

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE METABÓLITOS DE  
BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS**

THAÍS SARTORI

Porto Alegre  
Março/2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE METABÓLITOS DE  
BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS**

THAÍS SARTORI  
Biomédica, Esp. em Análises Clínicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Onilda Santos da Silva  
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Porto Alegre, Rio Grande do Sul-Brasil  
Março/2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Sartori, Thaís

Avaliação da Atividade Leishmanicida de Metobólitos de Bactérias Entomopatogênicas. / Thaís Sartori. -- 2015.

55 f.

Orientador: Onilda Santos da Silva.

Coorientador: Pedro Roosevelt Torres Romão.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Atividade leishmanicida. 2. Leishmania amazonensis. 3. Xenorhabdus nematophila. 4. Photorhabdus luminescens. I. Santos da Silva, Onilda, orient. II. Roosevelt Torres Romão, Pedro, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é apenas um estudo realizado com objetivo de busca por conhecimento. Ele também incorpora aprendizado pessoal! Não foi fácil chegar até aqui e só consegui pelo apoio que recebi ao longo do seu desenvolvimento.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Onilda Santos da Silva e ao meu co-orientador Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão, pela oportunidade de crescimento, pelos ensinamentos, orientação e conselhos.

A todos os colegas do grupo de pesquisa pelo apoio e auxílio nos biocultivos.

À doutoranda Ana Maria Antonello pelo auxílio nos bioensaios, inúmeras dúvidas sanadas, companheirismo e amizade.

Aos amigos e familiares pela compreensão nos momentos em que estive ausente e pelas boas energias que me renovaram durante esta jornada.

Aos meus pais Flávio e Zenaide pelo amor, carinho, dedicação e zelo. Agradeço também por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse estudar e chegar até aqui. Muito obrigada! Amo muito vocês!

Às minhas manas Bru e Aninha pelo amor, carinho e apoio, estar com vocês me deixa muito feliz e renova minhas energias! Amo muito!

Ao Leandro, que é meu amigo e companheiro de todas as horas, agradeço todo o apoio, conselhos e compreensão. Te amo!

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE METABÓLITOS DE BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS<sup>1</sup>

Autor: Thaís Sartori

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Onilda Santos da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

## RESUMO

A leishmaniose, doença parasitária vetoriada causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é uma das principais doenças tropicais negligenciadas do mundo. Os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses são insatisfatórios, principalmente devido à baixa efetividade dos mesmos, surgimento de resistência do parasito ou reações adversas graves apresentadas pelos pacientes. Nas últimas décadas, tem havido um interesse renovado em produtos naturais derivados de micro-organismos como fonte para a concepção de novas drogas. As bactérias entomopatogênicas *Xenorhabdus nematophila* e *Photorhabdus luminescens* produzem grande número de metabólitos secundários, muitos deles têm efeitos tóxicos específicos sobre as células eucarióticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de sobrenadantes de culturas destas bactérias. Os testes *in vitro* foram realizados sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e incluíram o efeito citotóxico dos sobrenadantes sobre macrófagos. Ambos os sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* mostraram atividade leishmanicida significativa contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (valores de CI<sub>50</sub> de 7,5 % e 0,63 % (v/v), respectivamente). O sobrenadante de cultura de *X. nematophila* foi o mais efetivo e o mais estável ao calor. Além disso, ambos os sobrenadantes de culturas continham pequenas moléculas que estimularam a atividade leishmanicida de macrófagos por um mecanismo independente de óxido nítrico. Estes resultados revelaram que estas bactérias entomopatogênicas são fontes potenciais para a concepção de novos medicamentos contra a leishmaniose.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (55 p.) Março, 2014.

# EVALUATION OF LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF METABOLITES FROM ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA

Author: Thaís Sartori<sup>2</sup>

Supervisor: Prof. Dr. Onilda dos Santos da Silva

Co-supervisor: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

## ABSTRACT

Leishmaniasis, a vector-borne parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, is one of the main neglected tropical diseases in the world. The drugs currently available for the treatment are unsatisfactory, mainly due to their low effectiveness, parasite resistance emergence or serious adverse reactions presented by the patients. In recent decades, there has been a renewed interest in natural products derived from microorganisms as a source for the design of new drugs. The Entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens* produce a large number of secondary metabolites, many of them have specific toxic effects on eukaryotic cells. The objective of this study was to evaluate the leishmanicidal activity of these bacteria culture supernatants. *In vitro* tests were performed on promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and included the cytotoxic effect of the supernatants on macrophages. Both supernatants from *P. luminescens* and *X. nematophila* cultures showed significant leishmanicidal activity against promastigotes forms of *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub> values of 7.5% and 0.63 % (v/v), respectively). The supernatant from *X. nematophila* was the most effective and more heat-stable. Furthermore, both culture supernatants contained small molecules that stimulated the leishmanicidal activity of macrophages by a mechanism independent of nitric oxide. These results revealed that these entomopathogenic bacteria are potential sources for the development of new drugs against leishmaniasis.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (55 p.) March, 2015.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Leishmaniose.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.1 Agente etiológico.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.2 Vetores.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1.3 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.4 Epidemiologia .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.5 Formas clínicas.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.5.1 Leishmaniose Visceral.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.5.2 Leishmaniose Tegumentar Americana.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.6 Infecção por <i>Leishmania</i> spp. e resposta imune do hospedeiro.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.7 Tratamento.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.8 Busca por novos fármacos anti-<i>Leishmania</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 <i>Photorhabdus luminescens</i> e <i>Xenorhabdus nematophila</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Bactérias.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Culturas bacterianas e sobrenadantes de culturas das bactérias.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 Cultura de <i>Leishmania amazonensis</i>.....</b>	<b>27</b>

4.4 Efeito dos sobrenadantes de <i>X. nematophila</i> e <i>P. luminescens</i> no crescimento de <i>L. amazonensis</i> .....	27
4.5 Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de <i>X. nematophila</i> e <i>P. luminescens</i> .....	28
4.6 Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	29
4.7 Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas bacterianas aquecidos.....	29
4.8 Viabilidade de macrófagos.....	30
4.9 Atividade leishmanicida de macrófagos estimulados com sobrenadantes de culturas de <i>X. nematophila</i> e <i>P. luminescens</i> .....	30
4.10 Dosagem de Óxido Nítrico.....	31
4.11 Análise estatística .....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1 Efeito dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> e <i>X. nematophila</i> sobre o crescimento de <i>L. amazonensis</i> .....	33
5.2 Efeito leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> e <i>X. nematophila</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	35
5.3 Efeito dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> e <i>X. nematophila</i> aquecidos sobre a viabilidade de <i>L. amazonensis</i> .....	40
5.4 Efeito dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> e <i>X. nematophila</i> sobre a citotoxicidade de macrófagos.....	42

<b>5.5 Atividade leishmanicida de macrófagos por mecanismos independentes de Óxido Nítrico.....</b>	<b>43</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>47</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Formas promastigotas (a) e amastigotas (b) de <i>Leishmania</i> spp.....	5
Figura 2: Fêmea de flebotomíneo.....	6
Figura 3: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	8
Figura 4: Pacientes em período inicial da Leishmaniose Visceral.....	11
Figura 5: Pacientes em período de estado da Leishmaniose Visceral.....	11
Figura 6: Paciente em período final da Leishmaniose Visceral.....	12
Figura 7: Formas cutâneas de LTA.....	13
Figura 8: Leishmaniose Mucosa.....	14
Figura 9: Efeito dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> e <i>X. nematophila</i> sobre o crescimento de <i>L. amazonensis</i> <i>in vitro</i> .....	34
Figura 10: Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> (A), <i>X. nematophila</i> (B), <i>E. coli</i> (C) e <i>E. faecalis</i> (D).....	36
Figura 11: Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> (AD) e <i>X. nematophila</i> (EH).....	38
Figura 12: Efeito dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> e <i>X. nematophila</i> na integridade de <i>L. amazonensis</i> .....	39
Figura 13: Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> (A) e <i>X. nematophila</i> (B) aquecidos a 100 °C.....	42

Figura 14: Efeito citotóxico dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> (A) e <i>X. nematophila</i> (B) em macrófagos.....	43
Figura 15: Efeito dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> (A e C) e <i>X. nematophila</i> (B e D) sobre a viabilidade das formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e a produção de óxido nítrico, <i>in vitro</i> .....	45

