

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR – PPGGEV

DÉBORA MEIRA NERIS

**Efeito modulador do extrato total do *Paenibacillus polymyxa* RNC-D em
macrófagos e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* *in vitro***

São Carlos - SP

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR – PPGGEV

DÉBORA MEIRA NERIS

Efeito modulador do extrato total do *Paenibacillus polymyxa* RNC-D em macrófagos e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências, área de concentração Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Paiva de Sousa

São Carlos – SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Débora Meira Neris, realizada em 20/04/2018:

Prof. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dra. Patricia Brassolatti
UFSCar

Prof. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur
UFSCar

Prof. Dra. Mara Cristina Pinto
UNESP

Prof. Dra. Cynthia Aparecida de Castro
USP

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por me dar paciência, força, permitindo superar obstáculos surgidos ao longo do caminho.

Aos meus queridos pais **Cleusa Meira Neris** e **Valdemar de Oliveira Neris** que me apoiaram em todos os momentos, sempre com muito amor, mesmo estando longe. Ao meu irmão **Leandro de Oliveira Neris** mesmo tão distante, que me ajudou em tudo que eu precisei. Ao meu irmão **Luciano de Oliveira Neris** juntamente com minha cunhada **Vânia Paula de Almeida Neris** e meus sobrinhos **Ana Júlia de Almeida Neris** e **Pedro Henrique de Almeida Neris**, sem eles eu não teria conseguido chegar aonde eu cheguei, sem palavras para expressar meu grande agradecimento: OBRIGADA! Meus tesouros! ***A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família*** (Léon Tolstói).

A minha querida orientadora **Profª Dra. Fernanda de Freitas Anibal** obrigada pelos diversos ensinamentos, pela confiança, paciência em muitas ocasiões, e pela grande amizade. Tivemos uma convivência enriquecedora fora e dentro do LIDI. Eu agradeço por tudo o que você fez por mim! Saudades!

A **Profª Dra Cristina Paiva de Sousa** pela grande contribuição no desenvolvimento desta pesquisa, obrigada pelos ensinamentos.

As minhas irmãs do coração! **Laís Souza (Maju)**, **Luciana Camillo** e **Joice Rodolpho**. Obrigada pelos: cafezinhos, pasteizinhos na república, temakis (na promoção, claro!), estudos durante a madrugada, festas/churras, conselhos e idas nas lojinhas. Eu sentirei muitas saudades. AMO VOCÊS! ***Todas as riquezas do mundo não valem um bom amigo*** (Voltaire).

Aos companheiros do LIDI. Vocês são especiais, e com cada um, aprendi muito sobre ciência, vida, amizade, obrigada por tudo!!!! **Ricardo de Oliveira Correia, Karina Alves, Carol Fattori, Bruna Fragelli, Letícia Ortolani, Genoveva Flores Luna, Patty Brassolatti, Laiza Gavioli, Túlio Cagnazzo, Elizandra Montija, Yulli Albuquerque, Mauricio Zaia e Beto Soares.**

Aos novos e velhos amigos, com quem sempre troquei informações científicas, risadas, conversas e conselhos. Muito obrigada. **Sandra Oliveira, Danilo Arantes, Ana Carolina Urbaczek, Cynthia Castro, Paulo Andrade, Thaianne Robeldo, Rafael Cavicchioli, Daiane Tezuka, Carla Peres de Paula, Gisele Bulhões, Nahryda Samara e Carla Moreira.**

As minhas amigas de Lucélia, **Tássia Martins, Livia Alcantara Pelloso, Márjorie Baraldi, Érica Hashimoto (japa do amor rs) e Tati Liodorio**, pelo incentivo e momentos de desconcentração, saudades, risadas, desabafos e muito amor envolvido. ***Há 2 espécies de chatos: os chatos propriamente ditos e ... os amigos, que são os nossos chatos prediletos.*** (Mario Quintana).

Ao meu marido **Felipe Adachi**, uma pessoa muito especial que entrou em minha vida pra me amar e me dar apoio em todos os momentos. Obrigada por sempre falar o que eu preciso ouvir e ser meu ombro amigo, obrigada por partilhar sua vida comigo, você torna meus dias mais felizes. Te amo demais!

Gostaria de agradecer também a todos os professores, técnicos e colegas do DMP, equipes de outros laboratórios por terem contribuído com o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A **CAPES** que contribuiu com apoio financeiro.

A **todos** que tornaram este trabalho possível, fazendo tudo que podiam para facilitar meu trabalho e a convivência dia-a-dia. **MUITO OBRIGADA!!**

"Certa vez um astronauta cético estava discutindo com um médico cirurgião: - Doutor, eu já viajei diversas vezes através do espaço e nunca vi Deus! - Meu caro, eu já fiz várias cirurgias no cérebro humano, e nunca vi um pensamento!"

Do livro O Mundo de Sofia

JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar é uma doença causada por protozoários digenéticos que pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. A transmissão do parasito é vetorial e acomete pele, cartilagens e mucosas. Os medicamentos utilizados para tratar a infecção por *Leishmania* apresentam reações severas e são encontradas cada vez mais cepas do parasito resistentes aos medicamentos usuais. Atualmente, não existe uma vacina e/ou fármaco totalmente eficaz contra a Leishmaniose. Portanto, é necessária a busca por novos compostos com efeito colateral reduzido e com maior eficácia para o desenvolvimento de novos fármacos. A utilização de microrganismos endofíticos é algo promissor na busca por novos compostos devido a sua capacidade de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas. A partir destes organismos, ocorreu um grande avanço nas áreas de desenvolvimento dos antibióticos, imunossupressores e medicamentos antineoplásicos. Por este motivo, foi objetivo desse estudo descrever novas características do Extrato Total Liofilizado (ETL) de *Paenibacillus polymyxa* RNC-D e direcionar estudos para a busca de moléculas com atividades biológicas promissoras. Também foi observado que o extrato é uma amostra constituída por um conjunto de substâncias que, uma vez isoladas, podem promover uma atividade biológica mais específica. Dessa forma, com base nesses resultados positivos, evidencia-se a importância da busca por novos compostos bioativos com atividade antitumoral, antioxidante, antimicrobiano e antiparasitária.

Este trabalho está dividido em dois capítulos, sendo o primeiro capítulo: Efeito citotóxico e produção de citocinas induzidas pelo endofítico *Paenibacillus polymyxa* RNC-D *in vitro* e o segundo capítulo: Ação do extrato total liofilizado de *Paenibacillus polymyxa* RNC-D sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

RESUMO

A leishmaniose é uma infecção causada por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento desta doença é usualmente problemático, uma vez que os medicamentos utilizados na prática clínica são tóxicos. Torna-se claro, portanto, a necessidade de se pesquisar novas substâncias com potencial leishmanicida. Um dos caminhos na busca por novos alvos terapêuticos é o estudo de moléculas produzidas por microrganismos endofíticos. Neste estudo, utilizou-se o Extrato Total Liofilizado (ETL) do endofítico *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, isolado do Cerrado de São Carlos - Brasil. O extrato foi avaliado em fibroblasto BALB/3T3, macrófago J774A.1, macrófago RAW 264.7 e direto em formas promastigota e amastigota de *Leishmania (L) amazonensis*. Dessa forma, foi avaliado nestas células a citotoxicidade, produção de óxido nítrico (NO) e produção de citocinas. Nossos resultados mostraram que a taxa de mortalidade de 50% (EC₅₀) de fibroblasto (BALB/3T3) foi observada em 1,171 mg/mL e 0,956 mg/mL após 48 e 72 horas, respectivamente. Em macrófago (J774A.1) a EC₅₀ foi de de 0,994 mg/mL e 0,945 mg/mL após 48 e 72 horas, respectivamente. Em relação à morte celular no período de 24 horas, o extrato induziu apoptose e necrose a partir da concentração de 5 mg/mL em fibroblasto (BALB/3T3) e de ≈1 mg/mL em macrófago (J774A.1). O tratamento com ≈1 mg/mL da concentração do extrato induziu a produção das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10, em 24 horas. A IL-10 teve sua produção detectada até 48 horas e IL-12 foi detectada a partir deste período. Para o ensaio de toxicidade em promastigotas de *L. amazonensis*, os valores da EC₅₀ obtidos nos períodos de 24 horas e de 48 horas foram de 0,624 mg/mL e de 0,547 mg/mL, respectivamente. Em relação à porcentagem de morte das promastigotas, nossos resultados mostraram que na concentração de 1 mg/mL do extrato, a porcentagem de morte no período de 24 horas foi de 59% e de 62% no período de 48 horas. Para o ensaio da carga parasitária, todos os grupos tratados (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) do extrato apresentaram uma porcentagem de aproximadamente 25 % de células infectadas com média de 3 amastigotas/célula para ambos os períodos. Em relação à produção de citocinas em macrófagos RAW 264.7 infectados/tratados com o extrato, observou-se um aumento significativo de TNF- α , nos períodos de 24 e 48 horas, em todos os grupos tratados com o extrato. Quanto à citocina IFN- γ , só foi observada a sua produção significativa no período de 48 horas na concentração de 1 mg/mL, assim como a produção de IL-12, só foi significativa na concentração de 0,5 mg/mL no mesmo período. Observou-se uma diminuição significativa de IL-4 em todos os grupos tratados com o extrato no período de 24 horas. A produção significativa de NO por macrófago RAW 264.7 no período de 48 e 72 horas foi observada nos grupos tratados com 0,5 mg/mL e 1 mg/mL do extrato. Devido à sua ação modulatória da atividade imunológica, sugere-se que o extrato em questão seja um alvo promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos imunoterapêuticos para o tratamento de diversas doenças, incluindo, mas não limitado a, a leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar. Peptídeos antimicrobianos. Microrganismo endofítico. Imunoterapia.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infection caused by *Leishmania* gender protozoa. The treatment of the disease is generally problematic, as the drugs used on clinical practice are toxic. It becomes clear, therefore, the need for research of new drugs with leishmanicide potential. One of the paths in the search for new therapeutic targets is the study of endophytic microorganisms-produced substances. In this study, the Total Lyophilized Extract (TLE) of the endophytic *Paenibacillus polymyxa* RNC-D was used, which was isolated from the Cerrado of São Carlos, Brazil. The TLE was assessed in terms of cytotoxicity, ON production and cytokines production on BALB/3T3 fibroblasts, J774A.1 macrophages, RAW 264.7 macrophages, as well as directly on promastigote and amastigote stages of *Leishmania (L) amazonensis*. Our results have shown that the mortality rate of 50% (EC₅₀) of fibroblasts (BALB/3T3) was of 1,171 mg/mL and 0,956 mg/mL after 48 and 72 hours, respectively. For macrophages (J774A.1) the mortality rate of 50% took place on doses of 0,994 mg/mL and 0,945 mg/mL after 48 and 72 hours, respectively. Regarding cellular death, at the period of 24 hours, the extract induced apoptosis and necrosis from the concentration of 5mg/mL in fibroblast (BALB/3T3) and from \approx 1 mg/mL in macrophage (J774A.1). The treatment with \approx 1 mg/mL concentration of the ETL induced TNF- α , IFN- γ and IL-10 cytokine production at the 24 hours period. The IL-10 had its production detected up to the 48 hours period, whereas the IL-12 was detected only at this period. For the toxicity essay on *L. amazonensis* promastigotes, the values of EC₅₀ obtained at the 24 and 48 hours period were of 0,624 mg/mL and 0,547 mg/mL, respectively. Regarding promastigotes death percentage, our result have shown that the 0,5 mg/mL concentration induced death of 31% at the 24 hours period and 35% at 48 hours. As for the concentration of 1mg/mL of the extract, the death percentage was of 59% and 62% at the periods of 24 and 48 hours, respectively. For the parasitary load essay, it was observed a percentage of 25% of infected cells with na average of 3 amastigotes/cell for the groups treated with 0,1; 0,5 and 1 mg/mL of the TLE at both periods. Regarding cytokine production on RAW 264.7 macrophage that were infected/treated with the extract, a significant increase of TNF- α was observed at both periods for all tested concentrations. Concerning IFN- γ cytokine, its significant production was only observed at the 48 hours period in the 1mg/mL concentration, whereas the IL-12 production was only significant in the 0,5 mg/mL at the same period. A significant decrease of IL-4 was observed in all treated groups with the TLE at the 24 hours period. The significant ON production by RAW 264.7 macrophages was observed in the groups treated with 0.5 mg/mL and 1 mg/mL of the extract on both periods of 48 and 72 hours. Due to its modulatory action of the immunological activity, it is suggested that the TLE of *P. Polymyxa* RNC-D is a promising target for the development of new immunotherapeutical drugs for the treatment of several diseases, including, but not limited to, leishmaniasis.

Key-Words: Cutaneous Leishmaniasis. Antimicrobial peptides. Endophytic microorganisms. Immunotherapeutical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Aspectos morfológicos da bactéria *P. polymyxa* RNC-D, endofítico isolado de *Prunus* spp.....19

Figura 2. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polymyxa* RNC-D X *Phytophthora sojae*. A- teste com *P. polymyxa* RNC-D. B- controle.....21

Figura 3. Modelos estruturais das quatro classes de peptídeos antimicrobianos. Os PAMs podem ser agrupados de acordo com suas estruturas secundárias, como: (A) peptídeos α -hélice, (B) peptídeos compostos por uma série de folhas- β , (C) peptídeos que possuem estruturas não convencionais (como hélices estendidas) e (D) peptídeos com estrutura em *loop*.....23

Figura 4. Representação dos modelos de ruptura de membrana provocados por AMP's. A- Modelo Barril ou Barrel-stave B- Modelo carpete ou Carpet-like C- Poro Toroidal.....25

Figura 5. Gráficos concentração-resposta de citotoxicidade (%) de fibroblasto BALB/3T3.....39

Figura 6. Gráficos concentração-resposta de citotoxicidade (%) de macrófago J774A.1.....40

Figura 7. Morfologia da linhagem BALB/3T3 após a exposição com diversas concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D.....45

Figura 8. Morfologia da linhagem J774A.1 após a exposição com diversas concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D.....46

Figura 9. Quantificação de TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ49

CAPÍTULO 2

Figura 1. Formas evolutivas de *L. amazonensis*.....57

Figura 2. Ciclo da *Leishmania* spp.....60

Figura 3. Curva de crescimento da forma promastigota de *L. amazonensis*.....73

Figura 4. Gráficos concentração-resposta de citotoxicidade (%) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> expostos a diferentes concentrações do extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D.....	75
Figura 5. Ensaio leishmanicida sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . Aumento de 400X.....	76
Figura 6. Macrófagos RAW 264.7, após 24 horas de infecção com <i>L. amazonensis</i> , com respectivos tratamentos e número variável de formas amastigotas intracelulares. Aumento de 1000X.....	79
Figura 7. Detecção de citocinas após a infecção com <i>L. amazonensis</i> e posterior tratamento com extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D.....	83
Figura 8. Quantificação de NO por macrófago RAW 264.7, após exposição com extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D.....	86
Figura 9. Quantificação de NO por linhagem de macrófago RAW 264.7 após a infecção com <i>L. amazonensis</i> com subsequente exposição com extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D.....	88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Valores de EC ₅₀ para os períodos de 24, 48 e 72 horas (fibroblasto BALB/3T3).....	39
Tabela 2. Valores EC ₅₀ para os períodos de 24, 48 e 72 horas (macrófago J774A.1).....	40
Tabela 3. Cinética de crescimento de fibroblasto BALB/3T3. O extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D testado em várias concentrações no período de 24, 48 e 72 de exposição.....	42
Tabela 4. Cinética de crescimento de macrófago J774A.1. O extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D testado em várias concentrações no período de 24, 48 e 72 de exposição.....	43

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Valores de EC ₅₀ para os períodos de 24 e 48 horas em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	75
Tabela 2. Porcentagem de morte de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> cultivados por 24 e 48 horas com várias concentrações do extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D e de anfotericina B.....	77
Tabela 3. Porcentagem de células infectadas com <i>L. amazonensis</i> e média de amastigota por célula no período de 24 horas.....	80
Tabela 4. Porcentagem de células infectadas com <i>L. amazonensis</i> e média de amastigota por célula no período de 48 horas.....	80
Tabela 5. Concentração de nitrito dos grupos tratados com extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D e não tratados.....	86
Tabela 6. Concentração de nitrito dos grupos tratados com extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D e não tratados após infecção com <i>L. amazonensis</i>	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB - Anfotericina B

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

ATPase - Adenosinatrifosfatases

BE - Brometo de Etídio

BSA - *Bovine Serum Albumin* (Albumina de Soro Bovino)

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos

DCs - Células Dendríticas

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EC₅₀ - Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo

ETL - Extrato Total Liofilizado

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

Gp63 - Glicoproteína

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IFSC - Instituto de Física de São Carlos

IL - Interleucina

IFN - Interferon

LA - Laranja de Acridina

LAMIB - Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas

LPS - Lipopolissacarídeo

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LCM - Leishmaniose Cutâneamucosa

LPG - Lipofosfoglicano

LT - Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose *Visceral*

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NK - Células *Natural Killer*

NLR - *NOD-like receptors*

NO - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato-salino)

PACs - Peptídeos Anticarcinogênicos

PAMs - Peptídeos Antimicrobianos

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

RNC-D - Iniciais dos pesquisadores - Regiane, Nadja, Cristina e Daniel

ROS - Espécie reativa de Oxigênio

SBF - Soro Bovino Fetal

SDS - *Sodium Dodecyl Sulphate* (Dodecil-Sulfato de Sódio)

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento beta

Th - Células T *helper* (auxiliares)

TLRs - *Toll-Like Receptors*

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF - *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

Capítulo 1 EFEITO CITOTÓXICO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS PELO ENDOFÍTICO <i>Paenibacillus polymyxa</i> RNC-D IN VITRO.....	18
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Microrganismos endofíticos	18
1.2 <i>Paenibacillus polymyxa</i>	20
1.3 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)	22
1.4 Aplicações dos peptídeos antimicrobianos	27
1.5 Resposta Imune	28
1.6 Citotoxicidade celular	30
2. OBJETIVO GERAL.....	32
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Obtenção do extrato total liofilizado produzido por <i>Paenibacillus polymyxa</i> RNC-D.....	33
3.2 Obtenção das linhagens de fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1	33
3.3 Ensaio de citotoxicidade do extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D	34
3.4 Análise da cinética celular pelo ensaio MTT	35
3.5 Microscopia de fluorescência para avaliação da morte celular (Apoptose/Necrose) com laranja de acridina e brometo de etídio	35
3.6 Quantificação de citocinas pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	36
3.7 Análise Estatística	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Ensaio de citotoxicidade do extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D sobre fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1	38
4.2 Cinética do crescimento de fibroblasto BALB/3T3 de macrófago J774A.1 após exposição ao extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D	42
4.3 Microscopia de fluorescência para avaliação do processo de morte celular em fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1	44
4.4 Produção de citocinas TNF- α , IL-10, IL-12 e IFN- γ	48
5. Conclusões do Capítulo 1	52
Capítulo 2 Ação do extrato total liofilizado de <i>Paenibacillus polymyxa</i> RNC-D sobre formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	54
1. INTRODUÇÃO	54
1.1. Leishmaniose	54
1.2 Agente etiológico e morfologia	56
1.3 Vetor e reservatório	58

1.4 Ciclo de Vida	59
1.5 Invasão e formação do vacúolo parasitóforo	61
1.6 Parasito no ambiente intracelular	62
1.7 Tratamento das leishmanioses	63
2. OBJETIVO GERAL	67
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
3. MATERIAL E MÉTODOS	68
3.1 Parasitos	68
3.2 Cultura de macrófago RAW 264.7	68
3.3 Viabilidade de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> - Método de MTT	68
3.4 Infecção de macrófago RAW 264.7 com <i>L. amazonensis</i> e posterior tratamento com o extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D	69
3.5 Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 e após a infecção com <i>L. amazonensis</i> frente ao extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D	70
3.6 Quantificação de citocinas pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	71
3.7 Análise estatística	72
4. Resultados e Discussão	73
4.1 Cultivo das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	73
4.2 Avaliação da atividade leishmanicida do extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	74
4.3 Avaliação da atividade leishmanicida em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> e posterior tratamento com o extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D	78
4.4 Dosagem de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10	82
4.5 Produção de óxido nítrico por macrófago RAW 264.7	86
4.6 Produção de óxido nítrico por macrófago RAW 264.7 durante a infecção com <i>L. amazonensis</i> frente ao extrato de <i>P. polymyxa</i> RNC-D	87
5. Conclusão do Capítulo 2	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7. ANEXO	109

CAPÍTULO 1

EFEITO CITOTÓXICO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS PELO ENDOFÍTICO *Paenibacillus polymyxa* RNC-D *IN VITRO*

Capítulo 1 EFEITO CITOTÓXICO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS PELO ENDOFÍTICO *Paenibacillus polymyxa* RNC-D *IN VITRO*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microrganismos endofíticos

Os produtos naturais se constituem em elementos essenciais para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Mais especificamente, os produtos naturais microbianos representam uma fonte substancial de estruturas químicas que se tornaram otimizadas durante sua evolução e mudanças no ambiente (GUNATILAKA, 2006). Uma vasta gama de microrganismos é investigada como fonte de produtos naturais e são classificados como: epifíticos, fitopatógenos, micorriza e endofíticos. (SATYANARAYANA, 2005; CHAPLA, BIASETTO, ARAUJO, 2013). Dentre todos os diferentes tipos de microrganismos, destacam-se os endofíticos pela sua produção de metabólitos secundários bioativos (AZEVEDO, 1998; SOUSA e LACAVA, 2016). Os endofíticos são bactérias e fungos que habitam o interior de plantas sem causar danos ao hospedeiro (CHALLIS e HOPWOOD, 2003; PIZA et al., 2016). Estes microrganismos podem ser isolados de plantas cuja superfície foi desinfetada ou podem ser extraídos de tecidos internos, e também, uma diversidade de espécies bacterianas podem ser isoladas de apenas uma única planta (HALLMANN et al., 1997; KOBAYASHI e PALUMBO, 2000). Vários endofíticos podem produzir compostos naturais bioativos com múltiplas finalidades, como: inibição do crescimento de outros organismos, proteção do hospedeiro contra ameaças ou estresses ambientais (BACON, 2000; STROBEL et al., 2017), bem como a promoção do crescimento da planta diretamente através da fixação de nitrogênio da atmosfera (PURI et al., 2016). Estes microrganismos habitam nichos biológicos singulares (STROBEL et al., 2004; SERRANO, 2009) e, além disso, estão sujeitos a constantes interações metabólicas e ambientais e, como consequência, podem produzir maior variedade de metabólitos secundários (SCHUTZ, 2001).

Diversos estudos têm apontado o potencial dos microrganismos endofíticos na produção de substâncias antibacterianas (HAZALIN et al., 2009; CAVICCHIOLI,

2017), antitumorais (HAZALIN et al., 2009; LIU et al., 2017) e antifúngicas (CHO et al., 2007; SHI, et al., 2017). Para Shutz (2001) tanto o organismo quanto o ambiente são fatores importantes para a produção de metabólitos microbianos.

O Cerrado, também conhecido como a Savana tropical brasileira, é o segundo maior mosaico de biomas da América do Sul (BATALHA, 2011; Ministério do Meio Ambiente, 2017) e o segundo bioma mais rico em termos de biodiversidade do mundo (SANO et al., 2010). A pluralidade de fatores ambientais aos quais a vegetação desta região está submetida beneficia o potencial de síntese de novos compostos pelas plantas e também pelos endofíticos (CHALLIS e HOPWOOD, 2003; RANGEL et al., 2007). Em estudo bioprospectivo realizado por Favoretto (2010), 26 microrganismos foram obtidos de plantas do Cerrado da região de São Carlos - SP. A atividade antimicrobiana destes endofíticos foi efetiva contra diversos microrganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Candida albicans* (FAVORETTO, 2010). Neste mesmo contexto, uma espécie foi isolada de *Prunus* spp, identificada como *Paenibacillus polymyxa*. O microrganismo endofítico foi identificado genotipicamente com 99,2% quando comparado com *P. polymyxa* e foi denominado *Paenibacillus polymyxa* RNCD (SERRANO, 2009) (Figura 1).

Figura 1. Aspectos morfológicos da bactéria *P. polymyxa* RNC-D, endofítico isolado de *Prunus* spp.



Fonte: SERRANO, 2009.

1.2 *Paenibacillus polymyxa*

O gênero *Paenibacillus*, criado por Ash et al (1993) para agrupar o antigo “grupo 3” do gênero *Bacillus*. Contém cerca de 30 espécies de bactérias (bacilos) Gram-positivas, anaeróbios facultativos, formadores de esporos elípticos, e heterotróficos (LORENTZ, 2005). O nome do gênero reflete este conjunto de características, uma vez que *Paene*, em latim, significa “quase”, ou seja, *Paenibacillus* é quase um *Bacillus* (LAL e TABACCHIONI, 2009).

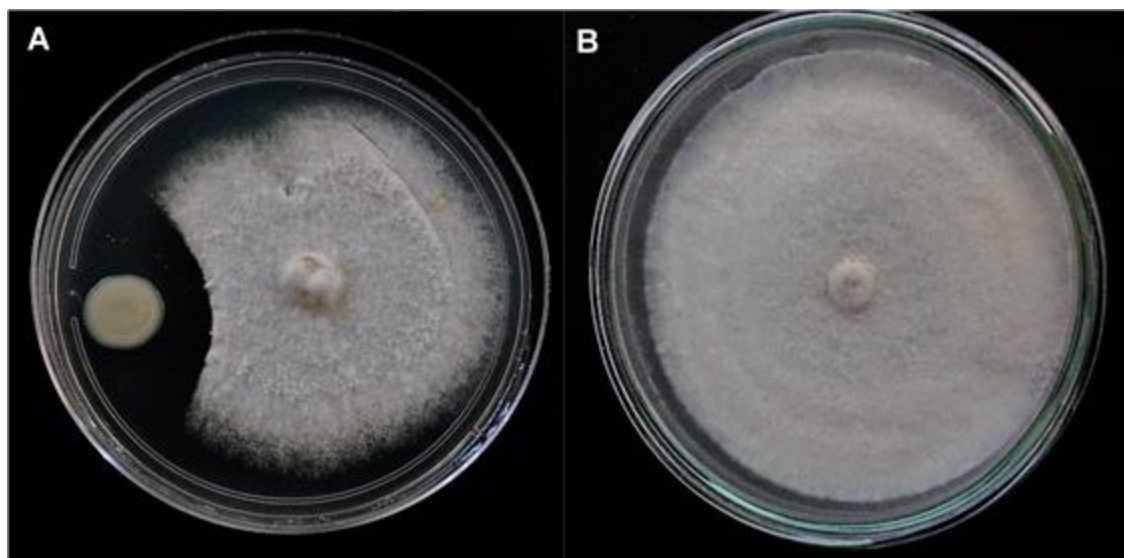
Utilizando vários substratos como seu habitat, a espécie *P. polymyxa* pode ser encontrada em sedimentos marinhos (RAVI et al., 2007), sorgo, cana de açúcar, cevada (GUEMOURI-ATHAMANI et al., 2000), sementes de arroz (COTTYN et al., 2009), alimentos (PIURI et al., 1998), água, raízes de ginseng (CHO et al., 2006; CHO et al., 2007) folhas de *Prunus* spp (SERRANO, 2009), solo (TIMMUSK et al., 2005; DENG et al., 2011), entre outras.

