagócitos, favorecendo a progressão da infecção (BARHOUMI et al., 2019; GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; REGLI et al., 2017).

Figura 10 – Principais atores da resposta imune inata e adaptativa durante a patogenia da leishmaniose



Notas: As células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, monócitos e *Natural Killer* (NK) juntamente com as proteínas do sistema complemento, a exemplo das anafilatoxinas C3a e C5a, a opsonina C3b e o complexo de ataque à membrana (MAC), são importantes mediadores da resposta imune inata durante a infecção por *Leishmania*. Por outro lado, a resposta adaptativa envolve a participação dos linfócitos T citotóxicos (Tc) e os linfócitos T auxiliares (Th), que se diferenciam nas subpopulação Th1, Th17, TReg e Th2 e direcionam a ativação de macrófagos em perfil clássico (M1) associado à resistência, ou alternativo (M2) associado à susceptibilidade. A resposta adaptativa conta ainda com a atividade dos linfócitos B através da produção de anticorpos direcionados aos parasitos.

Fonte: Autor (2021).

Os macrófagos juntamente com outros fagócitos mononucleares, fagocitam ativamente os corpos apoptóticos infecciosos além das promastigotas metacíclicas livres, presentes no sítio inflamatório. Os macrófagos tornam-se as principais células hospedeiras da *Leishmania*, nelas os parasitos conseguem não somente sobreviver, mas também multiplicar-se. Assim, os macrófagos são essenciais para que a *Leishmania* spp. estabeleça uma infecção bem sucedida (FALEIRO et al., 2014; ROMANO et al., 2017).

Outro componente da resposta imune inata presente desde a fase inicial da infecção por *Leishmania* spp. é o sistema complemento (**Figura 10B**). O sistema complemento auxilia no combate a infecções reconhecendo patógenos extracelulares. Essas proteínas se ativam durante cascatas de reações proteolíticas que levam à lise celular (DUNKELBERGER; SONG, 2010; MURPHY, 2014; RICKLIN et al., 2010).

Os efeitos protetores do sistema complemento são subvertidos pelos mecanismos de evasão da *Leishmania* spp. A resistência ao ataque do sistema do complemento está relacionada, entre outros fatores, à presença de moléculas de superfície de promastigotas metacíclicas, como o lipofosfoglicano (LPG) que recobre o parasito atuando como uma barreira mecânica, evitando a inserção e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), abstando o parasito da lise. O LPG também protege promastigotas englobadas no fagossomo, retardando o processo de fusão deste com as vesículas lisossomais. Outra molécula implicada no escape da atividade lítica do sistema complemento é a leishmanolisina (gp63), uma metaloprotease de 63 kDa capaz de clivar C3b ligado ao parasito gerando a forma inativa C3bi, interrompendo, desse modo, a cascata do complemento e montagem da MAC. A formação de C3bi, no entanto, promove a opsonização do parasito favorecendo a fagocitose e contribuindo para a progressão da infecção (ATAYDE et al., 2016; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012; LAUTHIER; KORENAGA, 2018).

A imunidade inata do hospedeiro também conta com a participação das células *Natural Killer* (NK) (**Figura 10C**). As células NK são importantes células linfoides que desempenham papéis críticos na vigilância imunológica contra processos neoplásicos e infecciosos. Elas constituem 5% a 15% das células mononucleares no sangue e podem ser identificadas pela expressão do marcador CD56 e ausência de CD3 de célula T (ABEL et al., 2018; FREUD et al., 2017).

Durante a infecção por *Leishmania* spp., as células NK, ao interagirem com células infectadas, são rapidamente ativadas levando a uma produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e de granzima e perforina, induzindo apoptose nas células infectadas por citotoxicidade. O IFN- γ e TNF- α produzidos pelas células NK, além de promoverem

sinergicamente a maturação de macrófagos, também auxiliam na condução da diferenciação das células T imaturas em células T_{H1} (MEIRA; GEDAMU, 2019; CAMPOS et al., 2020; SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016).

O aumento na proliferação de células NK entre as células mononucleares do sangue periférico de indivíduos curados, indicam um papel protetor das células NK na leishmaniose humana, entretanto, algumas evidências sugerem que a atividade citotóxica das NK poderia contribuir para a exacerbação das lesões de cutâneas devido à manutenção de um estado de hiperinflamação tecidual (ANTONELLI et al., 2005; BOGDAN, 2012; CUNHA et al., 2016, 2020; MESSLINGER et al., 2018).

Para que o organismo do hospedeiro consiga estabelecer uma defesa eficiente e capaz de levar a cura da leishmaniose, é fundamental que haja o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Portanto, o combate efetivo aos parasitos requer que o sistema imune utilize mecanismos potentes e especializados mediados por células T e macrófagos ativadas (**Figura 10D**) (JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019; LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008; MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2018).

A geração da imunidade adaptativa envolve a cooperação de células apresentadoras de antígenos que captam e processam os parasitos de *Leishmania* no sítio de infecção, e posteriormente migram para os linfonodos regionais, onde apresentam antígenos parasitarios aos linfócitos T $CD8^+$ e T $CD4^+$, ativando-os e induzindo-os à proliferação (GABRIEL et al., 2019; MEIRA; GEDAMU, 2019).

Resultados obtidos em de diferentes modelos de infecção por *Leishmania* têm apontado para um papel controverso das células T $CD8^+$, que podem adquirir funções patológicas ou protetoras a depender do equilíbrio entre o perfil citotóxico e da produção de $IFN\gamma$ por essas células (BOUSSOFFARA et al., 2019; CARDOSO et al., 2015; FARIA et al., 2009; SCOTT; NOVAIS, 2016; STAGER; RAFATI, 2012).

A apresentação antigênica e a produção de diversas interleucinas realizada pelas APCs, atuam em conjunto para ativar os linfócitos T helper $CD4^+$ naïve influenciando na sua polarização em diferentes populações efetoras ($Th1$, $Th2$, $Th17$) e reguladora (T_{reg}) (JAWED; DUTTA; MAJUMDAR, 2019; SCOTT; NOVAIS, 2016).

A resposta do tipo $Th1$ está relacionada a um perfil de resistência e cura. Ela é caracterizada por uma população de células T $CD4^+$ produtoras de $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$, que ativam macrófagos levando-os a um fenótipo denominado M1 (classicamente ativado), com alta capacidade de debelar amastigotas intracelulares por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO). Além disso, os macrófagos M1 secretam citocinas pró-

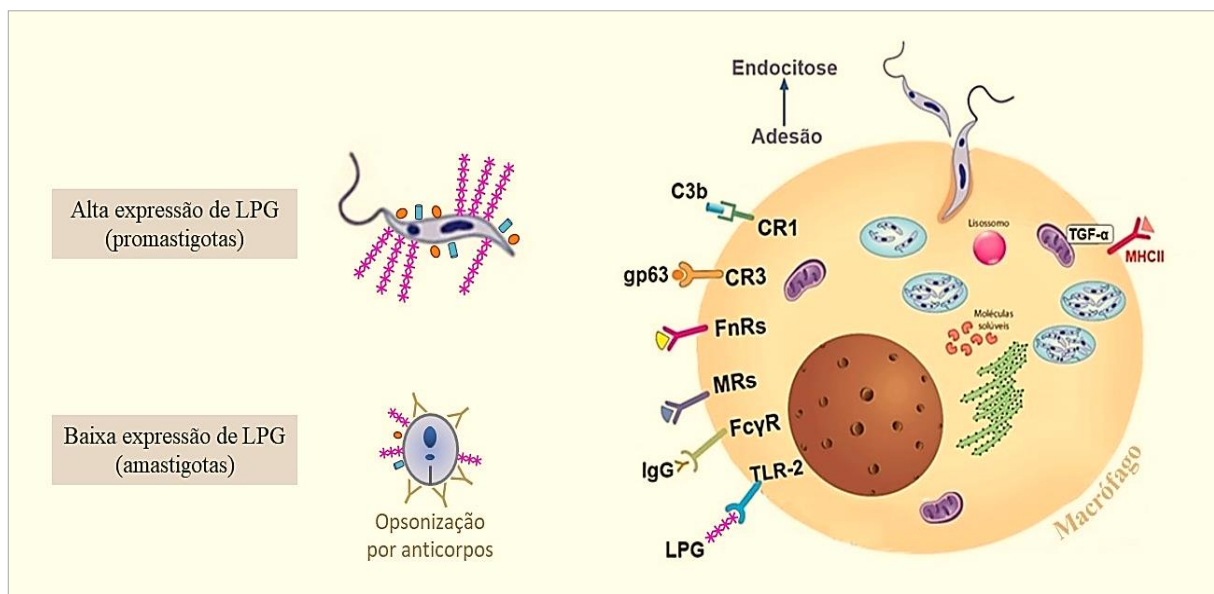
inflamatórias como IL-12, IL-1 β e TNF- α essencial para a expansão da resposta protetora. A resposta do tipo Th2 associa-se a suscetibilidade, exacerbação lesões e a cronicidade da infecção. O status de polarização Th2 é induzido pela produção de IL-4 e por baixos níveis de IL-12. Os linfócitos Th2 produzem IL-10, IL-13 e IL-4, que reduzem a expressão de IFN- γ conduzindo os macrófagos a um fenótipo M2 (alternativamente ativado), os quais secretam IL-10 e TGF- β com atividade anti-inflamatória (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; HURDAYAL; BROMBACHER, 2017; KAYE; SCOTT, 2011; KUMAR et al. , 2020; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; TY et al., 2019). O fenótipo M2 possui uma maior expressão de arginase, provocando o direcionamento do metabolismo de L-arginina para a produção de ornitinas e poliaminas em detrimento da produção de NO. As poliaminas são nutrientes importantes para o favorecimento da replicação de *Leishmania* spp. no macrófago, sendo assim, um fator de agravamento da doença (MUXEL et al., 2018).

As células Th17 e T_{reg} (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) são subpopulações de linfócitos T helper envolvidas na manutenção da homeostase imunológica. A perda do equilíbrio entre essas células é um elemento de vultosa relevância na patogênese de doenças infecciosas. No contexto da leishmaniose, as atividades das células Th17 podem ajudar na depuração de parasitos intracelulares, devido a sua colaboração com a resposta Th1 por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-17. Entretanto a liberação sustentada dessa interleucina pode gerar manifestações auto-imunes, além de um recrutamento exacerbado de neutrófilos, que levam à inflamação crônica. Em contraposição ao papel das células Th17, os linfócitos T_{reg} secretam IL-10, uma importante citocina reguladora que inibe a produção de IFN- γ , facilitando o desenvolvimento de respostas Th2 incapaz de destruir os parasitos favorecendo a suscetibilidade à infecção (BANERJEE et al., 2016; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; LEE, 2018; NOACK; MIOSSEC, 2014; ROSSI; FASEL, 2017).

A produção de TNF- α por linfócitos T e principalmente por macrófagos ativadas, durante a infecção por *Leishmania*, induz a ativação policlonal de linfócitos B com abundante produção de anticorpos anti-*Leishmania* (**Figura 10E**). Contudo, a resposta humoral direcionada a esses parasitos, ao invés de conferir proteção ao hospedeiro, está associada propagação do parasito, devido o favorecimento da fagocitose mediante a opsonização por imunoglobulinas G (IgG). Os mecanismos pelos quais os linfócitos B influenciam no desenvolvimento da doença ainda não estão bem estabelecidos na literatura (ANDREANI et al., 2015; DEAK et al., 2010; FIRMINO-CRUZ et al., 2019; NYLÉN; KUMAR, 2012; SOARES et al., 2017; UENO; WILSON, 2012).

As formas promastigotas possuem grandes quantidades de moléculas como LPG e gp63 expostas, essas moléculas se ligam a receptores da superfície dos macrófagos – como o receptor do complemento tipo 1 e tipo 3 (CR1 / CR3), o receptor de fibronectina (FnRs), o receptor de manose (MR) e o receptor *Toll-like 2* – desencadeando a fagocitose. As amastigotas, por outro lado, expressão baixos níveis de LPG e gp63 e, por isso, se beneficiam bastante da resposta humoral gerada durante a infecção. As amastigotas opsonizadas com imunoglobulinas específicas irão aderir principalmente aos receptores gama Fc (FcγRs) na superfície de macrófagos e células dendríticas contribuindo para sua internalização (POLANDO et al., 2018; UENO; WILSON, 2012). A **Figura 11** ilustra as principais moléculas de superfícies de *Leishmania* spp. e os diferentes receptores de reconhecimentos de células hospedeiras.

Figura 11 – Principais moléculas envolvidas no reconhecimento e endocitose de *Leishmania*.



Notas: O processo de endocitose dos parasitos de *Leishmania* requer uma complexa interação parasito-hospedeiro que envolve múltiplos receptores da célula hospedeira como o receptor do complemento 1 e 3 (CR1 / CR3), receptor de fibronectina (FnRs), receptor de manose (MR), receptor gama Fc (FcγR) e o receptor *Toll-like* (TLR), que reconhecem ligantes presentes na superfície do corpo celular ou do flagelo da *Leishmania*, sendo o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease gp63 (glicoproteína de 63 KDa) as principais moléculas envolvidas nesse processo.

Fonte: Adaptado de BRASILEIRO FILHO, 2016, p.1453.

Além dos receptores da superfície, a interação *Leishmania*-macrófago envolve uma série de eventos de sinalização citosólica. Os receptores tipo NOD (NLR) representam uma subclasse de sensores citoplasmáticos de reconhecimento de padrões moleculares associados

aos patógenos. Durante a infecção por *Leishmania* os NLRs agem sinergicamente com TLRs na ativação dos inflamassomas (NLRP3), responsáveis pela ativação da caspase-1 e maturação de IL-1 β e IL-18, desencadeando uma resposta inflamatória com produção de NO, restrição da replicação do parasito e morte celular pirotótica (DE CARVALHO; ZAMBONI, 2020; ZAMBONI; SACKS, 2019).

3.2.5 Classificação Clínica

As manifestações clínicas da leishmaniose podem ser classificadas em três síndromes principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV). O grande polimorfismo clínico da leishmaniose é resultado da interação entre diferentes fatores, principalmente a espécie de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro (WHO, 2021). O **Quadro 2** apresenta as principais classificações clínicas das leishmanioses e as espécies de *leishmania* associadas.

Quadro 2 – Classificação Clínica das leishmanioses e principais espécies causadoras.

Classificação Clínica	Subgênero <i>Leishmania</i>		Subgênero <i>Viannia</i>
	Velho Mundo	Novo Mundo	Novo Mundo
Leishmaniose Visceral	<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (L.) infantum chagasi</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) pifanol</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) lainsoni</i> <i>L. (V.) naiffi</i> <i>L. (V.) lindenberg</i> <i>L. (V.) shawi</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	
Leishmaniose Mucocutânea			<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i>

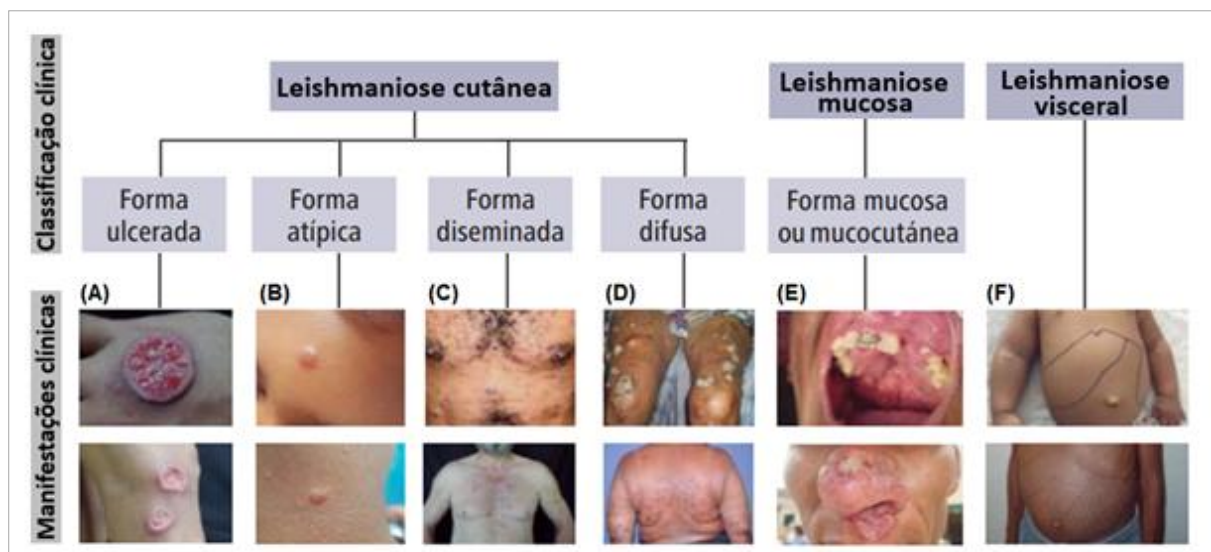
Fonte: TEIXEIRA et al., 2013, p. 14.

A Ásia Central, Oriente Médio, Mediterrâneo e as Américas são as regiões onde ocorrem 95% dos casos de LC, que é a manifestação mais comum da leishmaniose. (OPS, 2019a). No Velho Mundo a LC é causada pelas espécies *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.)*

aethiopica, enquanto que, no Novo Mundo mais de dez espécies estão relacionadas ao desenvolvimento da LC, entre elas, as principais são: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L.(V.) guyanensis*, encontradas no Brasil, e *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*, presentes em outros países das américas (BRASIL, 2006; BRASIL, 2017).

A LC possui diferentes apresentações: na Leishmaniose Cutânea Ulcerada (**Figura 12A**), observa-se uma lesão em forma de pápula que se desenvolve no local de inoculação. Essa lesão aumenta, evoluindo para uma úlcera de fundo granuloso de tecido necrótico com borda elevada bem circunscrita e endurecida com cerca de 3 cm, geralmente indolor. A úlcera pode ser acometida por infecções secundárias bacteriana tornado mais inflamada, purulenta e dolorosas, aumentando o seu período de recuperação. Se negligenciada, a úlcera pode sofrer múltiplas complicações tornando-se crônica. Quando curada, a lesão deixa uma cicatriz atrófica hiperpigmentada em sua periferia e hipocrômica ao centro. Nas infecções por *L. (L.) tropica* podem ocorrer cicatrizações não estéril (presença de parasitos viáveis), que podem gerar novas lesões próxima ao ferimento já cicatrizado, em fenômeno conhecido como Leishmaniose Recidivante. Uma variante da LC observada em habitantes da Venezuela, Costa Rica, El Salvador, Honduras e Nicarágua é chamada de Leishmaniose Cutânea Atípica (**Figura 12B**). Nessa variante clínica, os indivíduos infectados por *L. (L.) infantum* apresentam pequenas lesões papulares, pouco numerosas (1 a 3) e não ulceradas (BRASIL, 2006; BRASIL, 2017; JAMESON, 2020; OPS, 2019a).

Figura 12 – Classificações e manifestações clínicas da leishmaniose.



Fonte: Adaptado de OPS, 2019a, p.47

A Leishmaniose Cutânea Disseminada (**Figura 12C**) é uma manifestação incomum, causada pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) mexicana*. Essa forma atinge indivíduos imunocompetentes, capazes de montar uma resposta imune celular contra *Leishmania*, mas que possuem uma diminuição periférica da resposta do tipo Th1, permitindo, desse modo, a disseminação do parasito por via hematogênica ou linfática. Após o aparecimento da primeira lesão, dar-se início ao período metastásico, no qual, os acometidos apresentam, durante alguns dias, sintomas como mal-estar, astenia, febre e náusea. Em seguida, as lesões disseminadas aparecem simultaneamente ou de forma progressiva. Essas lesões tipicamente são pequenas úlceras granulomatosas, acneiformes, papulares, e numerosas, podendo atingir diferentes regiões anatômicas e afetar a mucosa. A Leishmaniose Cutânea Disseminada apresenta boa resposta terapêutica (HASHIGUCHI et al., 2016; OPS, 2019a; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019).

A Leishmaniose Cutânea Difusa (**Figura 12D**) é uma forma rara e grave gerada pela acentuada proliferação e disseminação dos parasitos devido à ausência de resposta celular específica em indivíduos com condição imune subjacente (anergia). No Brasil, essa manifestação está associada a infecção por *L. (L.) amazonensis*. As lesões difusas são caracterizadas por múltiplas pápulas que não se ulceram e formam nódulos cutâneos, de aspecto lepromatoso, com abundante quantidade de parasitos. A LC difusa possui resistência aos medicamentos disponíveis, gerando recaídas com frequência e cronificação das lesões (BRASIL, 2017; HASHIGUCHI et al., 2016; OPS, 2019a).

A Leishmaniose Mucocutânea (**Figura 12E**) é uma complicação da LC decorrente da extensão de lesões próximas a mucosa como lábio, ou devido à metástase hematogênica/linfática. No Brasil a *L. (V.) braziliensis* é a espécie associada à essa forma clínica. Essa manifestação pode apresentar-se simultaneamente às lesões ativas preexistente ou em um processo de recidiva. A mucosa oral e nasal são as mais acometida. Nessas regiões há uma inflamação intensa, em virtude da resposta imune hiperérgica predominantemente do tipo Th1, causando lesões infiltrativas e proliferativas com severa destruição tecidual. As infecções bacterianas secundárias são frequentes e podem veloluir para pneumonia por aspiração. As lesões não se curam espontaneamente, necessitando de um tratamento longo e com altas doses de drogas para seu controle (BRASIL, 2017; JAMESON, 2020; OPS, 2019a).

As manifestações clínicas provocadas pela infecção por *Leishmania*, não estão limitadas apenas a lesões tegumentares. As espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (no Novo mundo denominado de *L. (L.) chagasi*) possuem um forte tropismo para a visceralização da infecção, levando ao comprometimento de diferentes órgãos, principalmente baço, fígado,

medula óssea e linfonodos, onde se multiplicam em células do sistema fagocitário mononuclear, gerando o quadro da Leishmaniose Visceral (LV) (**Figura 12F**). O Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Quênia, concentram cerca de 90% da carga de LV no mundo (BRASIL, 2014; OPS, 2019a).

A LV é a forma mais grave de leishmaniose. Na Ásia Meridional essa forma clínica é conhecida como *kala-azar* (febre negra em hindi) e tem como principal agente etiológico a *L. (L.) donovani*. No Brasil a forma visceral é provocada pela *L. (L.) infantum chagasi*. Sem tratamento 95% dos casos evoluem para óbito (WHO, 2021). Inicialmente, os primeiros sintomas são a astenia com febre intermitente de longa duração, discreta esplenomegalia seguida por hepatomegalia e linfadenopatia. Durante o agravamento da doença, observa-se uma progressiva perda de peso, frequentes quadros hemorrágicos (gengival, epistaxe) e de infecções oportunistas. O estágio avançado é marcado por severa hepatoesplenomegalia, pancitopenia (resultante do comprometimento medular), hipoalbuminemia e hipergamaglobulemia (fundamentalmente de IgG) (DUTHIE et al., 2019; KUMAR; PANDEY; SAMANT, 2020).

Nas infecções por *L. (L.) donovani*, alguns indivíduos clinicamente curados da LV podem desenvolver após meses ou anos, uma complicação não letal denominada Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC), que é uma forma dermatrópica da infecção primária. O tratamento incompleto ou tardio da LV, a exposição solar e o uso de medicamentos imunossupressores são fatores de risco que levam a uma maior incidência de LDPC. Essa complicação ocorre em menos de 10% dos casos de LV na Ásia e é caracterizada por erupção cutânea maculares, enquanto na África ela é observada em mais de 50% dos casos de LV, apresentando-se na forma de lesões papulares. Os pacientes com LDPC são clinicamente estáveis. Entretanto, ao abrigar parasitos em sua pele, contribuem para a transmissão vetorial da LV na comunidade, dificultando o controle dessa doença (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DNDI, 2019b). Além disso, as epidemias da AIDS agravam ainda mais essa conjuntura, visto que o status imunológico de indivíduos infectados pelo HIV os tornam mais suscetíveis a de desenvolver a LV ativa (BRASIL, 2015; SOUSA-GOMES; ROMERO; WERNECK, 2017).

Um fator de risco para desenvolver a forma ativa da leishmaniose, é a coinfeção com HIV, visto que o status imunológico de indivíduos infectados por esse vírus os tornam mais suscetíveis a outras infecções. Os primeiros casos de coinfeção entre a *Leishmania* spp. e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram descritos no final da década de 80, e cresceram nas décadas seguintes devido à disseminação das epidemias da AIDS para áreas rurais em concomitância com o processo de urbanização das epidemias de leishmaniose, resultando na sobreposição de ambas na mesma área geográfica. Desde então as coinfeção *Leishmania*-HIV

já foram descritas em 35 países. Pacientes com leishmaniose, coinfectados pelo HIV, requerem cuidados especiais quanto à indicação terapêutica devido aos efeitos adversos e possíveis ocorrências de recidivas. Portanto, é recomendável oferecer a sorologia para HIV a todos os pacientes com leishmaniose em áreas endêmicas. (DNDI, 2019b; ADRIAENSEN et al., 2018; FONTOURA et al., 2018; OPS, 2019b).

3.2.6 Farmacoterapia

Atualmente não existe nenhum medicamento ou vacina aprovados para uso profiláticos para prevenção de infecções por *Leishmania* spp. em humanos (IKEOGU et al., 2020). Além disso, o arsenal de fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da leishmaniose continua restrito a opções com limitações em termos de custo, vias de administração e segurança (resistência / toxicidade), o que tem levado ao aumento de falhas terapêuticas (ARONSON et al., 2016; CHARLTON et al., 2018).

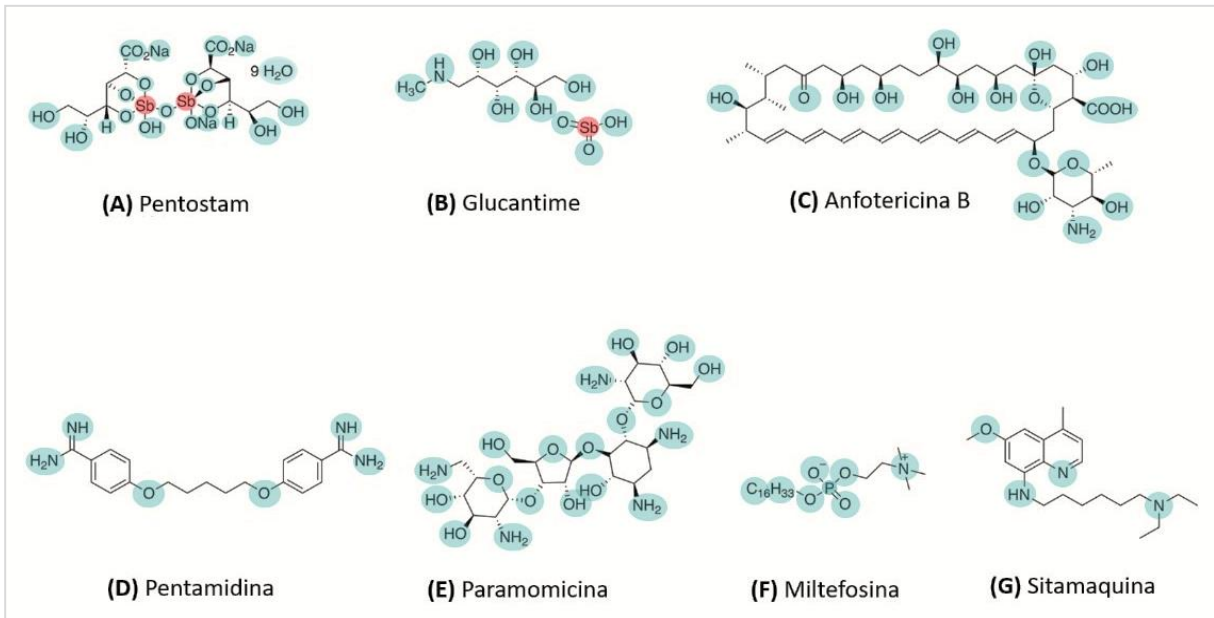
O regime de tratamento da leishmaniose é complexo, pois necessita de abordagem individualizada que leve em consideração diferentes fatores como: idade do paciente, espécies de *Leishmania*, a área geográfica em que a infecção foi adquirida, características clínicas e coinfeção com outros patógenos. Ademais, é importante um acompanhamento prolongado juntamente com cuidados de suporte a possíveis comorbidades como infecções secundárias, desnutrição, anemia e distúrbios hemorrágicos (CDC, 2020; ROATT et al., 2020).

Os diferentes compostos com atividade leishmanicida comercializados na atualidade, possuem diferentes origens químicas e atuam por meio de diversos mecanismos de ação. Classicamente, na maioria das regiões endêmicas do mundo, os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), como o estibogluconato de sódio (apresentando nome comercial de Pentostan®) (**Figura 13A**) e o antimoniato de N-metil glucamina ou antimoniato de meglumina (Glucantime®) (**Figura 13B**). Este último é a única formulação de antimonial disponibilizada pelo Ministério da Saúde no Brasil (BRASIL, 2019; BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018).

Os antimoniais são administrados aos pacientes em sua forma intramuscular ou, preferencialmente, intravenosa. No tratamento regular para a forma cutânea são utilizados 10 a 20mg Sb^{5+} /kg/dia entre 20 a 30 dias, enquanto para as formas mucosa ou visceral a posologia consiste em 20mg Sb^{5+} /kg/dia entre 30 a 40 dias. Na leishmaniose cutânea localizada, outra opção para tratamento é a administração intralesional (via subcutânea) com intervalos de 15 dias, na qual é injetado um volume necessário para infiltrar a base da lesão (aproximadamente

uma a três aplicações de 5 mL), elevando-a e deixando-a intumescida (BRASIL, 2014, 2017, 2019).

Figura 13 – Estrutura química dos principais fármacos para o tratamento da leishmaniose.



Fonte: Adaptado de CHARLTON et al., 2018.

A monoterapia com os antimoniais pentavalentes vêm sendo usados como tratamento padrão para as leishmanioses há mais de 70 anos. Contudo, insucessos terapêuticos têm sido observados durante esse período em varias regiões. Na Índia, a utilização dessas drogas foi descontinuada devido aos altos índices de resistência relatados. Nos outros países endêmicos, o uso dos antimoniais ainda é empregado, porém sua indicação é limitada a pacientes com idade inferior a 50 anos, que não sejam portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas. Além disso, é contraindicado para coinfectados com HIV e para gestantes (BRASIL, 2019; CROFT, 2006).

O mecanismo de ação exato pelo qual os Sb^{5+} exercem a sua atividade leishmanicida ainda não está bem estabelecido. Algumas hipóteses buscam elucidar a questão. A principal propõe que o Sb^{5+} atue como pró-fármaco, sendo reduzidos à Sb^{3+} , responsável pela inibição de enzimas como a tripanotiona redutase, gerando danos oxidativos às formas amastigotas de *Leishmania* spp. Outras hipóteses associam o Sb^{5+} à inibição de superóxido dismutase (SOD) e topoisomerase de *Leishmania*, deflagrando a morte destes parasitos (DEMICHELI et al., 2002; FRÉZARD et al, 2009, 2013; RAYCHAUDHURY et al., 2005).

No início da terapia as intercorrências são raras, entretendo a toxicidade do Sb^{5+} aumenta no decorrer das sessões, gerando efeitos colaterais com: alterações eletrocardiográficas, gastrointestinais, pancreatite aguda, insuficiência renal e hepática. As limitações e riscos intrínsecos do Sb^{5+} levaram à necessidade de adoção de fármacos alternativos visando estabelecer tratamentos equilibrados em termos de eficácia e segurança (DNDI, 2019b; KATZUNG; TREVOR, 2017).

Quando o uso do Sb^{5+} é contraindicado, ou nos casos onde não há resposta satisfatória, o tratamento de segunda linha é realizado com a anfotericina B (**Figura 13C**). A anfotericina B é um antibiótico poliênico, inicialmente isolado de *Streptomyces nodosus*, amplamente administrado como um medicamento antifúngico. Esse fármaco foi aprovado em 1997 pela FDA para o tratamento da leishmaniose visceral (sua indicação para leishmaniose cutânea ou mucosa são consideradas *off-label*). As formulações mais amplamente utilizada na leishmaniose são o desoxicolato de anfotericina B (Anforicin B®) e a anfotericina B lipossomal (AmBisome®), esta última apresenta menos efeitos tóxicos sistêmicos (GUERY et al., 2017; MOSIMANN et al., 2018).

A anfotericina B é administrada por infusão intravenosa em regime de internação hospitalar. Reações infusionais como febre, calafrios, tremores, hipotensão, cefaleia e náuseassão são esperadas. Além disso, outros efeitos adversos observados incluem: hipocalemia, hipomagnesemia e nefrotoxicidade. O tratamento com anfotericina B demanda um longo período e embora apresente alta taxa de cura é bastante restritiva devido seu alto custo. Seu mecanismo de ação decorre da seletividade dessa droga ao ergosterol, que é um componente da membrana da *Leishmania*, gerando poros que levam a um desequilíbrio osmótico culminando na morte do parasito. (BRASIL, 2019; CDC, 2020; MOSIMANN et al., 2018; RODRIGO et al., 2018).

Outros agentes parenterais usadas em casos de hipersensibilidade ou falência dos antimoniais e da anfotericina B são a pentamidina e paromomicina. A pentamidina, cuja estrutura química está disposta na **Figura 13D**, é uma diamina aromática concebida originalmente para uso como hipoglicemiante, que mais tarde veio apresentar atividade contra protozoários tripanossomatídeos e contra *P. jiroveci*. Esse fármaco é comercializada para uso humano sob a forma de um sal isetonato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018; KATZUNG; TREVOR, 2017). No tratamento das leishmanioses o seu esquema posológico consiste em 3-4 mg/kg/dia, em dias alternados, de três a dez doses dependendo da região e da forma clínica (BRASIL, 2017).

O mecanismo de ação da pentamidina possivelmente inclui a atuação na inibição da S-adenosil-L-metionina e de outras enzimas que participam do metabolismo das poliaminas. Além disso, evidências sugerem que a pentamidina ligar-se ao DNA do cinetoplasto, gerando desequilíbrio oxidativo e interferindo na replicação e transcrição (KAUR; RAJPUT, 2014; NO, 2016).

Apesar de exibir notável seletividade de ação, a pentamidina está associada a uma acentuada toxicidade, que faz com que uma parcela dos indivíduos tratados exibam alguns efeitos adversos como hipotensão, cefaleia, náuseas, vômitos, insuficiência renal, pancreatite, hipoglicemia que pode evoluir para o diabetes *mellitus* tardio. Essa elevada toxicidade e a menor eficácia quando comparada com a anfotericina B, levou a um declínio gradual do seu uso na monoterapia das leishmanioses, não sendo mais prescrito rotineiramente na atualidade para essa finalidade, com exceção de regiões onde há predomínio de *L. (V.) guyanensis* (CHARLTON et al., 2018; OPS, 2019a).