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atividade dos sobrenadantes de culturas de <i>P. luminescens</i> and <i>X. nematophila</i> sobre a viabilidade de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos em 48 horas.....	37
--	----

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µL	Microlitro
5YS	Extrato de levedura 5% + sais
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
mL	Mililitro
µL	Microlitro
ng	Nanogramas
NBTA	Ágar nutriente-bromotimol-tetrazólio
rpm	Rotações por minuto
TSA	Ágar triptona de soja (do inglês: Tryptone Soy Agar)
µm	Micrômetro
LPS	Lipopolissacarídeo
INF-γ	Interferon gama
h	Horas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
°C	Graus Celsius
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
IL	Interleucina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
p/v	peso/volume
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2010a), estima-se que cerca de um bilhão de pessoas sofram de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (Organização Mundial da Saúde, 2010a). Embora essas doenças sejam típicas de países pobres e em desenvolvimento, a sua ocorrência tem aumentado nos países desenvolvidos e tem um impacto devastador sobre a humanidade. A leishmaniose, que é uma doença parasitária vetoriada causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é uma das principais DTNs. É considerada endêmica em 98 países de cinco continentes, nos quais cerca de 350 milhões de pessoas são consideradas em risco de contrair a infecção (Alvar et al., 2012). Uma infecção por *Leishmania* pode causar um amplo espectro de sintomas que vão desde úlceras localizadas até lesões muitas vezes fatais (García-Hernández et al., 2012; MacMahon-Pratt e Alexander, 2004; Soong et al., 2012). Atualmente, não existe uma vacina eficaz para prevenir a leishmaniose humana e os fármacos disponíveis para a quimioterapia apresentam várias limitações, tais como elevada toxicidade e elevado custo (Organização Mundial da Saúde, 2010b; Sundar, 2001; Sánchez-Cañete et al., 2009).

Nas últimas décadas, tem havido um interesse renovado em produtos naturais derivados de plantas ou microrganismos como fonte ou como um modelo para a concepção de novos fármacos, incluindo substâncias anti-infecciosas (Cragg e Newman, 2013; Kondo et al., 2002; Xu et al., 2004; Zhou et al., 2013). Entre as bactérias entomopatogênicas, aquelas dos gêneros

*Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são tidas como fontes promissoras para novos produtos naturais (Bode, 2009). Na natureza, elas estão simbioticamente associadas com nematódeos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente. A patogenicidade destas bactérias está baseada na habilidade de se multiplicarem dentro da hemocele de insetos, produzirem substâncias tóxicas e causarem septicemia (Owuama, 2001).

Atualmente, a bioatividade de *X. nematophila* e *P. luminescens* não foi testada em parasitos da espécie *Leishmania amazonensis*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de *X. nematophila* e *P. luminescens* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, bem como contra formas amastigotas presentes no interior dos macrófagos.

## 2 OBJETIVOS

### **Geral:**

Avaliar a ação leishmanicida dos sobrenadantes de culturas das bactérias *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *in vitro*.

### **Específicos:**

-Investigar se os sobrenadantes de culturas das bactérias *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* apresentam atividade citotóxica contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, *in vitro*;

-avaliar a citotoxicidade dos sobrenadantes de culturas das bactérias sobre macrófagos;

-determinar o índice de seletividade dos sobrenadantes de culturas das bactérias com ação contra *L. amazonensis*;

-avaliar a capacidade leishmanicida de macrófagos tratados com os sobrenadantes de culturas das bactérias;

-comparar a atividade leishmanicida de macrófagos murinos estimulados *in vitro* com LPS/IFN- $\gamma$  com os sobrenadantes de culturas das bactérias;

-determinar a concentração de Óxido Nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos infectados e estimulados com os sobrenadantes de culturas das bactérias.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Leishmaniose

##### 3.1.1 Agente Etiológico

Os agentes etiológicos das leishmanioses são parasitos do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomastidae) (Gontijo e Carvalho, 2003). Estes protozoários são heteroxenos e apresentam em seu ciclo de vida duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular (Figura 1a), e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos (Figura 1b). As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20  $\mu\text{m}$  e flagelo livre. As amastigotas têm corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2  $\mu\text{m}$  e flagelo interno (Pêsoa e Martins, 1982).

O gênero *Leishmania* compreende muitas espécies epidemiologicamente diversas que podem ser agrupadas, segundo Lainson e Shaw (1987), em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, com base no desenvolvimento do parasito no vetor. Cerca de vinte espécies podem causar a leishmaniose em todo o mundo. No Novo Mundo, as principais espécies são *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *panamensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (L.) *mexicana*, *Leishmania* (L.) *amazonenses*, *Leishmania* (L.) *venezuelensis*, *Leishmania* (L.) *chagasi* (Tortora, 2012).

As diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem grande variedade de manifestações clínicas durante uma infecção, que dependem da interação entre componentes do sistema imune do hospedeiro vertebrado e da invasividade, tropismo e patogenicidade do parasito (Organização Mundial da Saúde, 2010b). Os reservatórios primários dos parasitos são animais silvestres, mas animais como o cavalo e o cachorro, que convivem diretamente com o homem, servem como reservatórios secundários (Oliveira-Neto et al., 2000).

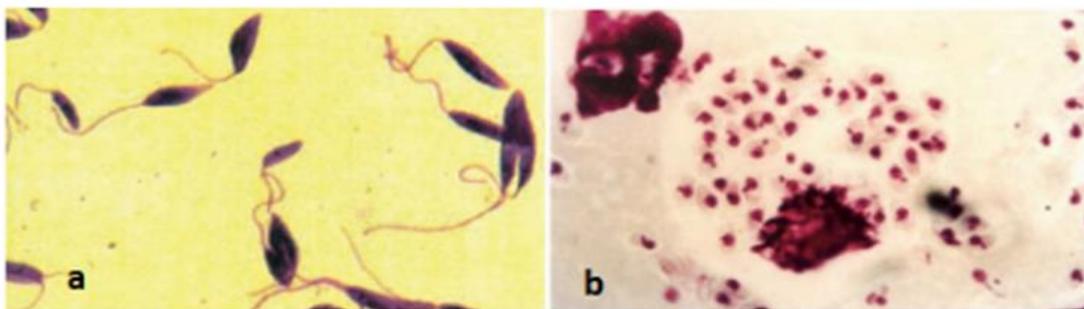


Figura 1: Formas promastigota (a) e amastigota (b) de *Leishmania* spp. (Fonte: Ministério da Saúde, 2006). Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceralf.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceralf.pdf). Acesso: 16 dez. 2014.

### 3.1.2 Vetores

Os vetores da *Leishmania* spp. são insetos da Ordem Díptera; Família Psychodidae; Subfamília Phlebotominae (Basano e Camargo, 2004). Várias espécies do gênero *Phlebotomus*, encontradas no Velho Mundo, e do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, são vetores de *Leishmania* spp. (Organização Mundial da Saúde, 2010b). São comumente chamados de flebotomíneos e popularmente conhecidos por mosquito palha, birigui, tatuquira, cangalhinha, dentre outros. São insetos (Figura 2) pequenos, medem de 1 a 3 mm, que têm como características a coloração amarelada ou de cor palha, corpo revestido por pelos e, em posição de repouso, suas asas

permanecem eretas e semiabertas (Brasil-MS, 2006).

O ciclo biológico dos flebotomíneos ocorre no ambiente terrestre. Os ovos desenvolvem-se em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica (folhas, frutos, fezes de animais e outros entulhos que favoreçam a umidade do solo). O desenvolvimento do ovo à fase adulta ocorre em cerca de 30 dias. As formas adultas abrigam-se nos mesmos locais dos criadouros e em anexos peridomiciliares, principalmente em abrigos de animais domésticos (Brasil-MS, 2006).

As fêmeas alimentam-se do sangue de uma ampla variedade de animais, o que é necessário para o desenvolvimento dos ovos. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética, que são extraídos da seiva de plantas. A alimentação é predominantemente noturna. Tanto o macho quanto a fêmea tendem a não se afastar muito de seus criadouros ou locais de abrigo, podendo se deslocar até cerca de um quilômetro, com a expressiva maioria não indo além dos 250 metros. Estima-se que o tempo de vida médio da fêmea é de 20 dias (Brasil-MS, 2007).