O interesse pela espécie *P. polymyxa* é devido ao seu grande potencial biotecnológico em processos industriais e agricultura sustentável. Como exemplos, pode-se citar a produção de enzimas fibrinolíticas (LU et al., 2007), hidrolases (CHO et al., 2006), amilase (JEON et al., 2010), bioatividade contra fungos fitopatogênicos (CHO et al., 2007), bioatividade contra fungos do solo, (TIMMUSK et al., 2005) e atividade antagônica contra bactéria Gram-positiva e Gram-negativa (RATTI et al., 2008; SERRANO, 2009).

Através de ensaios enzimáticos feitos com Extrato Total (ET) de *P. polymyxa* RNC-D foi possível verificar a natureza lipopeptídica e peptídica dos compostos antimicrobianos. O ET foi dividido em extrato lipopeptídico (ELP) e fração aquosa (FA).

Constatou-se que *P. polymyxa* RNC-D produz compostos peptídicos com ação antimicrobiana como a polimixina e peptídeos da família LI-F, já relatados na literatura. Entretanto, *P. polymyxa* RNC-D também produziu dois outros compostos peptídicos inéditos denominados PpRNCD, com atividade específica contra bactérias Gram-negativas e *polycerradin*, cuja fórmula proposta foi $C_{182}H_{321}N_{29}O_{29}$, que age contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. (SERRANO, 2014). Ainda em outro estudo a atividade específica do extrato do endofítico contra fungo fitopatogênico também foi demonstrado (CAVICCHIOLI, 2017) (Figura 2).

Figura 2. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polymyxa* RNC-D versus *Phytophthora sojae*. A- teste com *P. polymyxa* RNC-D. B- controle.



Fonte: CAVICCHIOLI, 2017.

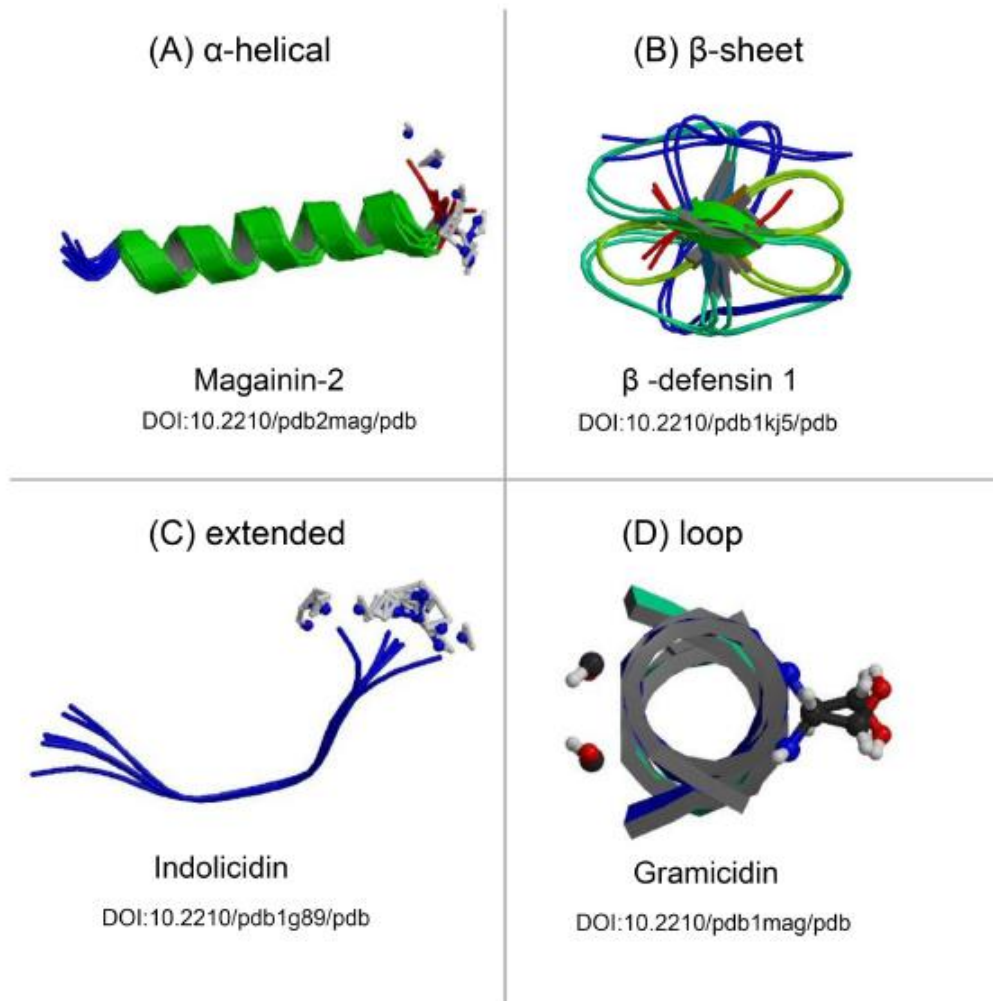
A análise do N-terminal determinou a sequência do PAM PpRNCD como glicina - ácido glutâmico - hidroxiprolina - glicina - alanina. A confirmação da estrutura primária deste novo composto foi feita por espectrometria de massas. O estudo de Serrano (2012) relatou pela primeira vez a produção do PAM PpRNCD que possui um aminoácido não usual, a hidroxiprolina, em sua constituição. Em termos de tamanho de molécula pode-se considerar que o PAM PpRNCD (massa molecular 463 Da), que contém apenas 5 resíduos de aminoácidos, é um dos menores peptídeos naturais ativos relatados. A hidroxiprolina é um aminoácido não essencial e um importante constituinte de uma das principais proteínas estruturais, o colágeno (SRIVASTAVA et al., 2016). Estudos mostram a existência de uma relação diretamente proporcional entre a concentração de hidroxiprolina e a concentração de colágeno. Por esta razão, espera-se que uma maior concentração de hidroxiprolina leve a um aumento da síntese de colágeno, um fato que se reflete em uma taxa mais rápida na cicatrização de feridas e proliferação celular (DWIVEDI et al., 2016). Esses dados são interessantes e podem confirmar o papel importante do PAM em explorações biotecnológicas.

1.3 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) possuem um importante papel na imunidade inata dos seres vivos, compreendendo fungos, bactérias, plantas, e animais (invertebrados e vertebrados) (ZASLOFF, 2002; METZ-BOUTIGUE et al., 2010), tendo sido identificado mais de 2.000 variedades destas moléculas (WANG, 2015). Com base no modo de síntese dos PAMs, são divididos em duas categorias: ribossomalmente sintetizados e não-ribossomalmente sintetizados (FINKING e MARAHIEL, 2004). A Síntese de peptídeos mediada por ribossomos é uma atividade bem conhecida em todos os organismos, contudo várias bactérias e poucos outros organismos eucarióticos apresentam síntese de peptídeos independente de ribossomos (DITTMANN; NEILAN, BORNER, 2001).

Normalmente, os PAMs possuem baixo peso molecular, geralmente são constituídos por 10-50 aminoácidos e contêm uma proporção substancial de resíduos hidrofóbicos (YEAMAN e YOUNT, 2003; PASUPULETI et al., 2012) e hidrofílicos (BULET e STOCKLIN, 2005; IZADPANAHA e GALLO, 2005). Foi constatado que os PAMs estão presentes em múltiplas isoformas e ainda permitem o seu agrupamento em famílias (Figura 3) (TAKAHASHI et al., 2010; PASUPULETI et al., 2012). Os PAMs possuem estruturas secundárias formadas por sequencias de resíduos de aminoácidos, no qual é caracterizadas de acordo com sua ação e função (HANCOCK e SAHL, 2006).

Figura 3. Modelos estruturais das quatro classes de peptídeos antimicrobianos. Os PAMs podem ser agrupados de acordo com suas estruturas secundárias, como: (A) peptídeos α -hélice, (B) peptídeos compostos por uma série de folhas- β , (C) peptídeos que possuem estruturas não convencionais (como hélices estendidas) e (D) peptídeos com estrutura em *loop*.



Fonte: As estruturas foram obtidas do RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>) e foram referenciadas de acordo com o Identificador de Objeto Digital (DOI) BERMAN et al., 2000; PETERS et al., 2010.

A busca por peptídeos que tenham atividade antimicrobiana e que não sejam tóxicos às células de mamíferos tem se elevado nos últimos anos, motivada ainda mais pela decorrência do aumento do número de cepas resistentes aos antibióticos mais comuns (YEAMAN e YOUNT, 2003; SANCHEZ e DEMAINE, 2014).

Os peptídeos antimicrobianos possuem como alvo os lipídeos das membranas celulares dos organismos (PAPO e SHAI, 2003), e a interação entre ambos pode resultar numa desestabilização das membranas plasmáticas, como: redução da regulação osmótica, inibição da respiração, ruptura da membrana e lise de células (YEAMAN e YOUNT, 2003; ECKERT, 2011).

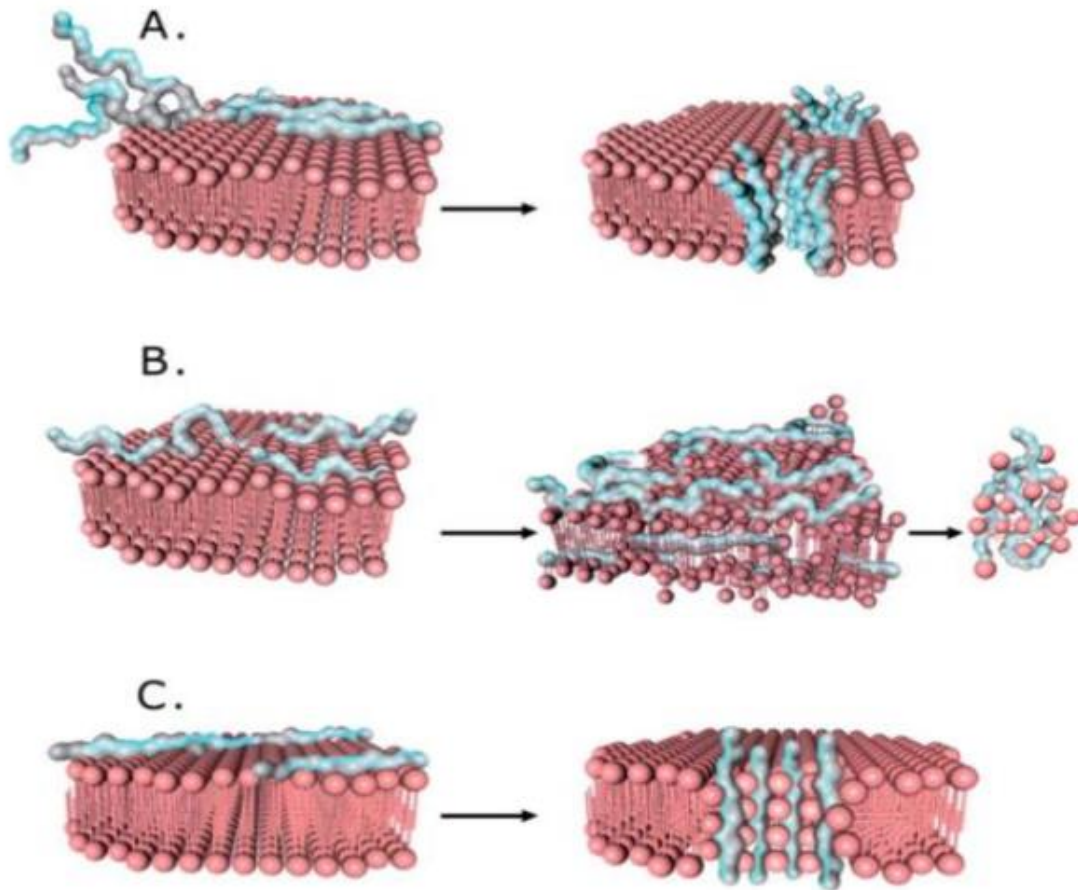
Os três modelos principais de mecanismos de ação dos PAMs, como: modelo de barril (*barrel-stave*), formação de carpete (*carpet-like* ou *detergent-like*), e poro toroidal (*toroidal pore*).

Barrel-stave: A interação do peptídeo inicia-se com acúmulo de monômeros de peptídeos interagindo na membrana. Quando a concentração de peptídeos chega a nível crítico, os aglomerados formam poros transmembranar do tipo barril, na qual a porção hidrofóbica se iguala a parte da cadeia (aos grupos acila) dos fosfolipídeos da membrana e a face hidrofílica forma a superfície interna do poro para a passagem de íons, água e componentes intracelulares. (BECHINGER, 2004; KOZMA; SIMON e TUSNÁDY, 2013).

Carpet-like: é o mecanismo no qual o peptídeo se interage com fosfolipídeos da membrana, cobrindo a superfície da membrana por peptídeos. Quando atinge uma concentração máxima, ocorre uma alteração na morfologia e se rompe, formando pequenos agregados de peptídeos e micelas como um efeito detergente (SHAI, 1999; HE e LAZARIDIS, 2013).

Toroidal pore: é o mecanismo de ação que forma poro. Os peptídeos atuam interagindo com as “cabeças” polares dos fosfolipídeos do folheto externo da membrana, o que leva a uma curvatura nessa estrutura e os agrupamentos de peptídeos se inserem verticalmente formando o poro, concomitantemente, permanecem ligados aos fosfolipídeos (SHAI, 1999; BOCCHINFUSO et al., 2009) (Figura 4).

Figura 4. Representação dos modelos de ruptura de membrana provocados por AMP's. A: Modelo Barril ou Barrel-stave, B: Modelo carpete ou Carpet-like e C: Poro Toroidal.



Fonte: HERZOG e FRIDMAN, 2014.

Os PAMs, além da participação direta na eliminação dos patógenos, possuem propriedades imunomoduladoras (FJELL et al., 2012; NERIS et al, 2017). Estas moléculas podem induzir a produção de diferentes citocinas e atuar como agentes quimioatrativos para certos tipos de células (monócitos/macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e eosinófilos). Além disso, podem inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (HÅVERSEN et al., 2002; YEUNG et al., 2011). Assim sendo, os PAMs possuem, indiretamente, um papel no desenvolvimento dos linfócitos e geram um impacto nas respostas do sistema imune adaptativo (MOOKHERJEE e HANCOCK, 2007).

Em humanos, os PAMs são produzidos por monócitos/macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, queratinócitos e mastócitos (MOOKHERJEE e HANCOCK, 2007). Em animais invertebrados, como os insetos, essas moléculas podem ser encontradas no tecido gorduroso, células da hemolinfa, epitélios do tubo digestório, sistema traqueal, entre outros. (BULET e STOCKLIN, 2005). Os peptídeos com atividade antimicrobiana produzidos por bactérias, na sua totalidade, parecem ser mais potentes que os produzidos por eucariotos, já que, na maioria dos casos, são ativos em baixas concentrações (FIMLAND et al., 2005).

A membrana plasmática de organismos procariontes e eucariontes difere em sua composição (YEAMAN e YOUNT, 2003). As membranas bacterianas possuem a membrana externa da bicamada lipídica voltada para o meio extracelular. Em bactérias Gram-positivas, a membrana citoplasmática é composta por uma camada grossa de peptidoglicano, já bactérias Gram-negativas possui uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa (LIN e WEIBEL, 2016). As membranas citoplasmáticas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são ricas em fosfolípidos, fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina, possui grupos carregados negativamente, que são altamente atraentes para PAMs positivamente carregadas (YEAMAN e YOUNT, 2003; EBENHAN et al., 2014). A presença de ácidos teicoicos na parede celular de bactérias Gram-positivas e lipopolisacarídeos (LPS) na membrana externa de bactérias Gram-negativas proporciona carga eletronegativa para a superfície bacteriana (LAI e GALLO, 2009; EBENHAN et al., 2014). Já a presença do colesterol na membrana celular normalmente reduz a atividade dos PAMs, devido a uma maior estabilização da bicamada lipídica e/ou a possíveis interações entre o colesterol de carga neutra e os PAMs (MATSUZAKI et al., 1998).

Os PAMs possuem modo de ação variável, que vai depender das condições que estes se encontram. Alguns aspectos devem ser levados em consideração na interação entre peptídeo e membrana, como: relação peptídeo/lipídio, composição da membrana, temperatura, entre outros. A análise desses fatores é essencial para as interações (BECHINGER e LOHNER, 2006). Além disso, trabalhos relatam que a desestabilização da parede ou da membrana celular não seriam os únicos mecanismos de ação desses peptídeos, mas também podem ser translocados para o interior do microrganismo e atuar sobre alvos intracelulares. Esta ação pode interferir em várias vias metabólicas como: na inibição da biossíntese de parede celular, ácidos

nucleicos e proteínas; inibição da atividade de enzimas bacterianas e outras; além de atingir outros mecanismos que podem levar à inibição do crescimento e morte do microrganismo (KRAGOL et al., 2001; BROGDEN, 2005).

1.4 Aplicações dos peptídeos antimicrobianos

No período de 2003 a 2015 concluiu-se que a maioria dos PAMs foram caracterizados não apenas como potentes antibióticos, mas também como moduladores efetivos da inflamação ou neutralizadores de toxinas produzidas por microrganismos patogênicos (KOSIKOWSKA e LESNER, 2016).

Muitos dos PAMs estão sendo utilizados como pomadas e emulsificantes. Sua administração é feita no local de feridas cirúrgicas ou em mucosas. Como exemplo, temos: Pexiganan MSI-78 (sapos), para tratamento da úlcera de diabéticos; Isegran IB-367 (mamíferos), para tratamento de inflamações nas mucosas, infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística e prevenção de pneumonia; e um derivado da indolicidina bovina (neutrófilo bovino), para tratamento de pacientes com hepatite C crônica e doenças dermatológicas (MIRANDA et al., 2008; HANCOCH e SAHL, 2006; GRÖNBERG et al., 2014).

Outro PAM em desenvolvimento clínico, o PXL01, derivado da lactoferrina humana (leite), foi avaliado em uma formulação em gel à base de ácido hialurônico para prevenção da formação de adesão pós-cirúrgica (WILG et al., 2014).

Outras aplicações incluem a utilização destas moléculas para impedir a colonização e o crescimento de microrganismos em materiais poliméricos sintéticos, tais como os cateteres intravenosos de uso médico (ZASLOFF, 2002). Além desses tratamentos, alguns tipos de PAMs podem interferir e causar a morte de diversas espécies de protozoários como: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* (SILVA et al., 2000; SOUZA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015).

Em geral, considera-se que as terapêuticas peptídicas têm vantagens do ponto de vista de segurança em comparação com os fármacos, uma vez que os seus produtos de degradação são aminoácidos naturais e, devido à sua meia-vida (curta), poucos peptídeos se acumulam nos tecidos, além de serem efetivos a altas temperaturas, pH e salinidade. No total, esse conjunto de fatores reduzem o risco de

complicações causadas por estes metabólitos (KOSARIC, 1993; NITSCHKE e PASTORE, 2002; VLIEGHE et al., 2010).

1.5 Resposta Imune

O sistema imune é dividido em imunidade inata ou natural e imunidade adaptativa ou adquirida. A imunidade inata apresenta uma resposta rápida a um elevado número de estímulos, porém é desprovida de memória e possui baixa especificidade. A imunidade inata também é caracterizada por barreiras físicas, químicas e biológicas, por moléculas solúveis e células especializadas, encontradas em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com antígenos ou agentes agressores (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000; SAALMÜLLER, 2006). A imunidade inata tem como principais células efetoras os macrófagos, neutrófilos, células Natural Killer (NK) e células dendríticas (DCs) e tendo como mecanismos essenciais a: fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento e síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (MEDZHITOV, PRESTON – HURLBURT, JANEWAY, 1997; OYOSHI et al., 2011).

Estes modos de ação são ativados por estímulos específicos como: LPS, resíduos de manose, ácidos teicoicos, entre outros. Estes estímulos são habitualmente encontrados na superfície de patógenos e constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Estas moléculas ativam a resposta inata por interação com diversos receptores, denominados como Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais temos a família dos receptores *Toll-like* (TLRs) (KAWAI et al., 2010). Assim como os PAMPs, a ativação das células efetoras também se dá por meio do reconhecimento da interação com receptores *Nod-like receptors* (NLRs) aos padrões moleculares associados aos sinais de perigo (Padrões Moleculares Associados a Danos - DAMPs), derivados de células mortas (SAJO et al., 2013).

Entre os vários RRP, os Receptores Semelhantes a Toll (TLRs) se sobressaem por seu papel crucial na ligação a patógenos e iniciação da resposta inflamatória. Estes receptores são encontrados principalmente em macrófagos, neutrófilos e DCs. Vários TLRs já foram descobertos, sendo localizados na membrana

celular e outros no interior das células (BOWIE, 2007; KAWAI et al., 2010; NEWTON e DIXIT, 2012).

Os monócitos compõem 3% a 8 % dos leucócitos circulantes e, no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos, dão origem a macrófagos. Os monócitos e macrófagos são fagócitos eficazes na fagocitose de patógenos, restos celulares e células apoptóticas (GREGORY e DEVITT et al., 2004).

Os macrófagos podem ser ativados por duas vias: via clássica ou alternativa (DAVIS et al., 2013). A via clássica ou tipo 1 (M1) está associada a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), junto a uma alta atividade microbicida e tumoricida (MANTOVANI et al., 2004). Sua ativação pode ser desencadeada tanto por citocinas da resposta inata quanto adaptativa, como fator de necrose tumoral (TNF) e interferon-gama (IFN- γ), respectivamente (OHRI et al., 2009; MA et al., 2010).

O segundo tipo, denominado alternativa ou do tipo 2 (M2), é caracterizada pela ativação/modulação dos macrófagos por meio das IL-4, IL-10 e IL-13 (MANTOVANI et al., 2004; OHRI et al., 2009; GORDON, 2013). Os macrófagos ativados alternativamente denominados macrófagos M2, e tem como função o remodelamento e reparo tissular, no combate a patógeno extracelular, na regulação da imunidade e promoção tumoral (MANTOVANI et al., 2009; MURRAY e WYNN, 2011). As células M2 têm diminuído níveis de citocinas inflamatórias e secretam grandes quantidades de moléculas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-beta (GINDERACHTER et al., 2006).

As populações de macrófagos M1 e M2 devem ser balanceados para um eficiente funcionamento do organismo e proteção do indivíduo. Visto que é necessário ter o equilíbrio entre as duas partes, pois se ocorrer um elevado número de células M1, leva a indução de doença inflamatória crônica; no entanto, se der um maior número de células M2 possibilita a imunossupressão (MOSSER e EDWARDS, 2008; POLLARD, 2009).

Em contrapartida à resposta inata, a resposta imune adaptativa necessita da ativação de células especializadas (linfócitos) juntamente com moléculas (principalmente anticorpos) por eles produzidas. Os principais atributos da resposta adquirida são: diversidade e especificidade de reconhecimento, memória, resposta especializada, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo. Ainda

que as principais células durante a resposta imune adquirida sejam os linfócitos, as células apresentadora de antígeno (APCs) são essenciais para ativação dos linfócitos T apresentando antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (LT) (DELVES e ROITT, 2000; LILIC, 2009).

A resposta imune adaptativa envolve principalmente linfócitos T (TCD4+ e TCD8+) e B e seus produtos, como citocinas e anticorpos. Tal resposta pode ser dividida em resposta imune humoral e resposta imune celular. Os linfócitos TCD4+ podem se diferenciar em subpopulações dentre as quais destacam-se as células Th1 (T helper tipo 1) e as células Th2 (T helper tipo 2), que produzem padrões diferentes de citocinas (ROMAGNANI et al., 1991; DEL PRETE et al., 2008).

A diferenciação de linfócitos TCD4+ em Th1 pode ser estimulada pela interleucina 12 (IL-12), produzida por células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas), já a diferenciação em Th2 se dá por ação da IL-4, produzida por TCD4+. As células Th1 produzem IFN- γ e está associada à resposta imune celular e ao combate de infecções causadas por microrganismos intracelulares. Os linfócitos Th2 produzem em especial, IL-4 e são correlacionadas com a resposta imune humoral e controle das infecções extracelulares. Alguns fatores, como: citocinas, moléculas co-estimulatórias, o antígeno e eventos que acontecem durante a resposta inata que envolve células dendríticas e as células NK, podem direcionar o tipo de resposta e determinar o controle ou não de uma infecção (DEL PRETE et al., 2008; MORETTA et al., 2008).

1.6 Citotoxicidade celular

Sabe-se que é importante estudar a atividade tóxica de novas moléculas bioativas, já que este é um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de novos compostos. Em vista disso, os ensaios celulares desempenham um papel fundamental nesta situação (KREWSKI et al., 2010), especialmente quando se tem em mente que os ensaios *in vivo* já estabelecidos talvez possam ser substituídos pelos ensaios *in vitro* (TRALAU et al., 2012). Além disso, ensaios de toxicidade *in vitro* (SLATER, 2001) podem reduzir os custos gerados pela análise de um grande número de compostos bioativos, podendo servir de alternativa aos testes em animais (NC3Rs, 2017).

A escolha do extrato de *P. polymyxa* RNC-D para este estudo foi influenciado pelo fato da literatura não apresentar dados sobre a atividade citotóxica deste extrato em linhagens celulares. A linhagem celular BALB/3T3 A31 (ATCC® CCL-163™) é derivada de embrião de camundongo da espécie *Mus musculus* e foi selecionada para este ensaio devido à sua fácil manutenção e manuseio, bem como a sua estabilidade (TODARO e AARONSON, 1969).

Sabe-se que os macrófagos são importantes na ativação da resposta imunológica, uma vez que induzem a liberação de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias. A linhagem J774A.1 (ATCC® TIB- 67™) é originária do sarcoma celular reticulado (tecido ascítico), da espécie *Mus musculus* (RALPH e NAKOINZ, 1975).

2. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo a avaliação da citotoxicidade e produção de citocinas induzidas pelo Extrato Total Liofilizado (ETL) produzido pelo endofítico *Paenibacillus polymyxa* RNC-D *in vitro*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade do extrato de *Paenibacillus polymyxa* RNC-D em fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1 e determinar a EC₅₀;
- Analisar o crescimento celular de fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1 após a exposição a diferentes concentrações do extrato de *Paenibacillus polymyxa* RNC-D;
- Analisar morte celular (apoptose/necrose) em fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1 após a exposição à diferentes concentrações do extrato, por meio da microscopia de fluorescência, no período de 24 horas;
- Quantificar a produção de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-10 por linhagem de macrófago J774A.1 exposto à diferentes concentrações do extrato de *Paenibacillus polymyxa* RNC-D.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato total liofilizado produzido por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D

O extrato foi cedido pela Dr.^a Nadja Fernanda Gonzaga Serrano do Departamento de Morfologia e Patologia, do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), fazendo parte da Bacterioteca do LaMiB. A bactéria *P. Polymyxa* RNC-D foi isolada de folhas de *Prunus* spp que foram coletados do Cerrado de São Carlos – SP, Brasil (RATTI et al., 2008). A população epífita foi eliminada, a população endofítica foi isolada e identificada e as cepas foram caracterizadas fenotípica e genotípicamente (SERRANO, 2009). O extrato foi preparado a partir de metabólitos bioativos excretados por bactérias ativadas em meio de cultura (ISP2). Não houve lise bacteriana no processo de obtenção desses metabólitos. O extrato foi então liofilizado, purificado e as frações foram obtidas por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (SERRANO, 2014).