A paromomicina (**Figura 13E**) é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro obtido a partir de algumas espécies de *Streptomyces*, sendo utilizado como sal de sulfato inicialmente para tratamento oral de infecções parasitárias intestinais. Sua administração intramuscular de 11 mg/kg durante 21 dias foi testada na Índia como monoterapia para LV e demonstrou uma taxa de cura de 95%, levando o governo indiano a aprovar em 2006 o seu uso para essa doença. Diferentemente dos resultados positivos encontrados na Índia, os testes realizados na África Oriental (Sudão, Etiópia e Quênia) a eficácia da paromomicina foi significativamente menor, sugerindo que há diferenças na capacidade dos pacientes africanos de responder ao medicamento ou na suscetibilidade dos parasitos dessas regiões em comparação com os da Índia (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; HAILU et al., 2010).

A paromomicina age principalmente sobre o ribossomo citoplasmático da *Leishmania*, inibindo a síntese proteica e conseqüentemente causando efeitos deletérios no parasito (SHALEV-BENAMI et al., 2017). Uma vantagem da paromomicina é seu baixo custo comparado a outros fármacos usados na leishmaniose (DNDI, 2019a). Embora seja considerado um medicamento relativamente seguro, alguns indivíduos podem manifestar efeitos secundários como cólicas abdominais e náuseas, além de reações adversas mais significativas como hepatotoxicidade, ototoxicidade reversível e mais raramente, nefrotóxicidade (JAMESON, 2020).

A administração parenteral é um dos principais inconvenientes no tratamento das leishmanioses, haja vista que esse procedimento exige que os pacientes se desloquem às unidades de saúde para serem atendidos por profissionais capacitados, e em alguns casos há

necessidade, também, de internação. Essas condições se contrapõem à realidade de vulnerabilidade socioeconômica de grande parte dos portadores da doença. Portanto, nota-se que nessa conjuntura, o desenvolvimento de medicamento para uso por via não invasivas é imprescindível para que haja uma melhora no contexto global do acesso e adesão terapêutica na leishmaniose (SOUZA, 2020). Nesse sentido a terapia tópica com cremes à base de paramomicina isoladamente ou combinado com outras drogas com a gentamicina, foram desenvolvidas e podem ser boas alternativas ao atual padrão de tratamento de leishmaniose cutânea nos casos onde a terapia parenteral não é viável (KIM et al., 2009; SOSA et al., 2019). Outras opções de terapias não parentais são a miltefosina e sitamaquina, ambas de uso oral (CHARLTON et al., 2018).

A Miltefosina (**Figura 13F**) é uma alquilfosfocolina originalmente desenvolvida na década de 1980 como um agente antineoplásico para o tratamento de câncer de mama e outros tumores sólido (BENNETT; DOLIN; BLASER, 2015; REIMÃO; PITA PEDRO; COELHO, 2020). Em 1995 a OMS firmou uma parceria público-privada com a empresa farmacêutica, Asta Medica para redirecionar essa droga para novas aplicações terapêuticas, visando o combate à doenças tropicais negligenciadas. Essa parceria gerou estudos clínicos realizados na Índia, nos quais foi observado a eficácia da miltefosina administrada por via oral no tratamento da LV, sendo então esse medicamento registrado em 2002 nesse país. Em 2014, a FDA aprovou a miltefosina para tratamento de todas as manifestações clínicas da leishmaniose (SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018). No Brasil a miltefosina não foi incorporada no protocolo terapêutico em humanos, o que permitiu que em 2016 fosse emitida a licença do medicamento importado Milteforan® de uso veterinário (BRASIL, 2016).

O principal mecanismo de ação da miltefosina é pouco compreendido, acredita-se que esse fármaco apresenta mais de um sítio molecular de ação. De maneira geral, sua atividade antileishmania envolve: a perturbação do metabolismo lipídico (diminuição na fosfatidilcolina e aumento de fosfotidiletanolamina); morte celular semelhante à apoptose (inibição da via PI3K/AKT); disfunção mitocondrial (inibição da citocromo c oxidase); além de efeitos imunomoduladores (promove resposta Th1) (DORLO et al. 2012).

Em humanos, o regime de tratamento recomendado consiste em uma dose oral de 50 mg de miltefosina duas a três vezes por dia (total de 100-150 mg por dia) durante 28 dias consecutivos. Distúrbios gastrointestinais foram relatados como efeitos adversos frequentes. Além disso, elevações discretas nos níveis séricos de transaminases hepáticas e creatinina podem ocorrer. Entretanto, estas manifestações são tipicamente brandas e reversíveis sem que haja a necessidade de hospitalizar o paciente durante o uso da miltefosina. Devido a seus efeitos

teratogênicos, as mulheres em idade reprodutiva devem realizar teste de gravidez antes de iniciar a terapia e fazer uso de métodos contraceptivos durante o tratamento e por mais 5 meses. (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018; REIMÃO; PITA PEDRO; COELHO, 2020). Além da teratogenicidade, outras desvantagens da miltefosina são a sua meia-vida, significativamente longa, que juntamente com o uso inadequado, têm contribuído para o número crescente de casos de insensibilidade à miltefosina (CARNIELLI et al., 2019; KHANRA et al., 2017; SRIVASTAVA et al., 2017).

A sitamaquina (**Figura 13G**) é uma droga da classe das 8-aminoquinolina, desenvolvida anteriormente para a malária, e posteriormente apontada como uma possível alternativa no tratamento da LV. Além de ser administrado por via oral, uma outra vantagem da sitamaquina é sua meia-vida de eliminação curta, o que evita o rápido surgimento de resistência. Sua eficácia terapêutica foi verificada em triagens clínicas de fase I e II com pacientes na Índia, Quênia e Brasil, apresentando taxas de curas contrastantes entre essas diferentes populações. Os feitos adversos como a metemoglobinemia e nefrotoxicidade têm sido os principais gargalos no desenvolvimento dessa medicação (LOISEAU; COJEAN; SCHRÉVEL, 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

O mecanismo de ação da sitamaquina na *Leishmania* envolve a inibição de succinato-Q redutase (complexo II da cadeia respiratória), que por sua vez desencadeia o estresse oxidativo pela produção de EROs e aumento do Ca^{2+} intracelular, gerando uma morte semelhante à apoptose dos parasitos (CARVALHO et al., 2011).

Ainda há muito o que avançar no desenvolvimento clínico e licenciamento de novos composto para monoterapia ou como parte de uma terapia combinada para leishmaniose, entretanto as expectativas são preocupantes. Segundo o relatório do G-Finder 2019 – principal plataforma de monitoramento do setor global de P&D de novos produtos e tecnologias para doenças negligenciadas – na última década, houve uma queda de quase 10% no financiamento do setor (PCR, 2020). As projeções para os próximos anos indicam um agravamento na diminuição do financiamento voltado às DTNs, devido aos desafios financeiros gerados pela pandemia do COVID-19 (DE SOUZA et al., 2020).

Quadro 3 – Via de administração, efeito colateral/adverso e contraindicação dos principais fármacos usados no tratamento da leishmaniose.

Fármaco	Vias de administração	Efeito colateral / adverso	Contraindicação
Antimoniais Pentavalentes ^a	Intramuscular Intravenosa Intralesional	Mialgias, artralgias, cefaleia, anorexia, náuseas e febre, aumento de transaminases, fosfatase alcalina, amilase, lipase, ureia e creatinina, diminuição da hemoglobina e de leucócitos e alterações de eletrocardiograma.	Gestação, hipersensibilidade aos componentes do fármaco, uso concomitante de medicamentos que prolongam o intervalo QTc, disfunção renal, disfunção cardíaca e disfunção hepática.
Desoxicolato de anfotericina B ^a	Intravenosa	Febre, cefaleia, náuseas, vômitos, anorexia, tremores, calafrios, flebite, hipopotassemia, cianose, hipomagnesemia, hipotensão, comprometimento da função renal, anemia e distúrbios do comportamento.	Insuficiência renal, hipersensibilidade à anfotericina B ou outro componente da formulação.
Anfotericina B lipossomal ^a	Intravenosa	Semelhantes aos observados com a desoxicolato de anfotericina B, porém com menor frequência e intensidade.	
Pentamidina ^a	Intramuscular	Dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação intramuscular, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia, hiperglicemia, hipoglicemia, diabetes mellitus tardio, elevações de creatinina fosfoquinase e da desidrogenase láctica séricas, pancreatite, arritmias cardíacas, leucopenia, trombocitopenia, insuficiência renal aguda, hipocalcemia, taquicardia ventricular e choque anafilático.	Gestação, aleitamento, crianças menores de 1 ano, diabetes mellitus, intolerância à glicose, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas ou hipersensibilidade aos componentes do medicamento.
Paramomicina ^b	Intramuscular Intravenosa Tópico	Cólicas abdominais, náuseas, hepatotoxicidade, nefrotóxicidade, ototóxicidade, eritema, irritação cutânea.	Hipersensibilidade aos componentes do medicamento.
Miltefosina ^c	Oral	Teratogenicidade, nefrotóxicidade, hepatotoxicidade, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, sonolência, dor de cabeça, e desconforto geral.	Gestação e hipersensibilidade aos componentes do medicamento.
Sitamaquina ^d	Oral	Metemoglobinemia, cianose, nefrotoxicidade.	Em estudo.

Fonte: ^aBRASIL, 2017; ^bJAMESON, 2020; ^cCHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; ^dLOISEAU; COJEAN; SCHRÉVEL, 2011.

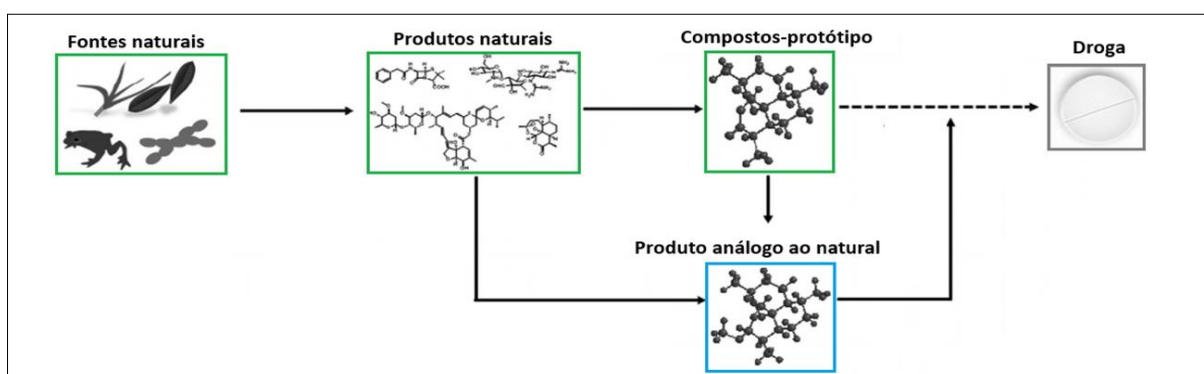
3.3 Pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos

No início do século XX, em torno de 80% de todos os medicamentos obtidos até aquele momento, partiram de fontes vegetais (SIDDIQUI et al., 2014; SNEADER, 1997). Contudo, em 1928, a descoberta acidental da atividade antimicrobiana do fungo *Penicillium notatum*, serviu como base da criação de um medicamento revolucionário: a penicilina. O pioneirismo da penicilina abriu novos caminhos na investigação de produtos naturais, que até então era muito pautada na pesquisa com plantas, agregando a microbiologia aos estudos de farmacologia (BENNETT; CHUNG, 2001; LERNER, 2004).

Os micro-organismos surgiram na terra – muito tempo antes das plantas, animais e seres humanos – há aproximadamente 3,5 bilhões de anos. Eles evoluíram durante todo esse período e hoje ocupam os mais variados habitats do planeta, até aqueles de condições mais extremas. Dessa forma os micro-organismos desenvolveram a capacidade de biossintetizar uma exuberante quantidade de produtos naturais com diversas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antinociceptiva, citotóxica, entre outras (MARTHO, 1997; SAMUELSSON; BOHLIN, 2009).

Um produto natural é um composto ou substância química proveniente de um organismo vivo isolado ou de organismos simbiotes, produzidos pelas vias do metabolismo primário ou secundário desses. Os produtos naturais, inicialmente, podem ser obtidos diretamente de fontes naturais para, então, ser utilizados como modelos moleculares (protótipo) em processos de Síntese Química (síntese parcial ou total) para elaboração de produtos análogos, favorecendo sua produção em larga escala (HANSON, 2003; LAHLOU, 2013). Essa estratégia é esquematizada na **figura 14**.

Figura 14 – Estratégias para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais.



Fonte: Adaptado de LI; LOU, 2018, p.2.

As inovações tecnológicas nas áreas de biologia molecular e bioinformática, ocorridos por volta de 1990, possibilitaram a melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a regulação da biossíntese e expressão de metabólitos secundário, isso permitiu à indústria farmacêutica desenvolver novas estratégias para pesquisa de entidades químicas bioativas, como o uso de modernas ferramentas de Modelagem Molecular e Química Combinatória para formar coleções de compostos em Bibliotecas Sintéticas. Essas novas estratégias receberam, ano a ano, elevados investimentos, entretanto, falharam em proporcionar um expressivo aumento na descoberta de moléculas ativas inovadoras capazes de chegar a se tornar um medicamento (HOPWOOD, 2007; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Diante desse insucesso, a indústria farmacêutica retomou o interesse na tradicional bioprospecção de produtos naturais (especialmente os produtos microbianos) que continuam a fornecer excelentes fontes de moléculas estruturalmente e quimicamente diversas com enorme potencial de aplicações terapêuticas (BERNARDINI et al., 2018; PHAM et al., 2019; SANCHEZ et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Inovar a partir de produtos naturais, ou de qualquer outra fonte, é um processo trabalhoso, caro e bastante longo, devido as inúmeras etapas necessárias (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016). Os produtos alvos precisam ser testados quanto a sua eficácia, segurança, perfil farmacocinético e custo-efetividade, para então serem aprovados pelas agências reguladoras (LUEPKE; MOHR III, 2017).

Apenas um medicamento entre os 5.000 e 10.000 compostos avaliados na cadeia de P&D do setor farmacêutico, consegue lograr êxito e chegar ao mercado. Para percorrer todos esses passos, um medicamento chega a necessitar, em média, mais de uma década de investimentos contínuos (IFPMA, 2017). O custo associado ao pipeline de desenvolvimento de novos produtos pela indústria farmacêutica é estimado em US\$ 1-2 bilhões (AL SHAER et al, 2019).

O aumento do mercado em economias emergentes, aliado a uma maior rigidez regulatória nos países desenvolvidos, resultou em uma importante migração de atividades econômicas e de pesquisa da Europa para esses mercados. Entretanto, os investimentos ocorridos nesse contexto, tem dado maior ênfase em inovações incrementais. Desse modo, a produção de medicamentos “*me-too*” (similares) ou “*me-better*” (melhorados) ocorre em detrimento do lançamento de medicamentos verdadeiramente inéditos (EFPIA, 2018; JENA et al., 2009; PAUL et al., 2010). Perante a essa situação, a produção de medicamentos baseados na síntese química mostrou-se insuficientemente capaz de responder sozinha, às necessidades de inovação e de aumento de competitividade no setor. Por isso, as indústrias farmacêuticas

buscaram incorporar à suas cadeias de P&D, novas estratégias, visando atender essas demandas (BERNARDINI et al., 2018). É nessa conjuntura que a biotecnologia surge como uma oportunidade de fortalecimento e crescimento da inovação terapêutica (PHAM, 2018).

A biotecnologia é a ciência da aplicação controlada de agentes biológicos, como microrganismos (algas, bactérias, fungos e leveduras) e células (vegetal e animal), de modo a gerar produtos ou serviços funcionais para fins industriais, agrícolas ou médicos, como objetivo de melhorar o bem-estar humano (BHATIA; GOLI, 2018). Diferentes áreas do conhecimento com a bioquímica, biologia molecular e microbiologia, compõem a biotecnologia. Dentre suas principais técnicas utilizadas, destacam-se a engenharia genética (rDNA), cultura de células, bioinformática, eletroforese, western blotting, PCR e a clonagem (PANDEY; TEIXEIRA, 2016; SILVEIRA; FUTINO; OLALDE 2002).

No campo médico-farmacêutico (também conhecido como “biotecnologia vermelha”), suas principais aplicações envolvem os métodos de pesquisa e de produção de moléculas com atividade terapêutica, que são usualmente chamadas de Biofármacos, Produtos Biológicos ou simplesmente Biológicos (BHATIA; GOLI, 2018; REIS et al., 2009).

Os Produtos Biológicos são moléculas de elevado peso molecular (proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, hemoderivados, enzimas e vacinas) e de alta complexidade estrutural. Essas características impendem que esses produtos sejam produzidos por meio da síntese química (PHAM et al., 2019).

Diferentemente das drogas quimicamente sintetizadas (também chamadas de Pequenas Moléculas ou Farmoquímicos), os medicamentos biológicos possuem uma caracterização molecular difícil, além disso, sua identidade química pode sofrer alterações devido ao processo e aos insumos empregados na sua fabricação (MAKURVET, 2020).

Apesar dos obstáculos, a revolução biotecnológica expandiu significativamente o número de novos medicamentos. A participação dos biológicos vem crescendo, tornando-se um componente cada vez mais importante no mercado farmacêutico. Essa nova classe de medicamento, tornou possível o desenvolvimento de terapias para necessidades de saúde até então não tratadas eficazmente com as intervenções tradicionais (FRIEDMAN, 2008; INTERFARMA, 2012; OGASAWARA; ALEXANDER, 2019).

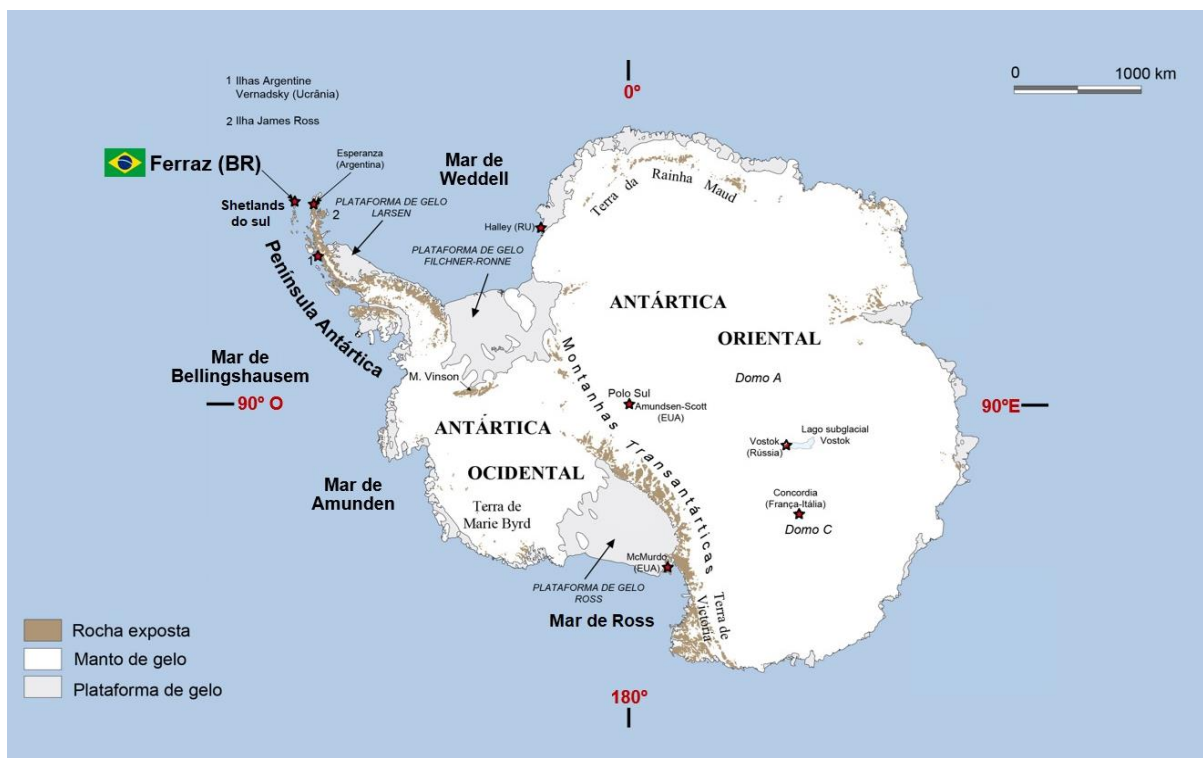
Uma forma de fortalecer e impulsionar a inovação na biotecnologia é investir na prospecção de microrganismo de ambientes extremos, como a Antártica, considerando-se que os seus metabolismos adaptados a condições inóspitas os tornam recursos adequados para a descobertas de moléculas que podem ser potencialmente convertidas em produtos biofarmacêuticos de alto valor (GIUDICE, et al., 2020; SILVA, et al., 2018).

3.4 Antártica – características ambientais e potencial biotecnológico

A Antártica ou Antártida são termos derivados da palavra “anti-ártico”. Apesar de ambas as denominações serem aceitas na norma culta da língua portuguesa, praticamente todos os órgãos públicos envolvidos no Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) utilizam, preferencialmente, o vocábulo Antártica (BRASIL, 2018).

O continente Antártico fica situado abaixo do paralelo 60 °S e possui cerca de 14 milhões de km². Menos de 0,5% do seu solo rochoso fica exposto pois grande parte da sua superfície é permanentemente coberta por um espesso manto de gelo e neve, representando cerca de 90% da água doce do planeta (**Figura 15**) (BURTON-JOHNSON et al., 2016; TERAUDS; LEE, 2016). A temperatura média anual da Antártica varia de -10 °C na costa, podendo atingir nas partes mais altas do interior até -60 °C (AUSTRÁLIA, 2019). No inverno o mar ao redor do continente congela formando um cinturão (*Pack-ice*) de cerca de 1.000 Km, ampliando a área em 18 milhões de Km² (PROANTAR, 2020).

Figura 15 – Mapa da Antártica, destacando o manto de gelo e as áreas de rocha exposta.



Fonte: Adaptado de INCT-CRIOSFERA, 2013, p. 3.

O esquema tradicional de classificação de zoneamento da Antártica divide a região em três principais topônimos: (1) Antártica continental – região mais interna e de alta latitude, representa a principal massa continental. Ela é cortada pelas Montanhas Transantárticas que a divide nas sub-regiões: ocidental e oriental; (2) Antártica marítima – corresponde à costa oeste da Península Antártica e ilhas adjacentes; (3) zona Sub-Antártica – inclui as ilhas espalhadas no oceano austral como a: Geórgia do Sul, Bouvet, Kerguelen, Heard & Macdonald, Prince Edward, Crozet e Macquarie (TERAUDS et al., 2012).

A Antártica não possui povos nativos e até hoje não tem população permanente, somente uma população provisória composta por cientistas expedicionários e pessoal de apoio presentes nas 70 estações polares, que são dedicadas exclusivamente a pesquisa (FIOANTAR, 2020). Esse continente não está sob posse exclusiva de nenhum país, sua gestão é regida pelo *Tratado da Antártica* que entrou em vigor em 1961 e o *Protocolo de Madri* (1998). Atualmente o tratado possui 50 signatários, dos quais, 29 nações (incluindo o Brasil) têm status consultivo. Durante as últimas seis décadas em que o tratado está em vigência, a antártica se mantém uma zona desmilitarizada com proibição de mineração e proteção de recursos biológicos (DODDS, 2019; USAP, 2020).

O Brasil aderiu ao Tratado da Antártica em 1975. Em 1982, por meio do PROANTAR houve a primeira Operação Antártica Brasileira (OPERANTAR I). Em 1984 foi estabelecida a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), localizada na Península de Keller, no interior da Baía do Almirantado, Ilha Rei George. A estação permaneceu ocupada continuamente entre 1986 até 2012, quando foi acometida por um incêndio que afetou 70% das instalações. Apesar da perda, as atividades científicas brasileiras no continente não pararam. Em janeiro de 2020 a nova EACF foi inaugurada (**Figura 16**). A instalação possui 4.500m², com capacidade para abrigar até 64 pessoas (BRASIL, 2020).

Figura 16 – Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF).



Fonte: ESTUDIO 41, 2020.

O ambiente Antártico reúne uma variedade de condições extremas, que além das baixas temperaturas, possui características geoquímicas desafiadoras, tais como os constantes ciclos de congelamento e descongelamento, hipersalinidade e intensa radiação solar. Em conjunto, essas condições exercem uma pressão evolutiva, que seleciona comunidades microbianas com adaptações metabólicas que envolve a produção de compostos bioativos como estratégia de sobrevivência (BRATCHKOVA; IVANOVA, 2011; SCHULTZ; ROSADO, 2019; WONG et al., 2019). Estes microrganismos sobrevivem à essas condições adversas devido à diversidade bioquímica e metabólica que lhes permitem produzir um conjunto de moléculas orgânicas únicas – como extremólitos, extremozimas e crioprotetores – para a proteção de suas estruturas celulares. Desse modo, bactérias, fungos filamentosos, leveduras e microalgas resistem e se desenvolvem em locais com níveis extremos de estresse físico e oxidativo, típicos do deste continente (BECKER; WITTMANN, 2020; MAURYA et al., 2020).

Uma variedade de estudos de análises espaciais da Antártica tem identificado diversas regiões biogeográficas distintas tanto nos sistemas terrestres como marinhos. Essas pesquisas demonstram que a biodiversidade da Antártica é muito mais extensa e ecologicamente estruturada do que se imaginava anteriormente (CHOWN et al., 2015; TERAUDS et al., 2016).

A microbiota representa a maior parte da biodiversidade da Antártica (CHOWN et al., 2015). Essa região foi colonizada com sucesso por microrganismos psicrófilos (cresce a temperaturas abaixo de 15 °C), xerofílicos (adaptados à baixa disponibilidade de água), oligotróficos (adaptados à escassez de nutrientes), halófilos (adaptados à ambiente salino) e radorresistente (tolerantes à radiação ionizante) que se espalham nos diferentes substratos disponíveis, como gelo, solos, rochas, fezes de animais, penas de pássaros, além de serem abrigados em briófitas, líquenes, macroalgas e esponjas marinhas (CHOWN et al., 2015, SAVOCA et al., 2019; ZUCCONI et al., 2020).

Os raros eventos de dispersão natural permitiram que a biota da Antártica evoluísse e se diversificasse em relativo isolamento (BARNES et al., 2006). Para manter o metabolismo, sustentar o seu crescimento e reprodução em meio as rigorosas condições da Antártica, os microrganismos se adaptaram, passando por uma gama de ajustes metabólicos, estruturais e funcionais em suas membranas, sistemas energéticos e seu maquinário de síntese de proteínas e enzimas, para dessa forma resistirem aos fatores ambientais bióticos e abióticos (TRIPATHI et al., 2018; ZUCCONI et al., 2020). Além disso a diversificação microbiana, é favorecida pela transferência horizontal de genes entre táxons, resultando em grande diversidade bioquímica. Ao longo do tempo essas trocas contribuem para a formação de táxons filogenéticos distintos e

para a evolução de genes biossintéticos de metabólitos secundários em resposta às pressões do ecossistema inóspito da Antártica (PURVES et al., 2016).

Diversas novas ferramentas desenvolvidas recentemente nos campos de análise, planejamento e otimização experimental em microbiologia e bioquímica, em combinação com os avanços na tecnologia de sequenciamento, tem ajudado na compreensão crescente sobre o potencial metabólico de microrganismo da Antártica. Isso tem impulsionado o interesse na exploração dos recursos naturais desse continente na busca por compostos bioativos (CHOWN et al., 2015; TIAN; ZHAO, 2017).

3.4.1 Metabólitos microbianos com atividade biológica de importância clínica

Os microrganismos da Antártica são produtores excepcionais de metabólitos secundários, como alcaloides, carboidratos, esteroides, lipídios, peptídeos, policetídeos e terpenóides. Essas moléculas evolutivamente refinadas e versáteis desempenham um papel fundamental nas interações inter e intra-específicas dentro das comunidades microbianas, fornecendo vantagens competitivas sobre outros microrganismos. Além disso, essas estruturas químicas únicas também podem ser usadas como condutores terapêuticos para doenças humanas (O'BRIEN; WRIGHT, 2011; ZUCCONI et al., 2020).

Atualmente, muitas pesquisas têm examinado um grande número de compostos derivados de microrganismo antárticos (GIORDANO, 2020; TRIPATHI et al., 2018). Esses estudos têm levado a novos *insights* sobre moléculas químicas de extremófilos, levantando evidências concretas sobre as atividades biológicas desses produtos, e de seu grande potencial em aplicações biotecnológicas e farmacêuticas. Dessa forma, os microrganismos da Antártica desempenham um papel central nos esforços para descoberta de medicamentos para tratamento de doenças infecciosas e oncológicas (GIORDANO, 2020; TRIPATHI et al., 2018).

A investigação química da bactéria Gram-negativa *Aequorivita* sp., isolada de sedimentos rasos do mar Antártico, resultou no isolamento de quatro aminolipídios que mostraram atividade antimicrobiana moderada *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (CHIANESE et al., 2018). Em outro estudo, amostras de sedimentos marinhos da Antártica, coletadas a 20 m de profundidade, levou ao isolamento da cepa de *Pseudomonas* BNT1 e a purificação dos extratos dessa cepa produziu dois ramnolipídeos que exibiram efeito antimicrobiano contra *Burkholderia cepacia*, *B. metallica*, *B. seminalis*, *B. latens* e *S. aureus*. Além disso, um terceiro ramnolipídeo apresentou atividade moderada (MBC de 100 µg/mL) contra *S. aureus* (TEDESCO et al., 2016).

A análise do extrato bruto etanólico rico do pigmento violaceína da bactéria psicrotolerante *Janthinobacterium lividum* ROICE173, isolada da neve da região antártica, mostrou efeito antimicrobiano contra cepas de MRSA e MSSA, e também foi ativo contra cepas de *Enterococci* (*E. avium*, *E. fecalis*, *E. faecium*) e *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella*, *Yersinia*) (BARICZ et al., 2018). Mais recentemente, a investigação do extrato purificado de violaceína da bactéria não patogênica *Iodobacter* sp. 7MAnt, isolada de lagoa localizada na Ilha Rei George – Antártica, demonstrou que esse pigmento possui atividade também, contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATALAH et al., 2020).

Em Silva et al. (2018) um total de 326 isolados bacterianos, distribuídos em 39 gêneros diferentes, foram recuperados de diferentes locais da Antártica e posteriormente identificados. A triagem antimicrobiana revelou quinze isolados capazes de inibir o crescimento de pelo menos uma das cepas: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Um dos isolados identificado com *Pseudomonas* sp. exibiu ampla faixa antimicrobiana, além disso seu extrato de hexano apresentou atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e promoveu a inibição do crescimento de linhagens de U251 (glioblastoma) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão de células não pequenas).

Outras iniciativas também visaram explorar do potencial antiproliferativo em células tumorais humanas. A investigação do microbioma associado a fanerógamas comumente encontradas na Antártica (*Deschampsia antarctica* Desv.) levou ao isolamento de cepas de *Streptomyces* sp. Os metabólitos secundários das cepas CMAA 1527 e CMAA 1653 apresentaram atividades antiproliferativas contra as células cancerosas humanas U251 (glioblastoma), MCF-7 (adenocarcinoma de mama); 786-0 (adenocarcinoma de rim), NCI-H460 (carcinoma de pulmão de células não pequenas) (SILVA et al., 2020).

Assim como as bactérias, os fungos antárticos também foram explorados em busca de compostos com atividade biológica. O extrato etanólico do fungo antártico *Purpureocillium lilacinum*, apresentou alto nível de atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Candida krusei*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, como também, efeito antiprotozoário (*L. amazonensis* e *T. cruzi*) e ação citotóxica em células tumorais humanas mamárias (MCF-7) e renais (TK-10), com toxicidade moderada para células normais (GONÇALVES et al., 2015).

Sun et al. (2020) descreveram novos tripeptídeos cíclicos, obtidos a partir do extrato de acetato de etila do fungo *Aspergillus insulicola*, isolado de uma esponja não identificada da Antártica. O tripeptídeo M e N mostraram ampla atividade antimicrobiana contra um painel de

cepas patogênicas, incluindo *Bacillus cereus*, *Proteus* sp., *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio parahemolyticus*, *Edwardsiella tarda*, MRSA e *Stafilococcus coagulase-negativos* resistentes à metilina.

Ogaki et al. (2020) acessaram bibliotecas de fungos cultiváveis presentes em sedimentos de três lagos da Península de Fildes, Antártica. Os extratos de acetato de etila de *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium solitum* demonstraram atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum*. Extratos de *P. chrysogenum*, *Penicillium palitans* e *P. solitum* exibiram altas atividades contra *T. cruzi*. Além disso, os extratos de *Penicillium allii-sativi*, *P. chrysogenum*, *P. palitans*, e *P. solitum* demonstraram atividade contra *Plasmodium falciparum*. Os extratos de *Penicillium*, *Acremonium fusidioides* e *Pseudogymnoascus verrucosus* apresentaram fraca atividade contra *L. amazonensis*.

Buscando avaliar o potencial terapêutico de metabólitos fúngicos contra doenças tropicais negligenciadas, De Menezes et al. (2020) recuperaram fungos presentes em fragmentos de gelo glacial coletados em diferentes locais da Península Antártica. A análise dos extratos de *Penicillium* spp., *P. chrysogenum* e *P. palitans* apresentaram atividades contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Em um estudo semelhante, os extratos de *Pseudogymnoascus destructans*, *Mortierella parvispora* e *P. chrysogenum*, isolados de amostras de solo superficial coletadas em diferentes regiões da Antártica, exibiram atividade contra *L. amazonensis* e *T. cruzi*. (GOMES et al., 2018).

Diante dos diferentes relatos encontrados na literatura quanto à eficácia de compostos naturais derivados de microrganismos antárticos em aplicações terapêuticas, fica evidente a potencialidade desses produtos para o combate de diversas doenças. Apesar disso, ainda não há nenhum medicamento disponível proveniente de microrganismos antárticos, entretanto, os resultados preliminares reportados são encorajadores. Portanto, mais estudos devem ser conduzidos para embasar pesquisas clínicas futuras.

4 METODOLOGIA

4.1 Estudo experimental: Produção dos extratos bacterianos e ensaios farmacológicos

4.1.1 Obtenção dos produtos naturais oriundos de bactéria antárticas

Amostras de bactérias coletadas na Antártica foram cedidas pelo Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte (Campus Arapiraca/UFAL), participante do projeto MycoAntar: Diversidade e Bioprospecção de Fungos da Antártica. Os microrganismos foram isolados de amostras de sedimentos e de líquens coletados no Continente Antártico em duas expedições ao polo sul pela Equipe Brasileira de Pesquisa (OPERANTAR XXXIV e XXXVI, verões de 2015/2016 e 2017/2018, respectivamente).

Ao todo foram avaliados oito isolados bacterianos conforme demonstrado no **Quadro 4**. Os isolados do grupo **AN** (14. AN. P1, 14. AN. P3, 4. AN. P4) foram obtidos de amostras de sedimento, assim com os isolados do grupo **ANUV** (1. ANUV. P4, 2. ANUV. P4). Entretanto, as bactérias desse último grupo apresentaram resistência à luz ultravioleta (30 minutos de exposição de radiação UVC, usando a lâmpada Osram 30W) em resultados prévios descritos no nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). Os isolados do grupo **UVAB** (14. UVAB.11, 4. UVAB.12, 7. UVAB.14) foram obtidos de líquens.