Figura 2: Fêmea de flebotomíneo (Fonte: Ministério da Saúde, 2006). Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceralf.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceralf.pdf). Acesso: 16 dez. 2014.

### 3.1.3 Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Protozoários do gênero *Leishmania* são transmitidos através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas com o parasito (Figura 3). As fêmeas inoculam as formas infectantes (promastigotas metacíclicas) durante o repasto sanguíneo (Brasil-MS, 2006; Organização Mundial Da Saúde, 2010b; Tortora, 2012). As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos ou por outras células do tecido fagocítico mononuclear. Nos macrófagos, as formas promastigotas (flagelares) transformam-se nas formas amastigotas (aflagelares), que se multiplicam por divisão binária e conseguem inibir diversos mecanismos de defesa celular que deveriam provocar sua lise, tais como fusão fagossomo-lisossomo, enzimas hidrolíticas, produção de NO dentre outros (Yao et al., 2003). Quando a célula está densamente parasitada, há o rompimento da sua membrana e as amastigotas infectam novos macrófagos, exacerbando assim a infecção (Alexander et al., 1999).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No intestino do flebótomo, ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando as formas amastigotas que sofrem divisão e se diferenciam em promastigotas procíclicas, capazes de se dividir, mas que não são infectantes. Nesta forma, o parasito coloniza o epitélio intestinal e em seguida, passa por um processo chamado metaciclogênese, no qual se converte para a forma promastigota metacíclica, que é a forma infectante. Os parasitos destacam-se das células intestinais e migram para o aparelho bucal do inseto (Ilg et al., 1992). Na próxima picada, o parasito na forma promastigota metacíclica é inoculado no hospedeiro mamífero e invade as células fagocíticas

mononucleares (Brasil-MS, 2007; Organização Mundial da Saúde, 2010b; Tortora, 2012).

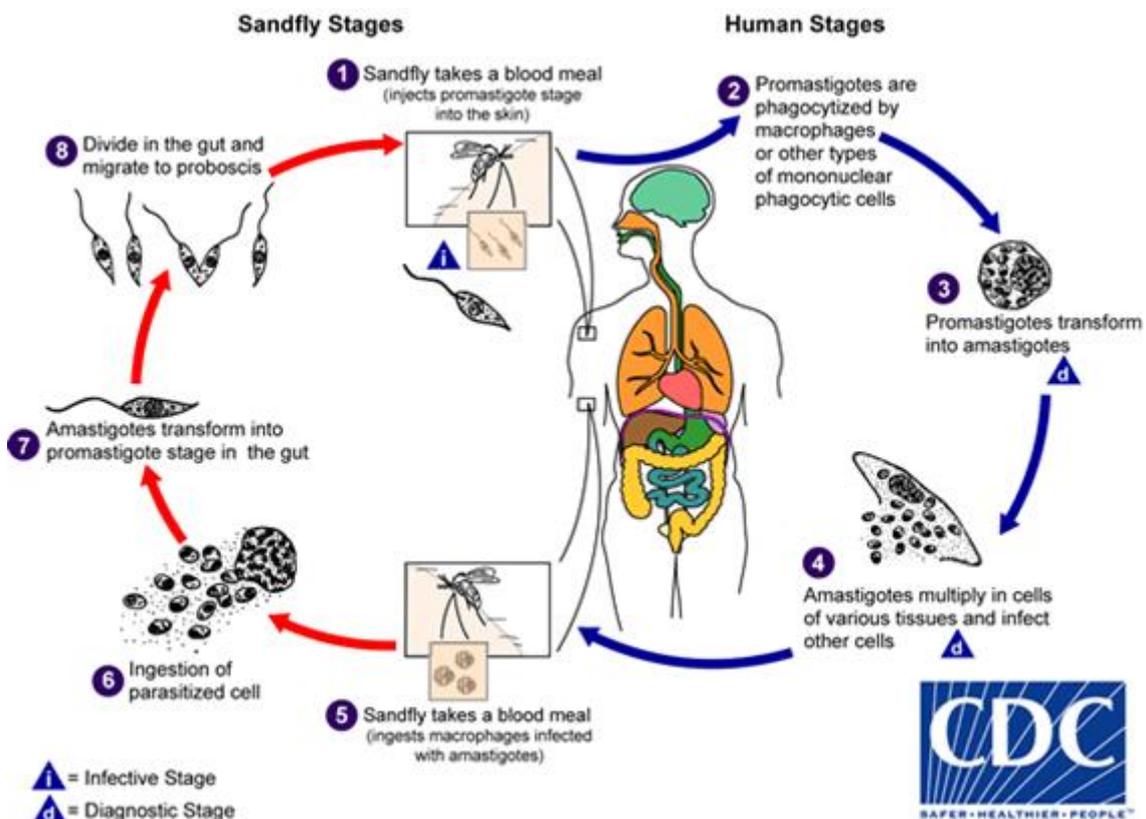


Figura 3: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Fonte: Center for Control Diseases). Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso: 16 dez. 2014.

### 3.1.4 Epidemiologia

A Leishmaniose é endêmica em 98 países e 3 territórios de 5 continentes. Há notificação de aproximadamente 58.000 casos de Leishmaniose Visceral (LV) e 220.000 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) por ano. No entanto, esta é uma doença de notificação compulsória em apenas cerca de dois terços dos países, o que faz com que estes dados sejam subestimados. Com base em estimativas, os dados reais são de aproximadamente 0,2-0,4 milhões de casos de LV e 0,7-1,2 milhões de casos de LTA por ano no mundo.

Mais de 90% dos casos de LV globais ocorrem em apenas seis

países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. Os dez países com maior número de casos de LTA são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, que juntos respondem por 70 a 75% de incidência leishmaniose cutânea global estimada (Alvar et al., 2012). Acredita-se que existam hoje, em todo o mundo, 12 milhões de pessoas infectadas e cerca de 350 milhões expostas aos riscos de infecção por *Leishmania* spp. (Organização Mundial da Saúde, 2010b).

Os dados de mortalidade são extremamente escassos e geralmente representam apenas as mortes de base hospitalar. No subcontinente indiano, a taxa de letalidade foi de 1,5% (93 mortes/6.224 casos de LV) no período de 2004-2008 (Alvar et al., 2012). A taxa de mortalidade relatada para LV no Brasil em 2009 foi de 5,7% (Brasil-MS, 2011). Usando uma taxa global de mortalidade de 10% e assumindo que praticamente todas as mortes são de LV, chegamos a uma estimativa preliminar de 20.000 a 40.000 mortes de leishmaniose por ano, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde, (2010b).

Os dados epidemiológicos mostram que a doença está em franca expansão e que algumas áreas anteriormente livres agora têm casos autóctones. Neste contexto, verifica-se uma tendência de expansão da leishmaniose no Sul do Brasil. De 2000 a 2010 foram diagnosticados 107 casos de LTA no RS. Com relação à LV, no ano de 2009 foram detectados 8 casos, sendo sete autóctones do município de São Borja e um advindo de Três Lagoas. No ano de 2010 dois novos casos foram detectados (Rio Grande Do Sul-SES-CEVS/RS, 2011).

No Brasil, no ano de 2013, foram notificados 3253 casos de LV, no RS houve dois registros, já o número de óbitos em todo o país foi de 231.

Neste mesmo ano, foram registrados 18226 casos de LTA, no RS houve 9 casos (Brasil-MS 2013a; Brasil-MS 2013b).

### **3.1.5 Formas Clínicas**

As leishmanioses humanas são caracterizadas por diversos sintomas e manifestações clínicas, que variam de lesões únicas na pele a infecções graves de órgãos internos. Tais manifestações podem ser divididas em dois grupos: Leishmaniose Visceral, caracterizada pela infecção de órgãos como baço e fígado e a Leishmaniose Tegumentar, caracterizada por lesões na pele e mucosas. Manifestações clínicas da doença, bem como sua patologia, são dependentes da espécie de *Leishmania*, do estado nutricional do hospedeiro e da resposta imune por ele desenvolvida (Anstead et al., 2001).

#### **3.1.5.1 Leishmaniose Visceral**

O espectro clínico da LV pode variar desde manifestações clínicas discretas até as graves, que se não tratadas, podem levar ao óbito. A LV também é conhecida como Calazar e febre dundun (Brasil-MS, 2006).