3.2 Obtenção das linhagens de fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1

A linhagem de fibroblasto BALB/3T3 clone A31(ATCC® CCL-163™) foi cedida pelo Prof. Dr. Andrei Leitão do Instituto de Química de São Carlos (USP). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich, EUA). A linhagem de macrófago J774A.1 foi cedida Prof. Dr. Célio Lopes Silva do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e foi cultivada em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, EUA). Ambos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado (Vitrocell-Embriolife, BRA) e 1% de mix de antibióticos penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). As culturas foram mantidas a 37°C numa atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

3.3 Ensaio de citotoxicidade do extrato de *P. polymyxa* RNC-D

A atividade citotóxica do extrato foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico MTT (MTT- [3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) 2, 5-difeniltetrazolium bromide] -Sigma-Aldrich, EUA). Enzimas desidrogenases mitocondriais encontradas em células vivas e metabolicamente ativas clivam o anel de tetrazólio (sal de MTT de coloração amarela e solúvel em água) transformando-se em cristais de formazan (de coloração purpura/roxo e insolúvel em água). Isto posto, a redução do MTT a formazan é proporcional a viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Linhagens celulares de macrófago J774A.1 e fibroblasto BALB/3T3 foram plaqueadas em placas de 96 poços, contendo 2×10^4 células/poço em 200 μ L e cultivadas durante 24 h a 37 °C em estufa com controle de gases com 5% de CO₂. Após a adesão, o meio foi descartado e 200 μ L de diferentes concentrações do extrato (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 15 mg/mL) foram adicionados. Como controle negativo (C-) foi utilizado apenas meio de cultura e como controle positivo (C+) foi utilizado dodecilsulfato de sódio 5% (SDS; Sigma-Aldrich, EUA). As placas foram incubadas no período de 24, 48 e 72 horas nas mesmas condições anteriores.

Em seguida, o sobrenadante foi armazenado e os poços foram lavados com PBS 1X estéril. Então, 100 μ L de solução de MTT (5 mg/mL de MTT + meio de cultura incompleto) foram adicionados nas placas e estas foram incubadas nas mesmas condições acima por 3 horas.

Os cristais de formazan formados foram solubilizados com 100 μ L álcool isopropílico e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro de placa (TP-Reader NM-Thermo Plate) a 550 nm.

A porcentagem da viabilidade celular foi calculada com a absorbância de células não tratadas (controle negativo) representando 100% da viabilidade celular (% de células vivas = Abs. Teste X100/Abs. do controle negativo). O valor do EC₅₀ foi obtido a partir dos valores da concentração citotóxica e calculado a partir da porcentagem de células viáveis. Foram realizados três experimentos independentes (quintuplicata).

3.4 Análise da cinética celular pelo ensaio MTT

A linhagens de fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1 foram inoculadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações celulares, de baixa densidade a alta densidade (1×10^3 até 1×10^6), juntamente com 200 μ L de uma solução de MTT e posteriormente incubados por 3 horas em uma estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação, 100 μ L de álcool isopropílico foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazana.

Posteriormente, o sobrenadante foi analisado em triplicada e a leitura de absorbância foi realizada com um comprimento de onda de 550 nm em um espectrofotômetro de placa (TP-Reader NM-Thermo Plate). As curvas de crescimento foram então obtidas a partir dos dados adquiridos (FRESHNEY, 2010).

3.5 Microscopia de fluorescência para avaliação da morte celular (Apoptose/Necrose) com laranja de acridina e brometo de etídio

Para avaliação da morte celular das linhagens celulares (fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1) após a exposição ao extrato de *P. polymyxa* RNC-D, foram utilizados os corantes Laranja de Acridina (LA) e Brometo de Etídio (BE) (Sigma-Aldrich), com os quais foi possível analisar se as células estavam em processo de morte e discriminá-las em apoptótica ou necrótica.

A coloração diferencial pelo BE/LA permite a diferenciação entre células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, por meio da revelação de fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON et al., 1995). O LA é um corante fluorescente que possui afinidade por DNA e RNA. Este corante também apresenta a capacidade de atravessar a membrana íntegra de células vivas ou em processo de morte e fluir pelo citoplasma ligando-se à estas moléculas e à lisossomos. O LA pode corar as células em verde, laranja ou vermelho dependendo do pH (BENVIN et al., 2007). O BE também é um corante fluorescente que possui a capacidade de se intercalar no DNA, entretanto o corante só penetrar em células que apresentem alterações na permeabilidade da membrana, e assim coram em vermelho (SPECTOR et al., 1998).

As células na densidade de 1×10^5 células/mL foram distribuídas em lâminas com 8 câmaras (*Nunc™ Lab-Tek™ II -Thermo Fischer*) para crescimento celular. Após, as células foram expostas ao extrato nas concentrações de 0,1; 1; 5 e 15 mg/mL. Foi utilizado meio de cultura com 10% de SFB como controle negativo e 10 μ M de Camptotecina como controle de morte (Santa Cruz Biotechnology, EUA). As lâminas foram incubadas por 24 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, as câmaras das lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS estéril 1X. Em seguida, 30 μ L da solução dos corantes (1:1) de LA (100 μ g/mL)/BE (100 μ g/mL) foram adicionadas em cada cavidade. Após 1 minuto à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as lâminas foram lavadas 2x com PBS 1x estéril, então foram desmontadas e levadas imediatamente ao microscópio de fluorescência Olympus BX41. A combinação de filtros utilizada foi: faixa de excitação: 470-490 nm e emissão de 515 nm (GENG; ZENG; WANG, 2003).

Para quantificar o percentual de cada um dos eventos celulares (células viáveis, necróticas, apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra e posteriormente fotografadas para o registro visual das alterações. Foram realizadas as seguintes considerações (MERCILLE et al., 1994): células viáveis apresentam-se coradas em verde, células em apoptose são coradas em alaranjado e células necróticas são coradas em vermelho.

3.6 Quantificação de citocinas pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para a quantificação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-12 foram utilizados os sobrenadantes de cultura de macrófago J774A.1 expostas às concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mg/mL do extrato, após 24 e 48 horas. O procedimento foi realizado conforme protocolo do fabricante (BD Biosciences®).

Inicialmente, placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de uma solução contendo o tampão e o anticorpo primário específicos para cada citocina. As placas foram incubadas por até 18h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas e foram adicionados 200 μ L da solução de bloqueio (PBS com 5% de albumina de soro bovino-BSA). Novamente, as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e depois lavadas. Em seguida, foram adicionadas as curvas padrão com as respectivas diluições e as amostras (100 μ L/poço). O ensaio

foi realizado em triplicata. Após 2 horas de incubação houve um novo ciclo de lavagem e 100 µL do anticorpo de detecção foram adicionados aos poços (anticorpo secundário com streptavidina conjugado com a enzima peroxidase). Após incubação à temperatura ambiente por uma hora e meia, outro ciclo de lavagem foi realizado e 100 µL/poço de substrato de tetrametilbenzidina (Revelador TMB 1:1) foi adicionado pelo tempo de até 30 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de Solução Stop (2N H₂SO₄). A leitura da absorbância foi obtida no comprimento de onda de 450 nm em um espectrofotômetro de placa (TPReader NM-ThermoPlate). As soluções e o fator das diluições foram realizadas de acordo com o kit de cada citocina. A análise foi feita a partir da curva de titulação dos padrões das citocinas e as concentrações finais foram determinadas em pg/mL.

3.7 Análise Estatística

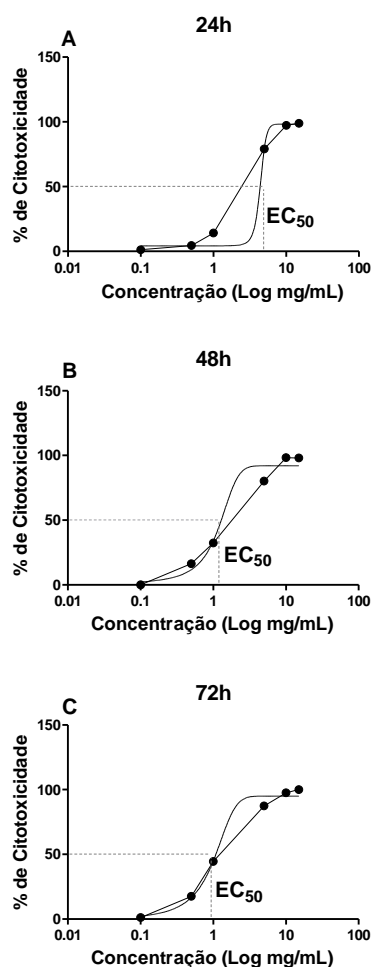
Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (2005) (San Diego, Califórnia, USA). Foi aplicado, para todos os dados obtidos, o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, para os dados paramétricos foi utilizado o teste *One-way* ANOVA (*One-way Analysis of Variance*) e o pós-teste foi realizado pelo método de Tukey (*Tukey's Multiple Comparison Test*). Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste foi realizado pelo método de Dunn (*Dunn's Multiple Comparison Test*). A significância estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$. Para calcular os valores de EC₅₀, foram feitas regressões não lineares das médias dos valores encontrados para cada concentração em, pelo menos, três experimentos independentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de citotoxicidade do extrato de *P. polymyxa* RNC-D sobre fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1

A toxicidade celular do extrato foi testada em linhagem de fibroblasto BALB/3T3 e de macrófago J774A.1 nos tempos de 24, 48 e 72 horas a diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 15 mg/mL) (Figuras 5 e 6). A capacidade das células viáveis em reduzir o sal de MTT foi avaliada pela formação de cristais de formazana que, posteriormente solubilizados, proporcionam os valores de absorbância dos testes. O resultado obtido foi comparado ao controle negativo, determinando assim a EC₅₀ nos períodos analisados. Os valores da EC₅₀ obtidos são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

Figura 5. Gráficos concentração-resposta de citotoxicidade (%) de fibroblasto BALB/3T3.



Legenda: A Figura mostra os valores do EC₅₀ (curvas), obtidos com o software GraphPad Prism 5, com intervalos de confiança de 95%. Resultados obtidos através do ensaio MTT.

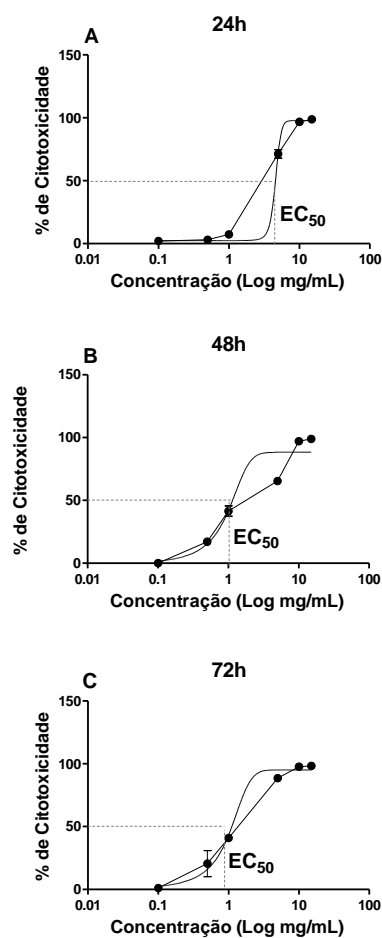
Fonte: Neris et al, 2017.

Tabela 1. Valores de EC₅₀ para os períodos de 24, 48 e 72 horas (fibroblasto BALB/3T3).

Tempo de exposição	EC ₅₀ (mg/mL)	Intervalos de confiança- 95%
24h	4,409	4,236 – 4,582
48h	1,171	1,010 – 1,331
72h	0,956	0,844 – 1,068

Fonte: NERIS et al, 2017.

Figura 6- Gráficos concentração-resposta de citotoxicidade (%) de macrófago J774A.1.



Legenda: A Figura mostra os valores do EC₅₀(curvas), obtidos com o software GraphPad Prism 5, com intervalos de confiança de 95%. Resultados obtidos através do ensaio MTT.

Fonte: NERIS et al, 2017.

Tabela 2. Valores EC₅₀ para os períodos de 24, 48 e 72 horas (macrófago J774A.1).

Tempo de exposição	EC ₅₀ (mg/mL)	Intervalos de Confiança- 95%
24h	4,584	4,486 – 4,683
48h	0,994	0,824 – 1,164
72h	0,945	0,665 – 1,226

Fonte: NERIS et al., 2017.

Os ensaios de toxicidade *in vitro* permitem avaliar as alterações celulares produzidas de acordo com diferentes estímulos (KHATIBISEPEHR et al., 2011). A técnica desenvolvida por MOSMANN (1983) tem como principal vantagem a possibilidade da análise de sinais de toxicidade precoce, já que o ensaio envolve a avaliação da atividade mitocondrial.

Neste estudo foram realizados vários testes pilotos para a determinação da melhor concentração celular apropriado para o ensaio de citotoxicidade (dados não apresentados). Nossos resultados mostraram que as concentrações de 10 e 15 mg/mL resultaram em taxas de mortalidade total para ambas as linhagens (Figuras 5 e 6). A concentração de ≈ 1 mg/mL levou a resultados semelhantes de toxicidade entre os períodos de 48 e 72 horas, tendo induzido a morte de cerca de 50% das células (EC₅₀) em ambos os casos (Tabelas 1 e 2). No entanto, para o período de 24 horas, a morte de 50% das células se deu apenas para um valor de concentração de 4,409 mg/mL para fibroblasto (BALB/3T3) e 4,584 mg/mL para macrófagos (J774A.1). Em vista disso, sugere-se que pode ter ocorrido efeito de saturação do extrato no período 48 e 72 horas, estabilizando o efeito contra as células. Outro fato observado é que não houve discrepância da morte celular entre os períodos de 48 e 72 horas, sugerindo um efeito menos agressivo contra as células.

Kim e colaboradores (2007) mostraram que o peptídeo antimicrobiano surfactina, composto semelhante ao produzido por *Bacillus subtilis*, tem um efeito antiproliferativo na linhagem celular LoVo (adenocarcinoma de cólon). Nessa mesma linha, o estudo de Ma e colaboradores (2012) relatou que o lipopeptídeo iturínico, chamado mojavensin A, produzido por *Bacillus mojavensis* B0621A, exibe citotoxicidade contra linhagem celular HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana). Estes PAMs, além de serem antimicrobianos, demonstram efeito antitumoral. Ademais, o extrato, além de exibir atividade antimicrobiana, pode ser usado contra um possível alvo antitumoral.

Os nossos resultados sugerem que o efeito do extrato nas células testadas não necessariamente é ocasionado por uma única substância, mas envolve substâncias de diferentes naturezas que podem ser vantajosas em aplicações biotecnológicas.

4.2 Cinética do crescimento de fibroblasto BALB/3T3 de macrófago J774A.1 após exposição ao extrato de *P. polymyxa* RNC-D

As tabelas 3 e 4 mostram as linhagens BALB/3T3 e J774A.1 expostas ao extrato com diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 15 mg/mL) por 24, 48 e 72 horas. Para obtenção dos dados foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT. Para a linhagem BALB/3T3, observa-se que o controle e o tratado com 0,1 mg/mL do extrato permaneceram em crescimento e atingiram em 48 horas sua concentração máxima de $1,1 \times 10^5 \pm 10801,4$ e $1,1 \times 10^5 \pm 9256,9$, respectivamente (Tabela 3). Já para a linhagem J774A.1 é importante observar que tanto o grupo controle quanto o grupo tratado com 0,1 mg/mL do extrato permaneceram crescendo e atingiram, em 72 horas, suas concentrações máximas de $3,8 \times 10^5 \pm 23752,3$ e $3,7 \times 10^5 \pm 23420,4$, respectivamente (Tabela 4). Nota-se que, em todos os tempos testados, a cinética de crescimento celular, quando comparado com o grupo controle, foi alterada negativamente de modo significativo para um valor de ≈ 1 mg/mL. As concentrações acima de 5 mg/mL resultaram em morte celular.

Tabela 3. Cinética de crescimento de fibroblasto BALB/3T3. O extrato de *P. polymyxa* RNC-D testado em várias concentrações.

GRUPO	24h	48h	72h
Controle	$0,68 \times 10^5 \pm 3704,4$	$1,1 \times 10^5 \pm 10801,4$	$1,1 \times 10^5 \pm 4262,2$
0,1 mg/mL	$0,71 \times 10^5 \pm 1433,7$ ^{NS}	$1,1 \times 10^5 \pm 9256,9$ ^{NS}	$1,1 \times 10^5 \pm 11365,2$ ^{NS}
0,5 mg/mL	$0,52 \times 10^5 \pm 4006,9$ ^{NS}	$0,82 \times 10^5 \pm 5792,7$ ^{NS}	$0,81 \times 10^5 \pm 4262,2$ ^{***}
1 mg/mL	$0,32 \times 10^5 \pm 2624,7$ ^{**}	$0,5 \times 10^5 \pm 750,0$ ^{***}	$0,4 \times 10^5 \pm 1250,0$ ^{***}

Legenda: Os símbolos ** p <0,01 e *** p <0,001 representam a diferença significativa entre o grupo tratado quando comparado com o grupo controle (sem tratamento) e NS - sem diferença estatística.

Fonte: NERIS et al, 2017.

Tabela 4. Cinética de crescimento da macrófago J774A.1. O extrato de *P. polymyxa* RNC-D testado em várias concentrações.

GRUPO	24h	48h	72h
Controle	$1,1 \times 10^5 \pm 14995,4$	$2 \times 10^5 \pm 3393,2$	$3,8 \times 10^5 \pm 23752,3$
0,1 mg/mL	$1 \times 10^5 \pm 9563,3^{NS}$	$2 \times 10^5 \pm 6786,4^{NS}$	$3,7 \times 10^5 \pm 23420,4^{NS}$
0,5 mg/mL	$1 \times 10^5 \pm 0,00^{NS}$	$1,8 \times 10^5 \pm 18181,4^{NS}$	$2,4 \times 10^5 \pm 2417,6^{***}$
1 mg/mL	$0,69 \times 10^5 \pm 373,5^{**}$	$0,56 \times 10^5 \pm 1876,4^{***}$	$0,49 \times 10^4 \pm 1105,7^{***}$

Legenda: Os símbolos ** p <0,01 e *** p <0,001 representam a diferença significativa entre o grupo tratado quando comparado com o grupo controle (sem tratamento) e NS - sem diferença estatística.

Fonte: NERIS et al, 2017.

As células sem estímulos em cultura mostram um padrão de atividade proliferativa que reflete a adaptação da cultura (2D), como por exemplo: o condicionamento ao ambiente; a disponibilidade de nutrientes e, no caso de células aderentes (como as linhagens estudadas), de superfície livre para adesão e geração de novas células (FRESHNEY, 2000). Células em diferentes fases do ciclo de crescimento (em cultura) tem comportamento distinto em relação à proliferação, glicólise e respiração, atividade enzimática, entre outras características (FRESHNEY, 2000).

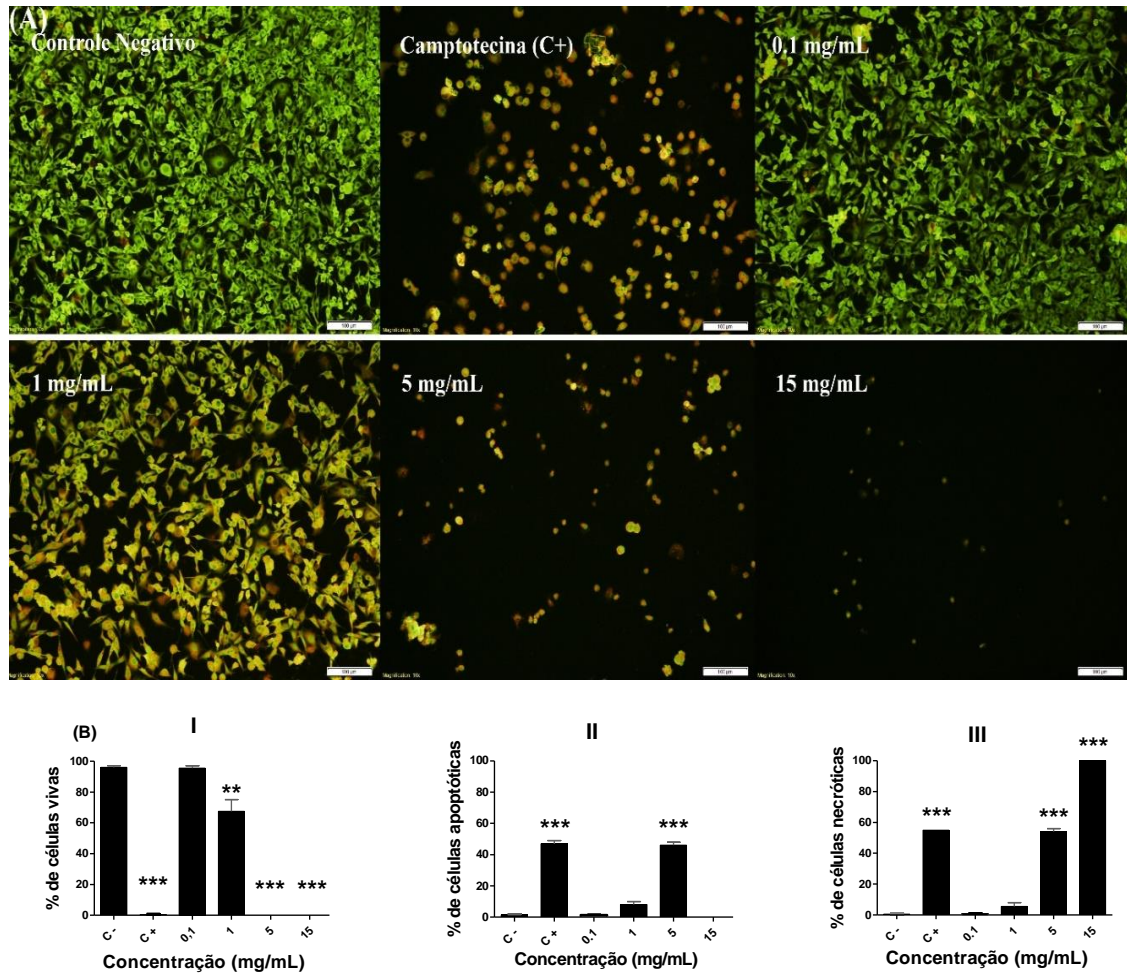
A cinética de proliferação celular durante a fase de crescimento é típica de cada linhagem e é durante essa fase que o tempo de duplicação e velocidade máxima de crescimento celular das células são determinados. As causas que influenciam a duração da fase de crescimento são: a concentração do inóculo, a velocidade de crescimento celular, a disponibilidade de nutrientes e o acúmulo de metabólitos inibitórios. Já a morte celular pode ser desencadeada por dois mecanismos distintos conhecidos: necrose ou apoptose (FRESHNEY, 2005).

Com relação à taxa de crescimento celular, nossos dados mostram (Tabelas 3 e 4) que a concentração de ≈ 1 mg/mL induziu a diminuição significativa do crescimento celular em todos os períodos testados, quando comparado com o grupo controle. Esse padrão de comportamento foi confirmado para ambas as linhagens testadas. Sugerimos que a ação do extrato, diminui o crescimento celular, assim como leva à célula a morte, já que a viabilidade das células do grupo controle estavam em condições favoráveis para o seu crescimento, não se viu afetada. Dessa forma, o extrato pode ter afetado apenas uma certa população de células, que de alguma forma influenciou na sua proliferação. Assim, nossos resultados sugerem que substâncias presentes no extrato alteraram os padrões de crescimento celular a partir de ≈ 1 mg/mL. Estas alterações foram evidenciadas e corroboradas pelas imagens da microscopia de fluorescência como mostrado nas Figuras 7 e 8.

4.3 Microscopia de fluorescência para avaliação do processo de morte celular em fibroblasto BALB/3T3 e macrófago J774A.1

A morfologia das células foi investigada usando os corantes Laranja de Acridina/Brometo de Etídio (LA/BE) por meio da microscopia de fluorescência no período de 24 horas exposto a diferentes concentrações (0,1; 1; 5 e 15 mg/mL) do extrato Controle negativo (sem tratamento) e controle positivo (células expostas à 10 μ M de camptotecina). Para quantificar a porcentagem de cada evento celular (células viáveis, necróticas, apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra e a porcentagem de células foi calculada em cada estágio (Figuras 7B e 8B).

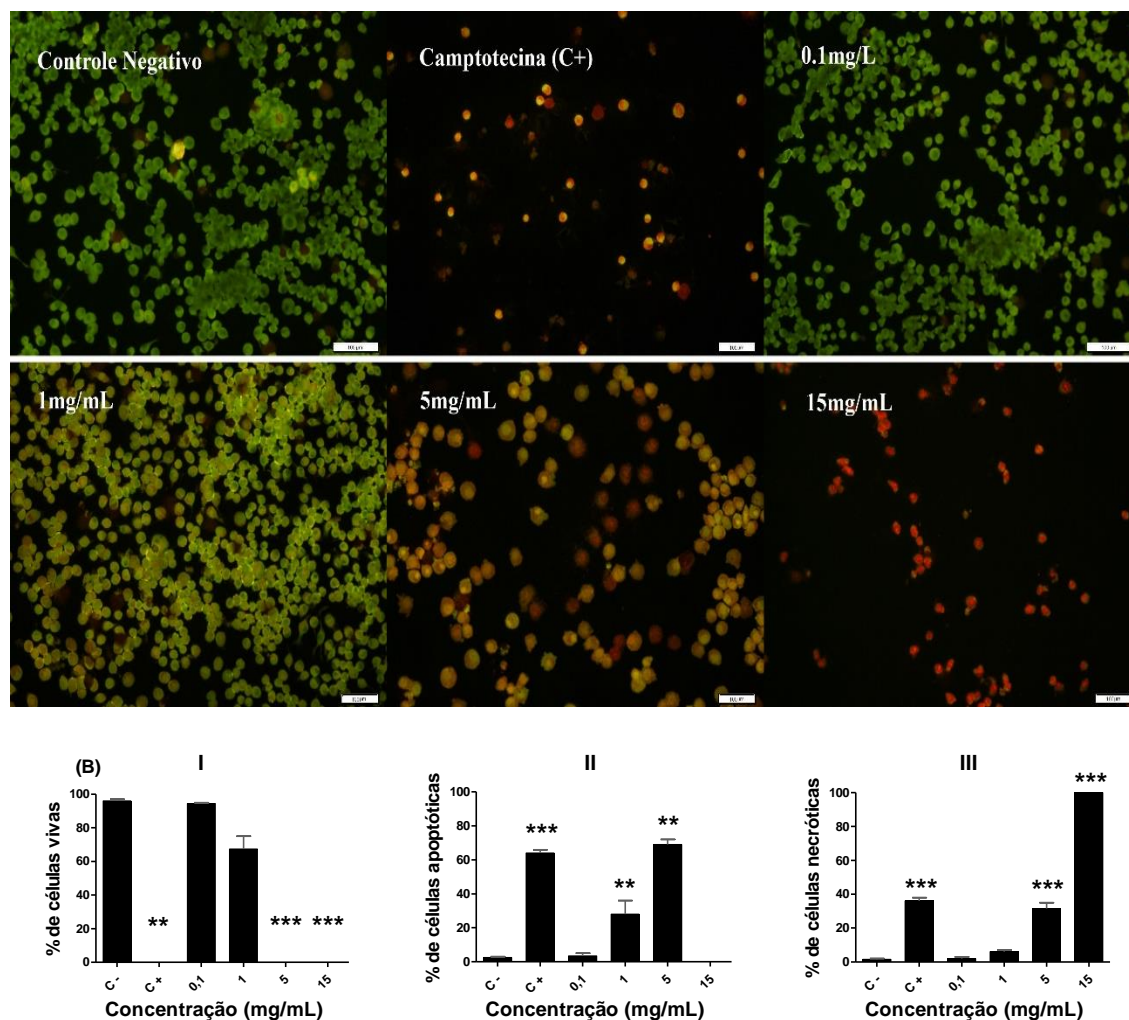
Figura 7. Morfologia da linhagem BALB/3T3 após a exposição com diversas concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D.