Quadro 4 – Bactérias isoladas do ambiente antártico

Grupo	Código do microrganismo	Origem	Cor da colônia
AN	14. AN. P1	Ilha Deception (Sedimento)	Amarelo Cítrico
	14. AN. P3	Ilha Deception (Sedimento)	Amarelo
	4. AN. P4	Ilha Deception (Sedimento)	Vermelho
ANUV	1. ANUV. P4	Ilha Deception (Sedimento)	Vermelho
	2. ANUV. P4	Ilha Deception (Sedimento)	Vermelho
UVAB	14. UVAB. 11	Líquens	Laranja
	4. UVAB. 12	Líquens	Amarelo
	7. UVAB. 14	Líquens	Vermelho

Fonte: Autor (2021).

4.1.2 Cultivo e produção de biomassa

O cultivo dos isolados bacterianos foi baseado em método descrito por Silva et al. (2019) com algumas modificações. Primeiramente, as amostras das bactérias da antárticas, criopreservada em glicerol 20% (v/v) em freezer à -80°C , foram descongeladas à temperatura ambiente e semeadas com auxílio de uma alça bacteriológica em Ágar nutriente (AN). As placas de AN foram então incubadas durante 7 dias a 20°C . Após o crescimento bacteriano, 3 a 6 colônias com mesma morfologia foram inoculadas em 6 mL de solução salina (0,85%) para formar uma suspensão homogênea. As suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm, com absorvância de 900 a 1000 nm, e, em seguida, transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de caldo nutriente para serem incubados sob agitação a 150 rpm, durante 7 dias a 15°C (**Figura 17**). Após esse período, as amostras foram transferidas para tubos tipo falcon de 50 mL e submetidas à centrifugação a 3.500 rpm durante 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* formado (que corresponde a biomassa bacteriana) foi submetido à lavagem com solução salina esterilizada, seguido de congelamento em freezer a -80°C .

Figura 17 – Aspecto do cultivo bacteriano em meio líquido após incubação por 7 dias a 15°C e 150 rpm.

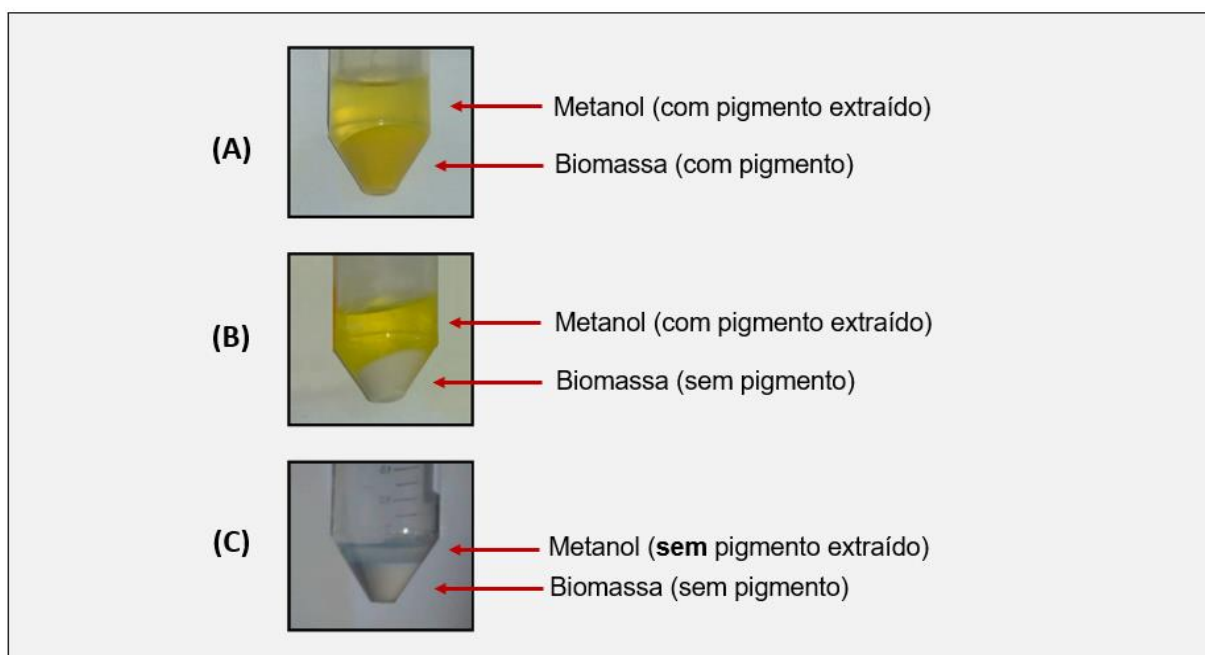


Fonte: Autor (2021).

4.1.3 Extração de pigmentos intracelulares bacterianos

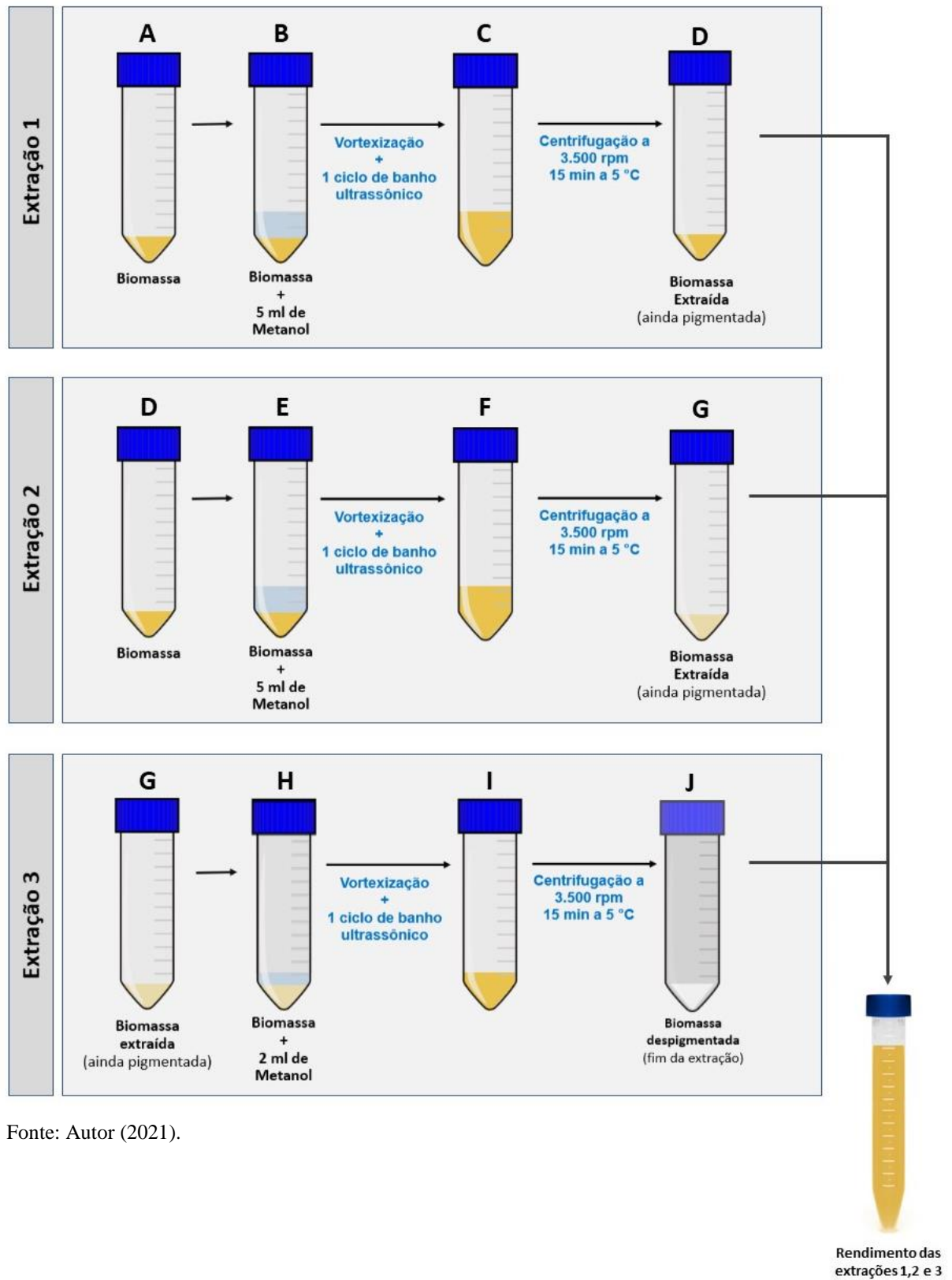
Para obtenção dos pigmentos intracelulares, as biomassas bacterianas foram submetidas à extração exaustiva por maceração com metanol P.A conforme descrito por Silva et al. (2019), com modificações. Todas as etapas da extração foram realizadas sob condições mínimas de luz para evitar a degradação dos pigmentos. Inicialmente as extrações foram realizadas em tubos tipo falcon de 50 mL contendo a biomassa bacteriana, juntamente com 5 mL de metanol. As biomassas com solvente foram então agitadas vigorosamente em vortex (AP59, Phoenix[®]) e em seguida mantidas por 30 minutos em cuba ultrassônica (USC-750, Unique[®]). Após a maceração e lise celular, as amostras foram submetidas à centrifugação a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Por fim, os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados para não ressuspender a biomassa, e em seguida transferidos para tubos falcon de 15 mL devidamente identificados. Esse processo foi repetido, reduzindo gradativamente o volume de solvente, até a máxima despigmentação da biomassa (**Figura 18C**). A confirmação da total despigmentação da biomassa foi feita observando não somente a coloração do pellet, mais também, a ausência de pigmento no sobrenadante. As etapas do processo de extração de pigmento estão ilustradas na **Figura 19**. As soluções extrativas obtidas foram secas em dessecador de vidro sob vácuo ao abrigo da luz.

Figura 18 – Diferentes estágios de extração dos pigmentos de bactérias da Antártica.



Fonte: Autor (2021).

Figura 19 – Etapas da extração dos pigmentos.



Fonte: Autor (2021).

4.1.4 Manutenção da linhagem macrófagos

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura em 10 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640) suplementado com L-glutamina, piruvato, aminoácidos não essenciais, 10% de soro fetal bovino (Roche), e mantidos em estufa a 37°C com 95% de umidade e 5% CO₂. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado, na concentração de 1×10^5 células/mL e 200 µL dessa suspensão foi distribuída em placa de 96 poços (Nunc, Denmark) ou 1×10^5 células /poço de placa de 24 poços com lamínulas.

4.1.5 Determinação da viabilidade celular

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em placas de 96 poços, na concentração de 5×10^4 células/poço e incubadas overnight em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e posteriormente preenchidos em triplicata com 200 µL dos extratos testados diluídos em meio RPMI nas concentrações de 100, 30, 10, 1, 3 e 0,3 mg/mL e reincubados por 48h. Os poços controles foram células cultivadas somente com meio de cultura e 10% de SFB ou células cultivadas na presença do diluente dos extratos (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada ensaio de redução de MTT (MOSMANN, 1983) realizando a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular dos macrófagos tratados com os extratos foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

4.1.6 Ensaio de viabilidade de promastigotas de *Leishmania*

As formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* em fase exponencial tardia de crescimento, foram centrifugadas e posteriormente resuspensas em meio Schneider suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 2% de urina humana, para obter uma concentração de 1×10^5 parasitos/mL. Em seguida, alíquotas de 100µL dessa suspensão foram distribuídas em placa de 96 poços. Posteriormente, foram adicionadas em triplicatas, diferentes concentrações dos extratos bacterianos (100, 30, 10, 1, 3 e 0,3 mg/mL) e anfotericina b (100 a 0,001 µM), como também o controle de veículo DMSO (0,2%) preparadas em meio Schneider suplementado, para alcançar um volume final de 200µL por poço. A placa então foi incubada em estufa BOD a 27 °C por 48 horas. Após esse período, o número de parasitos foi determinado

utilizando câmara de Neubauer, em microscópio óptico. A inibição causada por cada extrato foi expressa como uma porcentagem em relação às células cultivadas apenas na presença do veículo DMSO.

4.1.7 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos no ensaio *in vitro* foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) e testes post-hoc de Tukey, utilizando o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical). Os dados foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao diluente dos extratos DMSO 0,1%.

4.2 Estudo da literatura: Bioprodutos fúngicos com atividade leishmanicida – avaliação do estado da arte

Para estabelecer o estado da arte da produção científica sobre as evidências quanto à eficácia da atividade anti-*Leishmania* de bioprodutos fúngicos foi produzido uma revisão sistemática da literatura, na qual foram realizadas consultas nas bases de dados do PubMed, Lilacs e Scielo. A busca dos artigos foi feita entre os meses de novembro e dezembro de 2020, utilizando os seguintes descritores/termos livres e conectores booleanos: **(1)** ("Fungi"[Mesh]) AND "Leishmania"[Mesh]; **(2)** Fungi AND Leishmania; **(3)** Fungi AND leishmanicidal; **(4)** Lichen AND Leishmania e **(5)** Fungo AND Leishmania. Tendo como critérios de inclusão: artigos originais com delineamento experimental que testaram o potencial leishmanicida de bioprodutos (extratos/compostos isolados) obtidos de fungos (com pelo menos um bioprodutos ativo), e que estejam disponíveis na íntegra, publicados em qualquer período e idioma. Foram excluídos os artigos que não abordaram o recorte temático proposto ou que não seguiram todos os critérios de inclusão.

5 PRODUTOS

1. LEISHMANICIDAL AND ANTI-GLIOBLASTOMA POTENTIAL OF ANTARCTIC MICROBIAL PRODUCTS: PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF PIGMENTED BACTERIAL EXTRACTS, segundo as normas da ARCHIVES OF MEDICAL RESEARCH.
2. LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF FUNGAL BIOPRODUCTS: A SYSTEMATIC REVIEW, segundo as normas da FUNGAL BIOLOGY REVIEWS.

5.1 PRODUTO 1

Leishmanicidal potential of antarctic microbial products: pharmacological evaluation of pigmented bacterial extracts

Márcio Thomaz dos Santos Varjão ^{1,3}, Alysson Wagner Fernandes Duarte ^{1,4}, Luiz Henrique Rosa ^{4,5}, Magna Suzana Alexandre Moreira ^{2,3}, Aline Cavalcanti de Queiroz ^{1,3,4*}.

Affiliation

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brazil.
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brazil.
3. Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brazil.
4. Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Complexo de Ciências Médicas, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus Arapiraca, Arapiraca, AL, Brazil.
5. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

*Corresponding author: Ph.D. Aline Cavalcanti de Queiroz, Complexo de Ciências Médicas e de Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bairro Bom Sucesso, CEP 57309-005, Arapiraca, Alagoas, Brazil. E-mail address: aline.queiroz@arapiraca.ufal.br

Background and Aims

The decline in pharmaceutical innovation has put healthcare systems at risk. Diseases such as leishmaniasis continue to have unmet pharmacotherapeutic demands. In this context, the bioprospecting of Antarctic microorganisms is part of a movement that seeks to mitigate the deficit in drug innovation. Therefore, the present study aimed to evaluate the leishmanicidal properties of bacterial extracts from Antarctica.

Methods

The bacterial isolates were grown in liquid medium to produce biomass. The intracellular pigmented metabolites were extracted with methanol and subsequently the extractive solutions were dried in a vacuum desiccator. The cytotoxicity of the extracts was evaluated in host cells (macrophages of the J774.A1 lineage) through the MTT colorimetric assay. Leishmanicidal activity was evaluated in *L. chagasi* and *L. amazonensis* promastigote cultures by direct counting under an optical microscope.

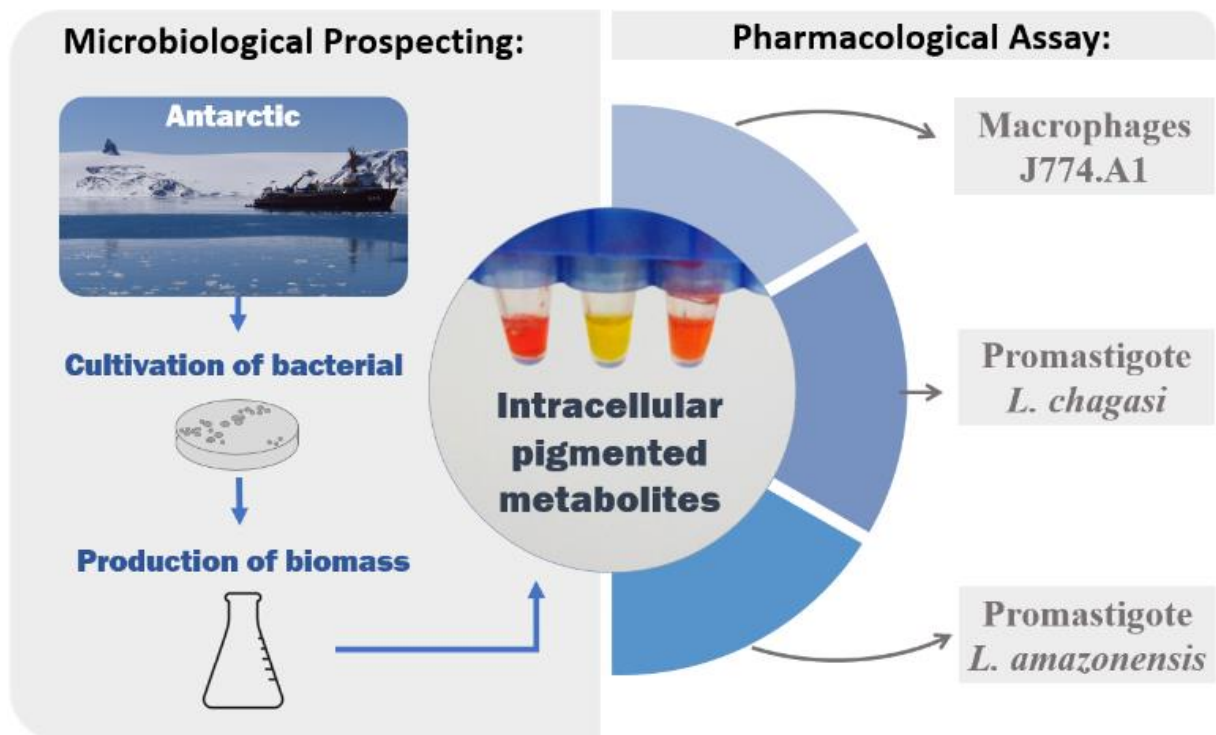
Conclusion

The extracts demonstrated in vitro leishmanicidal activity against *L. (L.) chagasi* promastigote forms, but failed to inhibit the growth of *L. (L.) amazonensis* promastigote forms.

Key Words

Bioprospecting; Extremophiles; Leishmaniasis; Antiparasitic Agents.

Graphical abstract:



Introduction

Despite the efforts of medicinal chemistry to find new entities with biological activity, there has been a decline in pharmaceutical innovation in recent decades, with many diseases still awaiting the emergence of more improved alternatives ⁽¹⁾. Medicines, particularly antibiotics, are an essential medical resource for saving lives, however the options currently available have gradually lost their effectiveness on human pathogens due to the development of resistance ^(2,3). Because of this, infectious diseases such as leishmaniasis continue to be treated with obsolete drugs, presenting many therapeutic failures ⁽⁴⁾. In addition, the spread of AIDS epidemics in areas at risk of transmission of leishmaniasis has resulted in a high number of cases of co-infected HIV-*Leishmania*. This overlapping of diseases has undermined leishmaniasis elimination programs and therefore represents an emerging challenge in global public health ⁽⁵⁾.

The maintenance of the double burden of morbidity and mortality from infectious and chronic diseases has placed an alarming demand on health systems, indicating a global health crisis ^(6,7). The answer to this scenario must be, among other factors, the expansion of therapeutic options ⁽⁸⁾. In this sense, the remodeling or combinations of existing drugs have not adequately responded to the growing need for innovation, therefore, the search for new bioactive chemical entities is essential. In view of this, natural products continue to be the starting points for the development of the main classes of drugs, including antibiotics and chemotherapeutic agents ⁽⁹⁾.

The compounds produced by microorganisms, and in particular bacteria, represent the main source of bioactive molecules. The development of high-throughput (omic) techniques has greatly increased the understanding of the mechanisms of biosynthesis of microbial secondary metabolites, triggering a revolution in the search for the discovery of potentially therapeutic molecules, revitalizing the pharmaceutical industry's interest in natural products ⁽¹⁰⁾.

A single bacterial strain can produce a variety of chemically diverse and structurally complex compounds with different biological properties ^(11,12), however the rediscovery of already known compounds hampers innovation, so several strategies seek to improve the likelihood of identifying unpublished metabolites, among which is bioprospecting of microorganisms in extreme and little explored environments such as Antarctica ^(13,14).

Antarctica is home to several communities of microorganisms endowed with adaptive mechanisms and characteristics that allow them to grow and overcome various environmental challenges with low temperatures, low water availability, nutrient shortages, intense UV radiation and hypersalinity. These factors exert an evolutionary pressure on the Antarctic microorganisms, inducing a biochemical and metabolic diversity that allow them to biosynthesize specialized organic molecules such as antifreeze proteins, heat shock proteins, cold active enzymes, antioxidant enzymes in addition to several other metabolites such as amino acids, peptides and polyketides with a remarkable range of biological activities (15,16,17,18).

Antarctic microorganisms are also excellent pigment producers. Several bacterial isolates recovered from different Antarctic niches such as soil, ice, lakes and marine sediments, are often pigmented. Bacterial pigments play a photoprotective and antioxidant function, which is important for the adaptation process to the Antarctic environment. In addition, these molecules also have potential applications in medicine, which can act as antimicrobial, antiparasitic and anticancer agents (19,20,21).

In view of the, the present study was carried out with the objective of producing pigmented extracts from the biomass of bacteria isolated from soil and lichen samples from the Antarctic environment and evaluating their leishmanicidal properties against *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis* promastigotes.

Materials and Methods

Obtaining Antarctic Bacteria

The bacteria used in this study were isolated from sediment and lichen samples collected in the Antarctic continent on two expeditions to the south pole by the Brazilian Research Team (OPERANTAR XXXIV and XXXVI, summers of 2015/2016 and 2017/2018, respectively).

In total, eight bacterial isolates were evaluated. The isolates of the AN group (14.AN.P1, 14.AN.P3, 4.AN.P4) were obtained from soil samples, as well as the isolates of the ANUV group (1.ANUV.P4, 2. ANUV. P4). However, the bacteria in the latter group showed resistance to ultraviolet light (30 minutes of exposure to UVC radiation, using the Osram 30W lamp). The isolates of the UVAB group (14.UVAB.11, 4.UVAB.12, 7.UVAB.14) were obtained from lichens.

Cultivation and production of biomass

The cultivation of bacterial isolates was based on the method described by Silva et al.⁽¹⁹⁾ with modifications. First, the isolates were incubated on nutrient agar for 7 days at 20 °C. After bacterial growth, 3 to 6 colonies with the same morphology were inoculated in 6 mL of saline solution (0.85%) to form a standardized suspension in a spectrophotometer at 900-1000nm and then transferred to Erlenmeyer containing 150 mL of nutrient broth for incubated with shaking at 150 rpm for 7 days at 15 °C. After that period, the samples were transferred to falcon tubes and subjected to centrifugation at 3.500 rpm for 10 minutes. The formed pellet (which corresponds to bacterial biomass) was subjected to washing with sterile saline solution. Finally, the biomasses were frozen in a freezer at -80 °C.

Extraction of bacterial intracellular pigments

All extraction steps were performed under minimal light conditions to avoid degradation of the pigments. Initially 5 mL of methanol was added to the bacterial biomass. The solvent samples were then shaken vigorously with the aid of a vortex and then kept for 30 minutes in an ultrasonic cleaner for maceration and cell lysis. the samples were subjected to centrifugation at 3.500 rpm for 10 minutes at 4 °C. Finally, the supernatants were collected and transferred to new duly identified tubes. This process was repeated, gradually reducing the volume of solvent, until the maximum depigmentation of the biomass. The extractive solutions obtained were dried in a glass desiccator under vacuum protected from light.

Cytotoxicity assay in macrophages

Macrophages of the J774.A1 strain were grown in 96-well plates, at a concentration of 5×10^4 cells /well and incubated overnight in an oven at 37 °C with a humid atmosphere containing 5% CO₂. Then, the wells were washed to remove non-adherent cells and subsequently filled in triplicate with 200 µL of the tested substances diluted in RPMI medium in concentrations of 100, 30, 10, 1, 3 and 0.3 µg/mL and reincubated by 48h. The control wells were cells cultured only with supplemented culture medium or cells cultured in the presence of the diluent of the substances (DMSO, Sigma). Cell viability was determined by an MTT reduction assay⁽²²⁾ by reading the absorbances in a spectrophotometer at 550 nm. The cell viability of the macrophages treated with the substances was compared to the pattern of death obtained in the control cultures.

Leishmania promastigote viability assay

The promastigote forms of *L. chagasi* and *L. amazonensis* at late exponential phase of growth were centrifuged and subsequently resuspended in Schneider medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine and 2% human urine, to obtain a concentration of 1×10^5 parasites/ml. Then, 100 μ L aliquots of this suspension were distributed in a 96-well plate. Subsequently, different concentrations of bacterial extracts (100, 30, 10, 1, 3 and 0.3 mg/mL) and amphotericin b (100 to 0.001 μ M) were added in triplicate, as well as the DMSO vehicle control (0.2%) prepared in supplemented Schneider medium, to reach a final volume of 200 μ L per well. The plate was then incubated in a BOD oven at 27 °C for 48 hours. After this period, the number of parasites was determined using a Neubauer chamber, under an optical microscope. The inhibition caused by each extract was expressed as a percentage in relation to cells grown only in the presence of the vehicle.

Statistical analysis

The statistical analysis of the data obtained *in vitro* assay were performed by means of analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc tests, using the GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA Statistical). Data were considered significant when *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 in relation to the diluent of 0.1% DMSO extracts.

Results and Discussion

The cultivation in nutrient broth of all bacterial isolates obtained from the Antarctic environment allowed the production of biomass rich in pigmented metabolites. The use of methanol to extract intracellular metabolites provided complete depigmentation of bacterial biomass. The use of a glass vacuum desiccator for drying extractive solutions allowed for a safe process without the need to raise the temperature of the samples, preventing their degradation. After drying, the extracts maintained the same colorimetric aspects of the original bacterial colonies.

The extracts of the AN group obtained from bacteria isolated from sediment (14.AN.P1, 14.AN.P3 and 4.AN.P4), showed pigments with greenish-yellow, yellow and red stains, respectively. The two extracts of bacteria resistant to UV light that make up the ANUV group (1.ANUV.P4 and 2.ANUV.P4) showed red color. The extracts of the isolates from the UVAB group (14.UVAB.11, 4.UVAB.12 and 7.UVAB.14) obtained from lichens, showed pigments

Orange, yellow and red, respectively. The origin and color of the pigmented extracts are presented in table 1.

Table 1 – Bacteria isolated from the Antarctic environment

Group	Microorganism code	Origin	Pigment color
AN	14. AN. P1	Deception island (Sediment)	Greenish-Yellow
	14. AN. P3	Deception island (Sediment)	Yellow
	4. AN. P4	Deception island (Sediment)	Red
ANUV	1. ANUV. P4	Deception island (Sediment)	Red
	2. ANUV. P4	Deception island (Sediment)	Red
UVAB	14. UVAB. 11	Lichen	Orange
	4. UVAB. 12	Lichen	Yellow
	7. UVAB. 14	Lichen	Red

AN: bacteria isolated from sediment. ANUV: UV light resistant bacteria isolated from sediment. UVAB: bacteria isolated from lichens.

Obtaining pigmented compounds produced by Antarctic bacteria has been previously described by some authors, among them Órdenes-Aenishanslins et al. reported that UV-resistant bacteria isolated from soil samples from Antarctica identified as *Hymenobacter* sp. and *Chryseobacterium* sp., are prolific producers of red and yellow pigments, respectively. The pigments produced by these bacteria were extracted and classified as belonging to the carotenoids family, specifically the xanthophylls⁽²³⁾. In another study, Reis-Mansur et al. pointed out the *Microbacterium* sp. isolate LEMMJ01 as a valuable source of carotenoids (neurosporene, α -carotene, echinenone, canthaxanthin and astaxanthin). The authors further demonstrated that these extracted pigments do not induce cytotoxic effects in mouse cells or in human keratinocytes and fibroblasts⁽²⁴⁾.

The therapeutic potential of a chemical entity essentially involves the balance between its ability to exert its intended effect and to generate harm. Therefore, drug prototype toxicity is a major concern in pharmacology, since safety assessment is a prerequisite during the development of new chemical entities to be introduced in the market. In this regard, an important tool to assess the *in vitro* cytotoxicity of prototypes is the MTT test. This colorimetric assay is based on the ability of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase from viable cells to reduce a tetrazolium salt to formazan which is then

solubilized with dimethylsulfoxide (DMSO), allowing its colorimetric measurement. Thus, the ability of cells to reduce MTT through mitochondrial activity can be interpreted as a measure of cell viability after exposure to test compounds ⁽²⁵⁾.

In the present study, the MTT assay was used to evaluate the effect of bacterial extracts from the AN, ANUV and UVAB group on the viability of macrophages of the J774.A1 strain after 48h of treatment (Table 2). The control group was established as cells cultivated only in the presence of the vehicle used to dilute the extracts (0.2% DMSO). Amphotericin B deoxycholate (Sigma-Aldrich), a polyenic antibiotic, widely administered as a second-line treatment in leishmaniasis, was chosen as the standard drug in this trial and showed a maximum cytotoxicity of $93.76 \pm 0.34\%$ and an IC_{50} of $23.96 \pm 1.32 \mu\text{M}$. All eight tested extracts showed an IC_{50} greater than $100\mu\text{g/ml}$, and did not show cytotoxic activity, when compared to the 0.2% DMSO group.

Table 2 – Effect of bacterial extracts of lichens and sediment from Antarctica (100, 30, 10, 3, 1 and $0.3 \mu\text{g/mL}$) and Amphotericin B (100 to $0.001 \mu\text{M}$) on the viability of macrophages J774.A1 strain in the MTT assay.

Treatment	$IC_{50}^a \pm \text{SEM}$	Maximum cytotoxicity $\pm \text{SEM} (\%)^b$
14. AN. P1	$> 100 \mu\text{g/ml}$	NC
14. AN. P3	$> 100 \mu\text{g/mL}$	NC
4. AN. P4	$> 100 \mu\text{g/mL}$	NC
1. ANUV.P4	$> 100 \mu\text{g/mL}$	NC
2. ANUV.P4	$> 100 \mu\text{g/mL}$	NC
14. UVAB.11	$> 100 \mu\text{g/mL}$	NC
4. UVAB.12	$> 100 \mu\text{g/mL}$	NC
7. UVAB.14	$> 100 \mu\text{g/mL}$	NC
Amphotericin B	$22.14 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ ($23.96 \pm 1.32 \mu\text{M}^{***}$)	$93.76 \pm 0.34^{***}$

^a50% inhibitory concentration of J774.A1, calculated using concentration-response curves. ^bMean \pm standard error of the mean of the maximum effect on the viability of J774.A1, in triplicates of a representative experiment. Maximum effect values were significant when $***p < 0.001$ compared to the 0.2% DMSO group. NC: non-cytotoxic effect determined up to the maximum concentration tested, when compared to the 0.2% DMSO group.

The bacterial extracts were then tested for biological activity against *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis* species. Therefore, viability tests were carried out on promastigote forms during 48h of treatment. As shown in Table 3, the pigmented extracts did not show antiparasitic activity against the promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* at any of the concentrations tested. On the other hand, all extracts were able to inhibit *L. (L.) chagasi* promastigotes in a statistically significant way, highlighting 14.AN.P1 (maximum effect of 89.08 ± 0.84 and IC_{50} of $63.04 \pm 5.49 \mu\text{g/mL}$), 2.ANUV.P4 (maximum effect of 73.28 ± 0.76 and IC_{50} of $91.19 \pm 3.69 \mu\text{g/mL}$), 14.UVAB.11 (maximum effect of 87.79 ± 0.76 and IC_{50} of $52.65 \pm 2.91 \mu\text{g/mL}$), 4.UVAB.12 (maximum effect of 100.0 ± 0.00 and IC_{50} of $36.83 \pm 2.61 \mu\text{g/mL}$), and 7.UVAB.14 (maximum effect of 74.05 ± 3.05 and IC_{50} of $78.10 \pm 4.42 \mu\text{g/mL}$). The standard drug amphotericin B, inhibited, at the maximum concentration tested, $100.00 \pm 0.00 \%$ of the growth of *Leishmania* parasites of both species, presenting IC_{50} of $0.32 \pm 0.02 \mu\text{M}$ and $0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$ against *L. (L.) chagasi* and *L. (L.) amazonensis*, respectively.

Table 3 – Effect of bacterial extracts of lichens and sediment from Antarctica (100, 30, 10, 3, 1 and 0.3 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and Amphotericin B (100 to 0,001 μM) on the viability of *Leishmania* promastigote assay.

Extract	<i>L. chagasi</i> promastigote		<i>L. amazonensis</i> promastigote	
	$IC_{50}^a \pm \text{SEM}$	Maximum Effect ^b $\pm \text{SEM}$ (%)	$IC_{50} \pm \text{SEM}$	Maximum Effect ^b $\pm \text{SEM}$ (%)
14.AN.P1	$63.04 \pm 5.49 \mu\text{g/mL}$	89.08 ± 0.84 ***	> 100 $\mu\text{g/mL}$	NA
14.AN.P3	> 100 $\mu\text{g/mL}$	37.82 ± 0.84 *	> 100 $\mu\text{g/mL}$	NA
4.AN.P4	> 100 $\mu\text{g/mL}$	32.77 ± 0.84 *	> 100 $\mu\text{g/mL}$	NA
1.ANUV.P4	> 100 $\mu\text{g/mL}$	ND	> 100 $\mu\text{g/mL}$	NA
2.ANUV.P4	$91.19 \pm 3.69 \mu\text{g/mL}$	73.28 ± 0.76 ***	> 100 $\mu\text{g/mL}$	NA
14.UVAB.11	$52.65 \pm 2.91 \mu\text{g/mL}$	87.79 ± 0.76 ***	> 100 $\mu\text{g/mL}$	NA
4.UVAB.12	$36.83 \pm 2.61 \mu\text{g/mL}$	100.0 ± 0.00 ***	> 100 $\mu\text{g/mL}$	NA
7.UVAB.14	$78.10 \pm 4.42 \mu\text{g/mL}$	74.05 ± 3.05 ***	> 100 $\mu\text{g/mL}$	NA
Amphotericin B	$0,30 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ($0.32 \pm 0.02 \mu\text{M}$)	100 ± 0.00 ***	$0.12 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ($0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$)	100.00 ± 0.00 ***

^a50% inhibitory concentration of *Leishmania* promastigote, calculated using concentration-response curves. ^bMean \pm standard error of the mean of the maximum effect on the viability of *Leishmania* promastigote, in triplicates of a representative experiment. Maximum effect values were significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the 0.2% DMSO group. NA: extract is not active, when compared to the DMSO group.