Segundo o Ministério da Saúde (2006), no curso da doença podemos verificar a presença de três períodos:

Período inicial: caracteriza-se pelo início da sintomatologia, na maioria dos casos inclui febre inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (Figura 4). O estado geral do indivíduo está preservado. Em área endêmica, uma pequena proporção de indivíduos, geralmente crianças, pode apresentar um quadro clínico discreto (com duração de cerca de 15 dias), com sintomas como febre baixa, palidez cutâneo-mucosa

leve, diarreia e/ou tosse não produtiva e pequena hepatoesplenomegalia, que frequentemente evolui para cura espontânea (forma oligossintomática) (Brasil-MS, 2006).



Figura 4: Pacientes em período inicial da Leishmaniose Visceral (Fonte: Ministério da Saúde, 2006). Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceralfdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceralfdf). Acesso: 16 dez. 2014.

Período de estado: caracteriza-se por febre irregular, associada ao emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (Figura 5). Apresenta um quadro geralmente com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado a comprometimento do estado geral de saúde (Brasil-MS, 2006).



Figura 5: Pacientes em período de estado da Leishmaniose Visceral (Fonte: Ministério da Saúde, 2006). Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceralfdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceralfdf). Acesso: 16 dez. 2014.

Período final: caso não seja realizado o tratamento, a doença evolui progressivamente para o período final, com febre contínua e comprometimento

mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição, edema dos membros inferiores que pode evoluir para anasarca (Figura 6). Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é decorrente de infecções bacterianas e/ou sangramentos (Brasil-MS, 2006).



Figura 6: Paciente em período final da Leishmaniose Visceral. (Fonte: Ministério da Saúde, 2006). Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceralf.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceralf.pdf). Acesso: 16 dez. 2014.

### **3.1.5.2 Leishmaniose Tegumentar Americana**

As manifestações clínicas da doença dependem não apenas da espécie envolvida, mas também do estado imunológico do indivíduo infectado. A Leishmaniose Cutânea (LC) representa a manifestação clínica mais frequente, na qual as lesões são exclusivamente cutâneas e tendem à cicatrização. A lesão começa com uma pápula no local onde o parasito foi inoculado pelo flebotomíneo. Ela cresce normalmente durante uma semana e atinge seu tamanho final de até 5 cm de diâmetro, com borda elevada e endurecimento circundante variável, ao longo de meses ou anos (Figura 7) (Brasil-MS, 2007; Organização Mundial da Saúde, 2010b).

As lesões únicas ou em pequeno número são as mais frequentes, mas em casos mais raros, as lesões podem ser numerosas, caracterizando a forma cutânea disseminada. As lesões apresentam aspectos variados e a infecção bacteriana secundária altera este aspecto tornando-as mais inflamadas, dolorosas e purulentas. Alguns indivíduos curam precocemente a lesão, outros permanecem meses com a lesão e o processo de cicatrização mostra-se lento. Isto pode ser explicado pelo estabelecimento rápido ou tardio de uma resposta imune específica eficiente na eliminação do parasito. Na Leishmaniose cutânea disseminada, geralmente há adenomegalia satélite e após o desenvolvimento das lesões primárias, ocorre disseminação do parasito por via hemática ou via linfática, mais ou menos aguda, que se estabelece em poucos dias, causando lesões distantes do local da picada (Brasil-MS, 2007).



Figura 7: Formas cutâneas de LTA (Fonte: Ministério da Saúde, 2006). Disponível em:[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf). Acesso: 16 dez. 2014.

A forma mucosa ou mucocutânea (LM) é caracterizada por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores (Figura 8). A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática. Geralmente surge após a cura clínica da LC, com início insidioso e pouca

sintomatologia. Na maioria dos casos, a LM resulta da LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Acomete com mais frequência o sexo masculino e faixas etárias usualmente mais altas do que a LC. Alguns indivíduos apresentam concomitantemente lesões cutânea e mucosa. Geralmente a lesão é indolor e se inicia no septo nasal anterior, cartilaginoso, próxima ao intróito nasal, sendo, portanto, de fácil visualização (Ministério da Saúde, 2007).



Figura 8: Leishmaniose Mucosa. (Fonte: Ministério da Saúde, 2006). Disponível em:[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf). Acesso: 16 dez. 2014.

### **3.1.6 Infecção por *Leishmania* spp. e resposta imune do hospedeiro**

Dependendo das espécies envolvidas e da resposta imune do hospedeiro, a infecção por *Leishmania* spp. provoca um espectro de doenças que varia de úlceras autolimitadas a infecções disseminadas e muitas vezes fatais (Organização Mundial da Saúde, 2010b).

A infecção do hospedeiro mamífero é iniciada pela deposição de promastigotas flageladas na pele durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos. Os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da picada do vetor e são responsáveis pela fagocitose dos parasitos. Estas células

podem matar os parasitos ou servirem como reservatórios, neste caso os neutrófilos infectados gradualmente sofrem apoptose e são ingeridos pelos macrófagos. Este modelo foi denominado o "cavalo de Tróia" para descrever a entrada "silenciosa" de *Leishmania* nos macrófagos (Santos e Brodskyn, 2014). Macrófagos são células frequentes no local da infecção causada por *Leishmania* spp. e apresentam múltiplas funções: servem como células hospedeiras do parasito, como células apresentadoras de antígenos (APCs) e como produtoras de citocinas moduladoras da resposta mediada por linfócitos T (De Freitas e Pinheiro, 2010; Naderer e Mcconville, 2007). Após a fagocitose, as promastigotas são direcionadas para fagolisossomos, onde se diferenciampara a forma amastigota. Estas proliferam por divisão binária e, após o rompimento da membrana do macrófago pela alta carga parasitária, podem atingir outros macrófagos, bem como outras células fagocíticas, exacerbando assim a infecção (Naderer e Mcconville, 2007). Outra célula importante para a resposta imunitária contra a *Leishmania* é a célula dentrítica (CD). No modelo murino de *L. major*, a infecção da CD leva a sua ativação, que regula positivamente a expressão de moléculas de MHC da classe II, moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, e a liberação de IL-12. As células Natural Killer (NK) também participam do processo sendo fonte importante de IFN- $\gamma$ , que estimula mecanismos microbicidas em macrófagos (Santos e Brodskyn, 2014).

O controle da infecção é fortemente dependente da ativação de linfócitos T. Estas células podem tanto induzir o controle da infecção, como também promover uma supressão excessiva da resposta imune. Em resposta aos antígenos de microrganismos apresentados pelas APCs, as células T CD4<sup>+</sup>

auxiliares podem se diferenciar em subpopulações: Th1, Th2, Th17, Treg, dentre outras (De Freitas e Pinheiro, 2010). Células Th1 secretam citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, já as células Th2 secretam IL-4 e IL-10 e as células Th17 secretam IL-17 e IL-22 (Bogdan e Rollinghoff, 1998; DeFreitas e Pinheiro, 2010; Reis et al., 2006, Soong et al, 2012). Em modelo de infecção utilizando camundongo BALB/c e *L. major*, o desenvolvimento de resposta Th1 está associado com o controle da infecção, já a resposta Th2 está associada com a progressão da doença (Santos e Brodskyn, 2014; Sharma e Singh, 2009). Sabe-se que o NO é uma molécula efetiva contra vários patógenos e, de maneira geral, citocinas do perfil Th1 induzem sua produção. Em relação à leishmaniose, macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *in vitro* com IFN- $\gamma$  e LPS liberam grandes quantidades de NO e destroem o parasito (Reis et al, 2006; Romão et al, 1999). Em seres humanos, não é possível observar a dicotomia entre Th1 e Th2 (Sharma e Singh, 2009; Soong et al., 2012). Estudo com LC humana provocada por *L. braziliensis* e *L. major*, encontrou-se resposta Th1 predominante sobre a Th2. Outras investigações detectaram IL-13 e IL-4 na pele após o desenvolvimento inicial das lesões, sugerindo que citocinas Th2 tenham um papel imunorregulatório no início da infecção. Na LV humana os níveis de IL-4 e IFN- $\gamma$  estão elevados durante a doença ativa e declinam significativamente após a cura; a falta de produção de IFN- $\gamma$  parece prever progressão da gravidade da doença (Sharma e Singh, 2009).