Legenda: As células foram coradas com LA/BE e analisadas sob microscopia de fluorescência, em aumento de 1000X (Figura 7A). A Figura 7 B também mostra o gráfico da contagem de células com características viáveis (I) apoptóticas (II) e necróticas (III). ** p <0,01 e *** p <0,001 representam a diferença significativa entre o grupo tratado quando comparado ao grupo controle negativo.

Fonte: NERIS et al., 2017.

Figura 8. Morfologia da linhagem J774A.1 após a exposição com diversas concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D.



Legenda: As células foram coradas com LA/BE e analisadas sob microscopia de fluorescência, em aumento de 1000X (Figura 8A). A Figura 8 B também mostra o gráfico da contagem de células com características viáveis (I) apoptóticas (II) e necróticas (III). ** p < 0,01 e *** p < 0,001 representam a diferença significativa entre o grupo tratado quando comparado ao grupo controle negativo.

Fonte: NERIS et al., 2017.

A apoptose envolve o controle genético de eventos bioquímicos e morfológicos das células, incluindo ativação de caspases, redução de volume nuclear das células, fragmentação de DNA intranucleossomal, a ausência da reação inflamatória, entre outros. (SUZANNE e STELLER, 2013).

O programa apoptótico pode ser ativado por uma variedade de estímulos, tais como a ligação de moléculas aos receptores de membrana, ação de agentes

químicos, radiação ionizante, danos ao DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio, entre outros (BARAK et al., 2005; GRIVICICH et al., 2007). Analisando os nossos resultados, foi possível observar a perda da aderência com a matriz extracelular de células vizinhas, a presença de células arredondadas, cromatina condensada e corpos apoptóticos (BARAK et al., 2005; GRIVICICH et al., 2007).

Nas Figuras 7A e 8A, observamos células uniformemente verdes com morfologia regular, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com 0,1 mg/mL do extrato. Nas células tratadas com ≈ 1 mg/mL do extrato, observou-se o início dos processos de morte celular. Apesar disso, nota-se que o tratamento com a camptotecina age nas células de uma forma mais agressiva quando comparado com a concentração de ≈ 1 mg/mL do extrato, para ambas as linhagens (Figuras 7A e 8A). Nas concentrações de 5 e 15 mg/mL, os efeitos citotóxicos foram proeminentes (Figuras 7A e 8A).

As Figuras 7B e 8B apresentam os gráficos que discriminam as porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas. Para a linhagem de fibroblasto BALB/3T3 (Figura 7B), o extrato induz a morte celular por apoptose e necrose a partir da concentração de 5 mg/mL, observando-se um aumento significativo de células apoptóticas e necróticas quando comparado com o grupo controle. É importante destacar que, para esta mesma linhagem, a concentração de ≈ 1 mg/mL do extrato não induziu um aumento significativo do número de células apoptóticas e necróticas quando comparado com o grupo controle. No entanto, para a linhagem do macrófago J774A.1, o comportamento frente ao extrato mostra que a morte foi induzida a partir da concentração de ≈ 1 mg/mL, ocorrendo um aumento significativo de células apoptóticas quando comparado com o grupo controle (Figura 8B). Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que o macrófago é uma célula importante do sistema imune, principalmente com função de fagocitose. Desta forma sugerimos que pode ter ocorrido uma modulação da resposta imune primária causada pela ação do extrato, diferente do que ocorre com o fibroblasto, que tem como funções principais a produção e secreção de proteínas que constituem as fibras e a substância amorfa, e participa de re-estruturação de tecidos durante o reparo (KIWANUKA et al., 2012; DONOVAN et al., 2013).

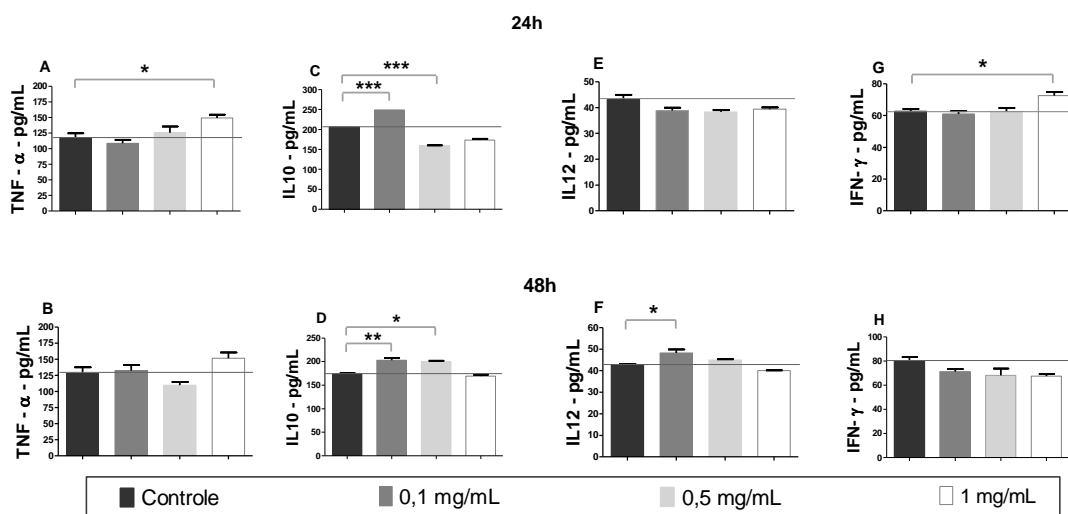
Várias substâncias bioativas produzidas por *Paenibacillus* já foram isoladas e caracterizadas, como as polimixinas, que são a classe mais antiga de lipopeptídeos isolados das espécies de *Bacillus* (STANSLY et al., 1947). Azad e colaboradores (2013) mostraram que a linhagem celular NRK-52E (epitélio de rim de rato) tratada com polimixina B (2,0 mM) apresentou apoptose em torno de 11% após 6 horas e atingiu um platô de >80% após 24 horas. Em um trabalho semelhante, Kim e colaboradores (2007) observaram que a surfactina (lipopeptídeo) interrompeu a proliferação de células LoVo, induzindo atividade proapoptótica e inibindo o ciclo celular. Já em nosso estudo, vale destacar que a concentração de ≈ 1 mg/mL do extrato não induziu aumento significativo no número de células apoptóticas na linhagem BALB/C 3T3 (Figura 7B). Contudo, na linhagem J774A.1 a apoptose chegou em torno de 40% em 24 horas após o tratamento. Nota-se que, a concentração de 1 mg/mL não induziu a produção significativa de células necróticas para ambas as linhagens (7B e 8B), fato importante já que durante a necrose, o conteúdo celular é extravazado, ocasionando danos às células vizinhas e levando a uma reação inflamatória (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004).

Apesar da capacidade do extrato de *P. polymyxa* RNC-D de induzir células apoptóticas em ambas linhagens celulares nesse modelo experimental, o mecanismo em que essas reações ocorrem ainda precisa ser esclarecido.

4.4 Produção de citocinas TNF- α , IL-10, IL-12 e IFN- γ

A Figura 9 mostra a produção de TNF- α , IL-10, IL-12 e IFN- γ pela linhagem de macrófago J774A.1 após a exposição a várias concentrações (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) do extrato em 24 e 48 horas. Verificou-se que, durante o período de 24 horas, houve um aumento significativo de TNF- α , IL-10 e IFN- γ (Figuras 9A/C/G), enquanto durante o período de 48 horas houve um aumento significativo de IL-10 e IL-12 (Figuras 9D/F).

Figura 9. Quantificação de TNF- α , IL-10, IL-12 e IFN- γ .



Legenda: O símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ representam a diferença significativa entre o grupo exposto ao extrato quando comparado com o grupo controle (sem tratamento).

Fonte: NERIS et al., 2017.

Os macrófagos possuem um papel crucial nas diversas fases da resposta inflamatória. Estas células identificam e reagem a diferentes tipos de moléculas, patógenos, antígenos e a diferentes tipos de desequilíbrios fisiológicos (LIDDIARD et al., 2011). Além disso, são dotados de diversos tipos de receptores que, ao reconhecerem algum tipo de patógeno, são ativados e produzem diversos tipos de quimiocinas e citocinas que irão iniciar a resposta imune inata (LIDDIARD et al., 2011). Neste trabalho foi dado destaque às citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-10, observamos que o extrato foi capaz de estimular a produção dessas citocinas. Estes dados podem nos fornecer informações importantes frente a regulação e ativação dos macrófagos como células fagocíticas e efectoras na imunidade inata, principalmente em respostas a infecções e inflamações agudas. Foram analisadas várias concentrações com o intuito de evidenciar possíveis efeitos das mesmas como estímulo imunológico, observando-se diferença na produção de citocinas entre as concentrações de estímulo.

Nossos resultados mostram que a concentração de ≈ 1 mg/mL do extrato foi capaz de induzir a produção significativa de TNF- α (Figura 9A) e de IFN- γ (Figura 9G) em 24 horas, quando comparado com o grupo controle. Já em 48 horas não foi observada a produção destas citocinas. Isto pode ser explicado por uma série de

fatores como: a) declínio no crescimento celular e posterior morte b) o TNF- α e IFN- γ serem citocinas pro-inflamatórias que estão mais envolvidas na resposta de fase aguda (BARBOSA et al., 2011; CALSAVARA et al., 2014). Outro fator é a concentração do estímulo, que também está diretamente relacionada com a produção destas citocinas, já que não foi observado a produção significativa nas outras concentrações do extrato. Como exemplo, podemos citar o LPS, que em concentrações adequadas estimula o macrófago a produzir TNF- α (De FORGE et al., 1990; McDERMOTT et al., 1999; PALLADINO et al., 2003). Esses dados sugerem que, nessa linhagem celular, o efeito inicial do tratamento com o extrato pode contribuir com a ativação de uma resposta inflamatória aguda (aumento de TNF- α) e ativação da resposta antimicrobiana (aumento de IFN- γ) frente a infecções por diferentes patógenos.

A IL-12 é uma citocina imunorreguladora (CHEHIMI e TRINCHIERI, 1994; SINIGAGLIA et al., 1999; BEADLING et al., 2006) e é produzida principalmente por células dendríticas, macrófagos, monócitos, e neutrófilos (AIROLDI et al., 2002), sendo característica de resposta imune Th1. Sua produção pode ser induzida por LPS, ácido teicoico, peptidoglicano, entre outros PAMs (ASTE-AMEZAGA et al., 1998; ZHANG et al., 2011).

A Figura 9F mostra um aumento significativo de IL-12 na concentração de 0,1 mg/mL do extrato no período de 48 horas, o que poderia indicar um estímulo inicial, já que não foi observado sua produção em 24 horas. Outra sugestão é que a IL-10, uma citocina regulatória, pode ter modulado a produção de IL-12. A IL-12 é essencial para a estimulação da produção de IFN- γ , que promove a ativação de macrófagos e neutrófilos, e tem funções importantes na imunidade contra microrganismos e controle de neoplasias. (KERKAR et al., 2013). Ademais, macrófagos e neutrófilos ativados convertem o oxigênio molecular em ROS, que são agentes oxidativos, altamente reativos e que destroem microrganismos e outras células. Além dos ROS, os macrófagos produzem espécie reativa de nitrogênio, principalmente o NO. A produção em excesso destes gases (ROS e NO), induzida pela intensa ativação de macrófagos e neutrófilos, pode danificar tecidos normais do hospedeiro (GUERRA et al., 2007; DE BIE et al., 2012; KOZLOV et al., 2011). Por outro lado, a deficiência na produção destes gases pode não promover a morte de certos microrganismos (KAVOOSI et al., 2009; PAWATE et al., 2004; NUSSE, 2011).

A IL-12 tem boas perspectivas de ser um agente imunoterapêutico porque, em conjunto com várias outras citocinas, desempenha um papel fundamental na regulação das respostas imunes inatas e adaptativas. Esta sinergia pode levar a um aumento de efeitos imunorreguladores contra várias doenças que estão ligadas à atividade efetora das células Th1 e macrófagos (MOSSER e EDWARDS, 2008; POLLARD, 2009; LASEK et al., 2014). Como no caso da infecção por *Leishmania*, essa regulação da resposta efetora é essencial para o sucesso do tratamento, já que seu objetivo não é apenas combater a infecção, mas também para controlar o processo inflamatório.

A IL-10 é uma citocina imunorreguladora expressa por células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células NK, entre outras. (MOORE et al., 2001; O'GARRA et al., 2006; SHOUVAL et al., 2014). Esta citocina inibe respostas pró-inflamatórias da imunidade inata e adaptativa e evita lesões nos tecidos causados por respostas imunes exacerbadas (MEGE et al., 2006; FILIPPI e von HERRATH, 2008).

Nossos resultados revelam que houve um aumento significativo da produção de IL-10 em 24 e 48 horas na concentração de 0,1 mg/mL (Figuras 9C e 9D). No entanto, para a concentração de 0,5 mg/mL, observou-se uma diminuição significativa no período de 24 horas (Figura 9C), enquanto que no período de 48 horas, houve um aumento significativo (Figura 9D), sugerindo um efeito tardio na produção desta citocina. O aumento da IL-10 sugere, neste modelo experimental, uma regulação do saldo Th1/Th2. Além dos resultados mostrados, outros estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que camundongos BALB/c com edema de pata induzido por carragenina tiveram a espessura do edema diminuído após o tratamento com o extrato de *P. polymyxa* RNC-D, o que pode indicar que o extrato induziu uma ação anti-inflamatória (CAVICCHIOLI, 2017). A IL-10, portanto mostra-se essencial na regulação da resposta imune em vários processos patológicos (GLOCKER et al., 2009; MORAN et al., 2013).

5. Conclusões do Capítulo 1

O extrato de *P. polymyxa* RNC-D promoveu um efeito antiproliferativo nas linhagens celulares BALB/3T3 e J774A.1 na concentração de ≈ 1 mg/mL no período de 48 e 72 horas *in vitro*. O extrato foi capaz de estimular a produção de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-10 por macrófagos J774A.1 *in vitro*.

A morte celular induzida pelo extrato de *P. polymyxa* RNC-D e a produção de citocinas pela linhagem J774A.1 pode não ser necessariamente ocasionada por uma única substância, mas por substâncias de diferentes naturezas químicas que constituem o extrato.

O extrato em questão pode ser um potencial candidato para o desenvolvimento de novos fármacos imunoterapêuticos.

CAPÍTULO 2

AÇÃO DO EXTRATO TOTAL LIOFILIZADO DE *Paenibacillus polymyxa* RNC- D SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

Capítulo 2 Ação do extrato total liofilizado de *Paenibacillus polymyxa* RNC-D sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

As leishmanioses estão entre uma das seis enfermidades tropicais prioritárias à saúde pública global. São doenças consideradas negligenciadas e endêmicas em 98 países, com maior ocorrência em países emergentes. Cerca de 1 bilhão de pessoas estão em áreas de risco. A doença está associada à desnutrição, condições precárias de habitação e sistema imunológico debilitado. (ANSTEAD et al., 2001; WHO, 2018).

Anualmente, em todo o mundo, ocorrem cerca de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de Leishmaniose Visceral e 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de Leishmaniose Tegumentar. Estima-se que, 75% dos casos registrados estão concentrados no Brasil, Afeganistão, Argélia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Colômbia, Arábia Saudita e República Árabe da Síria. Quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. (WHO, 2018).

As leishmanioses possuem várias formas clínicas divididas em: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar. A LV é caracterizada por febres irregulares, anemia, perda de peso, aumento do baço e do fígado. (WHO, 2018). A LT, forma cutânea da doença, é a mais comum. É definida por causar úlceras em grande quantidade, espalhadas pelo corpo (rosto, braços e pernas), o que pode causar incapacidade e exclusão social. Quando as úlceras cicatrizam, sistematicamente deixam cicatrizes permanentes sendo, muitas vezes, a causa de um grave prejuízo social, depressão, isolamento social, entre outras consequências. (PELISSARI et al., 2011; WHO, 2018).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e da resposta imune mediada por células da pessoa infectada, se desenvolve um amplo espectro de formas clínicas da doença, como: **leishmaniose cutânea localizada (LCL)**,

leishmaniose cutaneomucosa (LCM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) (CARVALHO et al., 1985; LAINSON e SHAW, 2005).

A LT é uma antropozoonose considerada uma das doenças mais negligenciadas do mundo e representa um grave problema de saúde pública em diversos países, incluindo países desenvolvidos. O Brasil possui registro de casos em todas as regiões brasileiras. No período de 1995 a 2014, verifica-se uma média anual de 25.763 de novos casos registrados (BRASIL, 2017). O crescente número de casos na última década vem sendo atribuído ao diagnóstico mais eficiente e com o aumento de notificações. Ademais, esse cenário pode ser devido a vários fatores como: controle inadequado do vetor, urbanização e o desmatamento (ORYAN e AKBARI, 2016).

A forma mais comum da LT é a LCL, que pode ser causada no Novo Mundo pelas espécies: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (BRASIL, 2010). A lesão ulcerada é precedida por uma mancha, que dura de um a dois dias depois da picada do flebotomíneo. A mancha evolui formando uma pápula que vai aumentando produzindo uma úlcera que é geralmente indolor. Possui formato arredondado ou ovalado, mede de alguns milímetros até alguns centímetros, possui base eritematosa e de consistência firme. Também apresenta bordas bem demarcadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações. Em análise histológica, observa-se a presença de macrófagos infectados por formas amastigotas e infiltrado de células mononucleares (BASSORGUN et al., 2015). Além disso, infecção bacteriana no local, pode provocar dor e produzir exsudato seropurulento que, ao dessecar-se em crostas, reveste total ou parcialmente o fundo da úlcera (BRASIL, 2017).

As LCM e LCD são as formas mais graves e o perfil de citocinas pode variar durante os diferentes estágios da doença (SCOTT e NOVAIS, 2016). A LCM caracteriza-se pela exacerbada reação imune associada à elevada produção de IFN- γ e TNF- α , que levam à necrose do tecido mucoso da nasofaringe e consequente escassez de parasitos na lesão (SILVEIRA, et al., 2009). Já a LCD apresenta grande quantidade de parasitos nas lesões, devido aos baixos níveis de citocinas Th1 e altos títulos de anticorpos circulantes. Além disso, pacientes com LCD são fortemente marcados pela elevada produção de IL-4 e IL-10, enquanto os níveis destas citocinas são encontrados em baixas concentrações nos indivíduos com LCM (SILVEIRA et al., 2009; SCOTT e NOVAIS, 2016).

No Brasil, a espécie *Leishmania amazonensis* é o agente etiológico responsável pela LCD, sendo a maioria dos casos relatados no Maranhão, Pará, Bahia e Mato Grosso (REIS et al., 2008; HERNANDEZ-RUIZ et al., 2010; CANEDA-GUZMAN et al., 2014). A LCD caracteriza-se uma forma rara da Leishmaniose Tegumentar, e devido às consequências estigmatizantes para o paciente, é reconhecida como um grave problema de saúde pública (DESJEUX, 2004). Esta doença possui uma forma clínica severa, caracterizada por um denso comprometimento dérmico e crônica, que progride lentamente e pode persistir por décadas (PEARSON e SOUSA 1996). A maioria dos pacientes possui recidiva ao tratamento. Após vários tratamentos anti-*Leishmania*, observa-se melhoras clínicas caracterizadas por redução de lesões que voltam a aumentar após a falha terapêutica (COSTA et al., 1995). A doença normalmente começa com uma lesão primária e única, que em seguida dissemina-se para outras partes do corpo (GREVELINK e LERNER, 1996; MACHADO et al., 2015). As lesões na LCD evoluem de forma lenta com formação de eritemas, pápulas, nódulos ou infiltrações com distribuição simétrica na face, tronco e nos membros e pode disseminar-se para todo o corpo após meses ou anos da infecção (COSTA et al., 2009).

As lesões, em geral, não cicatrizam de forma espontânea e são resistentes ao tratamento (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Histologicamente, as lesões ativas da LCD apresentam um denso infiltrado dérmico que é constituído principalmente por macrófagos vacuolizados com muitos parasitos, obscurecendo estruturas da derme e da hipoderme (CONVIT et al., 1972; BARRAL et al., 1995).

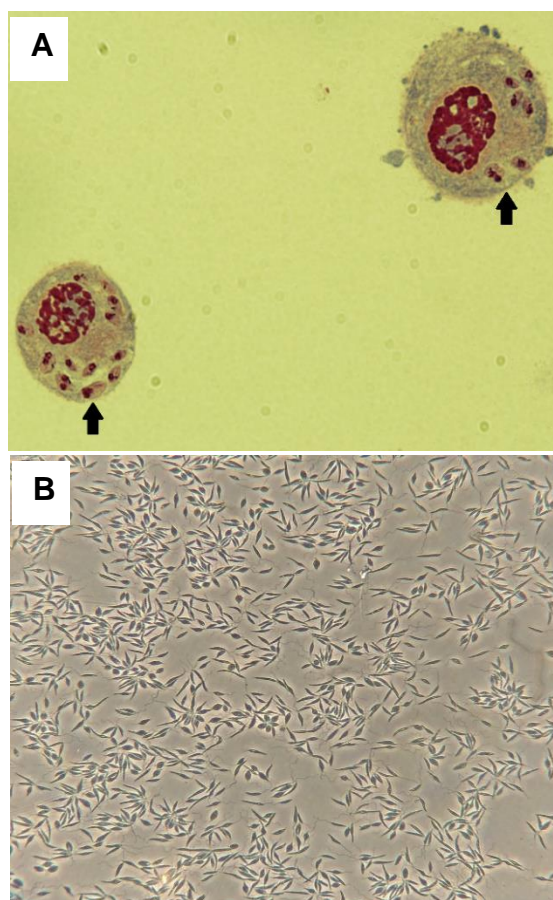
Nas lesões que envolvem espontaneamente ou por ação do medicamento, são identificados grandes infiltrados linfoplasmocitários e áreas de fibrose e necrose (BITTENCOURT, 2009). No entanto, as recidivas podem ser atribuídas a reinfecção ou alterações no estado imunológico do paciente (BARRAL et al., 1995).

1.2 Agente etiológico e morfologia

Leishmania é um protozoário digenético que durante seu ciclo de vida apresenta duas formas evolutivas. A forma promastigota (Figura 1B) é encontrada no tubo digestório do vetor, mede cerca de 20 a 30 µm de comprimento, é extracelular, alongada e flagelo livre, o qual lhe confere mobilidade e infectividade para o

hospedeiro. A forma amastigota (Figura 1A) é encontrada no hospedeiro vertebrado, são ovóides ou esféricas, chegam a medir de 2 a 5 μm , intracelular obrigatória e se multiplica dentro das células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente em macrófagos. Ambas as formas se multiplicam por divisão binária, possuem um núcleo e uma única mitocôndria, conhecida como cinetoplasto (EZQUERRA, 2001; BERNAL et al., 2010).

Figura 1. Formas evolutivas de *L. amazonensis*.



Legenda: (A) Formas amastigotas no interior de macrófagos (B) Formas promastigotas.

Fonte: Arquivo Pessoal.

O gênero *Leishmania* inclui cerca de 25 espécies e é dividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, variando de acordo com o local e o tipo de desenvolvimento do parasito no inseto vetor (flebotomíneo) (KILLICK-KENDRICK, 1990; LAINSON e SHAW, 1987). No Novo Mundo, os parasitos do subgênero *Leishmania* causam a doença cutânea, como: *Leishmania (L.) venezuelensis*,

Leishmania (L.) mexicana, *Leishmania (L.) amazonensis* e sistêmica visceral, como: *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Os parasitos do subgênero *Viannia* causam somente doença cutânea, são eles: *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lindenbergi*, *Leishmania (V.) panamensis* e *Leishmania (V.) peruviana* (LAINSON e SHAW, 1987). As manifestações clínicas dependem de algumas condições, como: da espécie do parasito, da virulência da cepa, da quantidade de parasitos inoculados, do vetor e especialmente das condições imunológicas do hospedeiro, as quais variam desde a leishmaniose cutânea (LC) (forma mais comum da doença), até a leishmaniose visceral (LV) (forma mais grave da doença e fatal caso não seja tratada) (BRUZUAL; ARCAÏ; DE LA PARTE-PÉREZ, 2008; WHO, 2018).

1.3 Vetor e reservatório

Os flebotomíneos são dípteros hematófagos, de 2 a 3 mm de diâmetro, da família *Psychodidae* e da subfamília *Phlebotominae*. São caracterizados pela cor cinza/palha, com asas pequenas, esbranquiçadas pontudas e sempre eretas, têm pelos e patas mais longas do que o seu corpo. São predominantes nas regiões tropicais e subtropicais. Existem seis gêneros de flebotomíneos principais: *Phlebotomus*, *Sergentomya*, *Chinius*, *Lutzomyia*, *Warileya* e *Brumptomya*. Destes gêneros, os reconhecidos como vetores de *Leishmania* são: no Velho Mundo, o gênero *Phlebotomus*; e no Novo Mundo, o gênero *Lutzomyia* (BERNAL et al., 2010). Na América existem mais de 530 espécies de flebotomíneos diferentes, mas apenas 20 têm sido encontradas infectadas naturalmente e/ou confirmadas como vetores de leishmaniose (BRAZIL et al, 2015).

O ciclo de vida do vetor ocorre no ambiente terrestre e passa por 4 fases: ovo, larva, pupa e adulto. O desenvolvimento do ovo até a fase adulta acontece em cerca de 30 dias e somente as fêmeas são hematófagas obrigatórias, pois necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos. A atividade hematófaga inicia-se cerca de 1 hora após o crepúsculo e tanto o macho quanto a fêmea tendem a não se deslocar muito de seus criadouros ou locais de abrigo e podem se afastar até cerca de 1 quilômetro. O tempo de vida da fêmea é estimada em 20 dias (BADARÓ, 2005.).