Only two works are found in the literature about leishmanicidal activity of bacterial pigments. The first report was from a study conducted by Leon et al., which demonstrated the leishmanicidal activity of a purple pigment, extracted from *Chromobacterium violaceum*, called violacein. This pigment had an IC₅₀/24h value of $4.3 \pm 1.15 \mu\text{mol/L}$ against *L. (L.) amazonensis* promastigotes⁽²⁶⁾. More recently, Numan et al., investigated the activity of a yellow pigment extracted from the bacterium *Arthrobacter gandavensis* and observed through an MTT assay that the treatment with 100 $\mu\text{g/mL}$ inhibited $43.91 \pm 1.21\%$ against *L. (L.) tropica* promastigotes⁽²⁷⁾. Therefore, both studies, as well as the results observed in the present work, corroborate the leishmanicidal biotechnological potential of bacterial pigmented metabolites, which should be more explored. The present study is the first work to report the leishmanicidal activity of Antarctic bacteria pigments.

The genus *Leishmania* encompasses parasites from different geographically and genetically isolated populations that form a mosaic of phylogenetically distinct species, which reflects the ability of this group to parasitize a wide range of vertebrate hosts and vectors, but also to produce different clinical presentations^(28,29). The parasites of the species *L. (L.) chagasi*, for example, have strong tropism for organs such as the spleen, liver and bone marrow, thus causing the visceral manifestation of leishmaniasis, while other species such as *L. (L.) amazonensis*, are dermatropic, causing integumentary forms⁽³⁰⁾. In addition to pathogenic factors, the different species of the genus *Leishmania* also differ about drug susceptibility profiles, as observed in the results of the present study.

The molecular and phenotypic heterogeneity present among natural populations of different species and clinical isolates of *Leishmania* leads to the emergence of different drug resistance profiles, even in the absence of previous exposure. This variability makes it difficult to screen for new compounds with therapeutic potential. In view of this, it has been increasingly sought to employ new high-throughput sequencing technologies that allow detailed comparative analyzes at the inter and intra-species level of *Leishmania* in order to try to elucidate the genetic factors that contribute to variation in drug resistance of these parasites^(31,32).

Conclusion

From the biomass of bacteria isolated from the Antarctic environment, it was possible to obtain extracts with intracellular compounds rich in pigments. These extracts did not show cytotoxic effect when tested on J774.A1 lineage macrophages in MTT assay. Furthermore, the extracts demonstrated *in vitro* leishmanicidal activity against *L. (L.) chagasi* promastigote forms, but failed to inhibit *L. (L.) amazonensis* promastigote forms. Given these results, it is worth deepening the studies with pigmented bacterial extracts, evaluating their activity and mechanism of action against amastigote forms *in vitro* and in an animal model of infection, as well as on other species of *Leishmania*.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Reference

1. Dugger SA, Platt A, Goldstein DB. Drug development in the era of precision medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2018; 17(3): 183-196. doi:10.1038/nrd.2017.226
2. Bloom DE, Cadarette D. Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response. *Front Immunol.* 2019; 10: 549. doi:10.3389/fimmu.2019.00549
3. Simpkin VL, Renwick MJ, Kelly R, Mossialos E. Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: progress, challenges and next steps. *J Antibiot.* 2017; 70(12): 1087-1096. doi:10.1038/ja.2017.124
4. Chakravarty J, Sundar S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 2019; 20(10): 1251-1265. doi:10.1080/14656566.2019.1609940
5. Akuffo H, Costa C, van Griensven J, Burza S, Moreno J, Herrero M. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(5): e0006375. doi:10.1371/journal.pntd.0006375
6. Wild CP. The global cancer burden: necessity is the mother of prevention. *Nat Rev Cancer.* 2019; 19(3): 123-124. doi:10.1038/s41568-019-0110-3
7. Aslam B, Wang W, Arshad MI, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018; 11:1645-1658. doi:10.2147/IDR.S173867
8. Årdal C, Balasegaram M, Laxminarayan R, et al. Antibiotic development - economic, regulatory and societal challenges. *Nat Rev Microbiol.* 2020; 18(5): 267-274. doi:10.1038/s41579-019-0293-3

9. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14(2): 111-129. doi:10.1038/nrd4510
10. Palazzotto E, Weber T. Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms. *Curr Opin Microbiol.* 2018; 45:109-116. doi:10.1016/j.mib.2018.03.004
11. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM; International Natural Product Sciences Taskforce, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2021; 20(3): 200-216. doi:10.1038/s41573-020-00114-z
12. Zarins-Tutt JS, Barberi TT, Gao H, et al. Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. *Nat Prod Rep.* 2016; 33(1): 54-72. doi:10.1039/c5np00111k
13. Bull AT, Goodfellow M. Dark, rare and inspirational microbial matter in the extremobiosphere: 16 000 m of bioprospecting campaigns. *Microbiology.* 2019; 165(12): 1252-1264. doi:10.1099/mic.0.000822
14. Danilovich ME, Sánchez LA, Acosta F, Delgado OD. Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. *Polar Biology.* 2018; 41(7): 1417-1433. doi.org/10.1007/s00300-018-2295-4
15. Becker J, Wittmann C. Microbial production of extremolytes - high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. *Curr Opin Biotechnol.* 2020; 65:118-128. doi:10.1016/j.copbio.2020.02.010
16. Merino N, Aronson HS, Bojanova DP, et al. Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Front Microbiol.* 2019; 10: 780. doi:10.3389/fmicb.2019.00780
17. Pham JV, Yilma MA, Feliz A, et al. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. *Front Microbiol.* 2019;10:1404. doi:10.3389/fmicb.2019.01404
18. Silva TR., Duarte AWF., Passarini MRZ. et al. Publisher Correction to: Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. *Polar Biol.* 2018; 41: 1505-1519. doi.org/10.1007/s00300-018-2322-5
19. Silva TR, Tavares RSN, Canela-Garayoa R, et al. Chemical Characterization and Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria. *Mar Biotechnol.* 2019; 21(3): 416-429. doi:10.1007/s10126-019-09892-z

20. Silva TRE, Silva LCF Júnior, de Queiroz AC, et al. Pigments from Antarctic bacteria and their biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2021;1-28. doi:10.1080/07388551.2021.1888068
21. Narsing Rao MP, Xiao M, Li WJ. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Front Microbiol.* 2017; 8:1113. doi:10.3389/fmicb.2017.01113
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
23. Órdenes-Aenishanslins N., Anziani-Ostuni G., Vargas-Reyes M., Alarcón J., Tello A., Pérez-Donoso JM. Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in Dye Sensitized Solar Cells. *J Photochem Photobiol B.* 2016; 162:707-714. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.004
24. Reis-Mansur MCPP., Cardoso-Rurr JS., Silva JVMA., et al. Carotenoids from UV-resistant Antarctic Microbacterium sp. LEMMJ01. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 9554. doi:10.1038/s41598-019-45840-6
25. Vinken M., Blaauboer BJ. In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. *Toxicol In Vitro.* 2017; 39:104-110. doi:10.1016/j.tiv.2016.12.004
26. Leon LL., Miranda CC., De Souza AO., Durán N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48(3): 449-450. doi:10.1093/jac/48.3.449
27. Numan, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Ullah, I., Khan, A. L., ... & Al-Harrasi, A. Chemical profile and in-vitro pharmacological activities of yellow pigment extracted from *Arthrobacter gandavensis*. *Process biochemistry.* 2018; 75: 74-82.
28. Maurício IL. *Leishmania Taxonomy*. In: Bruschi F., Gradoni L. (eds) *The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases*. 2018; Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_2
29. El Baidouri F., Diancourt L., Berry V., et al. Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(6):e2255. doi:10.1371/journal.pntd.0002255
30. Burza S., Croft SL., Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018; 392(10151): 951-970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2
31. Decuypere S., Vanaerschot M., Bruncker K., Imamura H., Müller S., Khanal B., Rijal S., Dujardin JC., Coombs GH. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(2):e1514. doi: 10.1371/journal.pntd.0001514
32. Samarasinghe SR., Samaranyake N., Kariyawasam UL., Siriwardana YD., Imamura H., Karunaweera ND. Genomic insights into virulence mechanisms of *Leishmania donovani*:

evidence from an atypical strain. *BMC Genomics*. 2018; 28:19(1): 843. doi: 10.1186/s12864-018-5271-z

5.2 PRODUTO 2

Leishmanicidal activity of fungal bioproducts: A systematic review.

Márcio Thomaz dos Santos Varjão^{1,2}, Alysson Wagner Fernandes Duarte^{1,3}, Luiz Henrique Rosa⁴, Magna Suzana Alexandre Moreira², Aline Cavalcanti de Queiroz^{1,2,3*}.

Affiliation

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões.
2. Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus A.C. Simões.
3. Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Complexo de Ciências Médicas, Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Campus Arapiraca.
4. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author: Ph.D. Aline Cavalcanti de Queiroz, Complexo de Ciências Médicas e de Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bairro Bom Sucesso, CEP 57309-005, Arapiraca, Alagoas, Brazil. E-mail address: aline.queiroz@arapiraca.ufal.br

Highlights

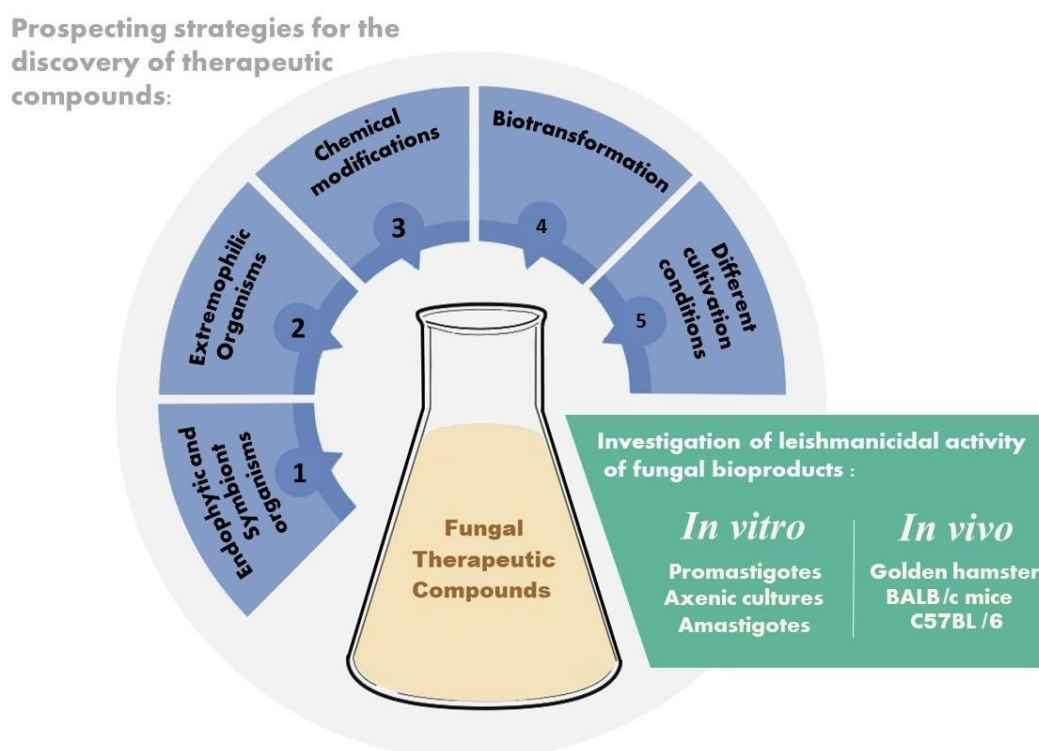
- *Leishmania amazonensis* was the most evaluated species (present in 49.6% of the studies).
- Bioproducts with leishmanicidal activity are mainly produced by *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp.
- Most studies (89.8%) performed exclusively *in vitro* assay.
- Assays with promastigotes are present in 70.1% of *in vitro* studies.
- Ethyl acetate was the main solvent used to produce the extracts.
- 66.1% of the studies evaluated isolated compounds.
- BALB/c mice is the main animal model (83.8%).

Abstract

The genome mining of biosynthetic genes from fungi demonstrates the enormous pharmacological potential that is still little explored. These results have encouraged the scientific community to invest in fungi as a source of innovative alternatives for the treatment of neglected diseases, such as leishmaniasis. Therefore, this work aimed to identify, through a systematic search in the databases of PubMed, Lilacs and Scielo, the existing evidence in the literature regarding the efficacy of the leishmanicidal activity of fungal bioproducts that represent new starting points for the advancement of pharmacotherapy of leishmaniasis. During the search process, 59 articles met all the eligibility criteria and, therefore, were included in this review. The studies demonstrate that different prospecting, cultivation, biotechnological and synthetic modification strategies contribute to the discovery and development of new therapeutic fungal compounds. 39 (66.1%) of the studies presented at least one isolated compound with leishmanicidal activity, while 20 (33.9%) evaluated only crude extracts or semipurified fractions. Terpenes, steroids and quinones were the most prevalent chemical classes among the isolated compounds. The active compounds are mainly produced by *Penicillium* and *Aspergillus* genera. A large majority (89.8%) of the selected studies were conducted *in vitro*. Only six studies performed *in vivo* assay. The species of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* were the most evaluated. The results support the hypothesis of the pharmacological potential of fungal bioproducts in the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Natural product, pre-clinical trial, microbial metabolite, antiparasitic agents.

Graphical abstract:



1. Introduction

Fungi constitute a diverse group of organisms that can be found in almost all ecosystems on Earth (PEAY; KENNEDY; TALBOT, 2016), including extreme environments such as Antarctic soils (ROSA, 2019) or deep ocean sediments (GROSSART et al., 2019). These organisms have crucial ecological roles in the regulation of the main processes of ecosystems, directly influencing the maintenance and composition of fauna and flora communities (PEAY; KENNEDY; TALBOT, 2016; VĚTROVSKÝ et al., 2019).

After insects, fungi are the second most diverse eukaryotic organisms on Earth (RAGHUKUMAR, 2017). The scientific nomenclature of fungi is established by the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (TURLAND et al., 2018). Currently, about 120,000 species of fungi have already been described and it is estimated that the fungal diversity is between 2.2 to 3.8 million (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017).

Fungi have been challenged by biotic and abiotic pressures over millions of years, causing adaptations in various aspects of the cellular mechanism such as metabolism, catabolism, enzymatic activity and gene expression, contributing to the enormous fungal biodiversity. Reflecting this process is the development of a rich chemical ecology expressed in the wide production of different metabolite profiles with potent physiological activities (BRAKHAGE, 2013; KELLER, 2019; KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; MAFART; COUVERT; LEGUÉRINEL, 2001; SPITELLER, 2015).

Secondary fungal metabolites commonly belong to four main chemical classes: indole alkaloids, non-ribosomal peptides, polyketides and terpenes (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). These fungi-derived bioactive compounds have been the source of many approved drugs, with various applications, such as hypolipidemic agent (lovastatin, compactin), antibiotic (penicillin, cephalosporin), anti-inflammatory and immunosuppressant (ascomycin, mycophenolic acid, cyclosporine A, gliotoxin) (HOEKSMAN et al., 2019; GONZÁLEZ-MEDINA, 2017; KÜCK; BLOEMENDAL; TEICHERT, 2014). In addition, studies have shown other biological activities of fungal products, such as antineoplastic (CHEN, 2016; DESHMUKH; PRAKASH; RANJAN, 2018), antiviral (LINNAKOSKI et al., 2018), antiparasitic (LENZI et al., 2018), among other properties (MASI et al., 2018; OSMANOVA; SCHULTZE; AYOUB, 2010; SINGH et al., 2017)

Given the several examples of successful results and considering that only a small fraction of the biodiversity of the Fungi Kingdom has been evaluated, the bioprospecting of fungal products has been established as a valuable starting point for obtaining medicines in the most diverse therapeutic applications (HOEKSMAN et al., 2019). The promising pharmacological potential of fungal metabolites has boosted the interest of the scientific community in the search for new alternatives for the treatment of infectious diseases with great relevance in public health, as is the case of leishmaniasis (NAGLE et al., 2014).

Leishmaniasis is a tropical disease whose etiologic agent is the flagellated protozoan of the genus *Leishmania*. These parasites are transmitted by the bite of contaminated sandflies. This disease has a zoonotic and anthroponotic character, having as main reservoirs (hosts) humans, wild mammals and domestic dogs (AKHOUNDI et al., 2016; (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021). *Leishmania* is an obligate intracellular parasite that has two evolutionary forms: the promastigote (flagellate) form present in the vector and the amastigote (aflagellate) form present in the cells of the host's mononuclear phagocytic system (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

The increase in therapeutic failures, largely due to conditions such as resistance to chemotherapy, side effects / toxicity and high cost of drugs, has been detrimental to the eradication of leishmaniasis. In several regions, drugs of the first choice for the treatment of leishmaniasis continue to be pentavalent antimonials. Other therapeutic options include amphotericin B, pentamidine, miltefosine and paromomycin (DIDWANIA et al., 2017; PONTE-SUCRE et al., 2017; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

In the light of these observations, this study aimed to identify, through a systematic search in electronic databases, the existing evidence in the literature regarding the effectiveness of the activity of fungal bioproducts that represent new potential alternatives for the treatment of leishmaniasis.

2. Material and methods

The present study is a systematic review of the literature, in which database searches were carried out in PubMed (National Library of Medicine / NLM), Lilacs (Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences) and Scielo (Scientific Library Online). The search for the articles was carried out between the months of November and December 2019, using

the following descriptors / free terms and Boolean connectors: (1) ("Fungi"[Mesh]) AND "Leishmania"[Mesh]; (2) Fungi AND *Leishmania*; (3) Fungi AND leishmanicidal; (4) Lichen AND *Leishmania* e (5) Fungo AND *Leishmania*.

The inclusion criteria defined to compose the review sample were: original articles with experimental design that tested the leishmanicidal potential of bioproducts (extracts / isolated compounds) obtained from fungi (with at least one active bioproduct), and that are available in full, published in any period and language. Articles that did not address the thematic focus of this review or that did not follow all inclusion criteria were excluded.

The publications found during the search process were initially evaluated for the title and reading of the abstract to verify the adequacy regarding the inclusion criteria. After selecting articles from all databases, repeated articles were excluded. Finally, all articles were read in full.

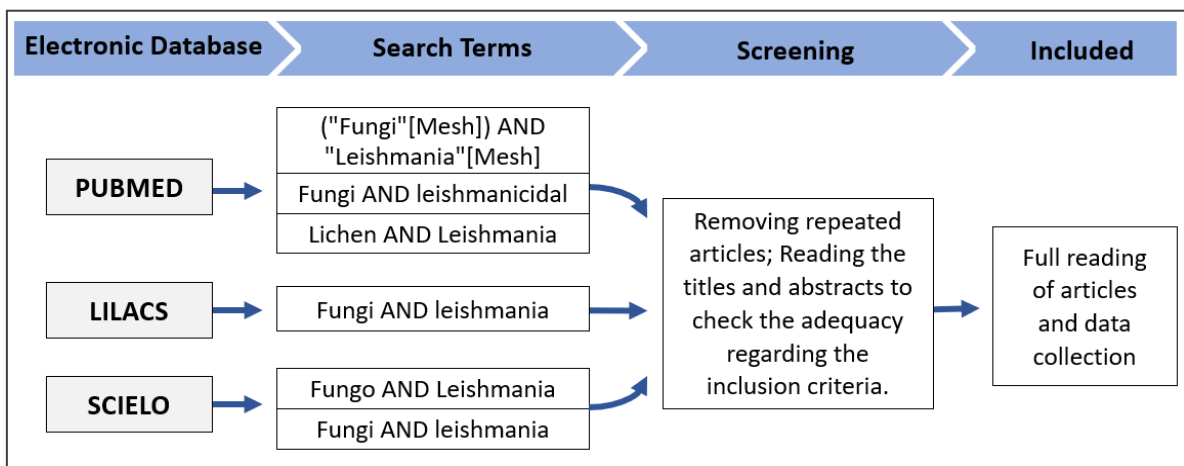


Figure 1 - diagram of the study selection process for inclusion in the systematic review.

3. Results

In the process of obtaining the articles, PUBMED was the database that presented the largest number of results found (**Table 1**), followed by LILACS and SCIELO respectively. In total 598 results were obtained. Among these, 520 articles were excluded because they did not address the proposed theme. In addition, there was no exclusion due to incomplete data or other criteria.

Initially 78 articles were selected by searching the databases. In addition to these, two new articles were found performing the reading of the references of the included articles, thus totaling 80 articles. After excluding the repeated studies, 59 studies remained. The articles

were coded by the acronym SA-, from the initials of “*Selected Articles*”, followed by the article number in descending order from the date of publication.

Table 1 - Number of articles found and selected in the systematic review using different databases and descriptors.

Database	Descriptors	Results	Selected
PUBMED	("Fungi"[Mesh]) AND " <i>Leishmania</i> "[Mesh]	366	47
	Fungi AND leishmanicidal	131	19
	Lichen AND <i>Leishmania</i>	6	5
LILACS	Fungi AND <i>Leishmania</i>	81	2
SCIELO	Fungo AND <i>Leishmania</i>	5	2
	Fungi AND <i>Leishmania</i>	9	3
Other sources		–	2
		Total: 598	80
Total articles selected after excluding duplicates:			59

The oldest publication found, dating the 1997 describes *in vitro* and *in vivo* studies carried out by Fournet and collaborators [SA-59]. In the following decades, there was a variation in the number of annual publications, with its highest peak in 2018 with 9 articles, as shown in

Figure 2.

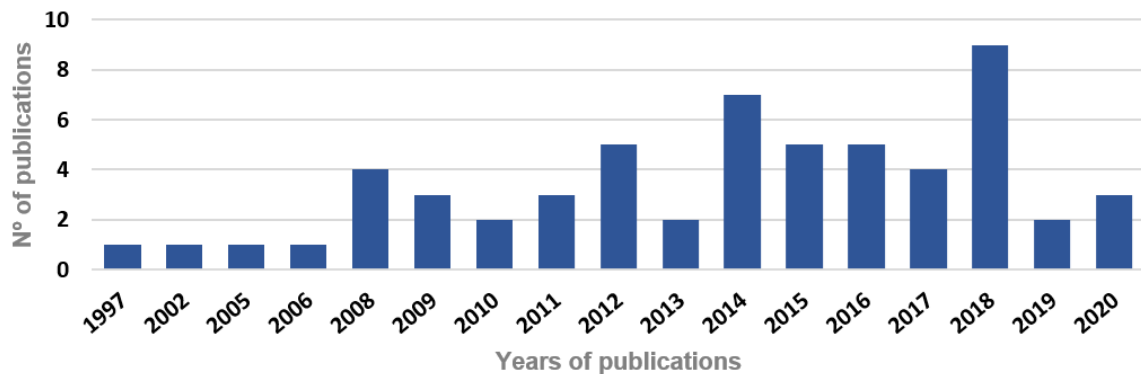


Figure 2 - Annual distribution of publications selected in the systematic review

Regarding the design of the selected studies (**Figure 3**), 53 (89.8 %) carried out exclusively *in vitro* assays, while only 2 (3.4 %) carried out exclusively *in vivo* assays. Another 4 (6.8 %) performed both analysis methodologies (*in vitro* and *in vivo*).

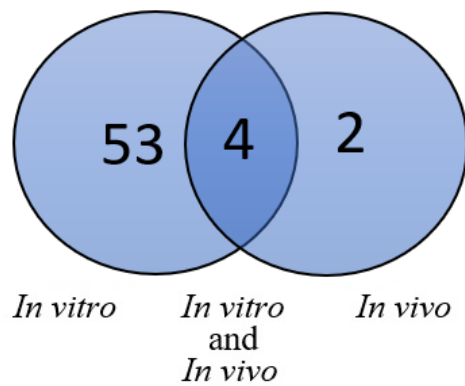


Figure 3 - Venn diagram grouping the studies by the type of assay *in vivo* and *in vitro*.

In **Table 2** the 57 studies with *in vitro* tests are gathered. The information collected to compose this table was: the species of fungi; fungal bioproducts (extract / isolated compound) with leishmanicidal activity; the species of *Leishmania* and its evolutionary form (promastigote / amastigote) and, finally, the reference of the article (name of the main author and year of publication).

Table 2 - *In vitro* studies of leishmanicidal activity of fungal bioproducts selected in the systematic review, summarized by year of publication.

Fungi (specie and strain identifier)	Extract / Compound isolated	<i>Leishmania</i> species (<i>in vitro</i>)	Reference
<i>Trichoderma asperelloides</i> LIBASP02	Ethanolic Extract		
	HMWF fraction	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-1] LOPES et al., 2020.
	LMWF fraction		
	LMWF fraction	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	
<i>Acremonium fusidioides</i> UFMGCB 13041			
<i>Penicillium allii-sativi</i> UFMGCB 13048, UFMGCB 13045, UFMGCB 13053, UFMGCB 13054			
<i>Penicillium chrysogenum</i> UFMGCB 13035; UFMGCB 13036; UFMGCB 13039; UFMGCB 13042; UFMGCB 13043; UFMGCB 13046; UFMGCB 13047; UFMGCB 13049; UFMGCB 13050; UFMGCB 13051; UFMGCB 13052; UFMGCB 13038.	Ethyl acetate extract	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-2] OGAKI et al., 2020.
<i>Penicillium palitans</i> UFMGCB 13034; UFMGCB 13037; UFMGCB 13027; UFMGCB 13028; UFMGCB 13029; UFMGCB 13030; UFMGCB 13031; UFMGCB 13032; UFMGCB 13033; UFMGCB 13044; UFMGCB 13056; UFMGCB 13057			
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> UFMGCB 13055			

<i>Penicillium chrysogenum</i> UFMGCB 12439; UFMGCB 12447; UFMGCB 12444; UFMGCB 12445; UFMGCB 13066	Dichloromethane extract	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-3] DE MENEZES et al., 2020.
<i>Penicillium palitans</i> UFMGCB 12446 <i>Penicillium</i> sp. UFMGCB 12440; UFMGCB 13070; UFMGCB 13071; UFMGCB 13065; UFMGCB 12575; UFMGCB 13062; UFMGCB 13081			
<i>Phyllosticta capitalensis</i> Tg06	Ethyl acetate extract	<i>L. amazonensis</i> (promastigote) <i>L. infantum</i> (promastigote)	[SA-4] GOLIAS et al., 2019.
<i>Paecilomyces</i> sp. 7A22	Harzialactone A	<i>L. amazonensis</i> (promastigote) <i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-5] BRAUN et al., 2019.
<i>Geosmithia langdonii</i>	(1S,2R,3R,4R,5R)-2,3,4-trihydroxy-5- methylcyclohexyl-2',5'-dihydroxybenzoate (1S,2S,3S,4R,5R)- 4-[(2',5'-dihydroxybenzyl)oxy]-5- methylcyclohexane-1,2,3-triol	<i>L. donovani</i> (promastigote)	[SA-6] MALAK et al., 2018.
<i>Bipolaris</i> sp. C36 <i>Bipolaris</i> sp. AZ26	Ethyl acetate extract	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-7] DE ALMEIDA et al., 2018.
<i>Agrocybe aegerita</i>	Fucogalactan FG-Aa	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-8] MOTOSHIMA et al., 2018.
<i>Grifola frondosa</i>	Ethanol Extract Semipurified fraction	<i>L. donovani</i> (promastigote) <i>L. donovani</i> (promastigote) <i>L. donovani</i> (amastigote) <i>L. major</i> (promastigote) <i>L. tropica</i> (promastigote)	[SA-9] SULTANA, et al., 2018
<i>Vermisporium-like</i> CMIAT232 <i>Emericella nidulans</i> CMIAT233 <i>Dichotomophthora portulacae</i> CBS 149.94 <i>Dichotomophthora boerhaaviae</i> CMIAT 235	Enzymatic extract	<i>L. amazonensis</i> (promastigote / amastigote)	[SA-10] ALVES et al., 2018.
<i>Morchella importuna</i>	Aqueous fraction 80% ethanol fraction Water-soluble polysaccharide fraction Polyphenolic fraction	<i>L. tropica</i> (promastigote)	[SA-11] PERETZ et al., 2018.
<i>Nectria pseudotrichia</i>	10-acetyl trichoderonic acid A 6'-acetoxy-piliformic acid hydroheptelidic acid	<i>L. braziliensis</i> (amastigote)	[SA-12] COTA et al., 2018.
<i>Pseudogymnoascus destructans</i> UFMGCB 10169; UFMGCB 10453; UFMGCB 10312; UFMGCB 10185; UFMGCB 10268; UFMGCB 10286; UFMGCB 10310; UFMGCB 10339; UFMGCB 10342; UFMGCB 10356; UFMGCB 10378; UFMGCB 10441; UFMGCB 10454 <i>Mortierella</i> sp. UFMGCB 10364 <i>Mortierella</i> sp. UFMGCB 10351 <i>Mortierella</i> sp. UFMGCB 10316 <i>Penicillium chrysogenum</i> UFMGCB 10240 <i>Pseudogymnoascus</i> sp. UFMGCB 10344	Dichloromethane extract	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-13] GOMES et al., 2018.
Lichenized fungi	Usnic acid	<i>L. major</i> (promastigote) <i>L. tropica</i> (promastigote) <i>L. infantum</i> (promastigote)	[SA-14] DERICI et al., 2018.

<i>Cochliobolus</i> sp.	Ethyl acetate extract Anhydrocochlioquinone A	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-15] CAMPOS et al., 2017.
<i>Diaporthe phaseolorum</i> 92C	18-des-hydroxy Cytochalasin H	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-16] BRISOW et al., 2017.
<i>Aspergillus terreus</i> F7	Terrein Butyrolactone I Butyrolactone V	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-17] DA SILVA et al., 2017.
<i>Cunninghamella blakesleeana</i> ATCC 8688A + <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	6 β ,17 β -dihydroxy-7 α ,17 α -dimethylestr-4-en-3-one	<i>L. major</i> (promastigote)	[SA-18] SIDDIQUI et al., 2017.
<i>Macrophomina phaseolina</i> KUCC 730	11 β ,17 β -dihydroxy-7 α ,17 α -dimethylestr-4-en-3-one		
<i>Trametes versicolor</i>	Ergosterol peroxide	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-19] LELIEBRE-LARA et al., 2016.
		<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	
	Trametenolic acid B	<i>L. amazonensis</i> (promastigote) <i>L. amazonensis</i> (amastigote)	
<i>Fusarium</i> sp.	Integracides H	<i>L. donovani</i> (promastigote)	[SA-20] IBRAHIM et al., 2016a.
	Integracides J		
<i>Fusarium</i> sp.	Integracides F	<i>L. donovani</i> (promastigote)	[SA-21] IBRAHIM et al., 2016b.
	Integracides G		
<i>Aspergillus terreus</i>	(22E,24R)-stigmasta-5,7,22-trien-3- β -ol	<i>L. donovani</i> (promastigote)	[SA-22] ELKHAYAT et al., 2016.
	stigmast-4-ene-3-one		
	Terrenolide S		
<i>Aspergillus</i> sp. 114QD	2-hidroxifenilquinoline	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-23] PARRA LIZARAZU et al., 2016.
		<i>L. braziliensis</i> (promastigote)	
<i>Curvularia</i> sp. P1-F1 <i>Phomopsis</i> sp. P5-F1	Ethanol Extract		
<i>Cochliobolus sativus</i> P2-F3	Ethanol extract	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-24] DO NASCIMENTO et al., 2015.
	Hexane phase		
	Cochlioquinone A + isocochlioquinone		
	Anhydrocochlioquinone A		
<i>Mucor ramannianus</i> ATCC 9628	1,3-cis-1-Methoxy-1-(2,5-dihydroxyphenyl)-3-hydroxy-3-phenylpropane	<i>L. donovani</i> (unreported evolutionary form)	[SA-25] MIKELL et al., 2015.
<i>Astraeus hygrometricus</i>	Astrakurkurene	<i>L. donovani</i> (promastigote)	[SA-26] MALLICK et al., 2015.
		<i>L. donovani</i> (amastigote)	
<i>Fusarium</i> sp. JQ905668.1 <i>Fusarium</i> sp. HM631978.1 <i>N. pseudotrichia</i> JN995626.1 <i>Xylaria</i> sp. JN995626.1	Ethyl acetate extract	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-27] CAMPOS et al., 2015.
Lichenized fungi <i>Cladonia substellata</i>	Usnic acid	<i>L. infantum chagasi</i> (promastigote)	[SA-28] DA LUZ et al., 2015.