Em modelo experimental, a suscetibilidade e resistência à infecção por *Leishmania* spp. também está relacionada com a emergência das células T reguladoras (Treg). Células Treg (Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) suprimem a atividade de

células T efectoras através da produção de IL-10 (Sharma e Singh, 2009). As células Th17 recentemente têm sido definidas como uma linhagem de células T efectoras, importantes na manutenção da homeostase. A descoberta deste novo subconjunto de células T CD4+ efectora explica as respostas que ocorrem independentemente da conhecida resposta tipo Th1 e Th2. Em infecção humana causada por *L. donovani*, IL-17 e IL-22, estão associadas com proteção contra calazar (Soong et al, 2012). As células TCD8+ também atuam na resposta imune à infecção por *Leishmania* spp. e possuem papel importante após a reinfecção, produzindo grande quantidade de IFN- $\gamma$  (Santos e Brodskyn, 2014).

Para o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* precisa adotar mecanismos de escape do sistema imune, tais como: evitar a lise do sistema complemento através do lipofosfoglicano (LPG) e proteína GP63 (ambos presentes na membrana celular do parasito), sobreviver ao processo de fagocitose, inibir a formação do fagolisossomo, neutralizar os radicais hidroxilas e ânions superóxidos através do LPG, inibir a degradação das enzimas do fagolisossomo pela enzima gp63, resistir ao NO, ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ao pH ácido do fagolisossomo e induzir a expansão de células do tipo Th2 (Boddan e Rollinghoff, 1998; Naderer e Mcconville, 2007; Yao et al., 2003).

### **3.1.7 Tratamento**

As decisões de tratamento devem ser individualizadas. Em geral, todos os casos de leishmaniose visceral necessitam de algum tipo de tratamento. Entretanto, nem todos os casos de leishmaniose cutânea o requerem. A abordagem do tratamento depende de fatores inerentes ao

hospedeiro e ao parasito. Algumas abordagens só são eficazes contra determinadas espécies de *Leishmania* e apenas em determinadas regiões geográficas. Grupos especiais tais como crianças, idosos, mulheres grávidas/lactantes e pessoas imunocomprometidas ou que têm outras comorbidades, podem necessitar de diferentes medicamentos ou regimes de dosagens (Organização Mundial da Saúde, 2010b).

Os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime), foram introduzidos como quimioterápicos na década de 40, sendo atualmente os principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses (Murray et al., 2005). A via de administração é intramuscular ou intravenosa e também pode ser administrada na lesão para o tratamento da leishmaniose cutânea. Os efeitos colaterais mais comuns são anorexia, vômitos, náuseas, dor abdominal, mal-estar, mialgia, artralgia, dor de cabeça, gosto metálico e letargia. Podem ocorrer alterações no eletrocardiograma, como a inversão da onda T, um intervalo Q-T prolongada e arritmia. Cardiotoxicidade e morte súbita são efeitos secundários graves, mas pouco frequentes. Concentrações de enzimas pancreáticas são comumente elevadas, mas pancreatite clínica é incomum. Outros achados podem ser leucopenia, anemia, trombocitopenia e alterações hepáticas (Organização Mundial Da Saúde, 2010b; Singh e Sivakumar, 2004).

O polieno anfotericina B é utilizado no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, apresentando também atividade contra *Leishmania*. O mesmo atua ligando-se ao ergosterol da membrana celular de fungos e *Leishmania* (Singh e Sivakumar, 2004). Este fármaco é utilizado nos casos de resistência do parasito aos antimoniais. Seus efeitos colaterais comuns são

reações à perfusão, incluindo febre, calafrios e tromboflebite da veia utilizada na administração do medicamento. A nefrotoxicidade também é comum, levando à interrupção frequente do tratamento. Outros efeitos raros, mas graves, são hipocalcemia e miocardite. O tratamento deve ser sempre no hospital para permitir o monitoramento contínuo dos pacientes (Organização Mundial Da Saúde, 2010b).

Existem várias formulações lipídicas de anfotericina B, incluindo a anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B e dispersão coloidal de anfotericina B, que têm sido usadas no tratamento da leishmaniose. Elas são semelhantes à anfotericina B tradicional na sua eficácia, mas são significativamente menos tóxicas. Reações à infusão leve (febre, calafrios e rigor) e dor nas costas podem ocorrer em alguns pacientes. Nefrotoxicidade transitória ou trombocitopenia ocorrem ocasionalmente. Estas apresentações de anfotericina B apresentam custo elevado, o que dificulta seu uso em larga escala (Singh e Sivakumar, 2004).

O Isotiocianato de pentamidina, outro medicamento para tratar leishmaniose, é administrado por via intramuscular ou através de infusão intravenosa. Efeitos adversos graves, como diabetes mellitus, hipoglicemia grave, choque, miocardite e nefrotoxicidade limitam seu uso (Organização Mundial da Saúde, 2010b).

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo utilizado em infecções bacterianas que também possui ação contra parasitos do gênero *Leishmania* (Iraji e Sadeghinia, 2005). Geralmente é administrado por via intramuscular. O acometimento mais comum é dor no local da injeção. A nefro e ototoxicidades são raras. Alguns pacientes podem desenvolver

hepatotoxicidade, indicado por concentrações das enzimas hepáticas elevadas. Também tem sido relatado tetania. Uma formulação tópica está disponível para leishmaniose cutânea (Organização Mundial Da Saúde, 2010b).

A miltefosina foi originalmente desenvolvida como um medicamento oral anticancerígeno, mas mostrou atividade leishmanicida. Os principais efeitos colaterais são náuseas, diarreia, vômito, porém são transitórios e passam com o decorrer do tratamento. Devido à ação teratogênica, não deve ser utilizado por mulheres grávidas ou em idade fértil (Organização Mundial da Saúde, 2010b).

Os Azóis são uma classe de antifúngicos que incluem o cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Estes agentes antifúngicos orais têm eficácia variável no tratamento da leishmaniose (Organização Mundial da Saúde, 2010b).

O alopurinol é um análogo da hipoxantina, que inibe o catabolismo das purinas em mamíferos e o anabolismo em patógenos do gênero *Leishmania* (Singh e Sivakumar, 2004).

### **3.1.8 Busca por novos fármacos anti-*Leishmania***

Os fármacos contra a leishmaniose possuem eficácia variável e elevada toxicidade. A maioria requer administração em ambiente hospitalar e o tratamento é prolongado, o que faz com que os pacientes muitas vezes não cumpram o esquema terapêutico. Tais características indesejáveis associadas ao aparecimento de parasitos resistentes (estudos realizados na Índia demonstram que quase 80% dos parasitos são resistentes aos antimoniais) e à ausência de medidas profiláticas eficientes e de vacina, demonstram a

necessidade do desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos tóxicos aos pacientes (Moore e Lockwood, 2011; Sundar et al., 2001).

Sabe-se que os produtos naturais são fontes para a concepção de muitos medicamentos. Estes produtos proporcionam uma maior diversidade estrutural do que a química combinatória padrão e podem oferecer grandes oportunidades para o encontro ou isolamento de substâncias ativas contra uma ampla gama de alvos (Cragg e Newman, 2013; Harvey, 2000). Considerando que menos de 10% da biodiversidade do mundo foi testada para atividades biológicas, muitos compostos naturais que podem ser úteis estão aguardando para serem descobertos (Harvey, 2000).

A observação do potencial terapêutico dos produtos naturais tem levado à pesquisa de compostos de origem vegetal e de microrganismos. O estudo de Neuman et al. (2003), mostrou que entre 1981 e 2002, 52% das novas substâncias químicas disponíveis no mercado eram derivadas ou sintetizadas a partir de produtos naturais. Estes produtos possuem ação antibacteriana, anticoagulante, antineoplásica, antiparasitária e imunossupressora (Neuman et al., 2003).

As plantas são uma fonte promissora para compostos antiparasitários. A isotetrandina isolada de *Limaciopsis loagensis*, uma planta da família Menispermaceae demonstrou efeito leishmanicida maior que o glucantime em modelo de infecção sobre *L. amazonensis in vivo* (Fournet et al., 1993). Outro exemplo é a coroniridina, um alcaloide indólico obtido de *Peschiera australys*, da família Apocynaceae, que foi ativo contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (Delorenzi et al., 2001).