Os reservatórios são animais vertebrados que abrigam o parasito, permitindo que os vetores se infectem, persistindo o ciclo biológico. Existe uma ampla variedade de animais selvagens e domésticos que são reservatórios de *Leishmania* spp (COSTA et al., 2000; GOUZÉLOU et al., 2013; AGUIAR-SOARES et al., 2014). A transmissão do parasito, dependendo da fonte de infecção, pode ter caráter zoonótico, cujos reservatórios são animais selvagens e domésticos; e antroponótico, cujo reservatório é o ser humano (OMS, 2010). Os locais de reprodução dos flebotomíneos são quentes e úmidos, onde existe matéria orgânica, tais como: árvores antigas, tocas de roedores, abrigos de animais, rachaduras em paredes e lixo (MACMORRIS-ADIX e MOLLY, 2008).

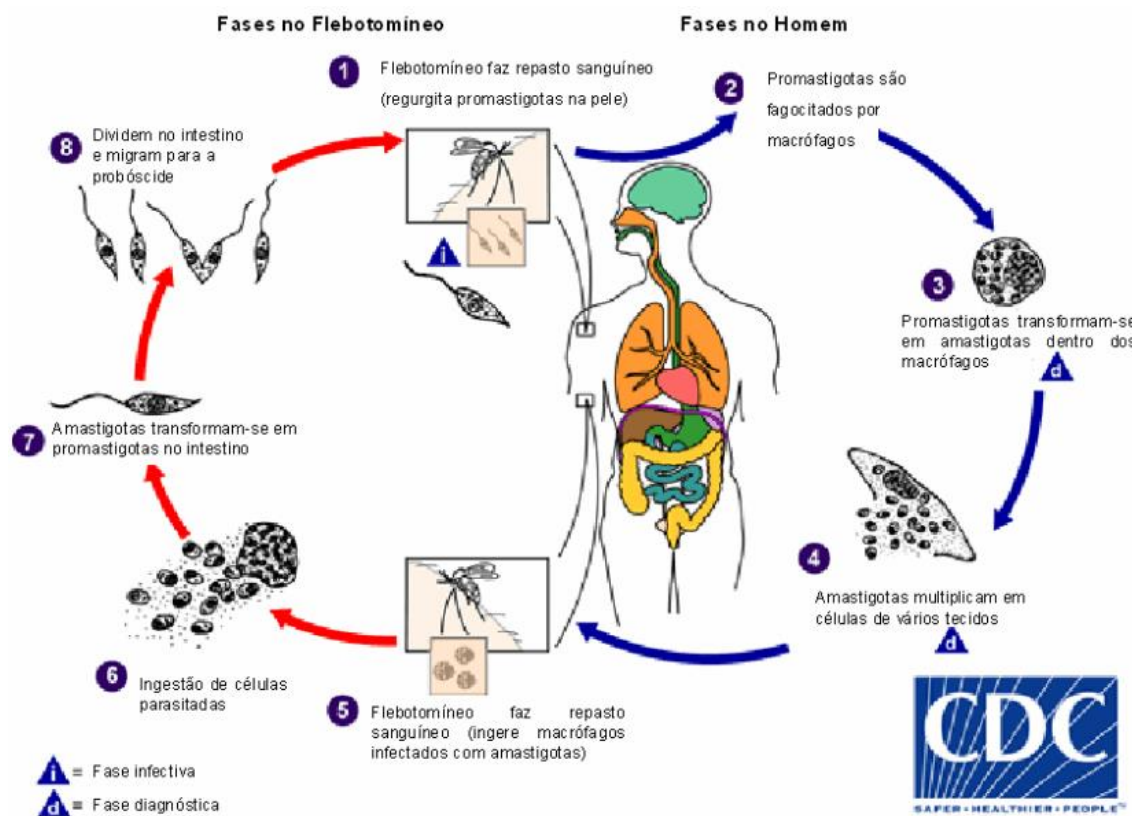
1.4 Ciclo de Vida

A infecção natural por *Leishmania* começa quando o inseto vetor inocula entre 10 a 100.000 formas promastigotas infectantes na pele do hospedeiro (KIMBLIN et al., 2008). A maior parte das formas promastigotas inoculadas são mortas pela imunidade inata do hospedeiro, mas os protozoários restantes são capazes de promover a infecção (DEKREY et al., 1998; DOMINGUEZ et al., 2003; VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

A infecção ocorre quando insetos hematófagos (fêmeas) sugam o sangue contendo amastigotas ou macrófagos infectados. No trato digestivo do inseto, acontece o rompimento da membrana dos macrófagos e as amastigotas liberadas diferenciam-se na forma promastigota. Estas formas são afiladas, exibem flagelo livre e se multiplicam no intestino do vetor (GOSSAGE et al., 2003). Ainda no vetor, as formas promastigotas sofrem metaciclogênese, em que passam por diversas modificações bioquímicas em sua superfície, perde a capacidade de adesão ao epitélio do intestino do vetor e torna-se móveis e infectantes chamadas de metacíclicas (AKOPYANTS et al., 2004). As formas metacíclicas infectantes migram para a probóscide do vetor onde serão transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante a picada do flebotomíneo (PETERSEN e GREENLEE, 2011). No local da picada, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, neutrófilos, entre outros) presentes na derme. Os parasitos internalizados ficam localizados dentro de vacúolos parasitóforos, também

conhecidos como fagolisossomas. Esta organela é formada a partir da fusão do fagossoma (formado durante a fagocitose do parasito) com os lisossomos e contém hidrolases e ácidos (LODGE e DESCOTEAUX, 2005; PESSOA et al., 2016). As formas promastigotas conseguem sobreviver e se diferenciar em amastigotas (COURRET et al., 2002), sendo esta responsável pelo estabelecimento da doença e disseminação da infecção pela sua replicação no interior da célula hospedeira (HENARD et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.



Legenda: O flebotomíneo faz o repasto sanguíneo; Promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos ou por células fagocíticas; Promastigotas transformam-se em amastigotas; Amastigotas multiplicam-se no interior das células; O flebotomíneo faz o repasto sanguíneo e ingere células infectadas; Amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino do mosquito, dividem-se e migram para a probóscide; Ocorre novamente o repasto sanguíneo.

Fonte: CDC.

1.5 Invasão e formação do vacúolo parasitário

Patógenos, normalmente, apresentam várias estratégias de invasão ao meio intracelular. Eles alcançam o citoplasma de uma certa célula-alvo como, por exemplo, os macrófagos e, desse modo, garantem sua sobrevivência e proliferação. Para tanto, diversos patógenos utilizam diferentes estratégias para o sucesso na invasão (GRUENBERG e VAN DER GOOT, 2006). A fagocitose é utilizada por muitos microrganismos como mecanismo de entrada em hospedeiros vertebrados. Entretanto, a invasão na célula hospedeira por esta via oferece o risco da degradação pelos mecanismos de defesa realizados pelas células fagocíticas envolvidas.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são bem adaptados à entrada na célula através da fagocitose. Estes patógenos se estabelecem no ambiente intracelular, evita sua destruição e multiplicam-se no interior do fagossomo. No período da interação entre as formas promastigotas com os macrófagos, acontecem modificações nos domínios de membrana da célula (GRUENBERG e VAN DER GOOT, 2006).

Dentre as moléculas encontradas na membrana de *Leishmania*, duas proteínas são essenciais para a invasão da *Leishmania* e sua permanência no interior do vacúolo, são elas: a molécula glicoproteína (gp63) e a molécula lipofosfoglicano (LPG) (DENKERS e BUTCHER, 2005). Estas proteínas conectam com receptores do complemento, CR1 e CR3, encontradas na membrana dos macrófagos. A molécula de gp63 é uma das mais encontradas na superfície das formas promastigotas, e está distribuída por toda sua superfície (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1999). Dessa forma, a molécula gp63 está envolvida na infectividade do parasito e na interação com a membrana da célula hospedeira (MOSSER e ROSENTHAL, 1993). Quando ocorre a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, o número de gp63 na superfície da célula é reduzida (OLIVIER et al., 2005). Dessa forma facilita o processo de entrada do patógeno na célula hospedeira, na sobrevivência da amastigota e assim modula a resposta imune do hospedeiro (OLIVIER et al., 2005).

A molécula LPG encontrada na membrana de promastigotas é importante para o atraso na fusão de lisossomos ao vacúolo contendo a *Leishmania*, visto que a LPG é transportada para a membrana vacuolar, o que impede a fusão de lisossomos (NYALWHIDE et al., 2003). Quando a *Leishmania* penetra na célula hospedeira, o vacúolo formado é decorrente da maturação e fusão com organelas da via endocítica

da célula e dessa forma torna-se acidificado cerca de 30 minutos após sua formação. Este ambiente é superado pela *Leishmania* por meio da ação de uma ATPase translocadora de prótons encontrado na membrana, que mantém o pH neutro no interior do patógeno (GLASER et al., 1992).

Certas espécies de *Leishmania* conseguem evitar a fusão do vacúolo com lisossomos da célula hospedeira até que se transformem em amastigota, como exemplo temos a *L. donovani*. Contudo, outras espécies, como *L. amazonensis*, possui a capacidade de suportar ao ambiente ácido do vacúolo parasitóforo mesmo antes da diferenciação em amastigotas. Esta característica leva a fusão de lisossomos antes mesmo da total diferenciação das formas promastigotas em amastigotas. Paralelamente, o vacúolo que contém *L. amazonensis* tem como particularidade ser um vacúolo grande e que pode abrigar várias amastigotas (COURRET et al., 2002). A formação de um vacúolo com essas particularidades é devido a secreção, pela *Leishmania*, da proteína proteofosfoglicana (aPPG) não filamentosa no meio extracelular. Este fato colabora para o aumento do vacúolo parasitóforo. Acredita-se que esta molécula seja parecida com a LPG. Ademais, a molécula de aPPG auxilia na formação de vacúolos largos (VANNIER-SANTOS, 2002).

As formas amastigotas de todas as espécies do gênero *Leishmania* são metabolicamente ativas em pH ácido, dessa forma mesmo após a fusão com lisossomos, os parasitos sobrevivem e se dividem no ambiente ácido do fagolisossomo formado (LEIRIÃO et al., 2004).

1.6 Parasito no ambiente intracelular

O vacúolo parasitóforo, como já citado apresenta um pH ácido, em torno de 4,7 a 5,2. Todavia, as formas amastigotas conseguem sobreviver neste ambiente e mantem o pH em torno de 7,0. Este fato é ocasionado pela presença de um gradiente de prótons na membrana da *Leishmania* que é importante para a sua sobrevivência (BURCHMORE e BARRET, 2001). Logo após o estabelecimento da forma amastigota em um pH ácido, estas formas conseguem se dividir no interior do vacúolo, e dessa forma estabelece a infecção no hospedeiro vertebrado. Para tanto, a *Leishmania* deve desenvolver estratégias de escape dos mecanismos microbicidas apresentados por células fagocíticas. Já no início do processo de entrada e estabelecimento do

parasito no ambiente intracelular, a molécula gp63 é essencial na proteção das formas amastigotas à degradação. Esta molécula converte o componente C3b (sistema complemento) em uma forma anérgica, C3bi. Dessa forma, as promastigotas conseguem evadir da opsonização pelo complemento, e assim escapam a degradação mediada por esta via (OLIVIER et al., 2005).

No interior do macrófago, as formas amastigotas conseguem inibir algumas funções desta célula, como: processos de produção de NO e ROS, apresentação de antígenos e produção de citocinas; Estas causas são resultados da ativação da expressão de moléculas imunossupressoras pelos parasitos, como metabólitos de ácido araquidônico, e citocinas como IL-10 e TGF- β (OLIVIER et al., 2005).

Os macrófagos produzem moléculas microbicidas essenciais para a destruição de patógenos no meio intracelular, sendo elas: óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (LIEW et al., 1990; RATNA e ARORA, 2016).

O NO (um gás de radical livre) é produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que parece ser inibida pela molécula LPG encontrada na superfície de *Leishmania*. Esta ação é devido a resposta à produção de INF- γ pelos macrófagos infectados com o parasito (PROUDFOOT et al., 1995; PROUDFOOT et al., 1996). Além do mais a inibição da produção de NO também se deve ao resultado da produção de algumas citocinas, como interleucina-10 (IL-10) e TGF- β .

A inibição da produção de ROS também parece ser inibida por LPG e pela molécula gp63 (SORENSEN et al., 1994; DESCOTEAUX e TURCO, 1999).

1.7 Tratamento das leishmanioses

Os antimoniais pentavalentes, como o Pentostan e o Glucantime, têm sido utilizados há muitos anos para tratamento das leishmanioses. (FRÉZARD et al., 2009; RATH et al., 2003; CHAKRAVARTY et al., 2010). Embora estes fármacos sejam de primeira escolha e apresentem resultados clínicos satisfatórios contra a leishmaniose tegumentar, o tratamento da doença apresenta eficácia limitada e desvantagens como: administração parenteral diária, toxicidade, tratamentos prolongados e hospitalização do paciente (FRÉZARD et al., 2009; CHAKRAVARTY et al., 2010). O tratamento da leishmaniose tegumentar pode ser local ou sistêmico, isto depende do progresso da lesão, da cepa de *Leishmania*, da possibilidade de disseminação e

consequências estéticas e funcionais (MINODIER e PAROLA, 2007; CHAKRAVARTY et al., 2010).

Ao mesmo tempo em que aparecem novos fármacos, nos últimos 20 anos, nota-se que os antimoniais pentavalentes padrões podem estar sendo comprometidos pelo desenvolvimento de resistência de cepas de *Leishmania*, o que compromete seu uso na rotina clínica (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010; MOHAMMADZADEH et al., 2013). Esse aumento crescente pode ser agravado pelas variações na farmacocinética e na sensibilidade das espécies de *Leishmania* aos componentes do medicamento (CHAKRAVARTY et al., 2010).

Os medicamentos de segunda escolha são utilizados quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial, pacientes em estado grave, gestantes ou na impossibilidade de seu uso (GONTIJO e CARVALHO, 2003; MURBACK et al., 2011; REVEIZ et al., 2013). Estes medicamentos receberam esse status, pois, eram considerados mais propícios a causar efeitos tóxicos sérios ou irreversíveis (por exemplo, insuficiência renal) (CHAKRAVARTY et al., 2010). Esse grupo é representado, principalmente, pelo isotionato de pentamidina e pela anfotericina B (AmB) (SAMPAIO et al, 2003; DEMICHELI et al., 2002). O primeiro é administrado por via intravenosa e tem alta toxicidade, principalmente para idosos, nefropatas e cardiopatas. Este medicamento é utilizado na América do Sul para tratar a LC, quando causada por *L. guyanensis*, por essa ser pouco vulnerável aos antimoniais (SAMPAIO et al, 2003; DEMICHELI et al., 2002; GOSWAMI et al., 2015). Por outro lado, a AmB possui reconhecida ação leishmanicida, principalmente no tratamento das lesões mucosas e é indicada como primeira opção no tratamento de pacientes gestantes com LC e/ou com coinfeção *Leishmania/HIV* (GONTIJO e CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

As propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis da AmB contribuem para a baixa solubilidade e fraca biodisponibilidade oral (KAYSER et al., 2003). Este medicamento não é absorvido no trato gastrointestinal, o que limita a sua administração por via oral e, por isso, é administrado por via parenteral (KAYSER et al., 2003; CHAKRAVARTY et al., 2010).

Apesar dos reconhecidos efeitos terapêuticos da AmB, a maioria dos pacientes apresenta alguns efeitos adversos como febre, náuseas, vômitos, cefaléia, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas (DEMICHELI et

al., 2002; SAMPAIO et al, 2003; RAHAL et al., 2014). A via de administração endovenosa juntamente com as reações adversas graves dificultam seu uso fora do ambiente hospitalar (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

A anfotericina B é um macrolídeo extraído da *Streptomyces nodosus* descrito em 1950. Refere-se a um antifúngico de amplo espectro utilizado no tratamento de infecções sistêmicas que representem risco (KLEINBERG, 2006; CIFANI et al., 2012). Seu efeito como agente antifúngico se deve à presença de ergosterol na membrana plasmática da maioria dos fungos parasitas, alvo preferencial da AmB. Assim como os fungos, *Leishmania* também possui ergosteróis parecido com o ergostano em sua membrana plasmática, sendo este seu principal esteroide de membrana (OUELLETTE et al., 2004). Este caso, pode explicar a eficiência da AmB contra o parasito. Não obstante de sua reconhecida ação, o uso de AmB está relacionado com resistência por parte da *Leishmania* após o longo tratamento (AL-MOHAMMED et al., 2005; PURKAIT et al., 2015).

A AmB também está disponível formulada em lipossomos, o que levou a uma certa melhoria tanto na eficácia do fármaco quanto na diminuição de seus efeitos citotóxicos, dependendo do agente infeccioso. Apesar desta melhora, a infusão hospitalar prolongada ainda é necessária e os efeitos adversos ainda são relevantes (MOEN; LYSENG-WILLIAMSON; SCOTT, 2009; SUNDAR et al., 2014; CUNHA et al., 2015).

A eficiência do tratamento depende de muitos aspectos, como resposta imune do hospedeiro, respostas clínicas e a suscetibilidade da espécie de *Leishmania* (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). Os tratamentos são avaliados na base da eficácia, tolerância e viabilidade da administração, além dos custos do tratamento. Encontra-se uma variação regional na resposta aos medicamentos para a leishmaniose e a recomendação para o tratamento da doença varia em diferentes regiões (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). Entretanto, os medicamentos disponíveis com ação leishmanicida são limitados e falhos, devido serem altamente tóxicos, poucos tolerados e com efetividade regular (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). As falhas no tratamento são agravadas quando associadas a coinfeção com vírus HIV ou outras doenças de natureza imunológica, farmacológica ou fisiológica (GIANOTTI et al., 2008).

A busca por terapias alternativas é essencial no combate à infecção por *Leishmania* devido aos elevados custos dos tratamentos que, muitas vezes, não são bem tolerados pelos pacientes (LAUNOIS et al., 2008). Diante destes fatos, justifica-se a busca por novas substâncias terapêuticas, sendo o uso de microrganismos endofíticos um caminho promissor para o controle da leishmaniose. Uma das vantagens na utilização dos endofíticos está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de moléculas bioativas (SCHUTZ, 2001). Por isso, a escolha do endofítico *Paenibacillus polymyxa* RNC-D isolado do cerrado de São Carlos – SP para esta pesquisa decorreu da literatura não apresentar dados sobre sua ação em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

2. OBJETIVO GERAL

Os medicamentos utilizados para combater a *L. (L) amazonensis* apresentam reações adversas severas e são encontradas cada vez mais cepas do parasito resistentes a estes medicamentos. Dessa forma, o objetivo foi estudar o extrato total liofilizado do endofítico *Paenibacillus polymyxa* RNC-D no modelo experimental da leishmaniose *in vitro*, com a tentativa de obter uma nova terapia contra a doença.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito leishmanicida do extrato de *P. polymyxa* RNC-D em forma promastigota e determinar a EC₅₀;
- Avaliar ação do extrato de *P. polymyxa* RNC-D na forma amastigota de *L. amazonensis*;
- Quantificar a produção de óxido nítrico em macrófago RAW 264.7 após a exposição à diversas concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D;
- Quantificar a produção de óxido nítrico por linhagem de macrófago RAW 264.7 infectado com *L. amazonensis*, após a exposição à diferentes concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D;
- Quantificar a produção de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-4 por linhagem de macrófago RAW 264.7 infectado com *L. amazonensis*, após a exposição à diferentes concentrações do extrato de *Paenibacillus polymyxa* RNC-D.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cedidas pelo prof. Dr. Sergio de Albuquerque da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Esta linhagem é rotineiramente mantida por meio de repiques em meio de cultura axênica semanalmente e também passadas serialmente em camundongos BALB/c para manutenção da virulência.

O meio de cultura utilizado foi o 199 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementando com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Vitrocell-Embriolife, BRA), 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) e 10% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA), sendo a cultura mantida em estufa a 25° C. O crescimento das promastigotas foi monitorado diariamente através de contagem em câmara de Neubauer para gerar a curva de crescimento.

3.2 Cultura de macrófago RAW 264.7

A linhagem de macrófago murino RAW 264.7 foi cedida pelo prof. Dr. Otávio Thiemann, do Instituto de Física de São Carlos (IFSC – USP II) e foi cultivada em meio DMEM (Sigma-Aldrich, EUA). O meio de cultura foi suplementado com 10% de SBF inativado (Vitrocell-Embriolife, BRA), 1% de mix de antibióticos penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA). Para realização dos experimentos, as células foram mantidas em garrafas de cultivo e para o desprendimento do tapete celular das garrafas foi usado ação mecânica com auxílio de “cell scraper” (TPP®). A suspensão celular foi distribuída em novos frascos de cultura estéreis, mantidos em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C.

3.3 Viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* - Método de MTT

Para este ensaio, foi utilizado o método colorimétrico de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) para a avaliação de toxicidade e viabilidade dos parasitos. Foram utilizadas

placas de 96 poços e em cada poço foi adicionado 100 µL de 1×10^7 de promastigotas na fase estacionária, com várias concentrações (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) do extrato. Como controle negativo foi adicionado apenas meio de cultura e como controle positivo foi adicionado 100 µM de Anfotericina B por poço (Sigma-Aldrich, EUA). Para cada grupo foi realizado um branco. Após 24 e 48 horas de tratamento, foi adicionado 100 µL em cada poço de uma solução com 0,5 mg/mL de MTT, diluído em tampão fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich, EUA) e meio de cultura incompleto. As placas foram incubadas a temperatura de 25°C, ao abrigo da luz, durante 4 horas.

Para a solubilização dos cristais de formazan, 100 µL de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço. Dando continuidade, a leitura da absorbância foi realizada com um comprimento de onda de 550 nm em um espectrofotômetro de placa (TP-Reader NM-Thermo Plate) (NEVES, 2016).

A porcentagem da viabilidade de promastigotas foi calculada com a absorbância de células não tratadas (controle negativo) representando 100% da viabilidade celular (% de células vivas = $\frac{\text{Abs. Teste} \times 100}{\text{Abs. do controle negativo}}$). O valor da EC₅₀ foi obtido a partir dos valores da concentração citotóxica e calculado a partir da porcentagem de células viáveis. Foram realizados três experimentos independentes (quintuplicata).

3.4 Infecção de macrófago RAW 264.7 com *L. amazonensis* e posterior tratamento com o extrato de *P. polymyxa* RNC-D

Para a realização do experimento, um volume de 500 µL de meio de cultura contendo 1×10^5 células/poço foi adicionado em placas de 24 poços previamente ocupadas com lamínulas de vidro estéreis e incubadas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C por 24 horas para adesão. Em sequência, o sobrenadante foi descartado e em cada poço foi adicionado 4×10^5 (4 parasitos/célula) de promastigotas (fase estacionária) em um volume de 500 µL de meio de cultura. Logo após, as placas foram centrifugadas a 3.000 rpm /5 min /25° C para melhor interação parasito-célula, e então levadas para estufa de CO₂ (5%), a 37 °C por 24 horas (tempo de fagocitose do parasito). Após este período, 500 µL de várias concentrações do extrato (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) foram adicionados nos poços, enquanto que para o controle negativo e controle positivo foi adicionado apenas meio de cultura e 100 µM de anfotericina B,

respectivamente. As placas foram levadas para a estufa nas mesmas condições anteriores por 24 e 48 horas. Após os períodos estabelecidos o sobrenadante foi retirado (reservado para análises de NO e ELISA) com auxílio de uma pipeta e os poços foram lavados com 500 µL PBS 1X em temperatura ambiente para a retirada de possíveis parasitos extracelulares. Em seguida, adicionou-se 10 µL de SFB para a fixação das lâminas e posteriormente foram coradas com 250 µL de panótico rápido (Laborclin). Dando continuidade, as placas foram lavadas com 500 µL de água por três vezes e as lâminulas foram retiradas dos poços para a secagem. Para a fixação das lamínulas em lâminas de microscopia, foi utilizado 10 µL de entellan (Merck, EUA) e após secagem, as lâminas foram levadas ao microscópio Olympus BX41 (objetiva de imersão-100x) para a captura das imagens. Para a contagem das células e da forma amastigota foi utilizado o programa ImageJ versão 1.51u. Foram contadas 100 células de três experimentos. O índice de infecção foi obtido multiplicando-se a porcentagem de células infectadas pelo número médio de parasitos por células infectadas, observando-se posteriormente as diferenças entre os grupos controle, tratados e não tratados (MORATO, 2013).

3.5 Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 e após a infecção com *L. amazonensis* frente ao extrato de *P. polymyxa* RNC-D

Para mensurar a produção de NO, 1×10^5 células/poço em 200 µL foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas para aderência. Em seguida foi retirado o sobrenadante e adicionado meio de cultura contendo o tratamento com diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) do extrato. Como controle positivo foi adicionado 100 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich, EUA) e para o controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura. Já para a dosagem de NO em macrófagos infectados com promastigotas, um volume de 500 µL de meio de cultura contendo 1×10^5 células/poço foi plaqueado em placas de 24 poços previamente ocupados com lamínulas de vidro estéreis e permanecendo nas mesmas condições anteriores, sendo incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas. Após a adesão, 4×10^5 de parasitos (4 parasitos/célula) por poço foram adicionados nas placas e levado para estufa por 24 horas. Em seguida, a placa foi lavada para a remoção dos parasitos que não foram fagocitados pelos macrófagos. Logo após, foi adicionado o tratamento com

diversas concentrações (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) do extrato, com seus respectivos controles como mencionado anteriormente e com 100 µM de anfotericina B. A quantificação de NO foi realizada nos períodos de 24 e 48 horas após a infecção.

Após os tempos estipulados, um volume de 100 µL do sobrenadante (dos tratados e controles) foi retirado e a ele adicionado 100 µL do reagente de Griess (diamina di-hidroclorido naftaleno-NEED a 0.1% diluído em água destilada (Sigma-Aldrich, EUA), sulfanilamida a 1% (Sigma-Aldrich, EUA) diluída em ácido sulfúrico a 5% (Dinâmica Ltda -BRA)) (GREEN et al., 1982). A produção de NO foi estimada pela quantificação do metabólito estável de NO, o nitrito (NO²⁻). A absorbância a 550 nm foi medida em um espectrofotômetro de placa (TPReader NM-ThermoPlate) após 15 minutos. A concentração de nitrito no sobrenadante foi quantificada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio em µM.

3.6 Quantificação de citocinas pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para a quantificação das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-4 e IL-12 foram utilizados os sobrenadantes de cultura de macrófago J774A.1 infectados com *L. amazonensis* expostas às concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mg/mL do extrato, após 24 e 48 horas com seus respectivos controles já mencionados. O procedimento foi realizado conforme protocolo do fabricante (BD Biosciences®).