<i>Trichosporum</i> sp.	(6-S)-3-(1,3-dihydroxypropyl)-6-(2-methylpropyl)piperazine-2,5-dione (6-R)-3-(1,3-dihydroxypropyl)-6-(2-methylpropyl)piperazine-2,5-dione	<i>L. donovani</i> (promastigote)	[SA-29] METWALY et al., 2015.
<i>Geosmithia langdonii</i>	Ethyl acetate extract (potato dextrose medium) Ethyl acetate extract (tryptic soy medium) 4-[2',4'-dihydroxy-6'-(hydroxymethyl)benzyl]benzene-1,2-diol (+)-epiepoformin (4S,5S)-4,5-dihydroxy-2-methylcyclohex-2-enone 2,5-dihydroxybenzaldehyde 3-hydroxybenzyl alcohol 2,5-dihydroxybenzyl alcohol 3-hydroxytoluene	<i>L. donovani</i> (promastigote)	[SA-30] MALAK et al., 2014.
<i>Cunninghamella echinulate</i> ATCC 9244 + <i>Cunninghamella blakesleeana</i> ATCC 9244	Nandrolone 10 β ,16 α ,17 β -trihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one 6 β ,10 β ,17 β -trihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one 10 β ,17 β -dihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one 6 β ,17 β -dihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one 10 β -hydroxy-19-nor-4-androsten-3,17-dione 16 β ,17 β -Dihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one	<i>L. major</i> (promastigote)	[SA-31] BAYDOUN et al., 2014.
<i>Aspergillus</i> sp.	Kojic acid (KA)	<i>L. amazonensis</i> (promastigote) <i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-32] RODRIGUES et al., 2014.
<i>Edenia</i> sp. F0755	Palmarumycin CP18	<i>L. donovani</i> (amastigote)	[SA-33] ORTEGA, et al., 2014.
<i>Tricholoma giganteum</i> AMFH- 510	80% ethanol fraction	<i>L. donovani</i> (promastigote)	
<i>Astraeus hygrometricus</i> AMFH- 583	80% ethanol fraction	<i>L. donovani</i> (promastigote)	
	Water-soluble polysaccharide fraction	<i>L. donovani</i> (amastigote)	
<i>Russula laurocerasi</i> AMFH- 602	Water-soluble polysaccharide fraction	<i>L. donovani</i> (amastigote)	[SA-34] MALLICK et al., 2014.
	Polyphenolic extract		
<i>Russula albonigra</i> AMFH- 598 <i>Russula delica</i> AMFH- 600 <i>Termitomyces eurhizus</i> AMFH- 604	Water-soluble polysaccharide fraction	<i>L. donovani</i> (amastigote)	
<i>Drechslera rostrate</i> DSM 62596	Ethanol extract di-2-ethylhexyl phthalate	<i>L. major</i> (promastigote)	[SA-35] AWAAD et al., 2014.
<i>Eurotium tonpholium</i> ATCC 16440	Ethanol extract 1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methyl-anthraquinone		
<i>Nigrospora sphaerica</i>		<i>L. braziliensis</i> (promastigote)	
	Aphidicolin	<i>L. braziliensis</i> (amastigote) <i>L. major</i> (promastigote)	
	3-deoxy-aphidicolin	<i>L. braziliensis</i> (promastigote) <i>L. major</i> (promastigote)	[SA-36] SANTOS et al., 2014.
	3-oxoaphidicolin	<i>L. braziliensis</i> (promastigote)	

	3-oxime-aphidicolin	<i>L. braziliensis</i> (promastigote) <i>L. braziliensis</i> (amastigote)	
<i>Penicillium herquei</i> LaBioMi 019	Citreorosein Emodin Janthinone	<i>L. braziliensis</i> (promastigote)	[SA-37] MARINHO et al., 2013.
<i>Fusarium</i> sp. TA50 <i>Fusarium</i> sp. TA54 <i>Verticillium</i> sp. TH28 2TA2 strain	Ethyl acetate extract	<i>L. mexicana</i> (promastigote)	[SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013.
<i>Astraeus hygrometricus</i>	Astrakurkurone	<i>L. donovani</i> (promastigote)	[SA-39] LAI et al., 2012.
<i>Agaricus blazei</i>	Aqueous extract (crude) Aqueous extract (Fab4) Aqueous extract (Fab5)	<i>L. chagasi</i> (promastigote) <i>L. chagasi</i> (amastigote)	[SA-40] VALADARES et al., 2012a.
<i>Aspergillus</i> sp. F1544	Pseurotin A 14-norpseurotin A FD-838 Pseurotin D Fumoquinone B	<i>L. donovani</i> (amastigote)	[SA-42] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2012.
<i>Alternaria</i> sp. UFMGCB 2301; UFMGCB 2508; UFMGCB 2564; UFMGCB 2673 <i>Cadophora luteo-olivacea</i> UFMGCB 2569 <i>Helgardia</i> sp. UFMGCB 2630 <i>Herpotrichia</i> sp. UFMGCB 2682 <i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i> UFMGCB 2272 <i>Phaeosphaeria</i> sp. UFMGCB 2515; UFMGCB 2518; UFMGCB 2528; UFMGCB 2560; UFMGCB 2649; UFMGCB 2650; UFMGCB 2667; UFMGCB 2669 <i>Oculimacula</i> sp. UFMGCB 2567 <i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> UFMGCB 2666 <i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i> UFMGCB 2672	Ethanol extract	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
<i>Aspergillus</i> sp. F1544A; F1544B; F1544C <i>Diaporthe</i> sp. F1647C <i>Diaporthe</i> sp. F1647D <i>Edenia</i> sp. F0755A; F0755B; F0755C; F0755D; F1644B; F1644C Unidentified sp. strain F0194B <i>Mycosphaerella</i> sp. F2140A; F2140B; F2140C; F2140D <i>Nectria</i> sp. F1491B; F1491C <i>Penicillium</i> sp. F1534C <i>Phomopsis</i> sp. F1566C; F1566D <i>Stenocarpella</i> sp. F0275A; F0275B; F0275D <i>Xylaria</i> sp. F1220D <i>Xylariaceae</i> sp. F0307B	Ethyl acetate extract	<i>L. donovani</i> (amastigote)	[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.
<i>Mycosphaerella</i> sp. F2140	Cercosporin Cercosporin acetylate	<i>L. donovani</i> (amastigote)	[SA-45] MORENO et al., 2011.

<i>Agaricus blazei</i>	Aqueous extract	<i>L. amazonensis</i> (promastigote) <i>L. chagasi</i> (promastigote) <i>L. major</i> (promastigote) <i>L. amazonensis</i> (amastigote) <i>L. chagasi</i> (amastigote) <i>L. major</i> (amastigote)	[SA-46] VALADARES et al., 2011.
<i>Lentinus strigosus</i> UFMGCB975	Panepoxydone Hypnophilin	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-47] SOUZA- FAGUNDES et al., 2010.
<i>Arthrinium</i> sp. UFMCB 509; UFMCB 513 <i>Fusarium oxysporum</i> UFMCB 529 <i>Cochliobolus melinidis</i> UFMCB 554 <i>Alternaria arborescens</i> UFMCB 563 <i>Penicillium citrinum</i> UFMCB 579 <i>Gibberella</i> sp. UFMCB 648 <i>Fungal endophyte</i> UFMCB 914	Ethyl acetate extract	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-48] ROSA et al., 2010.
<i>Gymnopilus</i> cf. <i>areolatus</i> UFMGCB36 <i>Nothopanus hygrophanus</i> CCB216 <i>Lentinus</i> cf. <i>strigosus</i> CCB162 <i>Irpex lacteus</i> CCB196 <i>Pleurotus flabellatus</i> CCB210 Basidiomycete (not identified) CCB369	Ethyl acetate extract (Mycelium) Ethanol extract (Basidium)	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-50] ROSA et al., 2009.
<i>Cochliobolus</i> sp. UFMGCB-555	Cochlioquinone A Isocochlioquinone A	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-51] CAMPOS et al., 2009.
<i>Chaetomium</i> sp.	Chaetoxanthone C1 Chaetoxanthone C2 Chaetoxanthone C3	<i>L. donovani</i> (amastigote)	[SA-52] PONTIUS et al., 2008.
<i>Edenia</i> sp.	Preussomerin EG1 Palmarumycin CP ₂ Palmarumycin CP ₁₇ Palmarumycin CP ₁₈ CJ-12,371	<i>L. donovani</i> (amastigote)	[SA-53] MARTÍNEZ- LUIS et al., 2008.
<i>Diaporthe phaseolorum</i> VA14 <i>Phyllosticta</i> sp. or <i>Guignardia mangiferae</i> VA16 <i>Phomopsis</i> sp. VA35	Ethyl acetate extract	<i>L. tarentolae</i> (promastigote)	[SA-54] GUIMARÃES et al., 2008.
Lichenized fungi <i>Protousnea poeppigii</i>	Dichloromethane extract Methanolic extract Isodivarcatic acid Isodivarcatic acid diacetate	<i>L. amazonensis</i> (promastigote) <i>L. braziliensis</i> (promastigote)	[SA-55] SCHMEDA- HIRSCHMANN et al., 2008
Lichenized fungi <i>Usnea florida</i>	Dichloromethane extract Methanolic extract Divaricatinic acid Usnic acid	<i>L. infantum</i> (promastigote)	

<i>Pycnopus sanguineus</i>	Hexanic extract	<i>L. panamensis</i> (amastigote)	[SA-56] CORREA et al., 2006.
	Acetone extract		
	Fraction 1		
	Fraction 2		
	Ergosterol 5,8-endoperoxide		
<i>Penicillium janthinellum</i> LaBioMi-018	Citrinin	<i>L. mexicana</i> (amastigote)	[SA-57] MARINHO et al., 2005.
Lichenized fungi <i>Ramalina celastri</i> 30911	GMPLY	<i>L. amazonensis</i> (amastigote)	[SA-58] NOLETO et al., 2002.
	GMPLYVO	<i>L. amazonensis</i> (promastigote) <i>L. amazonensis</i> (amastigote)	
Lichenized fungi <i>Protosnea malacea</i>	(+) Usnic acid	<i>L. amazonensis</i> (promastigote)	[SA-59] FOURNET et al., 1997.
<i>Erioderma leylandii</i>	1'-Chloropannarine	<i>L. braziliensis</i> (promastigote) <i>L. donovani</i> (promastigote)	
<i>Psoroma pallidum</i> Nyl.	Pannarine		

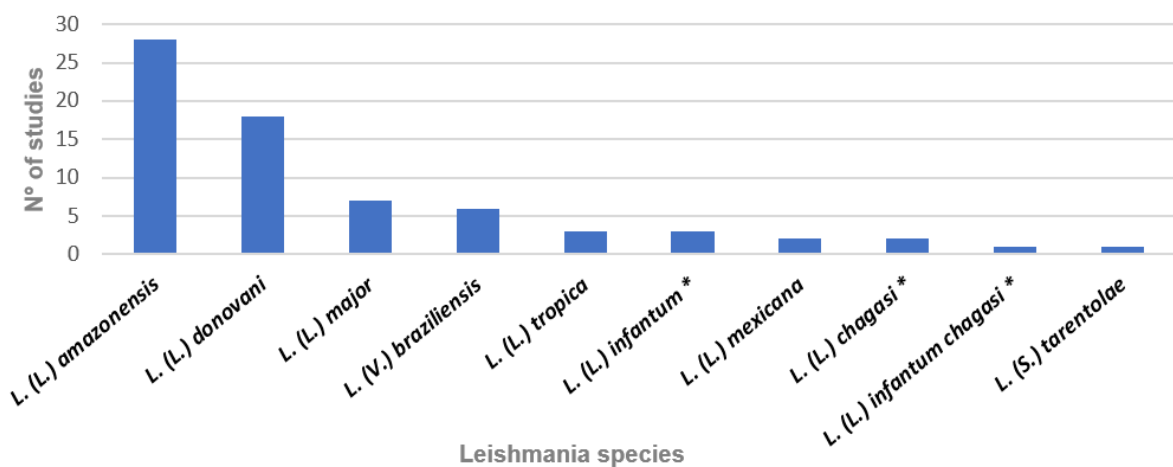
The 6 studies with *in vivo* tests are presented in **Table 3**. In this table, information is compiled such as: the fungal bioproducts tested and the microorganism of origin, the methodology applied in the test, the main results presented and the publication reference.

Table 3 - *In vivo* studies of leishmanicidal activity of fungal bioproducts selected in the systematic review, summarized by year of publication.

Fungi Extract / Compound	Animal Model	<i>Leishmania</i> species	Treatment	Result	Reference
<i>Aspergillus</i> sp. Kojic acid (KA)	Golden Hamsters	<i>L. amazonensis</i>	Daily treatment with topical formulation for 4 weeks started after 5 weeks of infection.	There was a decrease in the number of parasites at the injury site by 92.1%. The formulation promoted the production of collagen contributing to healing.	[SA-32] RODRIGUES et al., 2014.
<i>Drechslera rostrata</i> Ethanol extract					
di-2-ethylhexyl phthalate <i>Eurotium tonpholium</i>	BALB/c mice	<i>L. major</i>	Daily oral treatment of medications (twice a day) for 28 days (100 mg / kg of the ethanolic extract or 50 mg / kg of the isolated compounds).	Treatment with extracts and isolated compounds induced complete healing after 17 and 13 days of treatment, respectively.	[SA-35] AWAAD et al., 2014.
Ethanol extract 1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methyl-anthraquinone					

<i>Agaricus blazei</i>	Aqueous extract (crude) Aqueous extract (Fab5)	BALB/c mice	<i>L. chagasi</i>	Daily oral treatment with Fab5 fraction or aqueous crude extract (20 and 100 mg / kg / day, respectively), 5 days before infection, and maintained for another 20 days post-infection (chemoprophylactic regime) or between days 0–20 infection (therapeutic regimen).	Animals treated by the two treatment regimens had a significant reduction in parasitic burden on the liver, spleen and lymph nodes. The treated mice had higher levels of IFN- γ and lower levels of IL-4 and IL-10.	[SA-40] VALADARES et al., 2012a.
<i>Agaricus blazei</i>	Aqueous extract (crude)	BALB/c mice	<i>L. amazonensis</i>	Daily oral administration of 100 mg / kg bw per day for 20 days.	Mice treated presented at 60% reduction in the inflammation of infected footpads, 60 and 66% reductions in parasitic loads on the footpad and drainage lymph nodes, respectively. These treated animals produced significantly higher levels of IFN- γ , NO, higher levels of parasite-specific IgG2a isotype antibodies, and lower levels of IL-4, and IL-10 in the spleen and lymph node cell cultures.	[SA-41] VALADARES et al., 2012b.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Sophy β -glucana	BALB/c and C57BL/6 mice	<i>L. amazonensis</i>	The mice continuously received water supplemented with 5% β -glucan Sophy together with conventional feed ad libitum.	Supplementation with Sophy β -glucan increased NK activity and IFN- γ levels in infected C57BL / 6 mice. In addition, the treated C57BL / 6 showed lower swelling of the infected footpad compared to the untreated group.	[SA-49] YATAWARA et al., 2009.
<i>Protosnea malacea</i>	(+) Usnic acid	BALB/c mice	<i>L. amazonensis</i>	Subcutaneous (intralesional injections: 25 mg / kg bw) or oral (25 mg / kg bw).	The treatments had no effect.	[SA-59] FOURNET et al., 1997.

In the 59 studies selected in this systematic review 8 species of *Leishmania* were evaluated (Figure 4). Three species were prevalent: *L. amazonensis* in 28 studies (47.4%), *L. donovani* in 18 (30.5%) and *L. major* being evaluated in 7 studies (11.8%).



(*) same species

Figure 4 - Number of studies selected in the systematic review in relation to the *Leishmania* species studied.

Among the 57 studies with *in vitro* tests selected in this systematic review (**Table 2**) 28 evaluated the susceptibility of amastigotes of *Leishmania* spp. to fungal bioproducts (supplementary material 4). 12 studies obtained amastigote forms by performing axenic cultures, 13 studies used murine macrophage culture and 3 other studies used human monocytic cell lines (**Figure 5**).

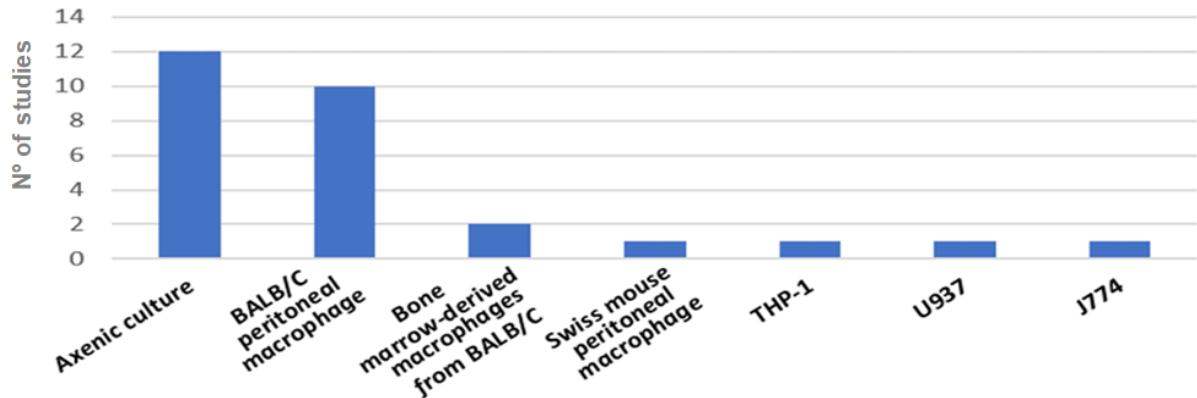


Figure 5 - Number of studies selected in the systematic review in relation to the test method for *in vitro* evaluation of the susceptibility to amastigote forms.

Among the selected studies 14 genera belong to the phylum *Basidiomycota* (20.6%); only 3 to traditional *Zygomycota* (4.5%) and in greater prevalence are *Ascomycota* with 50 different genera (74,6%). The bioproducts with leishmanicidal activity were mainly produced by *Penicillium* sp. (11.9%), *Aspergillus* sp. (10.2%) and *Fusarium* sp. (8.5%). Altogether, 68 different genera of fungi were identified in the analyzed articles (supplementary material 6).

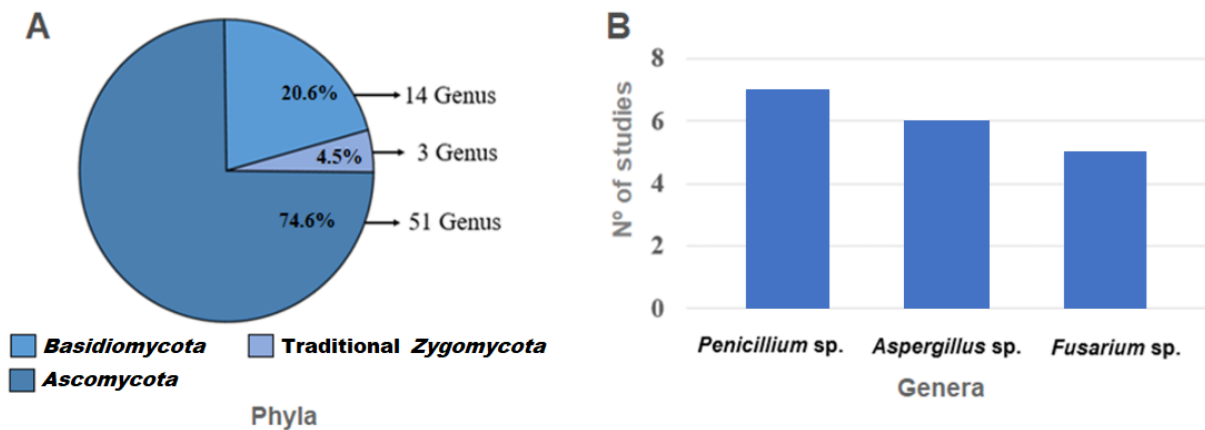


Figure 6 - Main genera and phyla of fungi that produce bioproducts with leishmanicidal activity.

Moreover, 39 (66.1%) of the studies presented at least one isolated compound with leishmanicidal activity, while 20 (33.9%) evaluated only crude extracts or semipurified fractions (**Figure 7**). Altogether, 84 different isolated compounds were reported. The most prevalent chemical classes were terpenes with 14 compounds (16.67%), steroids with 10 compounds (11.91%), quinones with 9 compounds (10.71%), and depsides with 5 compounds (5.95%) (supplementary material 7)

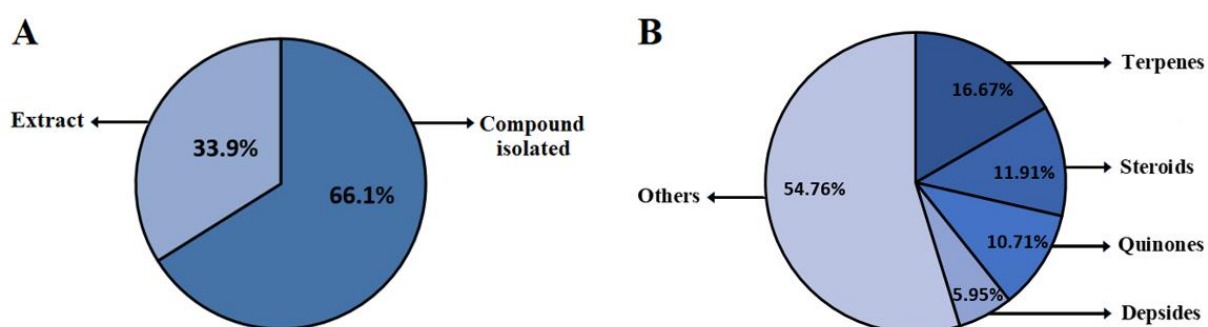


Figure 7 – Proportion of studies with at least one isolated compound and studies with only crude extracts or semi-purified fractions (A). Main chemical classes of isolated fungal compounds with leishmanicidal activity (B).

4. Discussion

4.1 Prospecting for bioactive fungal compounds

The classic methodology for prospecting fungal metabolites is based mainly on the identification and cultivation of isolates in the laboratory, followed by solvent extraction and solvent-solvent partition to produce fractions with different polarities. In the end, the characterization and isolation of the metabolites of the crude extracts or their fractions, commonly involve the use of chromatographic methods to obtain pure products (BUCAR; WUBE; SCHMID, 2013; CHÁVEZ et al., 2015; LI; LOU, 2018).

Among the studies included in this review, 38 (70.4%) of them present at least one isolated compound with leishmanicidal activity, while 16 (29.6%) of the studies evaluated only crude extracts or semipurified fractions. Regarding the production of the extracts, the main solvents used were ethyl acetate, acetone, water, dichloromethane, ethanol, hexane and methanol (supplementary material 3).

Despite the recurring rediscovery of already known compounds, fungi continue to play a central role in contemporary pharmacology. Microbial genome mining has demonstrated the existence of several clusters of silent biosynthetic genes that represent a huge field of exploration for new metabolites with potential therapeutic activities. These discoveries have again attracted the scientific community and the pharmaceutical industry to invest in prospecting for bioactive fungal compounds (BALTZ, 2019; KELLER, 2019; PYE et al., 2017). Among the articles analyzed in this review, it was observed that in the search for fungal metabolites, the researchers sought to establish some prospecting strategies to enhance the discovery of therapeutic compounds.

4.1.1 Prospecting strategies – Endophytic and symbiont organisms

Endophytes are a taxonomic and ecologically heterogeneous group of microbial communities, including bacteria, archaea, protists and mainly fungi, which at some point in their lives colonize plant tissues, in mandatory or facultative associations, without causing damage to them (HARDOIM et al., 2015; OMOMOWO; BABALOLA, 2019). The close relationship that endophytic fungi establish with the host plants, allow them to produce new organic molecules, including terpenoids, peptides, carbohydrates, aromatics, hydrocarbons and other biologically active compounds with applications in medicine, agriculture and industrial facilities (DESHMUKH et al., 2018; STROBEL, 2018; TEIXEIRA et al., 2019).

Golias et al. (2019) [SA-4] reported that crude extracts of the endophytic fungus *Phyllosticta capitalensis* (Desr.) Cogn. (Melastomataceae) isolated from healthy leaves of *Tibouchina granulosa* had activity against *L. amazonensis* and *L. infantum*. The study of De Almeida et al. (2018) [SA-7] investigated the chemical composition of crude extracts from strains of endophytic fungi of the genus *Bipolaris* isolated from two species of aquatic macrophytes: *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.). In biological screening, crude extracts exhibited activity against *L. amazonensis* promastigotes with IC₅₀ values ranging from 70–84,2 µg.mL⁻¹. Alves et al. (2018) [SA-10] described the production of lipases and biological activity against the parasite *L. amazonensis* from endophytic fungi: *Dichotomophthora portulacae*, *Dichotomophthora boerhaaviae*, *Emericella nidullans* and *Vermisporium*-like, obtained from fresh seeds of *Jatropha curcas* L.

Two studies selected in this review evaluated the leishmanicidal activity of endophytic fungi isolated from the native Brazilian tree: *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), Brazilwood. In

the first study, Campos et al. (2015) [SA-27] isolated 82 fungi from stems and barks of Brazilwood. The crude extract of ethyl acetate from three isolates (*Fusarium* sp., *Nectria pseudotrichia* and *Xylaria* sp.) It was able to inhibit *L. amazonensis*. On the other hand, Cota et al. (2018) [SA-12] demonstrated the inhibitory activity against *L. braziliensis* of three compounds isolated from the fungus *N. pseudotrichia*: 10-acetyl trichoderonic acid A, 6'-acetoxy-piliformic acid, hydroheptelidic acid.

Campos et al. (2017) [SA-15] verified the activity against *L. amazonensis* of anhydrococlioquinone A (ANDC-A) obtained from the fungus *Cochliobolus* sp. isolated from the plant *Piptadenia adiantoides* JF Macbr (Fabaceae). Previously, two other compounds of the fungus *Cochliobolus* sp. (cochlioquinone A and isocochlioquinone A) had also shown activity against *L. amazonensis* (CAMPOS et al., 2009) [SA-51]. In the study by Brissow et al. (2017) [SA-16], the chemical investigation of the ethyl acetate extract of the endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum-92C* isolated from the roots of *Combretum lanceolatum* led to the isolation of the 18-des-hydroxy cytochalasin H active against promastigotes of *L. amazonensis*.

Four studies from this review evaluated the leishmanicidal potential of secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus* spp. In the study by Da Silva et al. (2017) [SA-17] the compounds terrein, butyrolactone I and butyrolactone V, isolated from the crude extract of *Aspergillus terreus-F7* obtained from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., showed activity against *L. amazonensis*. In the study by Elkhayat et al. (2016) [SA-22] compounds (22E, 24R)-stigmasta-5,7,22-trien-3- β -ol, stigmast-4-ene-3-one and terrenolide S, isolated from the obtained *Aspergillus terreus* from *Carthamus lanatus* (Asteraceae) roots, exhibited activity against *L. donovani*.

In the research carried out by Martínez-Luis et al. (2011) [R-44], 25 fungi were isolated from the leaves of nineteen plants collected in the protected areas of Panama. Eleven isolates – including *Aspergillus* sp. – presented good antiparasitic potential, showing moderate or marked activity against *L. donovani* with inhibitions of 65.3 - 98.5%.

In another study, five compounds isolated from *Aspergillus* sp. obtained from a mature leaf of *Guapira standleyana* (Nyctaginaceae), which showed good activity (IC₅₀: 0.5 - 5.8 μ M) against *L. donovani* (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2012) [SA-42]. Formerly Martínez-Luis et al. (2008) [SA-53] had verified – in a similar study carried out in 2012 – the leishmanicidal

activity of five compounds of the fungus *Edenia* sp. isolated from *Guapira standleyana* against *L. donovani*.

A survey of tetracyclic triterpenoids isolated from the endophytic fungus *Fusarium* sp. obtained from the roots of *Mentha longifolia* L. (Labiatae) from Saudi Arabia, observed a significant leishmanicidal activity of these compounds in relation to *L. donovani* (IBRAHIM et al., 2016a, 2016b) [SA-20], [SA-21]. Do Nascimento et al. (2015) [SA-24] verified the leishmanicidal activity against *L. amazonensis* of endophytic fungi identified as *Curvularia* spp., *Phomopsis* spp. and *Cochliobolus sativus* isolated from leaves of the medicinal plant *Vernonia polyanthes*.

Marinho et al. (2013) [SA-37] reported the isolation of six polyketides of *Penicillium herquei* isolated from *Melia azedarach*. The compounds citreorosein, emodin and janthinone showed activity against the promastigote forms of *L. braziliensis*. Chemical investigation of the endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. associated with the foliage of the *Psychotria horizontalis* (Rubiaceae) plant in Panama, resulted in the isolation of cercosporin and a new analog of cercosporin both with activity against *L. donovani* (MORENO et al., 2011) [SA-45].

Rosa et al. (2010) [SA-48] isolated 121 endophytic fungi recovered from leaves of the bioactive Brazilian plant species: *Ageratum myriadenia*, *Palicourea tetraphylla*, *Piptadenia adiantoides* and *Trixis vauthieri*. Among all the isolates, the fungi *Alternaria* sp., *Arthrimum* sp., *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. and *Gibberella* sp. had activity against *L. amazonensis*. Previously, Rosa et al. (2009) [SA-50] had already demonstrated that extracts from *Gymnopilus cf. areolatus* Murr., *Nothopanus hygrophanus*, *L. cf. strigosus*, *Irpex lacteus*, *Pleurotus flabellatus* and an unidentified basidiomycete, also have activity against *L. amazonensis*.

In the study by Guimarães et al. (2008) [SA-54] 39 endophytic fungi of *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia* were isolated, both collected in Brazil. The fungi *Diaporthe phaseolorum*, *Phyllosticta* sp. (or *Guignardia mangiferae*) and *Phomopsis* sp. isolates of *Viguiera arenaria* showed activity against *L. tarentolae*. In Schmeda-Hirschmann et al. (2008) [SA-55] extracts of the Andean lichens *Protousnea poeppigii* and *Usnea florida* isolated from *Nothofagus* (Fagaceae) trees showed activity in *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* and *L. infantum* promastigotes. In the investigation conducted by Fournet et al. (1997) [R-59] three secondary metabolites isolated from Chilean lichens (usnic acid, pannarine and 1'-

chloropannarine) inhibited the promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. donovani*.

4.1.2 Prospecting strategies – Extremophilic Organisms

Extremophiles are microorganisms that thrive ideally in habitats whose physico-chemical conditions are challenging and harmful to most other beings. These organisms have adaptations that allow them to operate metabolically and biochemically under harsh environmental circumstances with extreme levels of pH, temperatures, hydrostatic pressure, radiation, osmotic stress and nutritional scarcity (COKER, 2019; MERINO et al., 2019; ZHANG et al., 2018). The investigation of fungi obtained from under-explored environments, such as glaciers, arid regions, hot springs, volcanic areas and deep ocean sediments, are considered good sources of bioactive compounds with biotechnological potential and of clinical importance (ARIFEEN et al., 2020; COKER, 2016; ZHANG et al., 2018).

Ogaki et al. (2020) [SA-2] Accessed cultivable fungi present in Antarctic marine sediments. The biological analysis of ethyl acetate extracts from the fungi *Acremonium fusidioides*, *Penicillium allii-sativi*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium palitans*, *Penicillium solitum* and *Pseudogymnoascus verrucosus* demonstrate the leishmanicidal activity of these products against promastigotic forms of *L. amazonensis*. De Menezes et al. (2020) [SA-3] reported leishmanicidal activity against *L. amazonensis* from crude extracts of *Penicillium* spp., *P. chrysogenum* and *P. palitan* isolated from fragments of Antarctic glacial ice.

In a bioprospecting study of antiparasitic metabolites and herbicides, Gomes et al. (2018) [SA-13] used molecular biology techniques to identify 218 fungi present in soil samples collected on four Antarctic islands. The fungi *Pseudogymnoascus destructans*, *Mortierella parvispora* and *Penicillium chrysogenum* were active against *L. amazonensis*. In Santiago et al. (2012) [SA-43] A total of 564 endophytic fungi were recovered from *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* plants in Antarctica. Of these, 12 species showed anti-*Leishmania* activity, highlighting the fungus *Phaeosphaeria herpotrichoides* which exhibited leishmanicidal activity against *L. amazonensis* with an IC_{50} of $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, equivalent to inhibition by amphotericin B.

4.1.3 Prospecting strategies – Chemical modifications

The drug discovery and development process started with the study of natural products, however, the re-isolation of already known compounds has been causing a deficit in pharmacotherapeutic innovation. Faced with this challenge, several technological instruments of analysis and computational molecular design have been used in medicinal chemistry for the structural elucidation of natural products allowing the rational planning of drugs based on these products (BARNES; KUMAR; DAVIS, 2016; BUTLER, 2004; LI; LOU, 2018; THOMFORD et al., 2018).

Small changes in the structure of a natural product allow the improvement of some characteristics such as solubility, stability and selectivity of the molecule, in addition to being able to add new biological activities and, thus, obtain new candidates for innovative semi-synthetic drug prototypes. Thus, aggregating the knowledge of synthetic organic chemistry and the pharmacology of natural products has been one of the main ways to accelerate the discovery of new drugs (DECORTE, 2016; GUO, 2017; YAO et al., 2017).

In an assay with *L. donovani* carried out by Moreno et al. (2011) [SA-45], the cercosporin compound isolated from *Mycosphaerella* sp. presented an IC_{50} of $0,46 \pm 0,05 \mu\text{M}$, while its analog, obtained by the acetylation process, presented an IC_{50} of $0,64 \pm 0,05 \mu\text{M}$. In Noletto et al. (2002) [SA-58] a galactomannan (GMPOLY) isolated from the lichen *Ramalina celastri* underwent a complex reaction with vanadyl ions (IV; VO) forming the GMPOLY-VO complex. Both GMPOLY and GMPOLY-VO exhibited leishmanicidal effects in the amastigote form of *L. amazonensis*, however only GMPOLY-VO inhibited the growth of the promastigote form.

In the study by Santos et al. (2014) [SA-36] a series of aphidicolin derivatives (a secondary metabolite of the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*) as well as the oxime analog have been synthesized. Eight compounds were synthesized and tested against *L. braziliensis*. The evaluation showed a high leishmanicidal activity of aphidicolin while the derivative 3-oxime-aphidicolin presents moderate selectivity (IC_{50} : $2.7 \text{ M} \pm 0.33$) against the species *L. braziliensis*.

4.1.4 Prospecting strategies – Biotransformation

The microbial biotransformation strategy is an alternative approach to the production of new bioactive chemical derivatives through a reaction or a set of multi-enzymatic reactions in which a precursor molecule (natural or synthetic) is converted into a desired target product. The goal of biotransformation is to change the structure of a molecule by modifying some of its characteristics such as solubility, toxicity and effectiveness (BRENNNA et al., 2011; CAO et al., 2015; SHAH et al., 2014).

Fungi are notably useful as a resource for biotransformation, due to their potent biocatalytic system that involves a variety of reactions such as dehydrogenation, demethylation, esterification, glycosylation, hydrogenation, hydrolysis, hydroxylation, isomerization, methylation, oxidation and reduction. The production of analogous compounds resulting from fungal biotransformation processes has been extensively explored in the field of biotechnology, especially in the pharmaceutical area (CAO et al., 2015; LI; LOU, 2018; LI et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2019; SHAH et al., 2014; SURESH; ABRAHAM, 2020).

In Siddiqui et al. (2017) [SA-18] two metabolites obtained from the biotransformation of mibolerone (a potent synthetic anabolic androgenic steroid) with *Cunninghamella blakesleeana*, *C. echinulata* and *Macrophomina phaseolina*, showed activity against *L. major*. In another similar study, Baydoun et al. (2014) [SA-31] evaluated the leishmanicidal activity of the steroid nandrolone and its derivatives synthesized by biotransformation with *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana*. Nandrolone and derivative 16b,17b-Dihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one were found to have significant activity against *L. major*.

In the 2016 study, Parra Lizarazu et al. [SA-23] sought to elucidate the biological activity of 2-hydroxyphenylquinoline obtained in the biotransformation process of 2-phenylquinoline by *Aspergillus* spp. Both 2-phenylquinoline and its hydroxylated form showed activity against *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. In Mikell et al. (2015) [SA-25] The microbial transformation of 6-Hydroxyflavone by the fungus *Mucor ramannianus* resulted in the formation of 5 metabolites, among them the metabolite 1,3-cis-1-Methoxy-1-(2,5-dihydroxyphenyl)-3-hydroxy-3-phenylpropane that showed activity against *L. donovani*.

4.1.5 Prospecting strategies – Different cultivation conditions

The variation of fungus cultivation parameters, such as changes in the environment, aeration, salinity, pH and temperature, has an effect not only on fungal growth, but also on its metabolic profile, thus optimizing the production and discovery of new secondary metabolites during a screening of clinically important biomolecules. The diversification of microbial cultivation conditions leads to the activation of gene clusters that remain silenced under standard laboratory conditions, providing different biosynthetic pathways for the expression of novel compounds with therapeutic potential (BRAKHAGE, 2013; PAN et al., 2019; REEN et al., 2015; ROMANO et al., 2018; VANDERMOLEN et al., 2013).

Malak et al. (2014) [SA-30] evaluated leishmanicidal activities of *Geosmithia langdonii* ethyl acetate extracts, obtained through different growth media: potato dextrose broth, tryptic soy broth and malt extract broth. The extract obtained from cultures grown on potato dextrose showed the highest activity against *Leishmania donovani*, while the extract obtained using the tryptic soy medium showed lower activity and the extract obtained from the malt medium was not active. The potato dextrose medium was chosen for the large-scale cultivation of *G. langdonii*, which led to the production of five active metabolites.

In order to verify possible changes in the bioactivity profile of fungi *Aspergillus* sp. and *Mycosphaerella* sp., Martínez-Luis et al. (2012) [SA-42] and Moreno et al. (2011) [SA-45], respectively, proceeded to cultivate these microorganisms using four culture media: malt extract, potato dextrose, Czapek Dox and V8. In these two studies, all the growth media tested led to the production of active compounds against *L. donovani*.