Alguns estudos têm demonstrado a ação tóxica de proteínas bacterianas contra protozoários como *Trichomonas* spp. (Kondo et al., 2002) e *Plasmodium berghei* (Xu et al., 2003). As bactérias entomopatogênicas, *Xenorhabdus nematophila* e *Photorhabdus luminescens* tem sido estudadas como fontes promissoras para novos produtos de origem natural (Bode, 2009). No entanto, pouco se conhece sobre a ação de compostos derivados destas bactérias sobre o sistema imune e sobre protozoários do gênero *Leishmania*.

### **3.2 *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila***

*Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são dois gêneros de bactérias que estão simbioticamente associados com nematódeos. Ambas são bactérias móveis, gram-negativas, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Outras características em comum entre os dois gêneros incluem habitat no intestino de nematódeos entomopatogênicos, crescimento na hemocele de insetos no estágio larval e potencial patogênico contra insetos (French-Constant et al., 2007; Forst et al., 1997; Owuama, 2001)

*Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. são carreadas como simbiontes no intestino de estágios infectivos juvenis de nematódeos pertencentes às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente (Forst et al., 1997). Nos nematódeos do gênero *Steinernema*, as bactérias são carreadas em uma vesícula específica, enquanto que no gênero *Heterorhabditis*, as bactérias estão na região anterior do intestino (Martens e Goodrich-Blair, 2005). No solo, os nematódeos penetram na cavidade corporal de insetos através de aberturas naturais, como boca, ânus, ou espiráculos (Gulcu et al., 2012; Shrestha et al., 2012). Na cavidade corporal, os

nematódeos liberam as bactérias por regurgitação diretamente na hemocele do inseto (Ciche e Ensign, 2003; Heermann et al., 2008). As bactérias multiplicam-se rapidamente e provocam septicemia letal no hospedeiro pela produção de uma ampla variedade de compostos tóxicos e substâncias imunomoduladoras (Duchaud et al., 2003), causando a morte do inseto em 48 horas (Gulcu et al., 2012; Heermann et al., 2008). A bioconversão do cadáver do inseto por enzimas produzidas pelas bactérias permite que elas se multipliquem e que o nematódeo se reproduza por várias gerações (Duchaud et al., 2003; Heermann et al., 2008). Com o esgotamento de nutrientes os nematódeos evoluem para o estágio infectivo juvenil e se reassociam com as bactérias antes de emergir do cadáver do inseto para o solo à procura de novos insetos hospedeiros.

Durante o complexo ciclo de vida, além das bactérias matarem o inseto hospedeiro usando várias toxinas proteicas, também precisam combater vários outros microrganismos que competem por alimentos. Microrganismos saprófitos do solo, bem como bactérias que aderem ao intestino do inseto ou à cutícula do nematódeo representam potenciais concorrentes que podem crescer dentro do cadáver do inseto (Bode, 2009). Para competir com sucesso, espécies de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* produzem bacteriocinas derivadas de fagos (Thaler et al., 1995), e complexos de toxinas (ffrench-Constant et al., 2007), bem como vários metabólitos secundários (Bode, 2009).

Através do sequenciamento completo do genoma de *Photorhabdus luminescens* ssp. *laumondii* cepa TT01, foram identificadas várias toxinas proteicas e enzimas hidrolíticas (proteases, lipases e quitinases), presumivelmente úteis para matar os insetos hospedeiros (Duchaud et al., 2003). Além disso, vários genes que codificam enzimas envolvidas na

biossíntese de metabólitos secundários foram identificados e a reanálise da sequência do genoma levou à identificação de pelo menos 23 agrupamentos de genes da biossíntese que correspondem a mais de 6,5% da sequência do genoma global. Estes números colocam o gênero *Photorhabdus* muito perto das bactérias do gênero *Streptomyces*, as quais são consideradas como potentes produtores de metabólitos secundários (Bode, 2009).

Os genomas de *Xenorhabdus nematophila* e *Xenorhabdus bovienii* foram sequenciados e também foram identificados grupamentos de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários. Além das toxinas proteicas, espécies de *Xenorhabdus* também produzem pequenas moléculas que estão envolvidas na sua virulência ou atuam como antibióticos. Exemplos são benzylideneacetone (Ji et al., 2004), rhabduscin (Crawford et al., 2012), xenocoumacins (McInerney, 1991), xenorhabdins (Hjelmgaard, 2007), xenofuranones (Brachmann et al., 2006), nematophin (Li et al., 1997), e depsipeptídeos, como xenematides, szentiamides, e xentrival peptídeos (Zhou et al., 2013), que mostraram atividades antibacterianas, antifúngicas ou citotóxicas. Muitos antibióticos têm sido isolados de cepas de *Xenorhabdus* (Bode, 2009). Dentre eles, xenocoumacin 1 exibe a atividade mais potente, com efeitos antimicrobianos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e também contra fungos patogênicos como *Cryptococcus neoformans* (Lang et al., 2008; McInerney et al., 1991). *Xenorhabdus* spp. também produzem compostos com atividade antiparasitária, embora estes não tenham sido tão bem estudados como xenocoumacin 1. Um exemplo é a szentiamide, que demonstrou boa atividade contra *Plasmodium falciparum* (Nollmann et al., 2012).

As bactérias entomopatogênicas *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* parecem representar uma nova e rica fonte de metabólitos secundários que necessita ser explorada. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses*, *in vitro*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Bactérias

Para este estudo, foram utilizadas bactérias entomopatogênicas cedidas pelo Dr. Ralf Heermann do Instituto de Microbiologia, Ludwig-Maximilians-Universität München, Alemanha. *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 DSM15139 (Fischer-Le Saux, 1999) e *Xenorhabdus nematophila* ATCC 19061 (Thomas e Poinar, 1979) foram utilizadas nos bioensaios de atividade leishmanicida. As bactérias *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Schleifer e Kilpper-Bälz, 1984) e *Escherichia coli* Castellani e Chalmers 1919 ATCC 25922 (Buchanan e Gibbons, 1974) foram utilizadas como controles negativos.

As bactérias *P. luminescens* e *X. nematophila* foram mantidas no laboratório de Parasitologia do ICBS da UFRGS em tubo de ensaio contendo meio sólido inclinado TSA, imersas em óleo mineral, em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, sendo realizados repiques trimestralmente.

As bactérias *E. coli* e *E. faecalis* foram mantidas criopreservadas em meio leite desnatado 10% no setor de Microbiologia do ICBS da UFRGS.

### 4.2 Culturas bacterianas e sobrenadantes de culturas das bactérias

As bactérias *P. luminescens* e *X. nematophila* foram semeadas por esgotamento no meio NBTA [ágar nutriente suplementado com 0,025% (p/v) de

azul de bromothimol e 0,004% (p/v) de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio] e cultivadas a 30°C por três dias com o intuito de verificar a pureza do cultivo e a fase fenotípica na qual as bactérias se encontravam. Uma colônia na fase 1 de cada bactéria foi inoculada em 50 mL de meio 5YS como descrito por Shrestha e Lee, (2012) [5% (p/v) de extrato de levedura, 0,5% (p/v) NaCl, 0,05% (p/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% (p/v) NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 % (p/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O]. Para estimular a proliferação bacteriana, as mesmas foram incubadas em Shaker a 180 rpm, temperatura de 28°C, durante 48 horas, tempo necessário para as bactérias atingirem a fase estacionária de crescimento. Posteriormente as culturas bacterianas foram centrifugadas a 2,295xg por 20 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em filtros de 0,22 µm, aliquotados em microtubos e armazenados a -20°C para uso posterior (por até 6 meses). *E. faecalis* e *E. coli* foram semeadas em ágar TSA. Uma colônia de cada cultura foi inoculada no meio 5YS. Cultura bacteriana, centrifugação e filtração foram efetuadas sob as mesmas condições utilizadas para *P. luminescens* e *X. nematophila*

#### **4.3 Cultura de *Leishmania amazonensis***

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/73/M2269) foram rotineiramente mantidas em meio M199 contendo 40 mM de HEPES, 0,1 mM de adenina, 7,7 mM de hemina, 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina. Culturas foram incubadas a 26°C, e as células foram mantidas em densidades que variavam entre 1 x 10<sup>5</sup> and 3 x 10<sup>7</sup> parasitos/mL (Romão et al., 2006).