Inicialmente, placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100µL/poço de uma solução contendo o tampão e anticorpo primários específicos para cada citocina. As placas foram incubadas por até 18h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas e foi adicionado 200 µL da solução de bloqueio (PBS com 5% de albumina de soro bovino - BSA). Novamente, as placas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente e depois lavadas. Em seguida, foram adicionadas a curva padrão com as respectivas diluições e as amostras (100 µL/poço). O ensaio foi realizado em triplicata. Após 2 horas de incubação, houve um novo ciclo de lavagem e 100 µL do anticorpo de detecção foram adicionados aos poços (anticorpo secundário com streptavidina conjugado com a enzima peroxidase). Após incubação a temperatura ambiente por uma hora e meia, outro ciclo de lavagem foi realizado e 100 µL/poço de substrato de tetrametilbenzidina (Revelador TMB 1:1) foi adicionado pelo tempo de até 30 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 50

μL/poço de Solução Stop (2N H₂SO₄). A leitura da absorvância foi obtida no comprimento de onda de 450 nm em um espectrofotômetro de placa (TPReader NM-ThermoPlate). As soluções e o fator das diluições foram realizadas de acordo com o kit de cada citocina. A análise foi feita a partir da curva de titulação dos padrões das citocinas e as concentrações finais foram determinadas em pg/mL.

3.7 Análise estatística

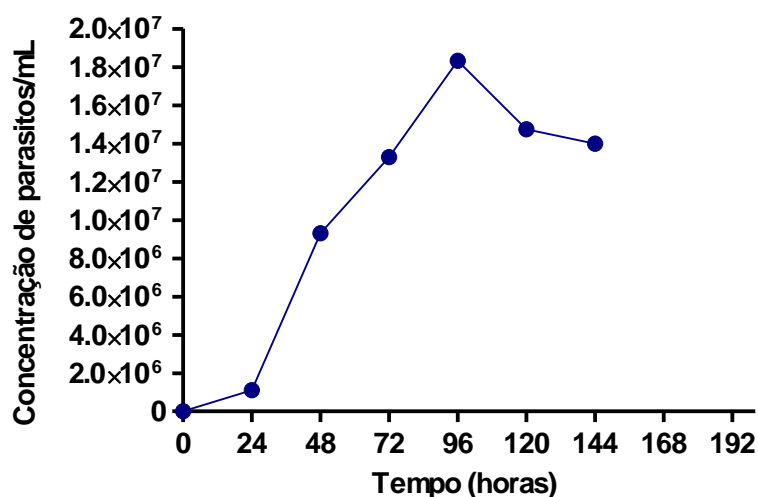
Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (2005) (San Diego, Califórnia, USA). Foi aplicado, para todos os dados obtidos, o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, para os dados paramétricos foi utilizado o teste *One-way ANOVA (One-way Analysis of Variance)* e o pós-teste foi realizado pelo método de Tukey (*Tukey's Multiple Comparison Test*). Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste foi realizado pelo método de Dunn (*Dunn's Multiple Comparison Test*). A significância estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$. Para calcular os valores de EC₅₀, foram feitas regressões não lineares das médias dos valores encontrados para cada concentração em, pelo menos, três experimentos independentes.

4. Resultados e Discussão

4.1 Cultivo das formas promastigotas de *L. amazonensis*

Por meio da curva de crescimento (Figura 3) é possível determinar a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento de microrganismos em cada forma de cultivo. Em nosso estudo, a fase exponencial tardia e a fase estacionária foram determinadas observando-se a curva de crescimento e a morfologia das promastigotas. Para *L. amazonensis*, a fase exponencial tardia e a fase estacionária ocorreram em 96 e 120 horas de cultivo, respectivamente.

Figura 3. Curva de crescimento da forma promastigota de *L. amazonensis*.



Fonte: Arquivo pessoal.

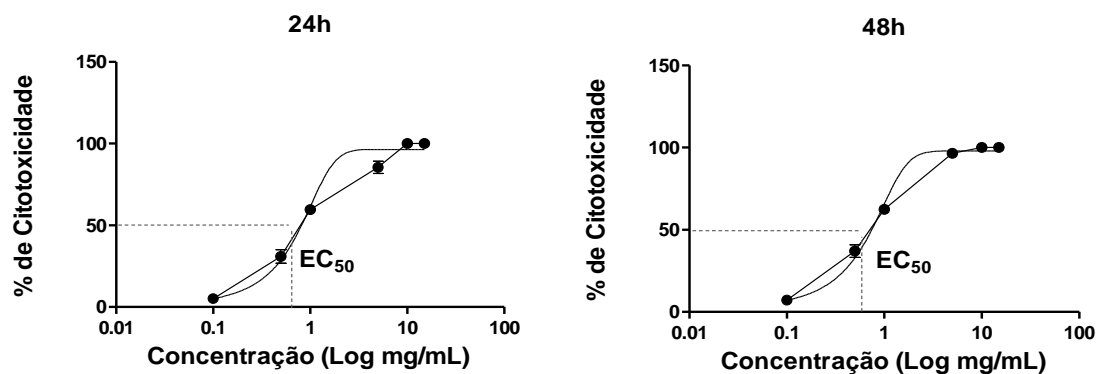
Ao longo do cultivo (*in vitro*) das promastigotas de *Leishmania* ocorrem as formas promastigotas procíclicas e promastigotas metacíclicas. Promastigotas procíclicas são formas mais alongadas, não infectivas para o hospedeiro mamífero e que replicam ativamente, sendo predominantes na fase exponencial de crescimento *in vitro*. Formas procíclicas, *in vivo* são encontradas no intestino médio do inseto vetor, se multiplicam e se diferenciam em formas infectivas metacíclicas. As formas promastigotas metacíclicas são pequenas, delgadas, com flagelo longo e que podem ser encontradas em grande número em uma população de fase estacionária *in vitro*.

Já, *in vivo*, as formas metacíclicas são encontradas no intestino anterior do inseto vetor e são altamente infectivas para o hospedeiro mamífero (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998).

4.2 Avaliação da atividade leishmanicida do extrato de *P. polymyxa* RNC-D sobre promastigotas de *L. amazonensis*

A toxicidade do extrato foi testada, pelo método do MTT, em várias concentrações (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 15 mg/mL) em promastigotas de *L. amazonensis* nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento (Figura 4). O resultado obtido foi comparado ao controle negativo, determinando assim a EC₅₀ nos períodos analisados. Os valores da EC₅₀ obtidos são mostrados na Tabela 1. Já para o ensaio leishmanicida, as porcentagens de morte causada pelo extrato foram determinadas para cada concentração (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 15 mg/mL) nos períodos de 24 e 48 horas a partir da comparação com o grupo infectado (sem tratamento). O método MTT foi utilizado para a realização deste ensaio. A tabela 2 apresenta os valores de porcentagem da mortalidade de diversos grupos, para ambos os períodos mencionados: grupo infectado, grupo tratado com 100 µM de anfotericina B e grupos tratados com várias concentrações do extrato. As imagens da figura 5 apresentam a condição das promastigotas pertencentes aos referidos grupos, apenas para o período de 24 horas.

Figura 4. Gráficos concentração-resposta de citotoxicidade (%) de promastigotas de *L. amazonensis* expostos a diferentes concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D.



Legenda: A figura mostra os valores EC₅₀, obtidos com o software GraphPad Prism 5, com intervalos de confiança de 95%. Resultados obtidos através do ensaio MTT.

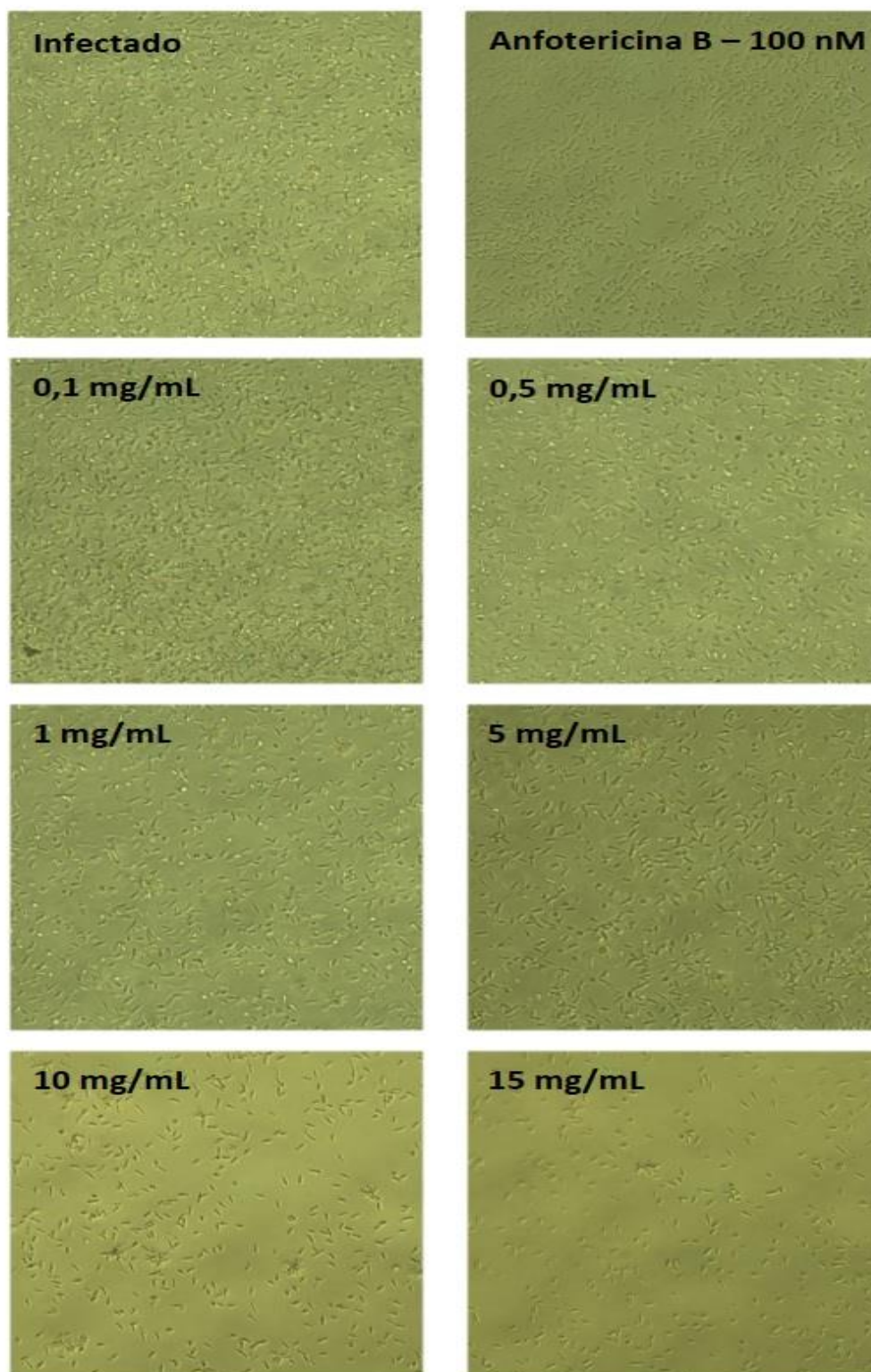
Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 1. Valores de EC₅₀ para os períodos de 24 e 48 horas em promastigotas de *L. amazonensis*.

Tempo de Exposição	EC ₅₀ (mg/mL)	Intervalos de Confiança- 95%
24h	0,624	0,503 – 0,745
48h	0,547	0,431– 0,664

Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 5. Ensaio leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Aumento de 400X.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 2. Porcentagem de morte de promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas por 24 e 48 horas com várias concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D e de anfotericina B.

Tempo	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL	Anfo. B 100 µM
24 horas	5%	31%	59%	87%
48 horas	10%	35%	62%	94%

Fonte: Arquivo Pessoal.

Neste ensaio avaliou-se a capacidade do extrato de promover a morte de promastigotas de *L. amazonensis*. Os valores da EC₅₀ obtidos para os períodos de 24 horas e de 48 horas foram de 0,624 mg/mL e de 0,547 mg/mL, respectivamente (Tabela 1). Neris e colaboradores (2017) observaram o efeito do extrato em fibroblasto BALB/3T3 e em macrófago J774A.1. Nesse ensaio foi reportado que no período de 48 horas a taxa de mortalidade de 50% foi em torno de 1,171 mg/mL para fibroblasto e de 0,994 mg/mL para macrófago. Isto mostra que as promastigotas de *L. amazonensis* foram mais sensíveis à ação do extrato do que as células em questão, já que a concentração necessária para a morte de 50% das promastigotas causa a morte de menos de 50% das células relatadas no período de 48 horas. Esta disparidade pode ter ocorrido pelo fato de que as promastigotas possuem mais de 60 % de lipofosfoglicano aniônico na membrana plasmática (MARR; MCGWIRE; MCMASTER, 2012). Estas moléculas são carregadas negativamente, atraindo os PAMs, por serem positivamente carregadas (YEAMAN e YOUNT, 2003; EBENHAN et al., 2014).

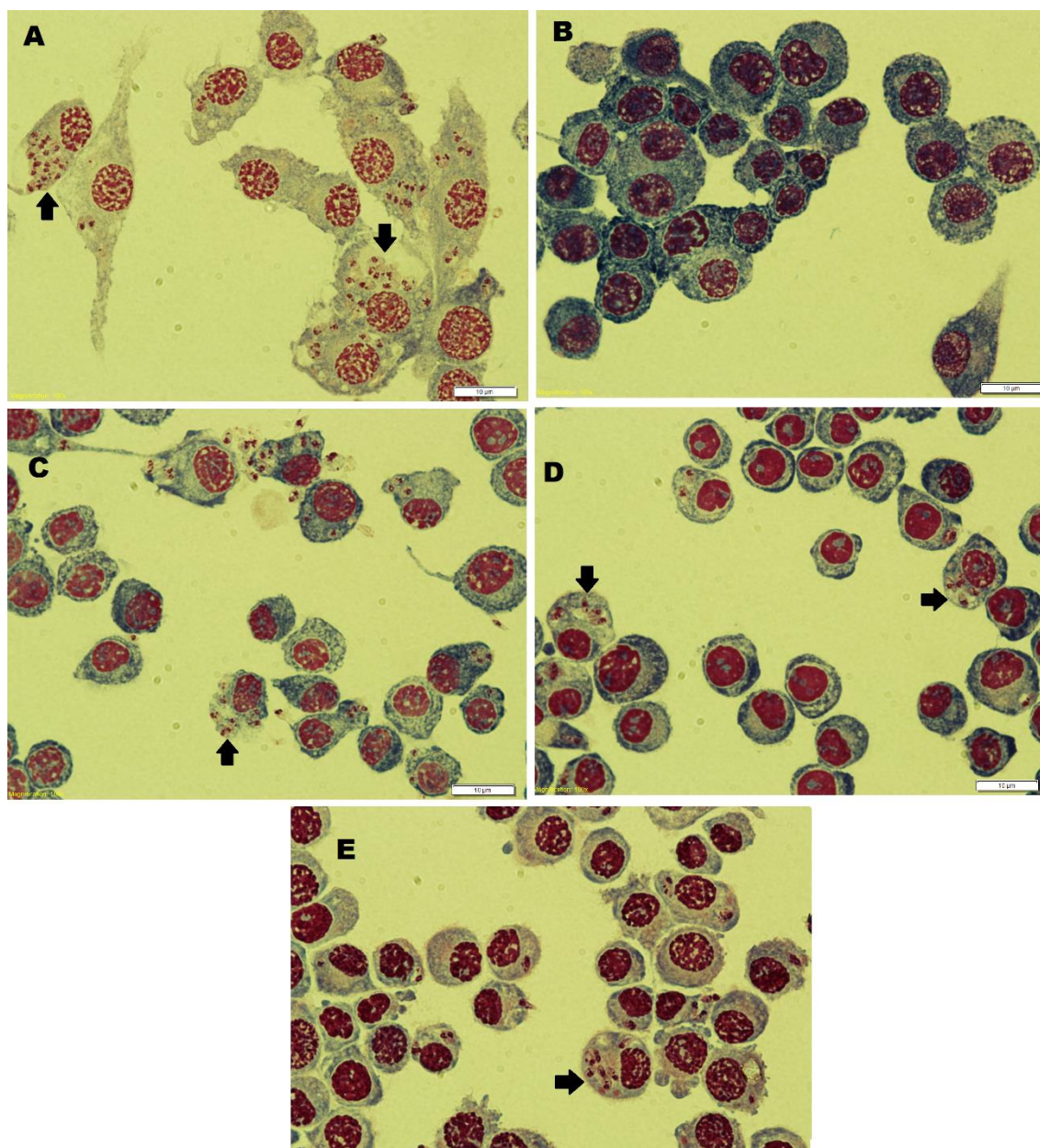
Em relação à porcentagem de morte das promastigotas, nossos resultados mostraram que a concentração de 0,5 mg/mL induziu a morte de 31% no período de 24 horas e 35% no período de 48 horas. Já para a concentração de 1mg/mL do extrato, a porcentagem de morte no período de 24 horas foi de 59% e de 62% no período de 48 horas (Tabela 2). A morte das promastigotas observadas em nossos estudos pode ter sido causada pela ação do extrato, que neste caso ocasionou danos

à membrana plasmática e conseqüentemente a morte do parasito (Tabela 2). Sabe-se que os PAMs agem diretamente na membrana plasmática, sendo esta barreira muito importante para o estabelecimento e aquisição de nutrientes. Portanto, fármacos que desestabilizam a superfície da membrana plasmática, nas suas funções e integridade, podem ser considerados bons quimioterápicos para o tratamento de leishmanioses (BURCHMORE e BARRET, 2001).

4.3 Avaliação da atividade leishmanicida em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e posterior tratamento com o extrato de *P. polymyxa* RNC-D

Macrófagos RAW 264.7 murinos foram cultivados sobre lamínulas, infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e tratados. As lamínulas foram fixadas e coradas para posteriormente serem analisadas. As imagens da microscopia (representativo) estão apresentadas na (Figura 6) apenas no período de 24 horas com as respectivas concentrações. A partir das imagens das lâminas foi possível fazer a contagem das formas amastigotas (Tabelas 3 e 4).

Figura 6. Macrófagos RAW 264.7, após 24 horas de infecção com *L. amazonensis*, com respectivos tratamentos e número variável de formas amastigotas intracelulares. Aumento de 1000X.



Legenda: (A) Macrófagos apenas infectados (sem tratamento); (B) infectados e tratados com anfotericina B 100 µM; (C) infectados e tratados com 0,1 mg/mL do ETL; (D) infectados e tratados com 0,5 mg/mL do ETL e (E) infectados e tratados com 1 mg/mL do ETL de *P. Polymyxa* RNC-D.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 3. Porcentagem de células infectadas com *L. amazonensis* e média de amastigota por célula no período de 24 horas.

GRUPO	% de células infectadas	Média de amastigota por célula
Controle	53±2,5	4,5±0,02
0,1 mg/mL	23±5	2,5±0,08
0,5 mg/mL	25±5	3,3±0,5
1 mg/mL	25±4	3,2±1,07
Anfo. B 100 µM	0	0

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 4. Porcentagem de células infectadas com *L. amazonensis* e média de amastigota por célula no período de 48 horas.

GRUPO	% de células infectadas	Média de amastigota por célula
Controle	25±4,5	3,2±1,1
0,1 mg/mL	22±5,5	2,2±0,4
0,5 mg/mL	23±5	2,3±0,5
1 mg/mL	23±0	2,2±0
Anfo. B 100 µM	0	0

Fonte: Arquivo pessoal.

Os testes *in vitro* constituem uma primeira etapa para avaliação da eficácia de novos fármacos contra a leishmaniose. Neste caso são utilizadas as formas promastigotas e amastigotas (GUPTA e NISHI, 2011). A susceptibilidade a medicamentos padrão em comparação com as formas amastigotas e promastigotas, e as diferenças bioquímicas que existem entre elas, tornam esse modelo benéfico para a busca de toxicidade de novas moléculas (CROFT et al., 2006).

Observa-se na Tabela 3 que a porcentagem de células infectadas do grupo controle foi de 53% com uma média de 4,5 amastigotas/célula. Já nos grupos tratados com 0,1; 0,5 e 1 mg/mL do extrato foi observado uma porcentagem de aproximadamente 25 % de células infectadas com média de 3 amastigotas/células, o que representa uma redução de 50% de células infectadas quando comparada ao grupo infectado. No grupo tratado com anfotericina B não foi detectado células infectadas com a forma amastigota. Foi observado um menor número de células (dados não apresentados) quando comparado com o controle e tratamento. Tal fato pode ser explicado pela ação citotóxica da AmB que pode ter contribuído com a morte dos macrófagos. No período de 48 horas, para o grupo infectado, observa-se uma diminuição de células infectadas ($\approx 25\%$), com média de 3 amastigotas/célula, quando comparado com o período de 24 horas. No mesmo período, nos grupos tratados com 0,5 e 1 mg/mL do extrato, a porcentagem de células infectadas foi de 23%, com aproximadamente 2 amastigotas/célula. Nota-se que no período de 24 horas a diminuição de amastigotas dos grupos tratados com o extrato, quando comparado ao grupo infectado, foi expressiva, o que não foi observado no período de 48 horas, observando-se uma estabilidade da % de célula infectada (Tabela 4). Isto pode ser explicado pelo fato de que macrófagos infectados com *L. amazonensis*, mesmo na presença de IFN- γ e TNF- α , não conseguem eliminar os parasitos por completo, devido a formação do vacúolo parasitóforo, o que pode comprometer a ação leishmanicida do NO, ROS e favorecer a manutenção da infecção (WILSON et al., 2008; CALEGARI-SILVA et al., 2015).

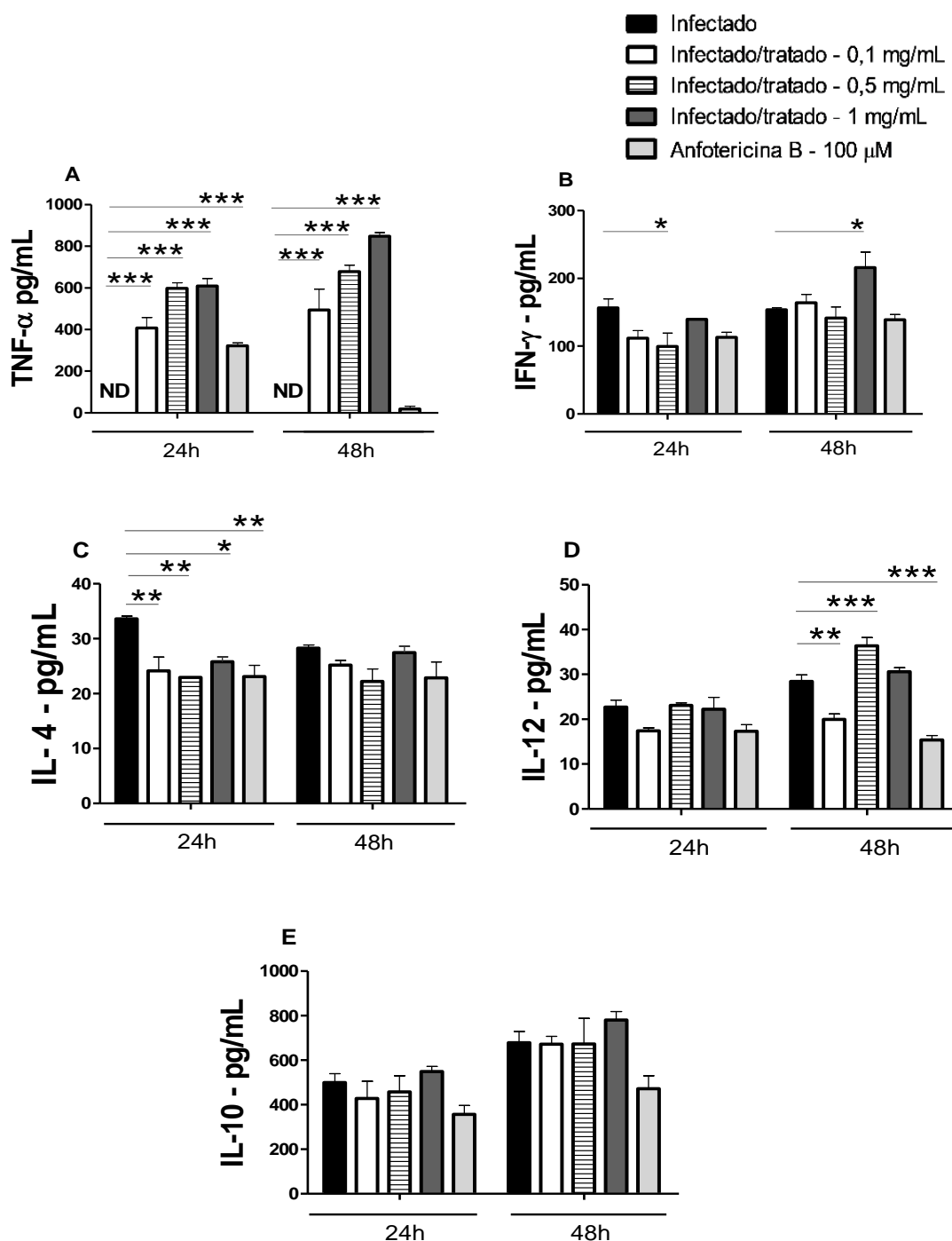
É importante destacar que para uma melhor análise da ação de fármacos contra *Leishmania* é necessário que a taxa de infecção celular esteja em aproximadamente 30-60%. Visto que, não se deve conter grandes quantidades de amastigotas por célula, em razão de que o excesso de amastigotas torna a avaliação fatigante.

Testes preliminares realizados em nosso laboratório (dados não apresentados) nos levaram a determinar a taxa de parasitos por célula (4:1). Uma vez que nos forneceu infecção $\geq 50\%$ com um grande número de amastigotas intracelulares, devido a características de infectividade desta espécie de *Leishmania* (CHANG, 1980).

4.4 Dosagem de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10

A Figura 7 mostra a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-10 pela linhagem de macrófago RAW 264.7 em 24 e 48 horas após a infecção com *L. amazonensis* e posterior tratamento com várias concentrações do extrato de *P. polymyxa* RNC-D. Verificou-se que, durante o período de 24 horas, houve aumento significativo de TNF- α , IFN- γ e IL-4 (Figuras 7A/B/C), enquanto que, no período de 48 horas houve também um aumento significativo de TNF- α e IFN- γ , além da produção de IL-12 e IL-10 (Figuras 7A/B/D/E).

Figura 7. Detecção de citocinas após a infecção com *L. amazonensis* e posterior tratamento com extrato de *P. polymyxa* RNC-D.



Legenda: O símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ representam a diferença significativa entre o grupo expostos ao ETL quando comparado com o grupo infectado (sem tratamento) nos períodos de 24 e 48 horas. ND - não detectado.

Fonte: Arquivo pessoal.

A espécie *L. amazonensis* é conhecida por inibir a resposta imunológica da célula hospedeira, interferindo nas vias de sinalização intracelular da célula hospedeira para evitar uma resposta imune efetiva, subvertendo deste modo a maquinaria celular e modulando o ambiente a seu favor. (OLVIER et al., 2005; ALMEIDA et al. 2012).