4.2 Investigation of leishmanicidal activity of bioproducts.

The process of identifying leishmanicidal compounds requires different laboratory methods that traditionally involve screening for potentially active molecules in *in vitro* parasite growth or multiplication assays using different stages of the parasite's life cycle (ALCÂNTARA et al., 2018; WOODS; WILLIAMS, 2007; SERENO et al., 2007).

The initial screening, in general, is directed to promastigote forms, which have the advantage of less complexity in maintaining the culture and lower cost. The next step is to investigate the action of the treatment on the intracellular amastigote form obtained in a culture of murine macrophages (peritoneal exudate, bone marrow derivatives, J744.A1 lines) in addition to

other cell lines such as macrophages derived from human blood monocytes and macrophages transformed into monocytes (THP-1, U937 and HL-60) (ALCÂNTARA et al., 2018; HENDRICKX et al., 2019).

The evolutionary stage of amastigote is responsible for all clinical manifestations in the host. This stage differs from promastigotes not only in their morphology, but also in relation to their biochemical profile. For the amastigote to be susceptible to a compound it is necessary that it can cross the membranes of the host cell and remain stable under low pH, in addition the activation of the compound may depend on its metabolism by the macrophage. In this way, assays with amastigote culture can mimic the pathophysiological picture of leishmaniasis, which affords more reliable results (DE MUYLDER et al., 2011; GUPTA; GOYAL; RASTOGI, 2001).

The intracellular amastigote model, despite covering many aspects of the development of the parasite in its clinically relevant form, presents some difficulties such as the limited supply of parasites and the frequent contamination due to more complex manipulation compared to the cultivation of cell-free parasites (GUPTA; GOYAL; RASTOGI, 2001; VERMEERSCH et al., 2009). Therefore, the development of axenic cultures (cell-free) by means of different techniques of promastigotes in forms similar to amastigotes, simulating phagolysosomal conditions (raising the incubation temperature and reducing the pH of the culture medium) has been presented as an intermediate option between screening with promastigotes and intracellular amastigotes (ALCOLEA et al., 2010; ZILBERSTEIN, 2020).

During the preclinical stage of a drug's development process, it is essential that the results of *in vitro* tests be revalidated in an animal model. The main objective of *in vivo* models is to determine the activity of a compound concerning its pharmacokinetic and pharmacodynamic profile (CROFT; BRUN, 2003; MEARS et al., 2015). Many *in vivo* experimental models targeting leishmaniasis have been developed. The experiments of infection by *Leishmania* spp. commonly use mice of pure lineage and specific-pathogen-free (SPF), in acute and chronic models, without cure and with self-healing, however, other animal models, such as hamster and rat species are also reported (CROFT; BRUN, 2003; MEARS et al., 2015).

5. Conclusion

The results found in the literature consulted for the preparation of this systematic review support the hypothesis of the pharmacological potential of fungal bioproducts in the treatment of leishmaniasis. The evidence presented corroborates the need for the scientific community and the pharmaceutical industry to engage in the strengthening of bioprospecting programs for natural products.

The investigation of endophytic and symbiont fungi or those selected from underexplored environments, especially in extreme conditions or obtained through different cultivation conditions, favors the discovery of new biologically active products. Furthermore, strategies such as chemical modifications and biotransformation also contribute to the development of innovative molecules.

This review provided an overview of current efforts in the search for alternatives to the pharmacotherapy of leishmaniasis, exploring fungal biodiversity. From this perspective, it was observed that scientific and technological development in this segment is very incipient. Most studies are still focused on in vitro assays and with non-isolated compounds. There was also a lack of studies that were sufficiently advanced to be able to advance to clinical trials. This gap is largely due to the low level of public and private investment in research aimed at combating neglected diseases. Taken together, the evidence reported by the publications gathered in this review, indicates in the prospecting of fungal bioproducts a promising path in the fight against leishmaniasis.

Financial support

This work has been supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Grant no. MycoAntar/PROANTAR 442258/2018-6 and Universal 433388/2018-8), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Foundation for Research Support of the State of Alagoas (FAPEAL), and Federal University of Alagoas (UFAL).

Acknowledgments

The authors thank parliamentarian Tereza Nelma da Silva Porto Viana Soares for supporting the Brazilian Antarctic research. The authors would also like to thank the CAPES, CNPq, MCTC, FINEP, and FAPEAL. Moreover, the authors would like to thank several colleagues working at the UFAL for constructive criticism of and assistance with this project.

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004349.
- Alcântara, L.M., Ferreira, T.C., Gadelha, F.R., Miguel, D.C., 2018. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.* 8, 430-439.
- Alcolea, P.J., Alonso, A., Gómez, M.J., Sánchez-Gorostiaga, A., Moreno-Paz, M., González-Pastor, E., Toraño, A., Parro, V., Larraga, V., 2010. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. *BMC Genomics.* 11, 1-24.
- Alves, D.R., Morais, S.M., Tomiotto-Pellissier, F., Vasconcelos, F.R., Freire, F.D.C.O., Silva, I.N.G.D., Cataneo, A.H.D., Miranda-Sapla, M.M., Pinto, G.A.S., Conchon-Costa, I., Noronha, A.A.A., Pavanelli, W.R., 2018. Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. *PLoS one.* 13, e0196796.
- Arifeen, M. Z., Ma, Y. N., Xue, Y. R., Liu, C. H., 2020. Deep-sea fungi could be the new arsenal for bioactive molecules. *Mar. Drugs.* 18, 9.
- Awaad, AS, Al-Zaylaee, H.M., Alqasoumi, S.I., Zain, M.E., Aloyan, E.M., Alafeefy A.M., Awad, E.S., El-Meligy, R.M., 2014. Anti-leishmanial Activities of Extracts and Isolated Compounds from *Drechslera rostrata* and *Eurotium tonholium*. *Phytother. Res.* 28, 774-780.
- Baltz, R.H., 2019. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *J. Ind. Microbiol.* 46, 281-299.
- Barnes, E.C., Kumar, R., Davis, R.A., 2016. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 33, 372-381.

- Baydoun, E., Karam, M., Khan, M. S. A., Ahmad, M. S., Smith, C., Abdel-Massih, R., Choudhary, M. I., 2014. Microbial transformation of nandrolone with *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella blakesleeana* and evaluation of leishmaniacidal activity of transformed products. *Steroids*. 88, 95-100.
- Brakhage, A.A., 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 21-32.
- Braun, G.H., Ramos, H.P., Candido, A.C.B.B., Pedrosa, R.C.N., Siqueira, K.A., Soares, M.A., Dias, G.M., Magalhães, L.G., Ambrósio, S.R., Januário, A.H., Pietro, R.C.L.R., 2019. Evaluation of antileishmanial activity of harzialactone a isolated from the marine-derived fungus *Paecilomyces* sp. *Nat. Prod. Res.* 1-4.
- Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F.G., Serra, S., 2011. Biocatalytic methods for the synthesis of enantioenriched odor active compounds. *Chem. Rev.* 111, 4036-4072.
- Brissow, E.R., da Silva, I.P., de Siqueira, K.A., Senabio, J.A., Pimenta, L.P., Januário, A.H., Magalhães, L.G., Furtado, R.A., Tavares, D.C., Sales Junior, P.A., Santos, J.L., Soares, M.A., 2017. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum-92C*, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. *J. Parasitol. Res.* 116, 1823-1830.
- Bucar, F., Wube, A., Schmid, M., 2013. Natural product isolation—how to get from biological material to pure compounds. *Nat. Prod. Rep.* 30, 525-545.
- Burza, S., Croft, S. L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. *The Lancet.* 392, 951-970.
- Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67, 2142-2149.
- Campos, F.F., Ramos, J.P., DE Oliveira, D.M., Alves, T.M.A., DE Souza-Fagundes, E.M., Zani, C.L., Sampaio, F.C., Converti, A., Cota, B.B., 2017. In vitro leishmanicidal, antibacterial and antitumour potential of anhydrocochlioquinone A obtained from the fungus *Cochliobolus* sp. *J. Biosci.* 42, 657-664.
- Campos, F.F., Rosa, L.H., Cota, B.B., Caligiorne, R.B., Rabello, A.L., Alves, T.M., Rosa, C.A., Zani, C.L., 2009. Correction: Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLOS Negl. Trop. Dis.* 3.
- Campos, FF, Sales Junior, P.A., Romanha, A.J., Araújo, M.S., Siqueira, E.P., Resende, J.M., Alves, T.M., Martins-Filho, O.A., Santos, V.L., Rosa, C.A., Zani, C.L., Cota, B.B., 2015. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110, 65-74.
- Cao, H., Chen, X., Jassbi, A.R., Xiao, J., 2015. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnol. Adv.* 33, 214-223.
- Chávez, R., Fierro, F., García-Rico, R.O., Vaca, I., 2015. Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Front. Microbiol.* 6, 903.

- Chen L., Zhang QY, Jia M., Ming Q.L., Yue W., Rahman K., Qin L.P., Han T., 2016. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 454-473.
- Coker, J.A., 2016. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000Research*, 5.
- Coker, J.A., 2019. Recent advances in understanding extremophiles. *F1000Research*, 8.
- Correa, E., Cardona, D., Quiñones, W., Torres, F., Franco, A.E., Vélez, I.D., Robledo, S., Echeverri, F., 2006. Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*. *Phytother. Res.* 20, 497-499.
- Cota, B.B., Tunes, L.G., Maia, D.N.B., Ramos, J.P., Oliveira, D.M., Kohlhoff, M., Alves, T.M.A., Souza-Fagundes, E.M., Campos, F.F., Zani, C.L., 2018. Leishmanicidal compounds of *Nectria pseudotrichia*, an endophytic fungus isolated from the plant *Caesalpinia echinata* (Brazilwood). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 113, 102-110.
- Croft, S.L., Brun, R., 2003. In vitro and in vivo models for the identification and evaluation of drugs active against *Trypanosoma* and *Leishmania*. A.H. Fairlamb, R.G. Ridley, H. Vial (Eds.), *Drugs against Parasitic Diseases: R&D Methodologies and Issues. Discoveries and Drug Development*, TDR/WHO, Geneva, Switzerland, pp. 165-176.
- da Luz, J.S., de Oliveira, E.B., Martins, M.C., da Silva, N.H., Alves, L.C., dos Santos F.A., da Silva, L.L., Silva, E.C., de Medeiros, P.L., 2015. Ultrastructural analysis of *Leishmania infantum* chagasi promastigotes forms treated in vitro with usnic acid. *Sci. World J.* 2015.
- da Silva, I.P., Brissow, E., Kellner Filho, L.C., Senabio, J., de Siqueira, K.A., Vandresen Filho, S., Damasceno, J.L., Mendes, S.A., Tavares, D.C., Magalhães, L.G., Junior, P.A., Januário, A.H., Soares, M.A. 2017. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*—F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 1-10.
- de Almeida, T.T., Ribeiro, M.A.D.S., Polonio, J.C., Garcia, F.P., Nakamura, C.V., Meurer, E.C., Sarragiotto, M.H., Baldoqui, D.C., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., 2018. Curvulin and spirostaphylotrichins R and U from extracts produced by two endophytic *Bipolaris* sp. associated to aquatic macrophytes with antileishmanial activity. *Nat. Prod. Res.* 32, 2783-2790.
- de Menezes, G.C.A, Porto, B.A., Amorim, S.S., Zani, C.L., de Almeida, Alves T.M., Junior, P.A.S., Murta, S.M.F., Simões, J.C., Cota, B.B., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2020. Fungi in glacial ice of Antarctica: diversity, distribution and bioprospecting of bioactive compounds. *Extremophiles.* 1-10.
- De Muylder, G., Ang, K.K., Chen, S., Arkin, M.R., Engel, J.C., McKerrow, J.H., 2011. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1253.
- DeCorte, B.L., 2016. Underexplored opportunities for natural products in drug discovery: miniperspective. *J. Med. Chem.* 59, 9295-9304.

Derici, M. K., Cansaran-Duman, D., Taylan-Özkan, A., 2018. Usnic acid causes apoptotic-like death in *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. tropica*. *3 Biotech*. 8, 1-7.

Deshmukh, S.K., Gupta, M.K., Prakash, V., Saxena, S., 2018. Endophytic fungi: a source of potential antifungal compounds. *J. Fungus*. 4, 77.

Deshmukh, S.K., Prakash, V., Ranjan, N., 2018. Marine fungi: A source of potential anticancer compounds. *Front. Microbiol*. 8, 2536.

Didwania, N., Shadab, M., Sabur, A., Ali, N., 2017. Alternative to chemotherapy—the unmet demand against leishmaniasis. *Front. Immunol*. 8, 1779.

do Nascimento, A.M., Soares, M.G., da Silva Torchelsen, F.K., de Araujo, J.A., Lage, P.S., Duarte, M.C., Andrade, P.H., Ribeiro, T.G., Coelho, E.A., do Nascimento, A.M., 2015. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 31, 1793-1800.

Elkhayat, E. S., Ibrahim, S. R., Mohamed, G. A., Ross, S. A., 2016. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Nat. Prod. Res*. 30, 814-820.

Fournet, A., Ferreira, M.E., Rojas, de Arias A., Torres de Ortiz, S., Inchausti, A., Yaluff, G., Quilhot, W., Fernandez, E., Hidalgo, M.E., 1997. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*. 116, 51-54.

Gamboa-Angulo, M., Molina-Salinas, G. M., Chan-Bacab, M., Peraza-Sánchez, S. R., Heredia, G., Susana, C., Reyes-Estebanez, M., 2013. Antimycobacterial and antileishmanial effects of microfungi isolated from tropical regions in México. *Parasitol. Res*. 112, 559-566.

Golias, H.C., Polonio, J.C., Dos Santos Ribeiro, M.A., Polli, A.D., da Silva, A.A., Bulla, A.M., Volpato, H., Nakamura, C.V., Meurer, E.C., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., 2019. *Tibouchina granulosa* (Vell.) Cogn (Melastomataceae) as source of endophytic fungi: Isolation, identification, and antiprotozoal activity of metabolites from *Phyllosticta capitalensis*. *Braz. J. Microbiol*. 1-13.

Gomes, E.C.Q., Godinho, V.M., Silva, D.A.S., de Paula, M.T.R., Vitoreli, G.A., Zani, C.L., Alves, T.M.A., Junior, P.A.S., Murta, S.M.F., Barbosa, E.C., Oliveira, J.G., Oliveira, F.S., Carvalho, C.R., Ferreira, M.C., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2018. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*. 22, 381-393.

González-Medina, M., Owen, J.R., El-Elimat, T., Pearce, C.J., Oberlies, N.H., Figueroa, M., Medina-Franco, J.L., 2017. Scaffold diversity of fungal metabolites. *Front. Pharmacol*. 8, 180.

Grossart, H.P., Van den Wyngaert, S., Kagami, M., Wurzbacher, C., Cunliffe, M., Rojas-Jimenez, K., 2019. Fungi in aquatic ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol*. 17, 339-354.

Guimarães, D.O., Borges, W.S., Kawano, C.Y., Ribeiro, P.H., Goldman, G.H., Nomizo, A., Thiemann, O.H., Oliva, G., Lopes, N.P., Pupo, M.T., 2008. Biological activities from extracts

of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 134-144.

Guo, Z., 2017. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharm. Sin. B.* 7, 119-136.

Gupta, N., Goyal, N., Rastogi, A.K., 2001. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol.* 17, 150-153.

Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A., 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 79, 293-320.

Hawksworth D.L., Lücking R., 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species, in the fungal kingdom. *Microbiol. Spectr.* 5, 1-17.

Hendrickx, S., Van Bockstal, L., Caljon, G., Maes, L., 2019. In-depth comparison of cell-based methodological approaches to determine drug susceptibility of visceral *Leishmania* isolates. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007885.

Hoeksma, J., Misset, T., Wever, C., Kemmink, J., Kruijtzter, J., Versluis, K., Liskamp, R.M.J., Boons, G. J., Heck, A.J.R., Boekhout, T., Hertog, J.D., 2019. A new perspective on fungal metabolites: identification of bioactive compounds from fungi using zebrafish embryogenesis as read-out. *Sci. Rep.* 9, 1-16.

Ibrahim, S.R., Abdallah, H.M., Mohamed, G.A., Ross, S.A., 2016a. Integracides HJ: new tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus *Fusarium* sp. *Fitoterapia.* 112, 161-167.

Ibrahim, S.R., Mohamed, G.A., Ross, S.A., 2016b. Integracides F and G: New tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus *Fusarium* sp. *Phytochem. Lett.* 15, 125-130.

Keller, N.P., 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 167-180.

Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., 2005. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 937-947.

Kück, U., Bloemendal, S., Teichert, I., 2014. Putting fungi to work: harvesting a cornucopia of drugs, toxins, and antibiotics. *PLoS Pathog.*, 10, e1003950.

Lai, T.K., Biswas, G., Chatterjee, S., Dutta, A., Pal, C., Banerji, J., Bhuvanesh, N., Reibenspies, J.H., Acharya, K., 2012. Leishmanicidal and anticandidal activity of constituents of Indian edible mushroom *Astraeus hygrometricus*. *Chem. Biodivers.* 9, 1517-1524.

Leliebre-Lara, V., Monzote Fidalgo, L., Pferschy-Wenzig, E. M., Kunert, O., Nogueiras Lima, C., Bauer, R., 2016. In vitro antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). *Molecules.* 21, 1045.

Lenzi, J., Costa, T.M., Alberton, M.D., Goulart, J.A.G., Tavares, L.B.B., 2018. Medicinal fungi: a source of antiparasitic secondary metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 5791-5810.

Li, G., Lou, H., 2018. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Med. Res. Rev.* 38, 1255-1294.

Li, G., Lou, H.X., 2018. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Med. Res. Rev.* 38, 1255-1294.

Linnakoski, R., Reshamwala, D., Veteli, P., Cortina-Escribano, M., Vanhanen, H., Marjomäki, V., 2018. Antiviral agents from fungi: Diversity, mechanisms and potential applications. *Front. Microbiol.* 9, 2325.

Lopes, D. D. S., Santos, U. R. D., Dos Anjos, D. O., Silva Júnior, L. J. C. D., Paula, V. F. D., Vannier-Santos, M. A., Silva-Jardim, I., Castro-Gomes, T., Pirovani, C.P., Lima-Santos, J., 2020. Ethanolic Extract of the Fungus *Trichoderma asperelloides* Induces Ultrastructural Effects and Death on *Leishmania amazonensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 306.

Mafart, P.; Couvert, O.; Leguérinel, I., 2001. Effect of pH on the heat resistance of spores: comparison of two models. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 51-56.

Malak, L.G., Ibrahim, M.A., Bishay, D.W., Abdel-baky, A.M., Moharram, A.M., Tekwani, B., Cutler, S.J., Ross, S.A., 2014. Antileishmanial metabolites from *Geosmithia langdonii*. *J. Nat. Prod.* 77, 1987-1991.

Malak, L.G., Ibrahim, M.A., Moharram, A.M., Pandey, P., Tekwani, B., Doerksen, R.J., Ferreira, D., Ross, S.A., 2018. Antileishmanial Carbasugars from *Geosmithia langdonii*. *J. Nat. Prod.* 81, 2222-2227.

Mallick S., Dutta A., Dey S., Ghosh J., Mukherjee D., Sultana S.S., Mandal S., Paloi S., Khatua S., Acharya K., Pal C., 2014. Selective inhibition of *Leishmania donovani* by active extracts of wild mushrooms used by the tribal population of India: an in vitro exploration for new leads against parasitic protozoans. *Exp. Parasitol.* 138, 9-17.

Mallick, S., Dey, S., Mandal, S., Dutta, A., Mukherjee, D., Biswas, G., Chatterjee, S., Mallick, S., Lai, T.K., Acharya, K., Pal, C., 2015. A novel triterpene from *Astraeus hygrometricus* induces reactive oxygen species leading to death in *Leishmania donovani*. *Future Microbiol.* 10, 763-789.

Marinho, A. M., Marinho, P. S., Santos, L. S., Rodrigues Filho, E., Ferreira, I. C., 2013. Active polyketides isolated from *Penicillium herquei*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 85, 909-912.

Marinho, A. M., Rodrigues-Filho, E., Moitinho, M. D. L. R., Santos, L. S., 2005. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 280-283.

Martínez-Luis, S., Cherigo, L., Arnold, E., Spadafora, C., Gerwick, W. H., Cubilla-Rios, L., 2012. Antiparasitic and anticancer constituents of the endophytic fungus *Aspergillus* sp. strain F1544. *Nat. Prod. Commun.* 7, 1934578X1200700207.

Martínez-Luis, S., Cherigo, L., Higginbotham, S., Arnold, E., Spadafora, C., Ibañez, A., Gerwick, W.H., Cubilla-Rios, L., 2011. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. *Int. Microbiol.* 14, 95.

Martínez-Luis, S., Della-Togna, G., Coley, P. D., Kursar, T. A., Gerwick, W. H., Cubilla-Rios, L., 2008. Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *J. Nat. Prod.* 71, 2011-2014.

Masi, M., Maddau, L., Linaldeddu, B. T., Scanu, B., Evidente, A., Cimmino, A., 2018. Bioactive metabolites from pathogenic and endophytic fungi of forest trees. *Curr. Med. Chem.* 25, 208-252.

Mears, E.R., Modabber, F., Don, R., Johnson, G.E., 2015. A review: the current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003889.

Merino, N., Aronson, H.S., Bojanova, D.P., Feyhl-Buska, J., Wong, M.L., Zhang, S., Giovannelli, D., 2019. Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Front. Microbio.* 10, 780.

Metwaly, A. M., Ghoneim, M. M., Musa, A., 2015. Two new antileishmanial diketopiperazine alkaloids from the endophytic fungus *Trichosporum* sp. *Der. Pharma. Chemica.* 7, 322-327.

Mikell, J. R., Herath, W., Khan, I. A., 2015. Eleven microbial metabolites of 6-hydroxyflavanone. *Chem. Pharm. Bull.* 63, 579-583.

Moreno, E., Varughese, T., Spadafora, C., Arnold, A.E., Coley, P.D., Kursar, T.A., Gerwick, W.H., Cubilla-Rios, L., 2011. Chemical constituents of the new endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and their anti-parasitic activity. *Nat. Prod. Commun.* 6, 1934578X1100600620.

Motoshima, R.A., Rosa, T.D.F., Mendes, L.D.C., Silva, E.V.D., Viana, S.R.F., Amaral, B.S.D., de Souza, D.H.F., Lião, L.M., Corradi, da Silva M.L., de Sousa, L.R.F., Carbonero E.R., 2018. Inhibition of *Leishmania amazonensis* arginase by fucogalactan isolated from *Agrocybe aegerita* mushroom. *Carbohydr. Polym.* 201, 532-538.

Nagle, A.S., Khare, S., Kumar, A.B., Supek, F., Buchynskyy, A., Mathison, C.J., Chennamaneni, N.K., Pendem, N., Buckner, F.S., Gelb, M.H., Molteni, V., 2014. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chem. Rev.* 114, 11305-11347.

Nascimento, J.S.D., Núñez, W. E. R., Santos, V.H.P.D., Aleu, J., Cunha, S., Silva, E.D.O., 2019. Mapping the biotransformation of coumarins through filamentous fungi. *Molecules*, 24, 3531.

Noletto, G. R., Mercê, A. L. R., Iacomini, M., Gorin, P. A., Soccol, V. T., Oliveira, M. B. M., 2002. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. *Mol. Cell. Biochem.* 233, 73-83.

Ogaki, M.B., Coelho, L.C., Vieira, R., Neto, A.A., Zani, C.L., Alves, T.M.A., Junior, P.A.S., Murta, S.M.F., Barbosa, E.C., Oliveira, J.G., Ceravolo, I.P., Pereira, P.O., Cota, B.B., Viana, R.O., Alves, V.S., Rosa, L.H., 2020. Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: Taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds. *Extremophiles.* 24, 227-238.

- Omomowo, O.I., Babalola, O.O., 2019. Bacterial and fungal endophytes: tiny giants with immense beneficial potential for plant growth and sustainable agricultural productivity. *Microorganisms*. 7, 481.
- Ortega, H. E., Teixeira, E. D. M., Rabello, A., Higginbotham, S., Cubilla-Ríos, L., 2014. Anti-*L. donovani* Activity in Macrophage/Amastigote Model of Palmarumycin CP18 and its Large Scale Production. *Nat. Prod. Commun.* 9, 1934578X1400900128.
- Osmanova, N., Schultze, W., Ayoub, N., 2010. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochem. Rev.* 9, 315-342.
- Parra Lizarazu, C., Quiroga Selaez, G., Salamanca Capusiri, E., Flores Quisbert, E., Giménez Turba, A., 2016. Caracterización química y biológica de los productos derivados de la biotransformación del alcaloide leishmanicida 2-fenilquinolina (2FQ) por *Aspergillus* spp. *Rev. Boliv. Quim.* 33, 149-157.
- Peay, K.G.; Kennedy, P.G.; Talbot, J.M., 2016. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 434-447.
- Peretz, A., Zabari, L., Pastukh, N., Avital, N., & Masaphy, S., 2018. In vitro antileishmanial activity of a black morel, *Morchella importuna* (Ascomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*. 20, 71-80.
- Ponte-Sucre A., Gamarro F., Dujardin J.C., Barrett M.P., López-Vélez R., García-Hernández R., Pountain A.W., Mwenechanya R., Papadopoulou B., 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 11, e0006052.
- Pontius, A., Krick, A., Kehraus, S., Brun, R., & König, G. M., 2008. Antiprotozoal activities of heterocyclic-substituted xanthenes from the marine-derived fungus *Chaetomium* sp. *J. Nat. Prod.* 71, 1579-1584.
- Pye, C.R., Bertin, M.J., Lokey, R.S., Gerwick, W.H., Linington, R.G., 2017. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 5601-5606.
- Raghukumar, S., 2017. *Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems*. Springer.
- Reen, F.J., Romano, S., Dobson, A.D., O'Gara, F., 2015 . The sound of silence: activating silent biosynthetic gene clusters in marine microorganisms. *Mar. Drugs*. 13, 4754-4783.
- Rodrigues, A. P. D., Farias, L. H. S., Carvalho, A. S. C., Santos, A. S., do Nascimento, J. L. M., Silva, E. O., 2014. A novel function for kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* fungi, as antileishmanial agent. *PLoS One*. 9, e91259.
- Romano, S., Jackson, S.A., Patry, S., Dobson, A.D., 2018. Extending the “one strain many compounds”(OSMAC) principle to marine microorganisms. *Mar. Drugs*. 16, 244.
- Rosa, L. H., Machado, K. M., Rabello, A. L., Souza-Fagundes, E. M., Correa-Oliveira, R., Rosa, C. A., Zani, C. L., 2009. Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 95, 227-237.

Rosa, L.H. (Ed.), 2019. Fungi of antarctica: Diversity, ecology and biotechnological applications. Springer.

Rosa, L.H., Gonçalves, V.N., Caligorne, R.B., Alves, T.M., Rabello, A., Sales, P.A., Romanha, A.J., Sobral, M.E., Rosa, C.A., Zani, C.L., 2010. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 41, 420-430.

Santiago, I.F., Alves, T.M., Rabello, A., Sales Junior, P.A., Romanha, A.J., Zani, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2012. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles*, 16, 95-103.

Santos, G.B., Almeida, M.O., Cardoso, I.A., Manfrim, V., Chagas, F.O., Toledo, J.S., Pinzan, C.C., Araujo, A.S., Cruz, A.K., Pupo, M.T., Emery, F.S., 2014. The semisynthetic landscape of aphidicolin: inspiration towards leishmanicidal compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 1885-1899.

Sasidharan, S., Saudagar, P., 2021. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitol. Res.* 1-14.

Schmeda-Hirschmann, G., Tapia, A., Lima, B., Pertino, M., Sortino, M., Zacchino, S., Arias, A.R., Feresin, G.E., 2008. A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protousnea poeppigii*. *Phytother. Res.* 22, 349-355.

Sereno, D., Da Silva, A.C., Mathieu-Daude, F., Ouaiissi, A., 2007. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol. Int.* 56, 3-7.

Shah, S.A.A., Tan, H.L., Sultan, S., Faridz, M.A.B.M., Shah, M.A.B.M., Nurfazilah, S., Hussain, M., 2014. Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 12027-12060.

Siddiqui, M., Ahmad, M.S., Wahab, A.T., Yousuf, S., Fatima, N., Naveed Shaikh N., Rahman, A.U., Choudhary, M.I., 2017. Biotransformation of a potent anabolic steroid, mibolerone, with *Cunninghamella blakesleeana*, *C. echinulata*, and *Macrophomina phaseolina*, and biological activity evaluation of its metabolites. *PloS One.* 12, e0171476.

Singh, B.N., Upreti, D.K., Gupta, V.K., Dai, X.F., Jiang, Y., 2017. Endolichenic fungi: a hidden reservoir of next generation biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol.* 35, 808-813.

Souza-Fagundes, E.M., Cota, B.B., Rosa, L.H., Romanha, A.J., Corrêa-Oliveira, R., Rosa, C.A., Zani, C.L., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., 2010. In vitro activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: a potential prototype for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 1054-1061.

Spiteller, P., 2015. Chemical ecology of fungi. *Nat. Prod. Rep.* 32, 971-993.

Strobel, G., 2018. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *J. Fungus.* 4, 57.

Sultana, S.S., Ghosh, J., Chakraborty, S., Mukherjee, D., Dey, S., Mallick, S., Dutta, A., Paloi, S., Khatua S, Dutta, T, Bhattacharya, S, Acharya, K, Ghorai, N, Pal, C., 2018. Selective

in vitro inhibition of *Leishmania donovani* by a semi-purified fraction of wild mushroom *Grifola frondosa*. *Exp. Parasitol.* 192, 73-84.

Suresh, A., Abraham, J., 2020. Phytochemicals and Their Role in Pharmaceuticals. In *Advances in Pharmaceutical Biotechnology*. Springer, Singapore. 193-218.

Teixeira, T.R., Santos, G.S.D., Armstrong, L., Colepicolo, P., Debonisi, H.M., 2019. Antitumor potential of seaweed derived-endophytic fungi. *Antibiotics*, 8, 205.

Thomford, N.E., Senthebane, D.A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., Dzobo, K., 2018. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1578.

Uliana S.R.B., Trinconi C.T., Coelho A.C., 2018. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 145, 464-480.

Valadares, D.G., Duarte, C., Oliveira, J.S., Chávez-Fumagalli, M.A., Martins, V.T., Costa, L.E., Leite, J.P., Santoro, M.M., Régis W.C., Tavares, C.A., Coelho, E.A., 2011. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitol. Int.* 60, 357-363.

Valadares, D.G., Duarte, M.C., Ramírez, L., Chávez-Fumagalli, M.A., Martins, V.T., Costa, L.E., Lage, P.S., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Fernandes, A.P., Régis, W.C., Soto, M., Tavares, C.A., Coelho, E.A., 2012a. Prophylactic or therapeutic administration of *Agaricus blazei* Murill is effective in treatment of murine visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 132, 228-236.

Valadares, D.G., Duarte, M.C., Ramírez, L., Chávez-Fumagalli, M.A., Lage, P.S., Martins, V.T., Costa, L.E., Ribeiro, T.G., Régis, W.C., Soto, M., Fernandes, A.P., Tavares, C.A., Coelho, E. A., 2012b. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. *J. Parasitol. Res.* 111, 1807-1816.

VanderMolen, K.M., Raja, H.A., El-Elimat, T., Oberlies, N.H., 2013. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*, 3, 1-7.

Vermeersch, M., da Luz, R.I., Toté, K., Timmermans, J.P., Cos, P., Maes, L., 2009. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3855-3859.

Větrovský, T., Kohout, P., Kopecký, M., Machac, A., Man, M., Bahnmann, B.D., Baldrian, P., 2019. A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. *Nat. Commun.* 10, 1-9.

Woods, D.J., Williams, T.M., 2007. The challenges of developing novel antiparasitic drugs. *Invert. Neurosci.* 7, 245-250.

Yao, H., Liu, J., Xu, S., Zhu, Z., Xu, J., 2017. The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 12, 121-140.

Yatawara, L., Wickramasinghe, S., Nagataki, M., Takamoto, M., Nomura, H., Ikeue, Y., Watanabe, Y., Agatsuma, T., 2009. Aureobasidium-derived soluble branched (1, 3-1, 6) β -glucan (Sophy β -glucan) enhances natural killer activity in *Leishmania amazonensis*-infected mice. *Korean. J. Parasitol.* 47, 345.

Zhang, X., Li, S.J., Li, J.J., Liang, Z.Z., Zhao, C.Q., 2018. Novel natural products from extremophilic fungi. *Mar. Drugs.* 16, 194.

Zilberstein, D., 2020. In Vitro Culture for Differentiation Simulation of *Leishmania* spp. In: *Trypanosomatids: Methods and Protocols*. New York, pp. 39-47.

SUPPLEMENTARY MATERIAL 1

List of articles selected in the systematic review, using different descriptors and databases, summarized by the bibliographic references in decreasing order of the year of publication.

SELECTED ARTICLE [SA]	("Fungi"[Mesh] AND "Leishmania"[Mesh] (PUBMED)	Fungi AND leishmanicidal (PUBMED)	Lichen AND Leishmania (PUBMED)	Fungi AND Leishmania (LILACS)	Fungo AND Leishmania (SCIELO)	Fungi AND Leishmania (SCIELO)
[SA-1] LOPES et al, 2020.		x				
[SA-2] OGAKI et al., 2020.	x	x				
[SA-3] DE MENEZES et al., 2020.		x				
[SA-4] GOLIAS et al., 2019.	x					
[SA-5] BRAUN et al., 2019.		x				
[SA-6] MALAK et al., 2018.	x					
[SA-7] DE ALMEIDA et al., 2018.	x					
[SA-8] MOTOSHIMA et al., 2018.	x					
[SA-9] SULTANA, et al., 2018.	x					
[SA-10] ALVES et al., 2018.	x	x				
[SA-11] PERETZ et al., 2018.	x					
[SA-12] COTA et al., 2018.	x	x		x		x
[SA-13] GOMES et al., 2018.	—	—	—	—	—	—
[SA-14] DERICI et al., 2018.			x			
[SA-15] CAMPOS et al., 2017.	x	x				
[SA-16] BRISSOW et al., 2017.	x	x				
[SA-17] DA SILVA et al., 2017.	x	x				
[SA-18] SIDDIQUI et al., 2017.	x	x				
[SA-19] LELIEBRE-LARA et al., 2016.	x					
[SA-20] IBRAHIM et al., 2016a.	x					
[SA-21] IBRAHIM et al., 2016b.	x					
[SA-22] ELKHAYAT et al., 2016.	x					
[SA-23] PARRA LIZARAZU et al., 2016.						x
[SA-24] DO NASCIMENTO et al., 2015.	x					
[SA-25] MIKELL et al., 2015.	x					
[SA-26] MALLICK et al., 2015.	x					

[SA-27] CAMPOS et al., 2015.	x			x		x
[SA-28] DA LUZ et al., 2015.			x			
[SA-29] METWALY et al., 2015.	—	—	—	—	—	—
[SA-30] MALAK et al., 2014.	x					
[SA-31] BAYDOUN et al., 2014.	x					
[SA-32] RODRIGUES et al., 2014.	x	x				
[SA-33] ORTEGA, et al., 2014.	x					
[SA-34] MALLICK et al., 2014.	x					
[SA-35] AWAAD et al., 2014.	x					
[SA-36] SANTOS et al., 2014.					x	
[SA-37] MARINHO et al., 2013.	x					
[SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013.	x	x				
[SA-39] LAI et al., 2012.	x	x				
[SA-40] VALADARES et al., 2012a.	x	x				
[SA-41] VALADARES et al., 2012b.	x					
[SA-42] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2012.	x					
[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.	x	x				
[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.	x					
[SA-45] MORENO et al., 2011.	x					
[SA-46] VALADARES et al., 2011.	x	x				
[SA-47] SOUZA-FAGUNDES et al., 2010.	x					
[SA-48] ROSA et al., 2010.		x				
[SA-49] YATAWARA et al., 2009.	x					
[SA-50] ROSA et al., 2009.	x					
[SA-51] CAMPOS et al., 2009.	x	x				
[SA-52] PONTIUS et al., 2008.	x					
[SA-53] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008.	x					
[SA-54] GUIMARÃES et al., 2008.	x					
[SA-55] SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2008.	x		x			
[SA-56] CORREA et al., 2006.	x	x				
[SA-57] MARINHO et al., 2005.					x	
[SA-58] NOLETO et al., 2002.	x	x	x			
[SA-59] FOURNET et al., 1997.			x			

SUPPLEMENTARY MATERIAL 2

List of titles of the articles selected in the systematic review, summarized by the bibliographic references in decreasing order of the year of publication.