#### **4.4 Efeito dos sobrenadantes de culturas de *X. nematophila* e *P.***

### ***luminescens* no crescimento de *L. amazonensis***

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram plaqueadas em placas de microtitulação de 12 poços na densidade de  $1 \times 10^5$ /mL com meio M199 (controle) ou diferentes concentrações (1-50% v/v) dos sobrenadantes de cultura de *X. nematophila* e *P. luminescens*, perfazendo volume final de 1mL por poço. O crescimento de *L. amazonensis* foi avaliado pela motilidade e densidade celular, que foi determinada diariamente, durante cinco dias, utilizando um hemocitômetro.

### **4.5 Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de *X. nematophila* e *P. luminescens***

O efeito citotóxico direto dos sobrenadantes de culturas das bactérias *X. nematophila* e *P. luminescens* sobre *L. amazonensis* foi avaliado *in vitro*. Formas promastigotas de *L. amazonensis*, na fase estacionária de crescimento, foram plaqueadas em placas de microtitulação de 96 poços ( $3 \times 10^6$ /poço) e depois incubadas com meio M199 suplementado com SBF a 10% (controle) ou com várias concentrações (0,2-50% v/v) dos sobrenadantes de cultura bacterianos, perfazendo volume final de 200 $\mu$ L por poço. A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada após diferentes tempos de incubação (3, 6, 12, 24 e 48 horas) por contagem das formas promastigotas viáveis utilizando um hemocitômetro. A anfotericina B (Sigma, EUA) na concentração de 4  $\mu$ g/mL foi utilizada como droga leishmanicida padrão (100% de mortalidade em 48 horas). A taxa de sobrevivência foi calculada de acordo com a fórmula: percentagem de sobrevivência (número médio de parasitos viáveis no grupo tratado/média de parasitos viáveis não tratados) x 100. Posteriormente foram

calculados os valores de concentração inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) para cada um dos sobrenadantes testados.

#### **4.6 Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli***

Sobrenadantes de culturas de *E. faecalis* e *E. coli* foram utilizados como controle negativo. Formas promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços ( $3 \times 10^6$ /poço) e depois incubadas com meio M199 suplementado com SBF a 10% (controle) ou com diferentes concentrações (1-50% v/v) dos sobrenadantes de culturas bacterianas, perfazendo volume final de 200  $\mu$ L por poço. A viabilidade de *Leishmania* foi analisada como descrito para os sobrenadantes de culturas das bactérias entomopatogênicas.

#### **4.7 Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas bacterianas aquecidos**

Para este ensaio, os sobrenadantes das culturas foram aquecidos a 100°C (em microtubos contendo 1 mL de sobrenadante) por 10 minutos, em banho-maria. Após este procedimento, foram armazenados a -20°C para uso posterior. O ensaio foi executado da seguinte forma: formas promastigotas de *L. amazonensis* foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços ( $3 \times 10^6$ /poço) e posteriormente incubadas com diferentes concentrações (0,2-50% v/v) dos sobrenadantes de cultura de *X. nematophila* e *P. luminescens* previamente aquecidos, perfazendo volume final de 200  $\mu$ L por poço. Após 48 horas de incubação, a viabilidade parasitária foi determinada pela contagem

dos parasitos viáveis em hemocitômetro. A porcentagem de parasitos viáveis foi determinada como descrito anteriormente.

#### **4.8 Viabilidade de macrófagos**

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram mantidos em cultura em meio RPMI 1640 suplementado com SBF 10%, 10 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Para os testes de viabilidade,  $1 \times 10^5$  células foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços e foram incubadas durante a noite a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as placas foram lavadas antes de serem cultivadas durante 44 horas a 37°C em meio RPMI ou o com meio na presença de diferentes concentrações (0,2-50% v/v) dos sobrenadantes de cultura das bactérias entomopatogênicas. Após este período, foi adicionado 20 µL/poço 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenil brometo de tetrazolina: MTT (5 mg/mL em PBS) e as incubações foram continuadas durante mais 4 horas. O produto formazan de cor púrpura, que é formado pela ação de enzimas mitocondriais em células vivas foi solubilizado pela adição de álcool isopropílico e foi realizada a leitura em espectrofotômetro, a 570 nm, utilizando o equipamento Spectramax M2 (Romão et al.,1999; Pal et al., 2011). Com estes dados foi calculada a concentração dos sobrenadantes de culturas das bactérias que causa 50% de citotoxicidade de macrófagos (CC<sub>50</sub>).

#### **4.9 Atividade leishmanicida de macrófagos estimulados com sobrenadantes de culturas de *X. nematophila* e *P. luminescens***

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram ajustados para a concentração de  $1 \times 10^6$ /mL em meio RPMI incompleto e distribuídos em placa de

microtitulação de 96 poços no volume de 100 µL/poço. Após 12-16 h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, as células não aderentes foram removidas e as células aderentes lavadas 3 vezes com meio RPMI pré-aquecido. Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* (5 parasitos/células). Quatro horas após a infecção, as culturas de células foram lavadas com PBS para remover os parasitos que não foram fagocitados pelos macrófagos e, em seguida, foram estimuladas com IFN-γ+LPS (10 ng/mL) ou foram incubadas com diferentes concentrações dos sobrenadantes de *X. nematophila* e *P. luminescens* (0,2-10% v/v). Após 48 horas, o sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C para determinação dos níveis de NO. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 100 µL de meio M199 contendo 0,01% de dodecil sulfato de sódio (SDS) durante 20 minutos a 37°C. Após este período, o volume de 100 µL de meio M199 suplementado com 30% de SBF foi adicionado às culturas e as mesmas foram transferidas para estufa B.O.D. a 26°C. A atividade leishmanicida dos macrófagos foi avaliada através da contagem em hemocítômetro do número de formas promastigotas recuperadas, uma vez que apenas amastigotas viáveis são capazes de se diferenciar em promastigotas. Com estes dados foi calculada a concentração dos sobrenadantes de culturas das bactérias que causa 50% de mortalidade dos parasitos (CI<sub>50</sub>).

#### **4.10 Dosagem de Óxido Nítrico**

A concentração de NO no sobrenadante de macrófagos infectados e ativados foi determinada pela reação de Griess de acordo com Romão et al. (1999).

#### 4.11 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, e a análise estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. As análises foram realizadas pelo GraphPad Software versão 5.0 e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todos os experimentos foram repetidos três vezes e realizados em quadruplicata. Os valores  $CI_{50}$  e  $CC_{50}$  para cada um dos sobrenadantes bacterianos foram determinados por análise de regressão linear utilizando o programa GW-Basic Probit. O índice de seletividade (IS) dos sobrenadantes de culturas das bactérias foi determinado considerando-se a seguinte equação:  $CC_{50}$  contra células de mamíferos/ $CI_{50}$  contra *L. amazonensis*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* sobre o crescimento de *L. amazonensis*

Como um primeiro passo para testar a toxicidade dos sobrenadantes das culturas sobre os parasitos, avaliou-se o crescimento *in vitro* de formas promastigotas de *L. amazonensis* incubadas com diferentes concentrações dos sobrenadantes das culturas das bactérias. Na figura 9 observa-se que os sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* inibiram significativamente o crescimento dos parasitos em todas as concentrações testadas, e que não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações testadas. Sugere-se assim, que ambos os sobrenadantes continham compostos bioativos capazes de inibir o crescimento dos parasitos, *invitro*.