Foi relatado que macrófagos infectados com *L. amazonensis* produzem menos TNF- α mesmo na presença de IFN- γ (GOMES, et al., 2003; HORTA, et al., 2012). Isto indica que a ativação de macrófagos infectados com *L. amazonensis* é deficiente, pelo menos *in vitro* (GOMES, et al., 2003; HORTA, et al., 2012). Nossos achados corroboram com este fato. Foi observado no grupo apenas infectado com *L. amazonensis* a não produção de TNF- α (Figura 7A), mesmo com a detecção de IFN- γ (Figura 7B). Já para todos os grupos infectados e tratados (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) com extrato, houve um aumento significativo na produção de TNF- α quando comparado com o grupo infectado, no período de 24 e 48 horas. Quanto à citocina IFN- γ , só foi observada a sua produção significativa no período de 48 horas na concentração de 1 mg/mL do extrato.

A não detecção significativa de IFN- γ nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL pode ser explicada pela ação da citocina regulatória IL-10. Já para o grupo tratado com anfotericina B houve uma produção significativa de TNF- α apenas no período de 24 horas. O IFN- γ é essencial na ativação de macrófagos no combate a *Leishmania*. Esta citocina eleva a síntese da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e radicais reativos de nitrogênio tóxicos para o parasito (GREEN et al., 1990a; GREEN et al., 1990b; LIEW; LI; MILLOTT, 1990; ASSREUY et al., 1994). Diante dos nossos resultados sugere-se que o extrato foi capaz de induzir a produção significativa de TNF- α em macrófagos RAW 267 após a infecção com *L. amazonensis* (Figura 7A)

Sabe-se que a IL-12 ativa a produção de IFN- γ e conseqüentemente a diferenciação de células T em Th1. Este processo leva a produção de IFN- γ que resulta na produção de NO e morte da *Leishmania* (AFONSO et al., 1994; SACKS e NOBEN, 2002; ALEXANDER e BRYSON, 2005). Dessa forma, a IL-12 participa no início de uma resposta celular protetora contra a doença (AFONSO et al., 1994). Nossos resultados mostraram que houve uma produção significativa de IL-12 no grupo infectado e tratado com 0,5 mg/mL (Figura 7D). Já para as outras concentrações do extrato (0,1 e 1 mg/mL), não houve produção significativa desta citocina, o que pode

ser resultado da regulação da IL-10, uma vez que foi observado a produção significativa de NO no período de 24 e 48 horas em macrófagos apenas expostos ao extrato em questão (NERIS, 2017).

Sabe-se que a resistência contra infecção está correlacionada com uma resposta Th1 induzida por IL-12 e IFN- γ , pesquisas utilizando diversos modelos experimentais (como camundongos geneticamente deficientes) têm questionado sobre a IL-4 no progresso de lesões crônicas. Pesquisas *in vivo* determinaram que a IL-4, durante o estágio inicial da infecção é essencial no desenvolvimento de células Th2. Este fato foi comprovado pelo uso de anticorpos anti-IL-4 a camundongos BALB/c (infectados com *L. major*), no início da infecção, que eliminava a polarização Th2, proporcionando uma expansão de células Th1 com consequente cura da lesão (SADICK et al., 1990). Em nossos achados *in vitro* com *L. amazonensis*, observou-se uma diminuição significativa de IL-4 em todos os grupos infectados/tratados com o extrato no período de 24 horas quando comparado com o grupo apenas infectado. (7 C).

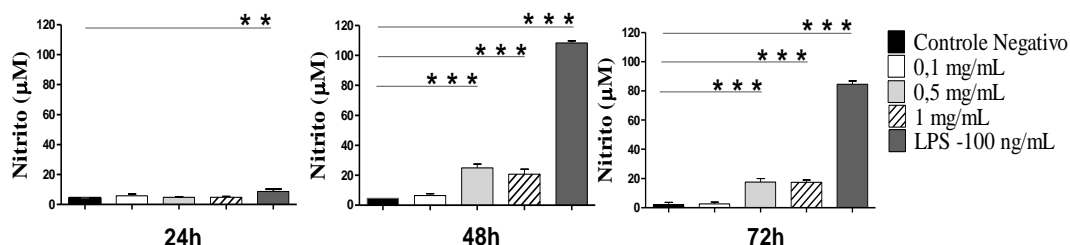
Estes resultados se mostraram relevantes, uma vez que citocinas como IL-4, IL-10 IL-13 promovem a replicação e sobrevivência dos parasitos (WANASEN et al., 2007; INIESTA, et al., 2002; da SILVA, et al., 2012). Em relação à citocina IL-10, o estudo de KANE e MOSSER (2001) mostrou que a interação da *Leishmania* com receptores na superfície do macrófago induziu preferencialmente a produção de altos níveis de IL-10. Esta citocina produzida pelos macrófagos murinos infectados com *L. major* inibiu a ativação da IL-10 e diminuiu sua produção de citocinas inflamatórias (KANE e MOSSER, 2001). Com relação ao presente estudo, os resultados obtidos mostraram que não houve uma produção significativa de IL-10 em todos os grupos tratados/infectados com o extrato (Figura 7E), o que pode ter ocorrido devido a uma modulação na resposta Th1/Th2 neste modelo experimental.

Embora o papel biológico fundamental dos PAMs seja a atividade antimicrobiana, estudos têm revelados novas funções para estas moléculas, incluindo atividade imunomodulatória, cicatrização de feridas e propriedades anti-neoplásicas (BROWN e HANCOCK, 2006; STEINSTRAESSER et al., 2008; NERIS, et al., 2017; CAVICCHIOLI, 2017) e antiparasitárias. A ação dos PAMs, juntamente com uma resposta imunológica efetiva, pode ser de grande valia para o combate da leishmaniose.

4.5 Produção de óxido nítrico por macrófago RAW 264.7

A Figura 8 apresenta a produção de óxido nítrico pelo macrófago RAW 264.7 exposto a diferentes concentrações (0,1; 1 e 0,5 mg/mL) do extrato, assim como dos grupos controles nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Como controle negativo, foi utilizado apenas meio de cultura e como controle positivo 100 ng/mL de LPS. Os dados apresentados na Figura 8 também são exibidos numericamente na Tabela 5.

Figura 8. Quantificação de NO por macrófago RAW 264.7, após exposição com extrato de *P. polymyxa* RNC-D.



Legenda: O símbolos *p <0,05, **p <0,01, *** p <0,001 representam a diferença significativa entre o grupo exposto ao extrato quando comparado com o grupo controle (sem tratamento).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5. Concentração de nitrito dos grupos tratados com extrato de *P. polymyxa* RNC-D e não tratados.

GRUPO	24h (µM)	48h (µM)	72h (µM)
Controle	4,216±0,1 ^{NS}	4,632±0,2 ^{NS}	2,118±0,5 ^{NS}
0,1 mg/mL	5,835±1,5 ^{NS}	6,428±1,7 ^{NS}	2,519±0,6 ^{NS}
0,5 mg/mL	4,726±0,5 ^{NS}	24,936±4,5 ^{***}	17,411±4,6 ^{***}
1 mg/mL	4,868±1,2 ^{NS}	20,636±6,0 ^{***}	17,353±3,4 ^{***}
LPS -100 ng/mL	8,724±2,5 ^{***}	108,385±2,4 ^{***}	84,678±4,7 ^{***}

Legenda: Os símbolos ** p <0,01 e *** p <0,001 representam a diferença significativa entre o grupo tratado quando comparado com o grupo controle (sem tratamento) e NS - sem diferença estatística.

Fonte: Arquivo pessoal.

Verificou-se que, durante o período de 24 horas, houve um aumento significativo de NO apenas do grupo exposto ao LPS quando comparado com o grupo controle negativo (sem tratamento). Já no período de 48 e 72 horas, ocorreu um aumento significativo de NO dos grupos tratados com 0,5 mg/mL e 1 mg/mL do extrato e também do grupo exposto ao LPS, quando comparado com o controle negativo (Tabela 5).

Isto mostra que o extrato, apesar de apresentar uma potencia menor, quando comparado ao LPS, também foi capaz de induzir os macrófagos a produzirem NO. Outro dado observado é que a produção de NO induzida pelo extrato foi dependente do tempo e da concentração, tendo sido mostrado uma produção significativa nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL a partir de 48 horas. Sabe-se que o NO é induzido durante a ativação dos macrófagos e, assim, contribui para o controle da replicação ou neutralização de patógenos intracelulares, como no caso da *Leishmania* (LOWENSTEIN et al, 1994; HORTA et al., 2012).

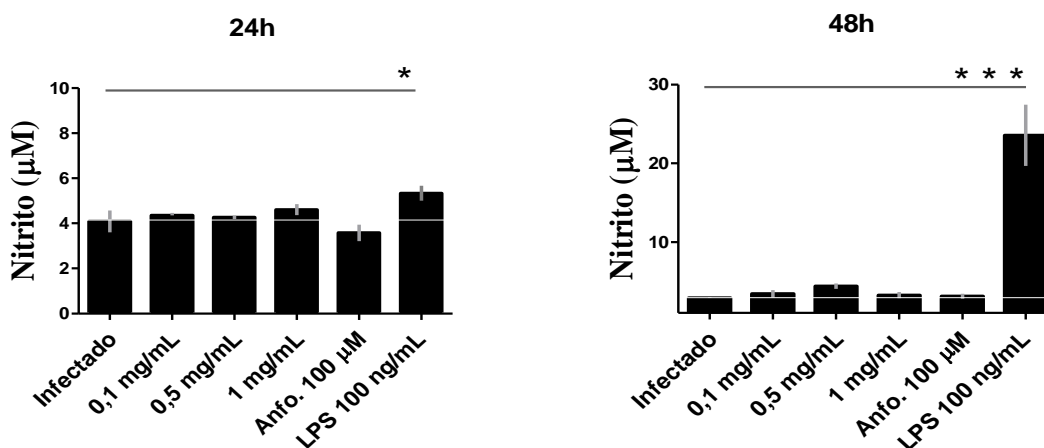
Além disso, estudos mostram que o NO é um mediador crucial em diversas funções biológicas, incluindo a transmissão neuronal, relaxamento vascular, modulação imunológica e citotoxicidade contra células tumorais (LOWENSTEIN et al, 1994; HIROI et al., 2013). Um estudo semelhante ao nosso mostrou que o composto β -glucano produzido por *Paenibacillus polymyxa* JB115 induz a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW264.7, também de forma dependente da concentração e do tempo (ZHI-QIANG et al., 2009). Dessa forma, com base nos nossos achados, sugerimos que nosso extrato tem potencial como imunoestimulante ou até mesmo como adjuvante para algumas vacinas. Apesar disso, mais estudos devem ser realizados para que essas hipóteses sejam validadas.

4.6 Produção de óxido nítrico por macrófago RAW 264.7 durante a infecção com *L. amazonensis* frente ao extrato de *P. polymyxa* RNC-D

A fim de avaliar os efeitos de várias concentrações (0,1; 0,5 e 1 mg/mL) do extrato em macrófagos infectados com a forma amastigota, foi determinado a quantificação da produção de NO em sobrenadante do cocultivo (parasito + célula) celular, nos períodos de 24 e 48 horas. Para o controle positivo foi adicionado 100 μ M

de Anfotericina B e para o controle negativo, apenas meio de cultura. Os dados expressos na Figura 9 também são mostrado numericamente na Tabela 6.

Figura 9. Quantificação de NO por linhagem de macrófago RAW 264.7 após a infecção com *L. amazonensis* com subsequente exposição ao extrato de *P. polymyxa* RNC-D.



Legenda: Os símbolos *p <0,05 e ***p <0,001 representam a diferença significativa entre o grupo infectado/tratado quando comparado com o grupo infectado (sem tratamento).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 6. Concentração de nitrito dos grupos tratados com extrato de *P. polymyxa* RNC-D e não tratados após infecção com *L. amazonensis*.

GRUPO	24h (µM)	48h (µM)
Controle	4,094±0,684 ^{NS}	2,907±0,138 ^{NS}
0,1 mg/mL	4,353±0,159 ^{NS}	3,438±0,665 ^{NS}
0,5 mg/mL	4,268±0,104 ^{NS}	4,394±0,481 ^{NS}
1 mg/mL	4,616±0,352 ^{NS}	3,253±0,542 ^{NS}
Anfo -100 µM	3,585±0,511 ^{NS}	3,137±0,436 ^{NS}
LPS - 100 ng/mL	5,333±0,471*	23,553±5,505***

Legenda: Os símbolos ** p <0,01 e *** p <0,001 representam a diferença significativa entre o grupo tratado quando comparado com o grupo controle negativo (apenas infectado) e NS - sem diferença estatística.

Fonte: Arquivo pessoal.

Nossos resultados mostraram que apenas o grupo infectado/tratado com LPS produziu significativamente NO quando comparado com o grupo infectado (sem tratamento), nos períodos de 24 e 48 horas (Tabela 6). Observa-se que nos resultados anteriores (Tabela 5) o extrato foi capaz de induzir a produção significativa de NO em macrófagos a partir do período de 48 horas. No entanto a não produção de NO diante da infecção e tratamento com o extrato no período de 48 horas pode ser explicado pelo fato de que algumas espécies de *Leishmania* possuem a capacidade de resistir à ação do “burst” oxidativo do macrófago, aparentemente silenciando mecanismos de síntese de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (HOLZEMULLER et al., 2005; SOUZA et al., 2010).

A estratégia de sobrevivência utilizada por estes parasitos é a inibição de enzimas hidrolíticas e outras moléculas destrutivas que são secretadas no fagolisossomo. As peroxirredoxinas e superóxido dismutase degradam derivados de nitrito e radicais intermediários reativos de oxigênio, que são as moléculas microbicidas mais importantes (HOLZEMULLER et al., 2005). Apesar disso, conforme visto na Tabela 3, mostrou-se que o extrato foi capaz de reduzir o número de células infectadas em 50% no período de 24 horas, na concentração de 1 mg/mL do extrato.

5. Conclusão do Capítulo 2

O extrato de *P. polymyxa* RNC-D promoveu um efeito anti-*Leishmania* nas concentrações de \approx 0,5 e 1 mg/mL e foi capaz de modular a produção de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-4 por macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis*. Além disso, o extrato promoveu em macrófagos RAW 264.7 a produção de NO quando adicionado nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL.

Como perspectivas, o extrato em questão pode ser um potencial candidato para o desenvolvimento de novos fármacos contra a leishmaniose, visto que modula a resposta imune, contribuindo para uma resposta efetiva no controle da leishmaniose tegumentar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*. v.61, p.2952-2959, 1993.
- AFONSO, L.C. et al. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. v.263, p.235-237, 1994.
- AGUIAR-SOARES, R. D. O. et al. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4+ and CD8+) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivar gland of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 61, 2014.
- AIROLDI, I. et al. The Interleukin-12 And Interleukin-12 Receptor System In Normal And Transformed Human B Lymphocytes. *Haematologica*, v.87, p. 434-442, 2002.
- AKOPYANTS, N. S. et al. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 1, n. 136, p. 71-86, 2004.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol. Lett.* v.99, p.17-23, 2005.
- AL-MOHAMMED, C., BATES, M., PAUL, A. Production and Characterization of Stable Amphotericin-Resistant Amastigotes and Promastigotes of *Leishmania Mexicana*. *American Society for Microbiology*, v. 49, p.3274-3280, 2005.
- ALMEIDA, A.B.P.F. et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v.11, p.1555-1560, 2012.
- ANSTEAD, G. M. et al. Malnutrition alters the innate immune responses and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infection and Immunity, Washington, DC*, v. 69, n. 8, p. 4709-4718, 2001.
- ARNOLD, A.E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 15649-15654, 2003.
- ASH, C., et al. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antoine van Leeuwenhoek*, v. 64, 253-260, 1993.
- ASSREUY, J. et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology*, v.24, p.672-676, 1994.
- ASTE-AMEZAGA, M. et al. Molecular Mechanisms of the Induction of IL-12 and Its Inhibition by IL-10. *J. Immunol.*, v. 160, p. 5936-5944.1998.
- ATFORD, W. T. et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, v.14, p. 361-368, 2003.

- AZAD, M.A.K. et al. Polymyxin B Induces Apoptosis in Kidney Proximal Tubular Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 57, p. 4329-4335, 2013.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L.de, ed. *Ecologia Microbiana.*, p. 117-137, 1998.
- BARBOSA, I.G. et al. Increased plasma levels of soluble TNF receptor1 in patients with bipolar disorder. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, v. 261, p.139-143, 2011.
- BACON, C., White, J. Microbial endophytes. *Marcel Dekker, Inc., New York*, 2000.
- BADARÓ, R.; Duarte, M.I.S. Leishmaniose Visceral (Calazar). Em: Focaccia, R. (Ed.) *Tratado de Infectologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 1559-1588, 2005.
- BARRAL, A. et al. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Pathol.*, v. 147, p. 947-954, 1995.
- BARRATT G; BRETAGNE S. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. *International Journal of Nanomedicine*, v. 2, p. 301-13, 2007.
- BARAK, A.; GOLDKORN, T.; MORSE, L.S. Laser Induces Apoptosis and Ceramide Production in Human Retinal Pigment Epithelial. *Cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 46, p. 2587-2591, 2005.
- BEADLING, C.; SLIFKA, M.K. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, v. 54, 15-24, 2006.
- BECHINGER, B. Structure and Function of Membrane-Lytic Peptides. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 23, n. 3, p. 271-292, 2004.
- BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1758, p. 1529-1539, 2006.
- BENVIN, A.L.; CREEGER, Y.; FISHER, G.W.; BALLOU, B.; WAGGONER, A.S.; ARMITAGE, B.A. Fluorescent DNA nanotags: Supramolecular fluorescent labels based on intercalating dye arrays assembled on nanostructures DNA templates. *J. Am. Chem. Soc.* V.129, p. 2025-2034, 2007.
- BERMAN, H.M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, v. 28, p. 235-242, 2000.
- BERNAL, I. D. V. et al. Manual de procedimientos para el diagnostico y control de la leishmaniasis en Centro America. Medellin, Colombia, Colombia: Universidad de Antioquia, 2010. BERA, A. et al. of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 127, p. 23-35, 2003.
- BITTENCOURT, A.L. Aspectos histopatológicos e ultra estruturas da Leishmaniose cutânea difusa (LCD). *Gazeta Médica, Bhia*, v. 79, p. 45-51, 2009.
- BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol*, v. 4, p. 343-350, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar, Brasil, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar Americana, Brasil, 2010.

BRAZIL, R.P.; RODRIGUES, A.A.F.; FILHO; J.D.A. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol*, 4:144. 2015.

BRUZUAL, E.; ARCAY, L.; DE LA PARTE-PÉREZ, M. A. Diseminación tisular y efectos histopatológicos producidos por *Leishmania mexicana amazonensis* en roedores infectados experimentalmente. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 28, n. 2, p. 139–144, 2008.

BOMFIM, G. et al. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.*, v. 2, n. 84, p.188-94, 1996.

BOCCHINFUSO, G. et al. Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, v. 15, n. 9, p. 550 - 558, 2009.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today.*, v.15, p. 22-8, 1999.

BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, p. 238-250, 2005.

BOWIE, A.G. Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clin Exp immunol.* v.147, p. 217-26, 2007.

BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Peptide Lett.* v. 12, p. 3-11, 2005.

BURCHMORE, R.J. M.P. BARRETT. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol*, v.12, p.1311-1320, 2001.

CALEGARI-SILVA, T. C. et al. The human parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF- κ B p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway. *Open Biol*, v. 9, n.5, p. 150118, 2015.

CALSAVARA, A.C. et al. TNFR1 absence protects against memory déficit induced by sepsis possibly through over-expression of hippocampal BDNF. *Metabolic Brains Disease*, Epub ahead of print, v. 30, p.668-6798. 2014.

CANEDA-GUZMAN, I. C. et al. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: a comparative study of TLRs and cytokines. *PLoS One*, v. 9, n. 11, p. e112410, 2014.

CASTES, M. et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res.*, v. 26, p. 233238, 1993.

CAVICCHIOLI, R. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, ENDÓFITO ISOLADO DE *Prunus* spp. (CERRADO), PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INFLAMAÇÃO AGUDA. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, fevereiro 2017.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS*, v. 100, p.14555-14561, 2003.

CHANG, Z. Q. *et al.* A novel β -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115 induces nitric oxide production in RAW264.7 macrophages *J. Vet. Sci.*, v.10, p. 165 - 167, 2009.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos uma nova fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.*, v. 2, p. 167-176, 2010.

CHEHIMI, J.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12: A bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.*, v.14, p. 149-161,1994.

CHO, K.M, *et al.* Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microb. Ecol.*, v. 54, n. 2, p. 341-351, 2007.

CHO, K.M. *et al.* A cel44C-man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 73, p. 618-630, 2006.

CIFANI C, COSTANTINO S, MASSI M. Commercially available lipid formulations of amphotericin B: are they bioequivalent and therapeutically equivalent? *Acta Bio. Medica Atenei Parmensis*, v. 83:p. 154–63, 2012.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDÓN, A.J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 4, n. 66, p. 603-10, 1972.

COSTA, J.M., *et al.* [Psychosocial and stigmatizing aspects of mucocutaneous leishmaniasis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 20, p. 77-81,1987.

COSTA, J.M. *et al.* Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous Leishmaniasis (DCL). *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 28, p.457, 1995.

COSTA, J. M. *et al.* Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the Tegumentary Leishmaniasis in Brazil. *Gaz. Méd. Bahia*, v. 79, n. V, p. 70–83, 2009.

COSTA, C. H. N. *et al.* Competence of human host as reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis.*, v. 182, n. 3, p. 997-00. 2000.

COTTYN, B.; DEBODE. J.; REGALADO, E.; MEW, T.W.; Swings. J. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. *J. Appl. Microbiol.*, v.107, 885-897, 2009.

COURRET, N. *et al.* Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J. Cell. Sci*, v.115, p. 2303-2316, 2002.

- CUNHA, M. A., et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis from the New World: a retrospective study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 9, p.1214–8, 2015.
- CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R.M.; ALVES, F.A.; LEON, L.L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol.*, v. 89, n.1, p. 58-62, 1998.
- DA SILVA, M. F., et al. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. *PLoS One*, 7(3): e34022, 2012.
- DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to change in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. *mBio*, v. 4, e00264-13, 2013.
- DE BIE, M.K., et al. How to reduce sudden cardiac death in patients with renal failure. *Heart*, v. 98, p. 335–341, 2012.
- DE FORGE, L.E. et al. Regulation of the pathophysiology of tumor necrosis factor. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 116, p. 429–438, 1990.
- DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.
- DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*, v.1455, p.341-352,1999.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DESLOUCHES, B. et al. Engineered cationic antimicrobial peptides to overcome multidrug resistance by ESKAPE pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, v.59, p. 1329–1333, 2015.
- DESLOUCHES, B. Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.57, p. 2511–2521, 2013.
- DEL PRETE, G. The complexity of the CD4 T-cell responses: old and new T-cell subsets. *Parassitologia*, v. 50, p. 9-16, 2008.
- DELVES, P.J, ROITT, D. The Immune System – First of two parts. *N. Engl. J. Med.*, v. 343, p.-37-49. 2.000.
- DEMICHELI, C. et al. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1570: p.192-198, 2002.
- DENG Y, LU, Z. et al. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B6 produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. *Peptides*, v. 32, p. 1917-1923, 2011 (a).
- DENKERS, E.Y.; BUTCHER, B.A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.*, v. 21p. 35-41, 2005.
- DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria. *Current Drug Targets. Hilversum.*, v. 3, p. 107-122, 2002.

- DITTMANN, E.; NEILAN, B.A.; BORNER, T. Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, v. 57, p. 467-473, 2001.
- DOMINGUEZ, M. et al. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect*, v. 5, n. 6, p. 507-513, 2003.
- DONOVAN, J., ABRAHAM, D., NORMAN, J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. *Front Biosci (Landmark Ed)*, v. 18:p. 106–119, 2013.
- DWIVEDI, D. et al. Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. *J. Tradit. Complement. Med.*,v. 7, p. 79-85, 2016.
- EBENHAN, T., et al. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed Res. Int.*, v. 2014, p. 1-15, 2014.
- ECKERT, R. Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Fut. Microbiol.*, v. 6, p. 635–651, 2011.
- EZQUERRA, A. J. P. La leishmaniasis: de la biología al control. Segunda ed. Madrid, España: Instituto de Salud Carlos III, 2001.
- FAVORETTO, N.B. Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos – SP. 2010. 53f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2010.
- FILIPPI, C.; M.,VON HERRATH, M.G. IL-10 and the resolution of infections. *J. Pathol.*v. 214, p. 224–230, 2008.
- FIMLAND, G. et al. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Peptide Sci. Chichester*. v. 11, p. 688-696, 2005.
- FINKING, R.; MARAHIEL, M.A. Biosynthesis of non-ribosomal peptides. *Annu. Ver. Microbio.l.*, v. 58, p.453-88, 2004.
- FJELL, C. D. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 11, p. 37–51, 2012.
- FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4th ed. New York:John Wiley & Sons, 2000.
- FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. New York:John Wiley & Sons, 2005.
- FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, 6th ed.; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2010.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules.*, v.14, p. 2317-2336, 2009.
- GENG, C.X.; ZENG, Z.C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. *W. J. Gastroenterol.* 9: 696-700, 2003.

- GIANOTTI, N; et al. Leishmania infection can hamper immune recovery in virologically suppressed HIV-infected patients. *New Microbiol.*, v. 31, p. 435-438, 2008.
- GINDERACHTER, JO. et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, v. 211, p. 487-501, 2006.
- GREGORY, C.D.; DEVITT, A. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology*, v.113, p. 1-14, 2004.
- GRUENBERG, J.; VAN DER GOOT, F.G. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 7, p. 495-504, 2006.
- GREEN, L.C. et al. Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v.126, p. 131-138, 1982.
- GREEN, S.J. et al. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.*, v.145 p. 4290 - 4297, 1990.
- GLASER, T.A., UTZ, G.A. e MUKKADA, A.J. The plasma membrane electrical gradient (membrane potential) in *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, v. 51, p. 9-15, 1992.
- GLOCKER, E.O. et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N. Engl. J. Med.* v. 361, p. 2033–2045, 2009.
- GOSWAMI, R.P. Short-Course Treatment Regimen of Indian Visceral Leishmaniasis with an Indian Liposomal Amphotericin B Preparation (Fungisome). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 94, p. 93-98, 2015.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.*, v. 10, n. 33, p. 1027-1034, 2003.
- GOUZELOU, E. et al. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 342, 2013.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 3, p. 23-35, 2003.
- GOMES, I.N. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect.*, v. 5, p. 251- 260, 2003.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Med.Trop.*, v. 36, n. 13, p. 71 - 80, 2003.
- GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 34,n. 2, p. 257–272, 1996.
- GRVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. *Ver. Bras. Cancerol.*, v. 53, p. 335-343, 2007.