Selected article [SA]	Title
[SA-1] LOPES et al., 2020.	Ethanollic Extract of the Fungus <i>Trichoderma asperelloides</i> Induces Ultrastructural Effects and Death on <i>Leishmania amazonensis</i>
[SA-2] OGAKI et al., 2020.	Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds
[SA-3] DE MENEZES et al., 2020.	Fungi in glacial ice of Antarctica: diversity, distribution and bioprospecting of bioactive compounds
[SA-4] GOLIAS et al., 2019.	Tibouchina granulosa (Vell.) Cogn (Melastomataceae) as source of endophytic fungi: Isolation, identification, and antiprotozoal activity of metabolites from <i>Phyllosticta capitalensis</i> .
[SA-5] BRAUN et al., 2019.	Evaluation of antileishmanial activity of harzialactone a isolated from the marine-derived fungus <i>Paecilomyces</i> sp.
[SA-6] MALAK et al., 2018.	Antileishmanial Carbasugars from <i>Geosmithia langdonii</i> .
[SA-7] DE ALMEIDA et al., 2018.	Curvulin and spirostaphylotrichins R and U from extracts produced by two endophytic <i>Bipolaris</i> sp. associated to aquatic macrophytes with antileishmanial activity.
[SA-8] MOTOSHIMA et al., 2018.	Inhibition of <i>Leishmania amazonensis</i> arginase by fucogalactan isolated from <i>Agrocybe aegerita</i> mushroom
[SA-9] SULTANA, et al., 2018.	Selective in vitro inhibition of <i>Leishmania donovani</i> by a semi-purified fraction of wild mushroom <i>Grifola frondose</i>
[SA-10] ALVES et al., 2018.	Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts.
[SA-11] PERETZ et al., 2018.	In vitro antileishmanial activity of a black Morel, <i>Morchella importuna</i> (ascomycetes).
[SA-12] COTA et al., 2018.	Leishmanicidal compounds of <i>Nectria pseudotrichia</i> , an endophytic fungus isolated from the plant <i>Caesalpinia echinata</i> (Brazilwood).

[SA-13] GOMES et al., 2018.	Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites.
[SA-14] DERICI et al., 2018.	Usnic acid causes apoptotic-like death in <i>Leishmania major</i> , <i>L. infantum</i> and <i>L. tropica</i> .
[SA-15] CAMPOS et al., 2017.	In vitro leishmanicidal, antibacterial and antitumour potential of anhydrocochliquinone A obtained from the fungus <i>Cochliobolus</i> sp.
[SA-16] BRISSOW et al., 2017.	18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of <i>Diaporthe phaseolorum</i> -92C, an endophytic fungus isolated from <i>Combretum lanceolatum</i> Pohl ex Eichler
[SA-17] DA SILVA et al., 2017.	Bioactive compounds of <i>Aspergillus terreus</i> —F7, an endophytic fungus from <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.
[SA-18] SIDDIQUI et al., 2017.	Biotransformation of a potent anabolic steroid, mibolerone, with <i>Cunninghamella blakesleeana</i> , <i>C. echinulata</i> , and <i>Macrophomina phaseolina</i> , and biological activity evaluation of its metabolites.
[SA-19] LELIEBRE-LARA et al., 2016.	In vitro antileishmanial activity of sterols from <i>Trametes versicolor</i> (Bres. Rivarden).
[SA-20] IBRAHIM et al., 2016a.	Integracides H J: New tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus <i>Fusarium</i> sp.
[SA-21] IBRAHIM et al., 2016b.	Integracides F and G: New tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus <i>Fusarium</i> sp.
[SA-22] ELKHAYAT et al., 2016.	Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus <i>Aspergillus terreus</i> .
[SA-23] PARRA LIZARAZU et al., 2016.	Caracterización química y biológica de los productos derivados de la biotransformación del alcaloide leishmanicida 2-fenilquinolina (2FQ) por <i>Aspergillus</i> spp.
[SA-24] DO NASCIMENTO et al., 2015.	Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant <i>Vernonia polyanthes</i> and their potential as source of bioactive substances.
[SA-25] MIKELL et al., 2015.	Eleven microbial metabolites of 6-hydroxyflavanone.

[SA-26] MALLICK et al., 2015.	A novel triterpene from <i>Astraeus hygrometricus</i> induces reactive oxygen species leading to death in <i>Leishmania donovani</i> .
[SA-27] CAMPOS et al., 2015.	Bioactive endophytic fungi isolated from <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from <i>Fusarium</i> sp.
[SA-28] DA LUZ et al., 2015.	Ultrastructural analysis of <i>Leishmania infantum chagasi</i> promastigotes forms treated in vitro with usnic acid.
[SA-29] METWALY et al., 2015.	Two new antileishmanial diketopiperazine alkaloids from the endophytic fungus <i>Trichosporum</i> sp.
[SA-30] MALAK et al., 2014.	Antileishmanial metabolites from <i>Geosmithia langdonii</i> .
[SA-31] BAYDOUN et al., 2014.	Microbial transformation of nandrolone with <i>Cunninghamella echinulata</i> and <i>Cunninghamella blakesleeana</i> and evaluation of leishmaniacidal activity of transformed products.
[SA-32] RODRIGUES et al., 2014.	A novel function for kojic acid, a secondary metabolite from <i>Aspergillus</i> fungi, as antileishmanial agent.
[SA-33] ORTEGA, et al., 2014.	Anti- <i>L. donovani</i> Activity in Macrophage/Amastigote Model of Palmarumycin CP18 and its Large Scale Production.
[SA-34] MALLICK et al., 2014.	Selective inhibition of <i>Leishmania donovani</i> by active extracts of wild mushrooms used by the tribal population of India: an in vitro exploration for new leads against parasitic protozoans.
[SA-35] AWAAD et al., 2014.	Anti-leishmanial Activities of Extracts and Isolated Compounds from <i>Drechslera rostrata</i> and <i>Eurotium tonpholium</i> .
[SA-36] SANTOS et al., 2014.	The semisynthetic landscape of aphidicolin: inspiration towards leishmanicidal compounds.
[SA-37] MARINHO et al., 2013.	Active polyketides isolated from <i>Penicillium herquei</i> .
[SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013.	Antimycobacterial and antileishmanial effects of microfungi isolated from tropical regions in México.

[SA-39] LAI et al., 2012.	Leishmanicidal and anticandidal activity of constituents of Indian edible mushroom <i>Astraeus hygrometricus</i> .
[SA-40] VALADARES et al., 2012a.	Prophylactic or therapeutic administration of <i>Agaricus blazei</i> Murill is effective in treatment of murine visceral leishmaniasis.
[SA-41] VALADARES et al., 2012b.	Therapeutic efficacy induced by the oral administration of <i>Agaricus blazei</i> Murill against <i>Leishmania amazonensis</i> .
[SA-42] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2012.	Antiparasitic and anticancer constituents of the endophytic fungus <i>Aspergillus</i> sp. strain F1544.
[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.	Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms <i>Deschampsia antarctica</i> Desv. and <i>Colobanthus quitensis</i> (Kunth) Bartl.
[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.	Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi.
[SA-45] MORENO et al., 2011.	Chemical constituents of the new endophytic fungus <i>Mycosphaerella</i> sp. nov. and their anti-parasitic activity.
[SA-46] VALADARES et al., 2011.	Leishmanicidal activity of the <i>Agaricus blazei</i> Murill in different <i>Leishmania</i> species.
[SA-47] SOUZA-FAGUNDES et al., 2010.	In vitro activity of hypnophilin from <i>Lentinus strigosus</i> : a potential prototype for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy.
[SA-48] ROSA et al., 2010.	Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil.
[SA-49] YATAWARA et al., 2009.	Aureobasidium-derived soluble branched (1, 3-1, 6) β -glucan (<i>Sophy</i> β -glucan) enhances natural killer activity in <i>Leishmania amazonensis</i> -infected mice.
[SA-50] ROSA et al., 2009.	Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil.
[SA-51] CAMPOS et al., 2009.	Correction: Leishmanicidal Metabolites from <i>Cochliobolus</i> sp., an Endophytic Fungus Isolated from <i>Piptadenia adiantoides</i> (Fabaceae).

[SA-52] PONTIUS et al., 2008.	Antiprotozoal activities of heterocyclic-substituted xanthenes from the marine-derived fungus <i>Chaetomium</i> sp.
[SA-53] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008.	Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus <i>Edenia</i> sp.
[SA-54] GUIMARÃES et al., 2008.	Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from <i>Viguiera arenaria</i> and <i>Tithonia diversifolia</i> .
[SA-55] SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2008.	A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen <i>Protousnea poeppigii</i> .
[SA-56] CORREA et al., 2006.	Leishmanicidal activity of <i>Pycnoporus sanguineus</i> .
[SA-57] MARINHO et al., 2005.	Biologically active polyketides produced by <i>Penicillium janthinellum</i> isolated as an endophytic fungus from fruits of <i>Melia azedarach</i> .
[SA-58] NOLETO et al., 2002.	Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity.
[SA-59] FOURNET et al., 1997.	Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis.

SUPPLEMENTARY MATERIAL 3

Table with the main solvents used in the production of fungal extracts with leishmanicidal activity.

Selected Article	Organic Solvents
[SA-2] OGAKI et al., 2020. [SA-4] GOLIAS et al., 2019. [SA-7] DE ALMEIDA et al., 2018. [SA-15] CAMPOS et al., 2017. [SA-27] CAMPOS et al., 2015. [SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013. [SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011. [SA-48] ROSA et al., 2010. [SA-54] GUIMARÃES et al., 2008. [SA-50] ROSA et al., 2009.	Ethyl acetate
[SA-56] CORREA et al., 2006.	Acetone
[SA-11] PERETZ et al., 2018. [SA-34] MALLICK et al., 2014. [SA-40] VALADARES et al., 2012a. [SA-46] VALADARES et al., 2011.	Water
[SA-3] DE MENEZES et al., 2020. [SA-13] GOMES et al., 2018. [SA-55] SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2008	Dichloromethane
[SA-1] LOPES et al., 2020 [SA-9] SULTANA, et al., 2018. [SA-11] PERETZ et al., 2018. [SA-34] MALLICK et al., 2014. [SA-43] SANTIAGO et al., 2012. [SA-50] ROSA et al., 2009.	Ethanol
[SA-56] CORREA et al., 2006.	Hexane
[SA-55] SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2008	Methanol

SUPPLEMENTARY MATERIAL 4

List of articles selected in the systematic review, with assays in amastigotes obtained by different methods.

Selected Article	<i>Leishmania</i> (amastigote)	Host cell / Axenic culture
[SA-1] LOPES et al., 2020	<i>L. amazonensis</i>	Macrophage cell lines J774
[SA-5] BRAUN et al., 2019.	<i>L. amazonensis</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-9] SULTANA, et al., 2018.	<i>L. donovani</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-10] ALVES et al., 2018.	<i>L. amazonensis</i>	Bone marrow-derived macrophages from BALB/c
[SA-12] COTA et al., 2018.	<i>L. braziliensis</i>	THP-1 (cell line derived from human monocytes)
[SA-15] CAMPOS et al., 2017.	<i>L. amazonensis</i>	Axenic culture
[SA-19] LELIEBRE-LARA et al., 2016.	<i>L. amazonensis</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-26] MALLICK et al., 2015.	<i>L. donovani</i>	Bone marrow-derived macrophages from BALB/c
[SA-27] CAMPOS et al., 2015.	<i>L. amazonensis</i>	Axenic culture
[SA-32] RODRIGUES et al., 2014.	<i>L. amazonensis</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-33] ORTEGA, et al., 2014.	<i>L. donovani</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-34] MALLICK et al., 2014.	<i>L. donovani</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-36] SANTOS et al., 2014.	<i>L. braziliensis</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-40] VALADARES et al., 2012a.	<i>L. chagasi</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.	<i>L. amazonensis</i>	Axenic culture
[SA-42] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2012.	<i>L. donovani</i>	Axenic culture
[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.	<i>L. donovani</i>	Axenic culture
[SA-45] MORENO et al., 2011.	<i>L. donovani</i>	Axenic culture
[SA-46] VALADARES et al., 2011.	<i>L. amazonensis</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. major</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-47] SOUZA-FAGUNDES et al., 2010.	<i>L. amazonensis</i>	Axenic culture
[SA-48] ROSA et al., 2010.	<i>L. amazonensis</i>	Axenic culture
[SA-50] ROSA et al., 2009.	<i>L. amazonensis</i>	Axenic culture
[SA-51] CAMPOS et al., 2009.	<i>L. amazonensis</i>	Axenic culture
[SA-52] PONTIUS et al., 2008	<i>L. donovani</i>	Peritoneal macrophages from Balb/C
[SA-53] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008.	<i>L. donovani</i>	Axenic culture
[SA-56] CORREA et al., 2006.	<i>L. panamensis</i>	Human promonocytes U937
[SA-57] MARINHO et al., 2005.	<i>L. mexicana</i>	Axenic culture
[SA-58] NOLETO et al., 2002.	<i>L. amazonensis</i>	Peritoneal macrophages from Swiss mice

SUPPLEMENTARY MATERIAL 5

List of articles selected in the systematic review, summarized by bibliographic references and periodicals in descending order of the year of publication.

Selected Article	Periodicals
[SA-1] LOPES et al., 2020.	Frontiers in Cellular and Infection Microbiology
[SA-2] OGAKI et al., 2020.	Extremophiles
[SA-3] DE MENEZES et al., 2020.	Extremophiles
[SA-4] GOLIAS et al., 2019.	Brazilian Journal of Microbiology
[SA-5] BRAUN et al., 2019.	Natural Product Research
[SA-6] MALAK et al., 2018.	Journal of Natural Products
[SA-7] DE ALMEIDA et al., 2018.	Natural Product Research
[SA-8] MOTOSHIMA et al., 2018.	Carbohydrate Polymers
[SA-9] SULTANA, et al., 2018.	Experimental Parasitology
[SA-10] ALVES et al., 2018.	Plos One
[SA-11] PERETZ et al., 2018.	International Journal of Medicinal Mushrooms
[SA-12] COTA et al., 2018.	Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
[SA-13] GOMES et al., 2018.	Extremophiles
[SA-14] DERICI et al., 2018.	Biotech
[SA-15] CAMPOS et al., 2017.	Journal of Biosciences
[SA-16] BRISSOW et al., 2017.	Parasitology Research
[SA-17] DA SILVA et al., 2017.	World Journal of Microbiology and Biotechnology
[SA-18] SIDDIQUI et al., 2017.	Plos One
[SA-19] LELIEBRE-LARA et al., 2016.	Molecules
[SA-20] IBRAHIM et al., 2016a.	Phytochemistry Letters

[SA-21] IBRAHIM et al., 2016b.	Fitoterapia
[SA-22] ELKHAYAT et al., 2016.	Natural Product Research
[SA-23] PARRA LIZARAZU et al., 2016.	Revista Boliviana de Química
[SA-24] DO NASCIMENTO et al., 2015.	World Journal of Microbiology and Biotechnology
[SA-25] MIKELL et al., 2015.	Chemical and Pharmaceutical Bulletin
[SA-26] MALLICK et al., 2015.	Future Microbiology
[SA-27] CAMPOS et al., 2015.	Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
[SA-28] DA LUZ et al., 2015.	The Scientific World Journal
[SA-29] METWALY et al., 2015.	<i>Der Pharma Chemica</i>
[SA-30] MALAK et al., 2014.	Journal of Natural Products
[SA-31] BAYDOUN et al., 2014.	Steroids
[SA-32] RODRIGUES et al., 2014.	Plos One
[SA-33] ORTEGA, et al., 2014.	Natural Product Communications
[SA-34] MALLICK et al., 2014.	Experimental Parasitology
[SA-35] AWAAD et al., 2014.	Phytotherapy Research
[SA-36] SANTOS et al., 2014.	Journal of The Brazilian Chemical Society
[SA-37] MARINHO et al., 2013.	Anais da Academia Brasileira de Ciências
[SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013.	Parasitology Research
[SA-39] LAI et al., 2012.	Chemistry & Biodiversity
[SA-40] VALADARES et al., 2012a.	Experimental Parasitology
[SA-41] VALADARES et al., 2012b.	Parasitology Research
[SA-42] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2012.	Natural Product Communications
[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.	Extremophiles
[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.	International Microbiology

[SA-45] MORENO et al., 2011.	Natural Product Communications
[SA-46] VALADARES et al., 2011.	Parasitology International
[SA-47] SOUZA-FAGUNDES et al., 2010.	Brazilian Journal of Medical And Biological Research
[SA-48] ROSA et al., 2010.	Brazilian Journal of Microbiology
[SA-49] YATAWARA et al., 2009.	The Korean Journal of Parasitology
[SA-50] ROSA et al., 2009.	Antonie Van Leeuwenhoek
[SA-51] CAMPOS et al., 2009.	Plos Neglected Tropical Diseases
[SA-52] PONTIUS et al., 2008.	Journal of Natural Products
[SA-53] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008.	Journal of Natural Products
[SA-54] GUIMARÃES et al., 2008.	Fems Immunology & Medical Microbiology
[SA-55] SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2008.	Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives
[SA-56] CORREA et al., 2006.	Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives
[SA-57] MARINHO et al., 2005.	Journal of The Brazilian Chemical Society
[SA-58] NOLETO et al., 2002.	Molecular and Cellular Biochemistry
[SA-59] FOURNET et al., 1997.	Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology

SUPPLEMENTARY MATERIAL 6

List of evaluated fungi present in the systematic review, divided by phyla and genera.

	Filo	Genus	Selected Article
1	<i>Ascomycota</i>	<i>Acremonium fusidioides</i>	[SA-2] OGAKI et al., 2020.
2	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricus blazei</i> Murill <i>Agaricus blazei</i> Murill <i>Agaricus blazei</i> Murill	[SA-40] VALADARES et al., 2012a. [SA-46] VALADARES et al., 2011. [SA-41] VALADARES et al., 2012b.
3	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agrocybe aegerita</i>	[SA-8] MOTOSHIMA et al., 2018.
4	<i>Ascomycota</i>	<i>Alternaria</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012. [SA-48] ROSA et al., 2010.
5	<i>Ascomycota</i>	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
6	<i>Ascomycota</i>	<i>Arthrinium</i> sp.	[SA-48] ROSA et al., 2010.
7	<i>Ascomycota</i>	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Aspergillus terreus</i> -F7 <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus</i> sp.	[SA-23] PARRA LIZARAZU et al., 2016. [SA-32] RODRIGUES et al., 2014. [SA-42] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2012. [SA-17] DA SILVA et al., 2017. [SA-22] ELKHAYAT et al., 2016. [SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.
8	<i>Basidiomycota</i>	<i>Astraeus hygrometricus</i> <i>Astraeus hygrometricus</i> <i>Astraeus hygrometricus</i>	[SA-26] MALLICK et al., 2015. [SA-34] MALLICK et al., 2014. [SA-39] LAI et al., 2012.
9	<i>Ascomycota</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	[SA-49] YATAWARA et al., 2009.
10	<i>Ascomycota</i>	<i>Bipolaris</i> sp. AZ26 <i>Bipolaris</i> sp. C36	[SA-7] DE ALMEIDA et al., 2018. [SA-7] DE ALMEIDA et al., 2018.
11	<i>Ascomycota</i>	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
12	<i>Ascomycota</i>	<i>Chaetomium</i> sp.	[SA-52] PONTIUS et al., 2008.
13	<i>Ascomycota</i>	<i>Cladonia substellata</i> Vainio	[SA-28] DA LUZ et al., 2015.
14	<i>Ascomycota</i>	<i>Cochliobolus sativus</i> P2-F3 <i>Cochliobolus</i> sp. <i>Cochliobolus</i> sp. <i>Cochliobolus</i> sp.	[SA-24] DO NASCIMENTO et al., 2015. [SA-15] CAMPOS et al., 2017. [SA-48] ROSA et al., 2010. [SA-51] CAMPOS et al., 2009.
15	<i>Ascomycota</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	[SA-48] ROSA et al., 2010.
16	<i>Traditional Zygomycota</i>	<i>Cunninghamella blakesleeana</i> + <i>C. echinulata</i> <i>Cunninghamella blakesleeana</i> + <i>C. echinulata</i>	[SA-18] SIDDIQUI et al., 2017. [SA-31] BAYDOUN et al., 2014
17	<i>Ascomycota</i>	<i>Curvularia</i> sp. P1-F1	[SA-24] DO NASCIMENTO et al., 2015.
18	<i>Ascomycota</i>	<i>Davidiella tassiana</i>	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
19	<i>Ascomycota</i>	<i>Diaporthe phaseolorum</i> <i>Diaporthe phaseolorum</i> -92C <i>Diaporthe</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp.	[SA-54] GUIMARÃES et al., 2008. [SA-16] BRISSOW et al., 2017. [SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011. [SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.
20	<i>Ascomycota</i>	<i>Dichotomophthora portulacae</i> <i>Dichotomophthora boerhaaviae</i>	[SA-10] ALVES et al., 2018. [SA-10] ALVES et al., 2018.
21	<i>Ascomycota</i>	<i>Drechslera rostrata</i>	[SA-35] AWAAD et al., 2014.
22	<i>Ascomycota</i>	<i>Edenia</i> sp. <i>Edenia</i> sp.	[SA-53] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008. [SA-33] ORTEGA, et al., 2014.
23	<i>Ascomycota</i>	<i>Emericella nidulans</i>	[SA-10] ALVES et al., 2018.
24	<i>Ascomycota</i>	<i>Erioderma leylandii</i> (Lichenized fungi)	[SA-59] FOURNET et al., 1997.

25	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotium tonpholium</i>	[SA-35] AWAAD et al., 2014.
26	<i>Ascomycota</i>	<i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium sp. TA50</i> <i>Fusarium sp. TA54</i>	[SA-20] IBRAHIM et al., 2016a. [SA-21] IBRAHIM et al., 2016b. [SA-27] CAMPOS et al., 2015. [SA-48] ROSA et al., 2010. [SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013. [SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013.
27	<i>Ascomycota</i>	<i>Geosmithia langdonii</i> <i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30] MALAK et al., 2014. [SA-6] MALAK et al., 2018.
28	<i>Ascomycota</i>	<i>Gibberella sp.</i>	[SA-48] ROSA et al., 2010.
29	<i>Basidiomycota</i>	<i>Grifola frondosa</i>	[SA-9] SULTANA, et al., 2018.
30	<i>Basidiomycota</i>	<i>Gymnopilus cf. areolatus Murr.</i>	[SA-50] ROSA et al., 2009.
31	<i>Ascomycota</i>	<i>Helgardia sp.</i>	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
32	<i>Ascomycota</i>	<i>Herpotrichia sp.</i>	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
33	<i>Ascomycota</i>	<i>Hypocrea sp.</i>	[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.
34	<i>Basidiomycota</i>	<i>Irpex lacteus</i>	[SA-50] ROSA et al., 2009.
35	<i>Basidiomycota</i>	<i>Lentinus cf. strigosus</i> <i>Lentinus strigosus</i>	[SA-50] ROSA et al., 2009. [SA-47] SOUZA-FAGUNDES et al., 2010.
36	<i>Ascomycota</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	[SA-18] SIDDIQUI et al., 2017.
37	<i>Ascomycota</i>	<i>Microdochium sp.</i>	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
38	<i>Ascomycota</i>	<i>Morchella importuna</i>	[SA-11] PERETZ et al., 2018.
39	<i>Traditional Zygomycota</i>	<i>Mortierella parvispora</i>	[SA-13] GOMES et al., 2018.
40	<i>Traditional Zygomycota</i>	<i>Mucor ramannianus</i>	[SA-25] MIKELL et al., 2015.
41	<i>Ascomycota</i>	<i>Mycosphaerella sp.</i> <i>Mycosphaerella sp.</i>	[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011. [SA-45] MORENO et al., 2011.
42	<i>Ascomycota</i>	<i>N. pseudotrichia</i> <i>Nectria pseudotrichia</i> <i>Nectria sp.</i>	[SA-27] CAMPOS et al., 2015. [SA-12] COTA et al., 2018. [SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.
43	<i>Ascomycota</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>	[SA-36] SANTOS et al., 2014.
44	<i>Basidiomycota</i>	<i>Nothopanus hygrophanus</i>	[SA-50] ROSA et al., 2009.
45	<i>Ascomycota</i>	<i>Oculimacula sp.</i>	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
46	<i>Ascomycota</i>	<i>Paecilomyces sp.</i>	[SA-5] BRAUN et al., 2019.
47	<i>Ascomycota</i>	<i>Penicillium allii-sativi</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium herquei</i> <i>Penicillium janthinellum</i> <i>Penicillium palitans</i> <i>Penicillium palitans</i> <i>Penicillium solitum</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>	[SA-2] OGAKI et al., 2020. [SA-2] OGAKI et al., 2020. [SA-3] DE MENEZES et al., 2020. [SA-13] GOMES et al., 2018. [SA-37] MARINHO et al., 2013. [SA-57] MARINHO et al., 2005. [SA-2] OGAKI et al., 2020. [SA-3] DE MENEZES et al., 2020. [SA-2] OGAKI et al., 2020. [SA-3] DE MENEZES et al., 2020. [SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011. [SA-48] ROSA et al., 2010.
48	<i>Ascomycota</i>	<i>Phaeosphaeria herpotrichoides</i> <i>Phaeosphaeria sp.</i>	[SA-43] SANTIAGO et al., 2012. [SA-43] SANTIAGO et al., 2012.
49	<i>Ascomycota</i>	<i>Phomopsis sp.</i> <i>Phomopsis sp. P5-F1</i>	[SA-54] GUIMARÃES et al., 2008. [SA-24] DO NASCIMENTO et al., 2015.
50	<i>Ascomycota</i>	<i>Phyllosticta capitalensis</i> <i>Phyllosticta sp. ou Guignardia mangiferae</i>	[SA-4] GOLIAS et al., 2019. [SA-54] GUIMARÃES et al., 2008.

51	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pleurotus flabellatus</i>	[SA-50] ROSA et al., 2009.
52	<i>Ascomycota</i>	<i>Protousnea malacea</i> (Lichenized fungi) <i>Protousnea poeppigii</i> (Lichenized fungi)	[SA-59] FOURNET et al., 1997. [SA-55] SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2008
53	<i>Ascomycota</i>	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>	[SA-13] GOMES et al., 2018. [SA-2] OGAKI et al., 2020.
54	<i>Ascomycota</i>	<i>Psoroma pallidum</i> (Lichenized fungi)	[SA-59] FOURNET et al., 1997.
55	<i>Basidiomycota</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	[SA-56] CORREA et al., 2006.
56	<i>Ascomycota</i>	<i>Ramalina celastri</i> (Lichenized fungi)	[SA-58] NOLETO et al., 2002.
57	<i>Basidiomycota</i>	<i>Russula albonigra</i> <i>Russula delica</i> <i>Russula laurocerasi</i>	[SA-34] MALLICK et al., 2014. [SA-34] MALLICK et al., 2014. [SA-34] MALLICK et al., 2014.
58	<i>Ascomycota</i>	<i>Stenocarpella</i> sp.	[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.
59	<i>Basidiomycota</i>	<i>Termitomyces eurhizus</i>	[SA-34] MALLICK et al., 2014.
60	<i>Basidiomycota</i>	<i>Trametes versicolor</i>	[SA-19] LELIEBRE-LARA et al., 2016.
61	<i>Ascomycota</i>	<i>Trichoderma asperelloides</i>	[SA-1] LOPES et al., 2020.
62	<i>Basidiomycota</i>	<i>Tricholoma giganteum</i>	[SA-34] MALLICK et al., 2014.
63	<i>Ascomycota</i>	<i>Trichosporum</i> sp.	[SA-29] METWALY et al., 2015.
64	<i>Ascomycota</i>	<i>Usnea florida</i> (Lichenized fungi)	[SA-55] SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2008.
65	<i>Ascomycota</i>	<i>Vermisporium-like</i>	[SA-10] ALVES et al., 2018.
66	<i>Ascomycota</i>	<i>Verticillium</i> sp. TH28	[SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013.
67	<i>Ascomycota</i>	<i>Xylaria</i> sp. <i>Xylaria</i> sp.	[SA-27] CAMPOS et al., 2015. [SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.
68	<i>Ascomycota</i>	<i>Xylariaceae</i> sp.	[SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011.
Not identified		2TA2 strain Basidiomycete cepa F0194 Fungal endophyte UFMCB 914 Lichenized fungi	[SA-38] GAMBOA-ANGULO et al., 2013. [SA-50] ROSA et al., 2009. [SA-44] MARTÍNEZ-LUIS et al., 2011. [SA-48] ROSA et al., 2010. [SA-14] DERICI et al., 2018.

SUPPLEMENTARY MATERIAL 7

List of chemical classes of isolated fungal compounds with leishmanicidal activity, summarized in alphabetical order.