- GRÖNBERG, A. et al. Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Wound Repair Regen*, v. 22, p. 613–621, 2014.
- GUÉMOURI-ATHMANI, S. et al. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian soils. *Eu.r J. Soil. Biol.*, v. 36, p. 149 - 159, 2000.
- GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.*, v. 69, p. 509-526, 2006.
- GUERRA, A.N. et al. Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signal.*, v.3, p. 39-51, 2007.
- HÅVERSEN, L. et al. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B. *Cell. Immunol.*, v. 220, p.83–95, 2002.
- HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.
- HANCOCK, R.E.W.; LEHRER, R.I. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* v. 21, p. 82-88, 1998.
- HANCOCK, R.E.W.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.*, v. 24, p. 1551-1557, 2006.
- HAZALIN, N.A. et al. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complement Altern Med*, v. 21, n.9, p. 46, 2009.
- HE, Y.; LAZARIDIS, T. Activity determinants of helical antimicrobial peptides: a large-scale computational study. *PloS one*, v. 8, n. 6, 2013.
- HERNANDEZ-RUIZ, J. et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, p. e871, 2010.
- HENARD, C. A. et al. *Leishmania amazonensis* amastigotes highly express a trypanothione peroxidase isoform that increases parasite resistance to macrophage antimicrobial defenses and fosters parasite virulence. *PLoS Neglected Trop. Dis.*, v. 8, n. 7, 2014.
- HERZOG, I. M.; FRIDMAN, M. Design and synthesis of membrane-targeting antibiotics: from peptides- to aminosugar-based antimicrobial cationic amphiphiles. *Med.Chem.Comm.*, v. 5, n. 8, p.1014–1026, 2014.
- HIROI, M. et al. Anti-inflammatory cytokine interleukin-4 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription. *Mediators Inflamm.*, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- HOLZEMULLER, P. et al. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on *in vitro* parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect. Genet. Evol.*, v. 6, p. 187-197, 2005.

- INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite immunology*, v. 24, p. 113 – 118, 2002.
- IZADPANAH, A.; GALLO, R.L. Antimicrobial peptides. *J. American Acad. Dermatol. St. Louis.*, v. 52, p. 381-390, 2005.
- JANEWAY, C.A, MEDZHITOV, R. Innate immunity recognition. *Annu Rev Immunol.* v. 20, p.197-216, 2002.
- JEON, Y.H, et al. Effects of initial inoculation density of *Paenibacillus polymyxa* on colony formation and starch-hydrolytic activity in relation to root rot in ginseng. *J. Appl. Microbiol.*, v. 109, p. 461- 470, 2010.
- KAYSER, O. et al. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int J Pharm.*, v. 254, p. 73-75, 2003.
- KAJIMURA, Y, KANEDA, M. Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiotics*, v.49, p. 129 - 135,1996.
- KAVOOSI, G., ARDESTANI, S.K., KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, v.136, p.1193 - 1199, 2009.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Publ. Gr.* v.11, p. 373 - 84, 2010.
- KERKAR, S.P.; LEONARDI, A.J., VAN PANHUYS, N. Collapse of the tumor stroma is triggered by IL-12 induction of Fas. *Mol Ther.*, v. 21, p.1369 - 1377, 2013.
- KELSEY, K.T. et al. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, v.13, p. 51-138, 2010.
- KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents*, v. 27, p. 12–16, 2006.
- KHATIBISEPEHR, S. Data-based modeling and prediction of cytotoxicity induced by contaminants in water resources. *Comput. Biol. Chem.*, 2011, v. 35, p. 69-80, 2011.
- KIM, S.Y. et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS Lett.*, v. 581, p. 865-871, 2007.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Medical and veterinary entomology*, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1990.
- KIWANUKA, E., JUNKER, J., ERIKSSON, E. Harnessing growth factors to influence wound healing. *Clin. Plast. Surg.* v.39, p. 239 - 248, 2012.
- KOBAYASHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agricultura. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. *Microbiol endophytes*. New York: Marcel Dekker Inc, p. 199-233, 2000.
- KOSIKOWSKA P.; LESNER A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opin. Ther. Pat.*, v. 26, p. 689 -702, 2016.

- KOZMA, D.; SIMON, I.; TUSNÁDY, G. E. PDBTM: Protein Data Bank of transmembrane proteins after 8 years. *Nucleic acids research*, v. 41, p. D524–529, 2013.
- KRAGOL, G. et al. The antibacterial peptide pyrrococricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochem.*, v. 40, p. 3016-3026, 2001.
- KREWSKI, D. et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure? *Ann Intensive Care*, 1: 41, 2011.
- KULKARNI, M. M. et al. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol. Microbiol.*, v. 62, p. 1484-1497, 2006.
- LACAVA, P.T.; SOUSA, C.P. Role of Endophytic Actinomycetes in Crop Protection: Plant Growth Promotion and Biological Control. In: Gopalakrishnan Subramaniam; Sathya Arumugam; Vijayabharathi Rajendran. (Org.). *Growth Promoting Actinobacteria*. 1Ed.; *Singapore: Springer*, Vol. 1, pp. 147-160, 2016.
- LAI Y., GALLO R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.*, v.30, p. 131–141, 2009.
- LAINSON R. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Parasitology, 10th ed., ASM Press, London, p. 313-349, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: WALLACE PETERS, R. K.-K. (Ed.). *The leishmaniasis in biology and medicine*. Volume I. Biology and epidemiology. illustrate ed. Londres: Academic Press, p. 120, 1987.
- LAL, S.; TABACCHIONI, S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian J. Microbiol.*, v. 49, p. 2-10, 2009.
- LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; KIENY, M.P. Cutaneous leishmaniasis: progress towards a vaccine. *Expert Review of Vaccines*, v. 7, p.1277-1287, 2008.
- LASEK, W.; ZAGOŹDŹON, R.; JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother*, v. 63, p. 419 - 435, 2014. |
- LEIRIÃO, P. et al. Survival of protozoan parasites in host cells. *EMBO Rep.*, v.5, p. 1142-1147, 2004.
- LIDDIARD, K. et al. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur. J. Immunol.*, v. 41, p. 2503-2508, 2011.
- LIEW, F. Y. et al. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *European journal of immunology*, v. 21, p. 3009–3014, 1991.
- LIEW F.Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol.* v. 144, p. 4794 - 4794, 1999.
- LILIC, D. Immune response to infection. *Anaesth. Intens. Care Med.* v. 10, p. 218-220, 2009.

- LIN, T. Y.; WEIBEL, D. B. Organization and function of anionic phospholipids in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.100, p. 4255 - 4267, 2016.
- LIEW, F.Y., MILLOT, S., PARKINSON, C., PALMER, R.M. & MONCADA, S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol*, v. 144, p. 4794-4797,1990.
- LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. *Clinical Immunology*, v. 114, n. 3 SPEC. ISS., p.256–265, 2005.
- LORENTZ, R. H. Seleção de isolados de *Paenibacillus* spp com atividade enzimática e antimicrobiana. 2005 103p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- LOWENSTEIN, C.J.; DINERMAN, J.L.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.*, v.120, p. 227-237, 1994.
- LU, F. et al. Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes. *Curr. Microbiol*, v. 54, p. 435-439, 2007.
- SHAI, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 20, n. 11, p. 460 - 464, 1995.
- SHI, L. et al. *Paenibacillus polymyxa* NSY50 suppresses Fusarium wilt in cucumbers by regulating the rhizospheric microbial community. *Scientific Reports*, v. 13, p. 41234, 2017.
- LIU, X, et al. Endophytic fungi from mangrove inhibit lung cancer cell growth and angiogenesis in vitro. *Oncol Rep.*, v. 37, p. 1793-1803, 2017.
- MA, Z. et al. Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marinederived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *J. Antibiot.*, v. 65, p. 317-322, 2012.
- MACHADO, P. R. et al. Treatment of Disseminated Leishmaniasis with Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis*, v.15, p.945-949, 2015.
- MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology.*, v. 25, p.677 - 686, 2004;
- MANTOVANI, A. Orchestration of macrophage polarization. *Blood.*, v. 114, p. 3135 - 3136, 2009.
- MARSHALL, S.H.; ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic J. Biotechnol. Valparaiso.*,v. 6, p. 271-284, 2003.
- MATSUZAKI, K. et al. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1376, p. 391-400, 1998.
- McGAHON, A.J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods in Cell Biol.*, v. 46, p. 153-185, 1995.
- McDERMOTT, M. F., et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*, v. 97, p. 133-144, 1999.

- MECKE, A. et al. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding - An atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. *Biophys J BioFAST.*, v. 89, p. 4043 - 4050, 2005.
- MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. J.R. Innate immunity. *N Engl J Med*, 2000;
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., JANEWAY, C.A. JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v.388, p. 394-7, 1997.
- MEGE, J.L. et al. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect. Dis.*, v. 6, p. 557–569, 2006.
- MEINCKEN, M., HOLROYD, D.L., RAUTENBACH, M. Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and chemotherapy.*, v. 49, p. 4085 - 4092, 2005.
- MERCILLE, S.; MASSIE, B. Induction of apoptosis in oxygen-deprived cultures of hybridoma cells. *Cytotechnology*, v.15, p. 117-128, 1994.
- METZ-BOUTIGUE, M.H. et al. Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules. *Curr Pharm Des.*,v. 16, p.1024-1039, 2010.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE: O Bioma Cerrado. <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado> (Acesso em janeiro de 2017).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância. Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania-HIV*. Brasília, Brasil, 2011.
- MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease.*, v. 5, p.150–158, 2007.
- MIRANDA, A. et al. Gomesin: a powerful antimicrobial peptide isolated from the brazilian tarantula spider *Acanthoscurria Gomesiana*. Animal toxins: state of the art. Perspectives in health and biotechnology. Res. Signpost. Kerala, India, 2008.
- MOEN, M. D.; LYSENG-WILLIAMSON, K. A.; SCOTT, L. J. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs*, v. 69, n. 3, p. 361–392, 2009.
- MOHAMMADZADEH, M., BEHNAZ, F., GOLSHAN, Z. Efficacy of glucantime for treatment of cutaneous leishmaniasis in central Iran. *J Infect Public Health* v.6, p. 120–124, 2013.
- MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 7, p. 375-381, 2004.
- MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R.E. Cationic host defense peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell. Mol. Life. Sci.* v. 64, p. 922-933, 2007.
- MORATO, C.I. Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania Vianna braziliensis* por leucotrienos. Universidade Federal de Goiás; Goiânia; GO; 2013.

- MORETTA, A. et al. cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*, v.15, p. 226-233,2008.
- MORAN, C.J., et al. IL-10R polymorphisms are associated with very-early-onset ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, v.19, p. 115 -123, 2013.
- MOORE, K.J.; TURCO, S.J.; MATLASHEWSKI, G. *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 55: p. 91-98, 1994.
- MOORE, K.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, v.19, p. 683 - 765, 2001.
- 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.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, p. 958-969, 2008.
- MOSSER, D.M., ROSENTHAL, L.A. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol.*, v. 4, p. 315-22, 1993.
- MURBACK, N.D.N. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *An. Bras. Dermatol.*, v. 86, n.1, p.55-63, 2011.
- MURRAY PJ, WYNN TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 723–737, 2011.
- NASCIMENTO, V. V. et al. PvD1 defensin, a plant antimicrobial peptide with inhibitory activity against *Leishmania amazonensis*. *Bioscience Reports*, v., 35 e00248, 2015.
- (NC3Rs). The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs). <http://www.nc3rs.org.uk/> (Accessed January 15, 2017).
- NERIS, D.M. et al. Cytotoxic Effects and Production of Cytokines Induced by the Endophytic *Paenibacillus polymyxa* RNC-D *in Vitro*. *Curr Pharm Biotechnol.*, v.18, p. 758-768, 2017.
- NETO, J.F.R. Moléculas coestimulatórias na leishmaniose visceral. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, TESE, 2015.
- NEVES, P.G.R. Avaliação *in vitro* da quercetina como potencial agente anti-leishmania. 2016.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, v.79, p. 629-661, 2016.
- NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 3, p. 1-19, 2012.
- NUSSE, O. Biochemistry of the phagosome: the challenge to study a transient organelle. *Scientific World Journal*, v.11, p. 2364–2381, 2011.

NYALWIDHE, J.; MAIER, U.G.; LINGELBACH, K. Intracellular parasitism: cell biological adaptations of parasitic protozoa to a life inside cells. *Zoology (Jena)*, v.106, p. 341-348, 2003.

OHRI, C.M. et al. Macrophages within NSCLC tumor islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur. Respir. J.*, v. 33, p. 118-126, 2009.

OLVIER, M.; GREGORY, D.J. e FORGET, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.*, v.18p. 293-305, 2005.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 425–28, 2007.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac. J.Trop. Med.*, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.

OYOSHI, MK, et al. Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin. *J Clin Invest.*, v.121, p. 2210–2220, 2011.

PALLADINO, M. A. et al. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov*, v. 2, p. 736-746, 2003.

PASUPULETI, M., SCHMIDTCHEN A., MALMSTEN M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.*v. 32, p. 143 - 171,2012.

PAPO, N.; SHAI, Y. New lytic peptides based on the DL-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry*. v. 42, p. 9346–9354, 2003.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry, 3th ed, Oxford University Press: New York, 2005.

PAWATE, S. et al. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J Neurosci Res.*, v.77, p. 540–551, 2004.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. v.22, p.1-13, 1996.

PETERS B. M.; SHIRTLIFF M. E.; JABRA-RIZK M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, v.6, e1001067. 2010.

PELLISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 20, p. 107–110, 2011.

PESSOA, C. C. et al. *Trypanosoma cruzi* differentiates and multiplies within chimeric parasitophorous vacuoles in macrophages coinfecting with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, v. 84, n. 5, p. 1603–1614, 2016.

PETERSEN, C. A.; GREENLEE, M. Heather West. Neurologic manifestations of *Leishmania* spp. infection. *J. Neuroparasitol.*, n. 6, p. 1–9, 2011.

- PICHARD, B.; LARUE, J.P.; THOUVENOT, D. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 133, p. 215–218, 1995.
- PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S.M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Lett Appl Microbiol*, v. 27, p. 9-13, 1998.
- PIZA, A.C.M.T. et al. Endophytic *Nocardiosis dassonvillei* and *Amycolatopsis orientalis* isolated from Brazilian tropical savannah presented antibiosis against pathogens. *Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*. 1Ed.; Boca Raton: BrownWalker Press, v. 1, p. 264-266, 2016.
- PIEDRAFITA, D. et al. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania phosphoglycans*. *Eur J Immunol*, v. 29, p.235-244,1999.
- POLLOCK, K.G. et al. Interleukin-18 plays a role in both the alum-induced T helper 2 response and the T helper 1 response induced by alum-adsorbed interleukin-12. *Immunology*, v.108, p. 137- 43, 2003.
- POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, v. p. 259-270, 2009.
- PROUDFOOT, L. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania lipophosphoglycan* in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p. 10984-10989, 1996.
- PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*, v. 25, p. 745-750, 1995.
- PURI, A.; PADDA, K. P.; CHANWAY, C. P. Evidence of nitrogen fixation and growth promotion in canola (*Brassica napus L.*) by an endophytic diazotroph *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R. *Biol. Fertil. Soils*, v. 52, p.119- 125, 2016.
- PURKAIT, B. et al. Up-regulation of silent information regulator 2 (Sir2) is associated with amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*, v.70, p.1343 - 56, 2015.
- RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose; estado da arte. *Química nova*, v. 26, p. 550-555, 2003.
- RATNA, A.; ARORA, S. K. *Leishmania* recombinant antigen modulates macrophage effector function facilitating early clearance of intracellular parasites. *Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.*,v. 10, n. 110, p. 610-619, 2016.
- RALPH, P.; NAKOINZ, I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature*, v. 257, p.393-394, 1975.
- RAHAL, A. et al. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int.*, v. 2014, p.1-16, 2014.
- RANGEL, T. F. L. V. B. Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado. *Appl Geography*, v. 27, p. 14-27, 2007.

- RATTI, R.P.; SERRANO, N.F.G.; HOKKA, C.O.; SOUSA, C.P. Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian tropical savannah plants against *Staphylococcus* coagulase-positive strain. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 294-302.
- RAVI, A.V.; MUSTHAFA, K.S.; JEGATHAMMBAL, G.; KATHIRESAN, K.; PANDIAN, S.K. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 45, p. 219-223, 2007.
- REIS, L. de C. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, n. 5, p. 439–443, 2008.
- REVEIZ L, et al. Interventions for American cutaneous and Mucocutaneous leishmaniasis. A systematic review update. *PLoS One* *Yadon*, v.8, p.1-14, 2013.
- ROMAGNANI, S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res*, v. 21, p.52-58, 1991.
- SAALMÜLLER A. New understanding of immunological mechanisms. *Vet Microbiol*, v. 117, p. 32-38, 2006.
- SACKS, D.L., NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immuno*, v. 2, p. 845 - 58, 2002.
- SAHL, H. G. et al. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J. Leukoc. Biol.* v. 77, p. 466–475, 2005.
- SAIJO, K., CROTTI, A, GLASS, CK. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia*, v. 61, p. 104 - 111, 2013.
- SANCHEZ S.; DEMAINE A. L. Valuable products from microbes, in: G. Neelam, A. Abhinav (Eds.), *Microbes in Process*, Nova Scientific Publishers Inc, p. 23–57, 2014.
- SAMPAIO, R.N.R.; PORTO, C.; MOTTA, J. Estudo comparativo entre o tratamento com anfotericina B lipossomal e n-metil-glucamina na forma cutânea de Leishmaniose. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 37, p. 223, 2003.
- SANO, E.E. et al. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environ. Monit Assess*, v. 166, n. 1-4, p. 113-124, 2010.
- SATYANARAYANA, T. Microbial diversity. *Curr Sci*, v. 89, p. 926–928, 2005.
- SCHUTZ, B. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. In: Symposium on Bioactive Fungal Metabolites-Impact and Exploitation, 2001, Swansea. International Symposium Proceedings, University of Wales, Swansea, p. 328, 2001.
- SEGAL, B.M.; DWYER, B.K.; SHEVACH, E.M. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.*, v. 187, p. 537-546, 1998.
- SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESTRE J.L. Efficacy of second line drugs on antimonyl- resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, v. 74, p. 25-31, 2000.

SERRANO, N. F. G. Purificação e caracterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas por endófito isolado de *Prunus* spp. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos: São Carlos, Março, 2009.

SERRANO, N. F. G. et al. Optimal glucose and inoculum concentrations for production of bioactive molecules by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. *Chemical Papers*, v. 66, p. 1111–1117, 2012.

SERRANO, N.F.G. Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos. PhD Thesis, Universidade Federal de São Carlos: São Carlos, June, 2014.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol.*, v. 16, p. 581-592, 2016.

SHOUVAL, D.S., Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Adv. Immunol.*, v. 122, p.177–210, 2014.

SILVA, P.I.Jr., DAFFRE, S., BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, NA 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 3464-3470, 2000.

SILVEIRA, F.T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 31, p. 423-431, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 99, n.3, p. 239-251, 2004.

SINIGAGLIA, F. et al. Regulation of the IL-12/IL-12R axis: A critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol.Rev.*, v. 170, p. 65- 72, 1999.

SOGN, J.A. Structure of the peptide antibiotic polypeptin. *J Medicin Chem*, v. 19, p. 1228–1231, 1976.

SOTO, J. et al. Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.*,v.71, p. 577-581, 2004.

SOONG, L. et al. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity*. v.4, p.263-273, 1996.

SORENSEN, A.L.; HEY, A.S.; KHARAZMI, A. *Leishmania* major surface gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils *in vitro*. *APMIS*, v.102, p. 14395-14399, 1994

SOUZA, A. S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. *BMC Infect Dis*, v. 10, p. 1-11, 2010.

SOUZA, G. S. et al. Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*. V. 135, p. 116-125, 2013.

- SPECTOR, D.L.; GOLDMAN, R.D.; LEINWAND, L.A. Apoptosis assays. In: SPECTOR, D.L.; GOLDMAN, R.D.; LEINWAND, L.A. Cells: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1: 15.1-15.24, 1998.
- SRIVASTAVA, A.K. Hydroxyproline: A Potential Biochemical Marker and Its Role in the Pathogenesis of Different Diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.*, v. 17, p. 596-602, 2016.
- STANSLY, P.G.; SHEPHERD, R.G.; WHITE, H. J. Polymyxin: A new chemotherapeutic agent. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, v. 81, p. 43-54, 1947.
- STECKBECK, J.D.; DESLOUCHES, B.; MONTELARO, R.C. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? *Expert Opin Biol Ther.*, v.14, p.11–14, 2014.
- STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Products*, v. 67, p. 257–268, 2004.
- STROBEL, G. et al. *Urnula* sp., an Endophyte of *Dicksonia antarctica*, Making a Fragrant Mixture of Biologically Active Volatile Organic Compounds. *Microb. Ecol.*, p.1-10, 2017.
- SUNDAR, S. et al. Efficacy and safety of amphotericin B emulsion versus liposomal formulation in Indian patients with visceral leishmaniasis: a randomized, open-label study. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8: e3169, 2014.
- SUZANNE, M., STELLER, H. Shaping organisms with apoptosis Cell. *Cell Death and Differentiation*, v. 20, p. 669–675, 2013.
- TAKAHASHI, D. et al. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, v. 92, p.1236 -1241, 2010.
- TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; WAGNER, E.G.H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl Environ Microbiol*, v.11, p. 7292 - 7300, 2005.
- TODARO, G.J.; AARONSON, S.A. Properties of clonal lines of murine sarcoma virus transformed Balb-3T3 cells. *Virology*, v. 38, p. 174-179, 1969.
- TRALAU, T.; LUCH, A. Drug-mediated toxicity: illuminating the 'bad' in the test tube by means of cellular assays? *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 33, p. 353-364, 2012.
- VANNIER-SANTOS, M.A., MARTINY, A. e DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 297-318, 2002.
- VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.
- VIETH.M. et al. Interleukin-10 Inhibits Antimicrobial Activity Against *Leishmania major* in Murine Macrophages. *Scand J Immunol*. 40, p. 403-409, 1994.
- VLIEGHE, P., et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Disc. Today*, v.15, p. 40–56, 2010.
- WANDERLEY, J. L. M. et al. Subversion of Immunity by *Leishmania amazonensis* Parasites: Possible Role of Phosphatidylserine as a Main Regulator. *J. Parasitol. Res.*, v. 2012, p. 981686, 2012.

- WANASEN, N. et al. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infection and immunity*, v. 75, p. 2802-2810, 2007.
- WANG, G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods Mol. Biol.*, v. 1268, p. 43–66, 2015.
- WILSON, J, et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathog*, v.4 e1000179, 2008.
- WIIG, M. E. et al. PXL01 in sodium hyaluronate for improvement of hand recovery after flexor tendon repair surgery: randomized controlled trial. *PLoS ONE* 9:e110735. 2014.
- WIVEDI, D. et al. Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. *J. Tradit. Complement. Med.*, v. 7, p.79-85, 2016.
- WHO. Avanços para superar o impacto global de doenças. Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. [s.l.: s.n.], 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Acesso em 5 de março de 2018. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- YEUNG, A. T.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK R. E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 68, p. 2161–2176, 2011.
- YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* v. 55, p. 27-55, 2003.
- YOUNT, N.Y. et al. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers*. v. 84, p. 435-458, 2006.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nat.* v. 415, p. 389-395, 2002.
- ZAULI-NASCIMENTO, R.C. et al. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Am J .Trop. Med. Hyg.*, v.15, p. 68-76, 2010.
- ZIEGLER, U., GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.*, v.19, p.124-128, 2004.
- ZHANG, S.; WANG, Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: regulatory mechanism for IL-12p70 synthesis and inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.372, p.509-512, 2008.

RESEARCH ARTICLE

Cytotoxic Effects and Production of Cytokines Induced by the Endophytic *Paenibacillus polymyxa* RNC-D *in vitro*

Débora Meira Neris^{1,3,*}, Genoveva Lourdes Flores Luna^{2,3}, Joice Margareth de Almeida Rodolpho^{1,3}, Ana Carolina Urbaczek⁴, Ricardo de Oliveira Correia³, Karina Alves Feitosa^{1,3}, Nadja Fernanda Gonzaga Serrano^{2,3}, Cristina Paiva de Sousa^{2,3} and Fernanda de Freitas Anibal^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil; ³Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil; ⁴Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brazil

Abstract: Background: Prominent among all the organisms that have a potential value for the production of new medicines, are endophytes, fungi and bacteria that live inside plants without harming them. In this study, a total lyophilized extract (TLE) of *Paenibacillus polymyxa* RNC-D was used. The *P. polymyxa* lineages are known for their capacity to segregate a large number of extracellular enzymes and bioactive substances.

Methods: The TLE of *Paenibacillus polymyxa* RNC-D was tested in cell viability assays for cytotoxicity and cytokine production in BALB/3T3 and J774A.1 cell lineages.

Results: A 50% mortality rate of fibroblasts (BALB/3T3) was observed in the 1.171±0.161 mg/mL and 0.956±0.112 mg/mL doses after 48 and 72 hours, respectively, as well as a 50% mortality rate of macrophage cells (J774A.1) in the 0.994±0.170 mg/mL and 0.945±0.280 mg/mL doses after 48 and 72 hours, respectively. The ≈1 mg/mL concentration significantly affected the kinetic of growth in all the measured periods. The extract induced apoptosis and necrosis 24 hours after the ≈1 mg/mL concentration in both tested lineages. The treatment with the ≈1 mg/mL concentration led to the production of TNF-α and IFN-γ cytokines in 24 hours. IL-12 and IL-10 began to be detected as a result of the treatment with 0.1 mg/mL. However, with the 0.5 mg/mL dose in 24 hours, a significant reduction in IL-10 was observed.

Conclusion: Our data suggest that the TLE of *P. polymyxa* RNC-D modulated the production of cytokines with different patterns of immune response in a dose-dependent way.

ARTICLE HISTORY

Received: June 19, 2017
Revised: October 16, 2017
Accepted: October 17, 2017

DOI:
10.2174/1589201018066171026155522

Keywords: Cell death, cytokines, cytotoxicity, endophytic microorganism, fluorescence, immune response, *Paenibacillus polymyxa*.

1. INTRODUCTION

Natural products are still essential for the discovery and development of new drugs [1]. More specifically, microbial natural products represent a substantial source of unique chemical structures that become optimized during their evolution and changes in the environment, including environmental stress [2]. In this context, among all the different kinds of microorganisms, it is worth noting that endophytes,

which mainly consist of fungi and bacteria are able to live inside plants without damaging them [3-6]. Although they do not display any apparent signals or symptoms in the plant, endophytes can exist as symbionts, and provide their host with some kind of protection against several environmental threats, like insect or pathogen attacks or environmental stress (such as excess or lack of water and thermal shock) [7, 8] as well as promoting plant growth directly by fixing nitrogen from the atmosphere [9].

Endophytic microorganisms are capable of producing significant secondary metabolites that can be used in the pharmaceutical industry and agriculture, among other areas

*Address correspondence to this author at the Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 13565-905, Brazil; Tel: + 55 16 3351-8325; Fax: +55 16 3351-8326; E-mail: debora.m.neris@gmail.com