	Chemical Class	Isolated Substance	Fungi	Selected Article
1	Acids	10-acetyl trichoderonic acid A	<i>Nectria pseudotruchia</i>	[AS-12]
2	Acids	6'-acetoxy-piliformic acid	<i>Nectria pseudotruchia</i>	[AS-12]
3	Alcohols	4-[2',4'-dihydroxy-6'-(hydroxymethyl)	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30]
4	Alcohols	(4S,5S)-4,5-dihydroxy-2-methylcyclohex-2-enone	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30]
5	Alcohols	3-hydroxybenzyl alcohol	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30]
6	Alcohols	2,5-dihydroxybenzyl alcohol	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30]
7	Benzofurans	Usnic acid	Lichenized fungi (N.I.)	[SA-14]
	Benzofurans	Usnic acid	<i>Cladonia substellata</i> Vainio (Lichenized fungi)	[SA-28]
	Benzofurans	Usnic acid	<i>Usnea florida</i> (Lichenized fungi)	[SA-55]
	Benzofurans	(+)Usnic acid	<i>Protousnea malacea</i> (Stirt) Krog. (Lichenized fungi)	[SA-59]
8	Butenolide	Terrein	<i>Aspergillus terreus</i> - F7	[SA-17]
9	Carbasugar	(1S,2R,3R,4R,5R)-2,3,4-trihydroxy-5-methylcyclohexyl-2',5'-dihydroxybenzoate	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-6]
10	Carbasugar	(1S,2S,3S,4R,5R)-4-[(2',5'-dihydroxybenzyl)oxy]-5-methylcyclohexane-1,2,3-triol	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-6]
11	Depsides	Divaricatinic acid	<i>Usnea florida</i> (Lichenized fungi)	[SA-55]
12	Depsides	Isodivaricatic acid	<i>Protousnea poeppigii</i> (Lichenized fungi)	[SA-55]
13	Depsides	Isodivaricatic acid diacetate	<i>Protousnea poeppigii</i> (Lichenized fungi)	[SA-55]
14	Depsides	1'-Chloropannarine	<i>Erioderma leylandii</i> (Lichenized fungi)	[SA-59]
15	Depsides	Pannarine	<i>Psoroma pallidum</i> Nyl. (Lichenized fungi)	[SA-59]
16	Enzymes	Preussomerin EG1	<i>Edenia</i> sp.	[SA-53]
17	Ergostanes	Trametenolic acid B	<i>Trametes versicolor</i>	[SA-19]
18	Flavanones	1,3-cis-1-Methoxy-1-(2,5-dihydroxyphenyl)-3-hydroxy-3-phenylpropane	<i>Mucor ramannianus</i>	[SA-25]
19	Lactones	Butyrolactone I	<i>Aspergillus terreus</i> - F7	[SA-17]
20	Lactones	Butyrolactone V	<i>Aspergillus terreus</i> - F7	[SA-17]
21	Lactones	Harzialactone A	<i>Paecilomyces</i> sp.	[SA-5]

22	Lactones	Terrenolide S	<i>Aspergillus terreus</i>	[SA-22]
23	Mycotoxins	18-des-hydroxy Cytochalasin H	<i>Diaporthe phaseolorum -92C</i>	[SA-16]
24	Naphthalenes	Palmarumycin CP18	<i>Edenia</i> sp.	[SA-33]
25	Naphthalenes	Palmarumycin CP2	<i>Edenia</i> sp.	[SA-53]
26	Naphthalenes	Palmarumycin CP17	<i>Edenia</i> sp.	[SA-53]
27	Naphthalenes	Palmarumycin CP18	<i>Edenia</i> sp.	[SA-53]
28	Oxygenated cyclohexene	(+)-epiepopoformin	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30]
29	Peptides	(6-S)-3-(1,3-dihydroxypropyl)-6-(2-methylpropyl)piperazine-2,5-dione	<i>Trichosporum</i> sp.	[SA-29]
30	Phenalenones	Cercosporin	<i>Mycosphaerella</i> sp.	[SA-45]
31	Phenalenones	Cercosporin acetylate	<i>Mycosphaerella</i> sp.	[SA-45]
32	Phenols	benzyl]benzene-1,2-dio	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30]
33	Phenols	2,5-dihydroxybenzaldehyde	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30]
34	Phenols	3-hydroxytoluene	<i>Geosmithia langdonii</i>	[SA-30]
35	Phthalates	di-2-ethylhexyl phthalate	<i>Drechslera rostrata</i>	[SA-35]
36	Polyketides	Citreorosein	<i>Penicillium herquei</i>	[SA-37]
37	Polyketides	Emodin	<i>Penicillium herquei</i>	[SA-37]
38	Polyketides	Janthinone	<i>Penicillium herquei</i>	[SA-37]
39	Polyketides	Citrinin	<i>Penicillium janthinellum</i>	[SA-57]
40	Polysaccharides	Fucogalactan FG-Aa	<i>Agrocybe aegerita</i>	[SA-8]
41	Polysaccharides	GMPOLY	<i>Ramalina celastri</i> (Lichenized fungi)	SA-58]
42	Polysaccharides	GMPOLYVO	<i>Ramalina celastri</i> (Lichenized fungi)	SA-58]
43	Pyranone	Kojic acid (KA)	<i>Aspergillus</i> sp.	[SA-32]
44	Pyrrolidines	Pseurotin A	<i>Aspergillus</i> sp.	[SA-42]
45	Pyrrolidines	14-norpseurotin A	<i>Aspergillus</i> sp.	[SA-42]
46	Pyrrolidines	FD-838	<i>Aspergillus</i> sp.	[SA-42]
47	Pyrrolidines	Pseurotin D	<i>Aspergillus</i> sp.	[SA-42]
48	Quinones	2-hidroxifenilquinoline	<i>Aspergillus</i> sp.	[SA-23]
49	Quinones	1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methyl-anthraquinone	<i>Eurotium tonpholium</i>	[SA-35]
50	Quinones	Anhydrocochlioquinone A	<i>Cochliobolus</i> sp.	[SA-15]
51	Quinones	Cochlioquinone A + isocochlioquinone	<i>Cochliobolus sativus</i> P2-F3	[SA-24]

52	Quinones	Anhydrocochlioquinone A	<i>Cochliobolus sativus</i> P2-F3	[SA-24]
53	Quinones	Fumoquinone B	<i>Aspergillus</i> sp.	[SA-42]
54	Quinones	Cochlioquinone A	<i>Cochliobolus</i> sp.	[SA-51]
55	Quinones	Isocochlioquinone A	<i>Cochliobolus</i> sp.	[SA-51]
56	Quinones	CJ-12,371	<i>Edenia</i> sp.	[SA-53]
57	Steroids	6 β ,17 β -dihydroxy-7 α ,17 α -dimethylestr-4-en-3-one	<i>Cunninghamella blakesleeana</i> + <i>Cunninghamella echinulata</i>	[SA-18]
58	Steroids	11 β ,17 β -dihydroxy-7 α ,17 α -dimethylestr-4-en-3-one	<i>Macrophomina phaseolina</i>	[SA-18]
59	Steroids	Ergosterol peroxide	<i>Trametes versicolor</i>	[SA-19]
60	Steroids	Nandrolone	<i>Cunninghamella echinulata</i> + <i>Cunninghamella blakesleeana</i>	[SA-31]
61	Steroids	10 β ,16 α ,17 β -trihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one	<i>Cunninghamella echinulata</i> + <i>Cunninghamella blakesleeana</i>	[SA-31]
62	Steroids	6 β ,10 β ,17 β -trihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one	<i>Cunninghamella echinulata</i> + <i>Cunninghamella blakesleeana</i>	[SA-31]
63	Steroids	10 β ,17 β -dihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one	<i>Cunninghamella echinulata</i> + <i>Cunninghamella blakesleeana</i>	[SA-31]
64	Steroids	6 β ,17 β -dihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one	<i>Cunninghamella echinulata</i> + <i>Cunninghamella blakesleeana</i>	[SA-31]
65	Steroids	10 β -hydroxy-19-nor-4-androsten-3,17-dione	<i>Cunninghamella echinulata</i> + <i>Cunninghamella blakesleeana</i>	[SA-31]
66	Steroids	16b,17b-Dihydroxy-19-nor-4-androsten-3-one	<i>Cunninghamella echinulata</i> + <i>Cunninghamella blakesleeana</i>	[SA-31]
67	Terpenes	hydroheptelidic acid	<i>Nectria pseudotrichia</i>	[AS-12]
68	Terpenes	Aphidicolin	<i>Nigrospora sphaerica</i>	[SA-36]
69	Terpenes	3-deoxy-aphidicolin	<i>Nigrospora sphaerica</i>	[SA-36]
70	Terpenes	3-oxoaphidicolin	<i>Nigrospora sphaerica</i>	[SA-36]
71	Terpenes	3-oxime-aphidicolin	<i>Nigrospora sphaerica</i>	[SA-36]
72	Terpenes	Panepoxydone	<i>Lentinus strigosus</i>	[SA-47]
73	Terpenes	Hypnophilin	<i>Lentinus strigosus</i>	[SA-47]
74	Terpenes	Astrakurkurone	<i>Astraeus hygrometricus</i>	[SA-26]
	Terpenes	Astrakurkurone	<i>Astraeus hygrometricus</i>	[SA-39]
75	Terpenes	(22E,24R)-stigmasta-5,7,22-trien-3- β -ol	<i>Aspergillus terreus</i>	[SA-22]
76	Terpenes	stigmast-4-ene-3-one	<i>Aspergillus terreus</i>	[SA-22]
77	Terpenes	Integracides H	<i>Fusarium</i> sp.	[SA-20]
78	Terpenes	Integracides J	<i>Fusarium</i> sp.	[SA-20]
79	Terpenes	Integracides F	<i>Fusarium</i> sp.	[SA-21]
80	Terpenes	Integracides G	<i>Fusarium</i> sp.	[SA-21]

81	Vitamins	Ergosterol 5,8-endoperoxide	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	[SA-56]
82	Xanthenes	Chaetoxanthone C1	<i>Chaetomium</i> sp.	[SA-52]
83	Xanthenes	Chaetoxanthone C2	<i>Chaetomium</i> sp.	[SA-52]
84	Xanthenes	Chaetoxanthone C3	<i>Chaetomium</i> sp.	[SA-52]

6 CONCLUSÕES

- O estudo experimental com extratos pigmentados obtidos de bactérias isoladas do ambiente antártico, permitiu constatar a atividade leishmanicida *in vitro* desses metabolitos contra formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, entretanto não foi observado atividade contra a espécie *L. (L.) amazonensis*. Além disso o ensaio de viabilidade celular não mostrou efeito deletério dos extratos para as células da linhagem J774.A1 nas mesmas concentrações testadas nas promastigotas, evidenciando a toxicidade seletiva contra os parasitos.
- A revisão sistemática acerca da atividade leishmanicida de bioprodutos fúngicos mostrou um panorama do atual dos esforços na procura de alternativas para a farmacoterapia da leishmaniose explorando a biodiversidade de compostos naturais.
- Os resultados obtidos no estudo experimental, em conjunto com as evidências reportadas pelas publicações reunidas na revisão sistemática, indicam na prospecção de produtos microbianos um caminho promissor rumo ao desenvolvimento de novas entidades químicas para o combate à leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, Maha; KAMHAWI, Shaden; VALENZUELA, Jesus G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 691-703, 2014.
- ADDISU, Ayenew et al. Neglected tropical diseases and the sustainable development goals: an urgent call for action from the front line. **BMJ Global Health**, v. 4, n. 1, p. e001334, 2019.
- ADRIAENSEN, Wim et al. Immunomodulatory therapy of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1943, 2018.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 2016.
- AL SHAER, Danah et al. 2018 FDA Tides Harvest. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 52, 2019.
- ANDRADE, Bruno de Bezerril et al. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2-3, p. 122-127, 2007.
- ANDRADE, Bruno Leonardo Alves De. **A produção do conhecimento em doenças negligenciadas no Brasil: uma análise bioética dos dispositivos normativos e da atuação dos pesquisadores brasileiros**. Tese de Doutorado em Bioética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2015.
- ANDREANI, Guadalupe et al. *Leishmania infantum* amastigotes trigger a subpopulation of human B cells with an immunoregulatory phenotype. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, 2015.
- ANDRICOPULO, A.; FERREIRA, L. Medicinal chemistry approaches to neglected diseases drug discovery. **Journal of Modern Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 20-31, 2014.
- ANTONELLI, Lis RV et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 101, n. 2, p. 226-230, 2005.
- ARONSON, Naomi et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.
- ATALAH, Joaquin et al. Isolation and characterization of violacein from an Antarctic Iodobacter: a non-pathogenic psychrotolerant microorganism. **Extremophiles**, v. 24, n. 1, p. 43-52, 2020.
- ATAYDE, Vanessa Diniz et al. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 7-18, 2016.

ATRI, Chiraz; GUERFALI, Fatma Z.; LAOUINI, Dhafer. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018.

AUSTRÁLIA. Department of Agriculture, Water and the Environment. Australian Antarctic Division. About Antarctica. Australian: **Australian Antarctic Program**, 2019. Disponível em: <https://www.antarctica.gov.au/about-antarctica/>, Acesso em: 15 dez. 2020.

BANERJEE, Antara et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37-41, 2016.

BARHOUMI, Mourad et al. Infection of human neutrophils with Leishmania infantum or Leishmania major strains triggers activation and differential cytokines release. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 153, 2019.

BARICZ, Andreea et al. Investigating the potential use of an Antarctic variant of Janthinobacterium lividum for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

BARNES, David KA et al. Incursion and excursion of Antarctic biota: past, present and future. **Global Ecology and Biogeography**, v. 15, n. 2, p. 121-142, 2006.

BATTISTI, James M.; LAWYER, Phillip G.; MINNICK, Michael F. Colonization of *Lutzomyia verrucarum* and *Lutzomyia longipalpis* sand flies (Diptera: Psychodidae) by *Bartonella bacilliformis*, the etiologic agent of Carrion's disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, 2015.

BECKER, Judith; WITTMANN, Christoph. Microbial production of extremolytes—high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 65, p. 118-128, 2020.

BENNETT, Joan W.; CHUNG, King-Thom. **Alexander Fleming and The Discovery of Penicillin**. 2001.

BENNETT, John E.; DOLIN, Raphael; BLASER, Martin J. **Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases**. 8. ed. Elsevier Health Sciences, 2015.

BERMUDEZ, Jorge Antônio Zepeda . Acesso a medicamentos: direito ou utopia? 1. ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2014.

BERMUDEZ, Jorge Antônio Zepeda; COSTA, Jorge Carlos Santos da; NORONHA, José Carvalho de (org.). **Desafios do acesso a medicamentos no Brasil** [recurso eletrônico]. Rio de Janeiro: Edições Livres, 2020. 190 p.

BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.

BHATIA, Saurabh; GOLI, Divakar. **Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 1; Basic techniques and concepts**.UK: IOP Publishing, 2018.

BOGDAN, Christian. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 69, 2012.

BOGITSH, Burton J.; CARTER, Clint E.; OELTMANN, Thomas N. **Human Parasitology**: 5 ed. Academic Press, 2019.

BOUSSOFFARA, Thouraya et al. Activated cytotoxic T cells within zoonotic cutaneous leishmaniasis lesions. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 7, n. 3, p. 95-104, 2019.

BRASIL. Marinha do Brasil. Comissão Interministerial para os Recursos do Mar. InfoCIRM abr 2020. Brasília: **Promar**, 2020. Disponível em: <https://www.marinha.mil.br/secirm/sites/www.marinha.mil.br/secirm/files/publicacoes/infocirm/2020/infocirm-abr2020.pdf>, Acesso em: 21 dez. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários. **Nota Técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. 3. ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Boletim Epidemiológico Número Especial Mar. 2021 - Doenças tropicais negligenciadas. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2021.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. O Brasil na Antártica: a importância científica e geopolítica do PROANTAR no entorno estratégico brasileiro. Brasília: **Ipea**, 2018.

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo Patologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

- BRATCHKOVA, Anna; IVANOVA, Veneta. Bioactive metabolites produced by microorganisms collected in Antarctica and the Arctic. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. sup1, p. 1-7, 2011.
- BRAZIL, Reginaldo Peçanha; RODRIGUES, Andressa A. Fuzzari; ANDRADE FILHO, José D. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas-a mini review. **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 4, n. 2, p. 1, 2015.
- BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2018.
- BURTON-JOHNSON, Alex et al. An automated methodology for differentiating rock from snow, clouds and sea in Antarctica from Landsat 8 imagery: a new rock outcrop map and area estimation for the entire Antarctic continent. **The Cryosphere**, v. 10, p. 1665-1677, 2016.
- BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.
- CAMPOS, Taís M. et al. Granzyme B produced by natural killer cells enhances inflammatory response and contributes to the immunopathology of cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 6, p. 973-982, 2020.
- CARDOSO, Thiago Marconi et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 898-906, 2015.
- CARNIELLI, Juliana BT et al. Natural resistance of *Leishmania infantum* to miltefosine contributes to the low efficacy in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 789-794, 2019.
- CARVALHO, Luis et al. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4204-4210, 2011.
- CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Leishmaniasis. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, **Center for Disease Control and Prevention**, 2020. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 15 fev. 2020.
- CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Neglected tropical diseases. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, **Center for Disease Control and Prevention**, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/>. Acesso em: 15 jul 2019.
- CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 2019.
- CHARLTON, Rebecca L. et al. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. **Parasitology**, v. 145, n. 2, p. 219-236, 2018.

- CHIANESE, Giuseppina et al. Linear aminolipids with moderate antimicrobial activity from the antarctic gram-negative bacterium *Aequorivita* sp. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, p. 187, 2018.
- CHOWN, Steven L. et al. The changing form of Antarctic biodiversity. **Nature**, v. 522, n. 7557, p. 431-438, 2015.
- COHEN, Joshua P. et al. Progress report on neglected tropical disease drug donation programs. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 1193-1204, 2016.
- CROFT, S.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- CUNHA, Clarissa F. et al. Contribution of *Leishmania braziliensis* antigen-specific CD4+ T, CD8+ T, NK and CD3+ CD56+ NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: Cytotoxic, activation and exhaustion profiles. **Plos One**, v. 15, n. 3, p. e0229400, 2020.
- CUNHA, Clarissa F. et al. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 4, p. 244-254, 2016.
- DA MOTTA VIEIRA, Vera Maria; OHAYON, Pierre. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. **Revista Economia & Gestão**, v. 6, n. 13, 2006.
- DANILOVICH, Mariana Elizabeth et al. Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. **Polar Biology**, v. 41, n. 7, p. 1417-1433, 2018.
- DAVIES, Julian; DAVIES, Dorothy. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.
- DE CASTRO, Waldionê et al. Basic and translational research on sand fly saliva: pharmacology, biomarkers, and vaccines. In: **Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 2**. Academic Press, 2017. p. 65-89.
- DE MENEZES, Graciéle Cunha Alves et al. Fungi in glacial ice of Antarctica: diversity, distribution and bioprospecting of bioactive compounds. **Extremophiles**, p. 1-10, 2020.
- DE NEGRI, F. Novos caminhos para a inovação no Brasil. São Paulo: **Ipeia**, 2018.
- DE SOUZA, Dziejdom K. et al. Diagnosis of neglected tropical diseases during and after the COVID-19 pandemic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008587, 2020.
- DEAK, Eszter et al. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1355-1368, 2010.
- DEMICHELI, Cynthia et al. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1570, n. 3, p. 192-198, 2002.

DENLINGER, David S. et al. Comparison of *in vivo* and *in vitro* Methods for Blood Feeding of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 5, p. 1112-1116, 2016.

DIAS, Edelberto Santos et al. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 101-111, 2011.

DIMASI, Joseph A.; GRABOWSKI, Henry G.; HANSEN, Ronald W. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20-33, 2016.

DNDI - DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. InfoLEISH Boletim informativo da redeLEISH - 4ª edição. Rio de Janeiro: **DNDi**, 2019a. Disponível em: https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2019/08/2019InformativoRedeLEISH_POR.pdf, Acesso em: 21 jan 2020.

DNDI - DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Inovação e acesso para populações negligenciadas. Rio de Janeiro: **DNDi**, 2018. Disponível em: <https://www.dndi.org/comunicacao/publicacoes/>, Acesso em: 11 jul 2019.

DNDI - DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Rumo a uma nova geração de tratamentos para as leishmanioses. Rio de Janeiro: **DNDi**, 2019b. Disponível em: <https://dndi.org/resources/publications/>, Acesso em: 21 jan 2020.

DODDS, Klaus. Reflecting on the 60th anniversary of the Antarctic Treaty. **Polar Record**, v. 55, n. 5, p. 311-316, 2019.

DORLO, Thomas PC et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DUNKELBERGER, Jason R.; SONG, Wen-Chao. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 34, 2010.

DUTHIE, Malcolm S. et al. Impact of sequelae of visceral leishmaniasis and their contribution to ongoing transmission of *Leishmania donovani*. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 6, p. ftz057, 2019.

EFPIA - EUROPEAN FEDERATION OF PHARMACEUTICAL INDUSTRIES AND ASSOCIATIONS. The Pharmaceutical Industry in Figures. Belgium: **EFPIA**, 2018. Disponível em: <https://efpia.eu/publications/downloads/efpia/2018-the-pharmaceutical-industry-in-figures/>, Acesso em: 28 jun. 2019.

ESTUDIO41. Estação antártica comandante ferraz. Disponível em: <https://www.estudio41.com.br/projeto/estacao-antartica-comandante-ferraz/>. Acesso em: 16 dez. 2020.

FALEIRO, Rebecca J. et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432-439, 2009.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Tropical disease priority review voucher: guidance for industry. Washington :FDA, 2016. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM080599.pdf>. Acesso em: 10 jul 2019.

FERREIRA, Leonardo LG; ANDRICOPULO, Adriano D. Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 125-127, 2019.

FIOANTAR - PROJETO FIOCRUZ NA ANTÁRTICA. Fundação Oswaldo Cruz. Curiosidades sobre o continente antártico. Rio de Janeiro: **Fiocruz**. Disponível em: <http://fioantar.fiocruz.br/node/86>. Acesso em: 18 dez. 2020.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Co-infecção por HIV e leishmaniose emerge como desafio à saúde pública. 2008. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from%5Finfo%5Findex=221&infoid=315&sid=32>, Acesso em: 15 fev. 2020.

FIRMINO-CRUZ, Luan et al. How to B (e)-1 important cell during Leishmania sp infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 424, 2019.

FONTOURA, Iolanda Graepp et al. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of human visceral leishmaniasis (HVL) associated with human immunodeficiency virus (HIV) coinfection: a systematic review. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1801-1818, 2018.

FORTES, Paulo Antônio de Carvalho; RIBEIRO, Helena. Saúde Global em tempos de globalização. **Saúde e Sociedade**, v. 23, p. 366-375, 2014.

FRANCO, Luis H.; BEVERLEY, Stephen M.; ZAMBONI, Dario S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

FRÉZARD, F. et al. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**. v. 14, p. 2317-2336, 2009.

FRÉZARD, Frédéric et al. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2013.

FRIEDMAN, Y. **Building Biotechnology: Business, Regulations, Patents, Law, Politics, Science**. Washington, DC: Logos Press, 2008.

GABRIEL, Áurea et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

GIORDANO, Daniela. Bioactive Molecules from Extreme Environments. **Marine Drugs**, v. 18, n. 12, p. 640, 2020.

GIUDICE, Angelina Lo et al. Peculiarities of extracellular polymeric substances produced by Antarctic bacteria and their possible applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 7, p. 2923-2934, 2020.

GIUDICE, Angelina Lo; FANI, Renato. Antimicrobial potential of cold-adapted bacteria and fungi from polar regions. In: **Biotechnology of Extremophiles**. Springer, Cham, 2016. p. 83-115.

GOMES, Eldon CQ et al. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**, v. 22, n. 3, p. 381-393, 2018.

GOMES, Regis; OLIVEIRA, Fabiano. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 110, 2012.

GONÇALVES, Vivian N. et al. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biology**, v. 38, n. 8, p. 1143-1152, 2015.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Suênia da C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1437, 2017.

GUERY, Romain et al. Liposomal amphotericin B in travelers with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Not a panacea. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006094, 2017.

GUIMARÃES-COSTA, Anderson B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748-6753, 2009.

HAILU, Asrat et al. Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: a multicentre, open-label, randomized trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e709, 2010.

HANSON, James Ralph. **Natural products: the secondary metabolites**. Royal Society of Chemistry, 2003.

HASHIGUCHI, Yoshihisa et al. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical Medicine and Health**, v. 44, n. 1, p. 2, 2016.

HOPWOOD, David A. **Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers**. Oxford University Press, 2007.

HOTEZ, Peter J. et al. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 5, p. e102, 2006.

HOTEZ, Peter J. et al. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2865, 2014.

HURDAYAL, Ramona; BROMBACHER, Frank. Interleukin-4 receptor alpha: from innate to adaptive immunity in murine models of cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1354, 2017.

IFPMA - INTERNATIONAL FEDERATION OF PHARMACEUTICAL MANUFACTURERS & ASSOCIATIONS. The Pharmaceutical Industry and Global Health—Facts and Figures. Geneva: **IFPMA**, 2017. Disponível em: <https://www.ifpma.org/wp-content/uploads/2017/02/IFPMA-Facts-And-Figures-2017.pdf>, Acesso em: 28 jun. 2019.

INCT-CRIOSFERA - INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA CRIOSFERA. Centro Polar e Climático. Universidade Federal do Rio Grande do Sul . Dados Geográficos Antárticos. Porto Alegre: **UFRGS**, 2013. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/inctcriosfera/arquivos/FactSheetAntarticaBrasil.pdf> , Acesso em: 15 dez. 2020.

INTERFARMA - ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DE PESQUISA. Entendendo os Medicamentos Biológicos. São Paulo: **Interfarma**, 2012. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/public/files/biblioteca/34-biologicos-site.pdf>, Acesso em: 10 jul. 2019.

IQVIA - INSTITUTE FOR HUMAN DATA SCIENCE. The Global Use of Medicine in 2019 and Outlook to 2023 - Forecasts and Areas to Watch. USA: **Iqvia**, 2019. Disponível em: <https://www.iqvia.com/institute/reports/the-global-use-of-medicine-in-2019-and-outlook-to-2023> , Acesso em: 10 jul 2019.

IKEOGU, Nnamdi M. et al. Leishmania immunity: advancing immunotherapy and vaccine development. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1201, 2020.

JAMESON, J. Larry. et al. **Medicina Interna de Harrison**. 20. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2020.

JAWED, Junaid Jibrán; DUTTA, Sayanika; MAJUMDAR, Subrata. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, p. 109098, 2019.

JENA, Anupam B et al. “Me-Too' Innovation in Pharmaceutical Markets.” **Forum for health economics & policy**, vol. 12, 1, 2009.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

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

KHADEM, Forough; UZONNA, Jude E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901-915, 2014.

KHANRA, Supriya et al. Miltefosine resistant field isolate from Indian kala-azar patient shows similar phenotype in experimental infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

KIM, Dae Hyun et al. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, p. e381, 2009.

KUMAR, Awanish; PANDEY, Satish Chandra; SAMANT, Mukesh. A spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, p. e12727, 2020.

KUMAR, Rajiv et al. Type I Interferons Suppress Anti-parasitic Immunity and Can Be Targeted to Improve Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Cell Reports**, v. 30, n. 8, p. 2512-2525. e9, 2020.

LAHLOU, Mouhssen. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacol Pharm**, v. 4, n. 3A, p. 17-31, 2013.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAUTHIER, Juan José; KORENAGA, Masataka. Immunological and Immunopathological Aspects. In: **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. Springer, Cham, 2018. p. 107-125.

LEE, Gap Ryol. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 730, 2018.

LERNER, Phillip I. Producing penicillin. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 6, p. 524-524, 2004.

LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–26, 2017.

LI, Gang; LOU, Hong-Xiang. Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 4, p. 1255-1294, 2018.

LIESE, Jan; SCHLEICHER, Ulrike; BOGDAN, Christian. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 377-387, 2008.

LIU, Jing-Tang et al. Bioactive natural products from the antarctic and arctic organisms. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 617-626, 2013.

LOISEAU, P. M.; COJEAN, S.; SCHRÉVEL, J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. **Parasite: journal de la Société Française de Parasitologie**, v. 18, n. 2, p. 115, 2011.

LUEPKE, Katherine H.; MOHR III, John F. The antibiotic pipeline: reviving research and development and speeding drugs to market. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 15, n. 5, p. 425-433, 2017.

MACHADO, Gustavo Uzêda; PRATES, Fernanda Ventin; MACHADO, Paulo Roberto Lima. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9-16, 2019.

MAKURVET, Favour Danladi. Biologics versus small molecules: Drug costs and patient access. **Medicine in Drug Discovery**, p. 100075, 2020.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MARTHO, G. R. & AMABIS, J. M. **Biologia das Populações**. v.3, ed. Moderna LTDA., 1997.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, María et al. Leishmania hijacks myeloid cells for immune escape. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 883, 2018.

MARTINS, Kelsilândia Aguiar **Comportamento alimentar de dípteros vetores de patógenos e estudo da expressão de proteínas de choque térmico (HSP 70 e 90) de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Phlebotominae) frente a diferentes estresses relacionados à hematofagia**, Tese de Doutorado em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

MAURYA, Indresh Kumar et al. Bioactive Compounds from Extremophiles. In: **Microbial Versatility in Varied Environments**. Springer, Singapore, 2020. p. 117-134.

MEIRA, Camila dos Santos; GEDAMU, Lashitew. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 695, 2019.

MESSLINGER, Helena et al. Monocyte-derived signals activate human natural killer cells in response to Leishmania parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 24, 2018.

MITRA, Amal; MAWSON, Anthony. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 2017.

MOSIMANN, Vincent et al. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: a literature review. **Acta Tropica**, v. 182, p. 246-250, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MSF - MEDICINES SANS FRONTIERES. Fatal imbalance: the crisis in research and development for drugs for neglected diseases. **MSF**. 2001

MUNIARAJ, Mayilsamy. The lost hope of elimination of Kala-azar (visceral leishmaniasis) by 2010 and cyclic occurrence of its outbreak in India, blame falls on vector control practices or co-infection with human immunodeficiency virus or therapeutic modalities?. **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 10, 2014.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Medical Microbiology**. Elsevier Health Sciences, 2015.

MUXEL, Sandra M. et al. Arginine and polyamines fate in Leishmania infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2682, 2018.

NEVES, David Pereira; BITTENCOURT NETO, João Batista. **Atlas Didático de Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2006.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NO, Joo Hwan. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta tropica*, v. 155, p. 113-123, 2016.

NOACK, MéliSSa; MIOSSEC, Pierre. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 6, p. 668-677, 2014.

NYLÉN, Susanne; KUMAR, Rajiv. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 251, 2012.

O'BRIEN, Jonathan; WRIGHT, Gerard D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.

OGAKI, Mayara B. et al. Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: Taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds. **Extremophiles**, v. 24, n. 2, p. 227-238, 2020.

OGASAWARA, Ken; ALEXANDER, G. Caleb. Use of Population Pharmacokinetic Analyses Among FDA-Approved Biologics. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, 2019.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICADA DA SAÚDE. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: **OPAS**, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em: 25 jan. 2021

OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Departamento de Enfermedades Transmisibles y Análisis de Salud. Plan de Acción Para Fortalecer la Vigilancia y Control de las Leishmaniasis en Las Américas 2017-2022. Washington D.C.: **OPAS**, 2017. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34144>. Acesso em: 20 jun. 2020.

OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: **OPS**, 2019a. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 25 ago. 2019.

OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Programa de Control de Leishmaniasis Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control. Caracas: **Ministerio del Poder Popular para la Salud**, 2019b. Disponível em:

https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51880/9789806678095_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 18 jun. 2020.

PANDEY, Ashok; TEIXEIRA, Jose Antonio Couto (Ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Foundations of Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2016.

PAUL, Steven M. et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 3, p. 203, 2010.

PCR- Policy Cures Research. G-FINDER 2019 report. Neglected Tropical Disease Research and Development: Uneven Progress. 2020. Disponível em: <https://gfinderdata.policycuresresearch.org/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

PHAM, Janette V. et al. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1404, 2019.

PHAM, Phuc V. Medical biotechnology: techniques and applications. In: **Omics Technologies and Bio-Engineering**. Academic Press, p. 449-469, 2018.

PIMENTA, P. F. P.; DE SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

PIMENTA, P. F.; DE FREITAS, V. C.; MONTEIRO, C. C.; PIRES, A. C. M.; SECUNDINO F.C. Biology of the 72 *Leishmania* – Sand Fly Interaction. In: EF Rangel, JJ Shaw (Org.). **Brazilian Sand Flies**. 1. ed.: Springer International Publishing, 2018: 319-339.

POLANDO, Rachel E. et al. Mannose receptor (MR) and Toll-like receptor 2 (TLR2) influence phagosome maturation during *Leishmania* infection. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 4, p. e12521, 2018.

PROANTAR - PROGRAMA ANTÁRTICO BRASILEIRO. A ANTÁRTICA. Brasília : **PROANTAR**, 2020. Disponível em: <https://proantar.com.br/page/a-antartica-1567682445>, Acesso em: 16 dez. 2020.

PURVES, Kevin et al. Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting. **Metabolites**, v. 6, n. 1, p. 2, 2016.

RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

RAYCHAUDHURY, Bikramjit et al. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, v. 95, n. 1, p. 1-8, 2005.

REAL, Fernando et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1549-1564, 2014.

REIMÃO, Juliana Q.; PITA PEDRO, Débora P.; COELHO, Adriano C. The preclinical discovery and development of oral miltefosine for the treatment of visceral leishmaniasis: a case history. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p. 1-12, 2020.

REIS, C. et al. Biotecnologia para Saúde Humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. Rio de Janeiro: **BNDES Setorial**, n. 29, p. 359-392, 2009.

REIS, C.; BARBOSA, L. M. L. H.; PIMENTEL, V. P. O desafio do envelhecimento populacional na perspectiva sistêmica da saúde. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 46, p. 87-124, set. 2016.

RICKLIN, Daniel et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785, 2010.

RIFFEL, Raquel; DE OLIVEIRA VAZ, Natália Carolina. Meio Ambiente, Sociedade e Desenvolvimento: uma abordagem acerca das implicações causadas por um desenvolvimento desequilibrado com enfoque na saúde. **RELAcult-Revista Latino-Americana de Estudos em Cultura e Sociedade**, v. 4, 2018.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania–host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292-297, 2000.

ROATT, Bruno Mendes et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-13, 2020.

RODRIGO, C. et al. Amphotericin B for treatment of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of prospective comparative clinical studies including dose-ranging studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 591-598, 2018.

ROSSI, Matteo; FASEL, Nicolas. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2017.

SADLOVA, Jovana et al. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 186, 2013.

SAMUELSSON, Gunnar; BOHLIN, Lars. **Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy**. Stockholm, SE: Swedish Academy of Pharmaceutical Sciences, 2009.

SANCHEZ, Sergio et al. Microbial natural products. **Natural Products in Chemical Biology**, p. 65-108, 2012.

SAVOCA, Serena et al. Antarctic sponges from the Terra Nova Bay (Ross Sea) host a diversified bacterial community. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

SCHULTZ, Júnia; ROSADO, Alexandre Soares. Microbial Role in the Ecology of Antarctic Plants. In: **The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment**. Springer, Cham, 2019. p. 257-275.

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SÉGUIN, Olivier; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania, the phagosome, and host responses: the journey of a parasite. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 1-6, 2016.

SHALEV-BENAMI, Moran et al. Atomic resolution snapshot of Leishmania ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017.

SIDDIQUI, Anees A. et al. Role of natural products in drug discovery process. **Int J Drug Dev Res**, v. 6, n. 2, p. 172-204, 2014.

SILVA, Allan M. da et al. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 2, p. 209-225, 2008.

SILVA, Leonardo Jose et al. Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

SILVA, Tiago R. et al. Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. **Polar Biology**, v. 41, n. 7, p. 1505-1519, 2018.

SILVA, Tiago R. et al. Chemical characterization and biotechnological applicability of pigments isolated from Antarctic bacteria. **Marine Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 416-429, 2019.

SILVEIRA, J. M.; FUTINO, A. M.; OLALDE, A. R. Biotecnologia: corporações, financiamento da inovação e novas formas organizacionais. Campinas: **Economia & Sociedade**, v. 11, n. 1, p. 129-164, 2002.

SNEADER, W. Drug prototypes and their exploitation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 32, p. 91, 1997.

SOARES, Roberta Reis et al. What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis?. **Pathogens and Global Health**, v. 111, n. 3, p. 107-115, 2017.

SOSA, Néstor et al. Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007253, 2019.

SOUSA-GOMES, Marcia Leite de; ROMERO, Gustavo Adolfo Sierra; WERNECK, Guilherme Loureiro. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005772, 2017.

SOUZA, Myla Lôbo de et al. Recent strategies for the development of oral medicines for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Development Research**, 2020.

SRIVASTAVA, Saumya et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2017.

STAGER, Simona; RAFATI, Sima. CD8+ T cells in Leishmania infections: friends or foes?. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 5, 2012.

SUCEN - SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD. São Paulo, p. 161. 2006.

SUN, Chunxiao et al. Antibacterial Cyclic Tripeptides from Antarctica-Sponge-Derived Fungus *Aspergillus insulicola* HDN151418. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 532, 2020.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 1, p. 43-59, 2015.

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

SUNYOTO, Temmy; POTET, Julien; BOELAERT, Marleen. Why miltefosine—a life-saving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 3, 2018.

TEDESCO, Pietro et al. Antimicrobial activity of monoramnholipids produced by bacterial strains isolated from the Ross Sea (Antarctica). **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, p. 83, 2016.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.;

TERAUDS, Aleks et al. Conservation biogeography of the Antarctic. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 7, p. 726-741, 2012.

TERAUDS, Aleks; LEE, Jasmine R. Antarctic biogeography revisited: updating the Antarctic Conservation Biogeographic Regions. **Diversity and Distributions**, v. 22, n. 8, p. 836-840, 2016.

TIAN, Yuan; LI, Yan-Ling; ZHAO, Feng-Chun. Secondary metabolites from polar organisms. **Marine Drugs**, v. 15, n. 3, p. 28, 2017.

TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda et al. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2529, 2018.

TRIPATHI, Vikash Chandra et al. Natural products from polar organisms: Structural diversity, bioactivities and potential pharmaceutical applications. **Polar Science**, v. 18, p. 147-166, 2018.

TROUILLER, Patrice et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188-2194, 2002.

TY, Maureen C. et al. Immuno-metabolic profile of human macrophages after *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* infection. **PloS One**, v. 14, n. 12, 2019.

UENO, Norikiyo; WILSON, Mary E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

USAP - UNITED STATES ANTARCTIC PROGRAM. The Antarctic Treaty .Alexandria: **USAP**, 2020. Disponível em: <https://www.usap.gov/theantarctic treaty/?m=2>. Acesso em: 16 dez. 2020.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. Os produtos naturais e a medicina medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VON PHILIPSBORN, Peter et al. Poverty-related and neglected diseases—an economic and epidemiological analysis of poverty relatedness and neglect in research and development. **Global Health Action**, v. 8, n. 1, p. 25818, 2015.

WAITE, R. C. et al. Integration of water, sanitation and hygiene for the control of neglected tropical diseases: a review of progress and the way forward. **International Health**, v. 8, n. suppl 1, p. i22–i27, mar. 2016.

WHEELER, Richard J.; GLUENZ, Eva; GULL, Keith. The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647-662, 2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Epidemiological situation. Geneva: **World Health Organization**, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>, Acesso em: 22 nov. 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Geneva: **World Health Organization**, 2021. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1, Acesso em: 19 mar. 2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: **World Health Organization**, 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015. Geneva: **World Health Organization**, 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Geneva: **World Health Organization**, 2013.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: **World Health Organization**, 2010.

WONG, Sin Yin et al. Communication within East Antarctic Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 1, 2019.

ZUCCONI, Laura et al. Extracellular Enzymes and Bioactive Compounds from Antarctic Terrestrial Fungi for Bioprospecting. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 18, p. 6459, 2020.

ZULFIQAR, Bilal; SHELPER, Todd B.; AVERY, Vicky M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516-1531, 2017.