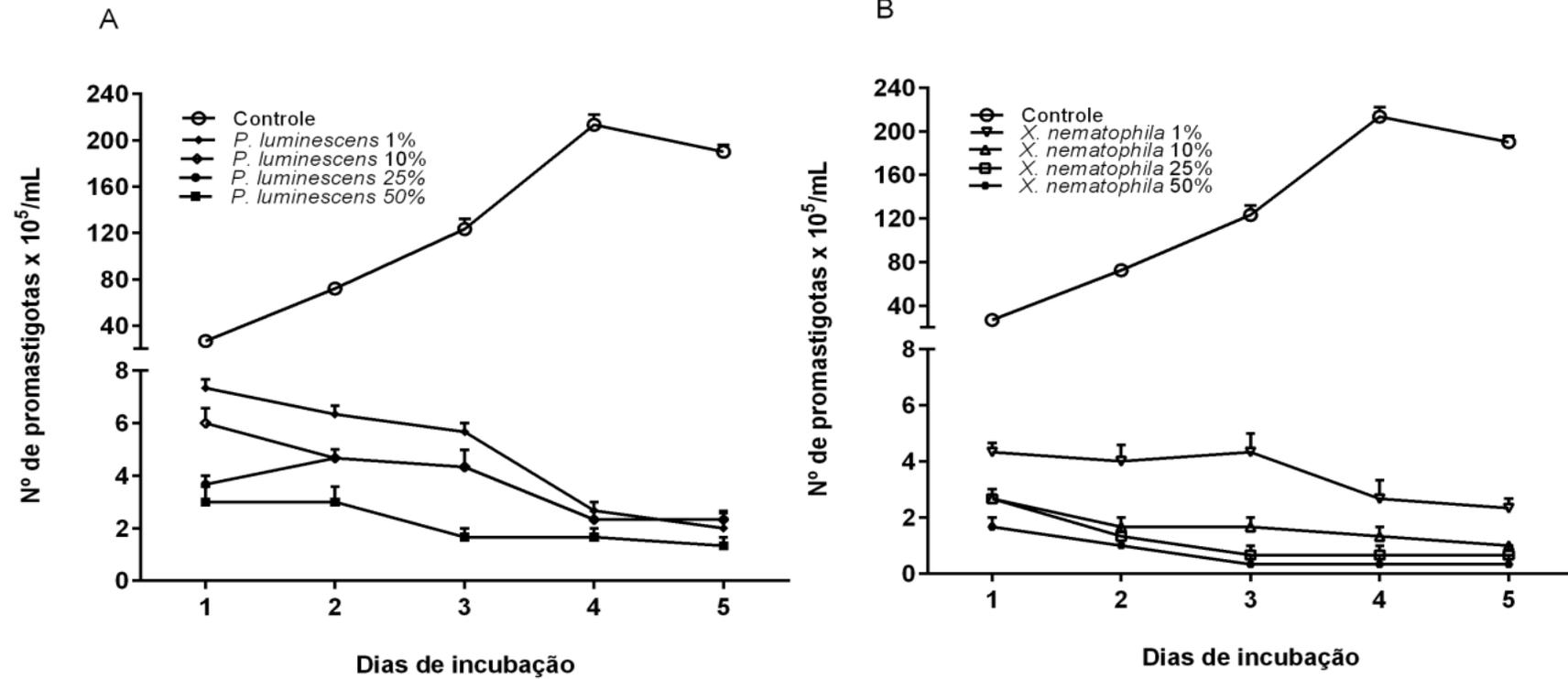


Figura 9: Efeito dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* sobre o crescimento de *L. amazonensis* *in vitro*. Foram plaqueados  $1 \times 10^5$  parasitos/mL com em meio M199 (controle) ou M199 na presença de diferentes concentrações dos sobrenadantes bacterianos. Cada ponto representa a média do número de promastigotas viáveis de três experimentos independentes.

## **5.2 Efeito leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis***

Foi testado o efeito dos sobrenadantes das culturas bacterianas sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Observou-se assim, morte dos parasitos de modo concentração-dependente. Após 48 h de incubação, observou-se diferença significativa na magnitude da atividade leishmanicida entre *P. luminescens* e *X. nematophila*. O sobrenadante de cultura de *X. nematophila* foi mais letal que o de *P. luminescens* em todas as concentrações (Figura 10A e 10B). Os valores de  $CI_{50}$  para *P. luminescens* e *X. nematophila* foram 7,50 e 0,63% (v/v), respectivamente (Tabela 1). Como esperado, a anfotericina, apresentou potente atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* ( $CI_{50}$  48 h= 0,12  $\mu$ g/mL) (dados não mostrados). O sobrenadante da cultura da bactéria *E. coli* apresentou baixa toxicidade e o sobrenadante de cultura de *E. faecalis* não apresentou nenhum efeito sobre a viabilidade dos parasitos (Figura 10C e 10D).

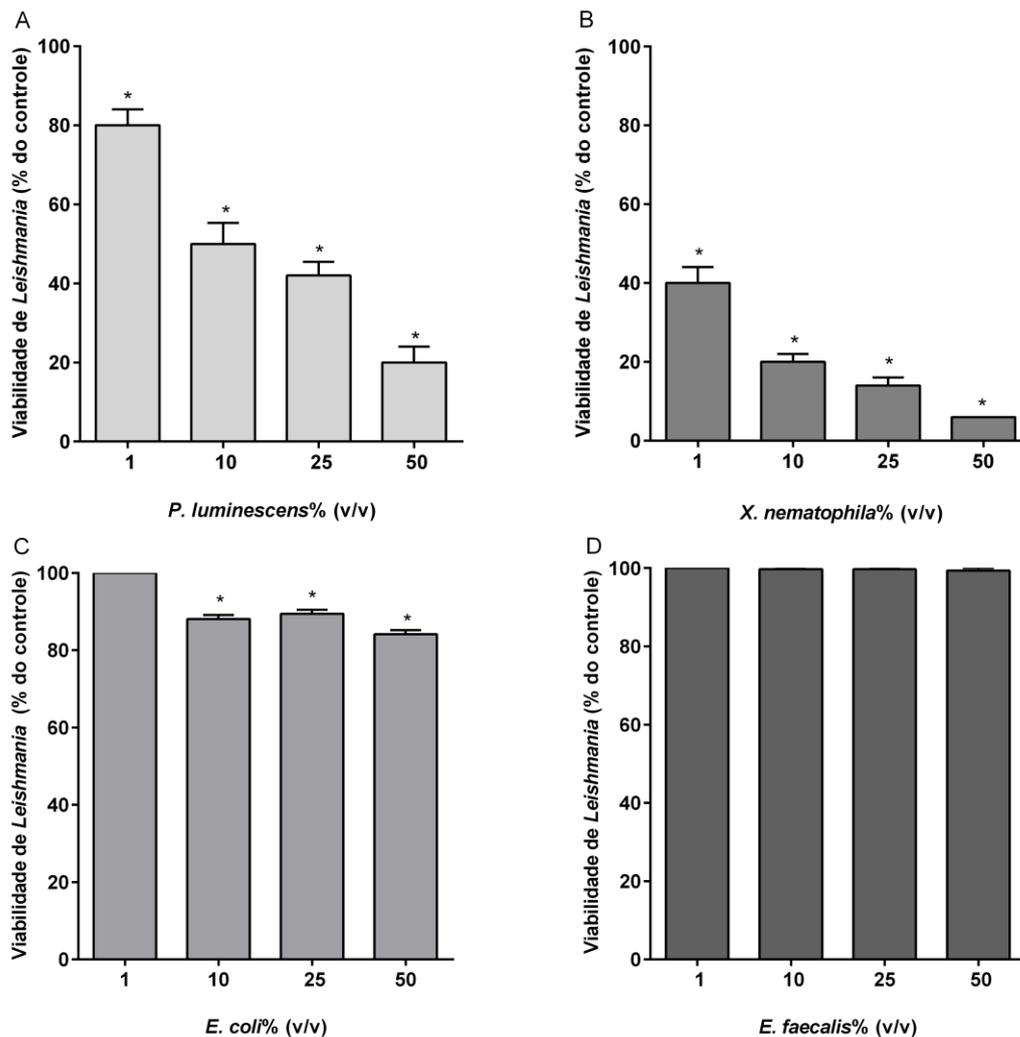


Figura 10: Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* (A), *X. nematophila* (B), *E. coli* (C) e *E. faecalis* (D). Formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $3 \times 10^6$ /poço) foram incubadas em meio M199 (controle) ou M199 mais os sobrenadantes de culturas das bactérias (1-50% v/v) durante 48 h. A sobrevivência de *Leishmania* foi determinada usando um hemocitômetro. As barras representam média  $\pm$  E.P.M. (quadruplicata) e são representativas de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

**Tabela 1. Atividade dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* sobre a viabilidade de *Leishmania* e macrófagos.**

Sobrenadante de cultura	<sup>a</sup> Cl <sub>50</sub> , % (95% IC) Promastigota	<sup>a</sup> Cl <sub>50</sub> , % (95% IC) Amastigota	<sup>b</sup> CC <sub>50</sub> , % (95% IC)	<sup>d</sup> IS P	<sup>d</sup> IS A
<i>X. nematophila</i>	0,63 (0,38-0,93)	1,30 (0,58-2,91)	17,10 (14,26 – 20,92)	27,14	13,15
<i>P. luminescens</i>	7,50 (5,48-10,59)	2,83 (0,97-8,29)	24,96 (21,16 – 30,21)	3,33	8,82

<sup>a</sup>Cl<sub>50</sub> e <sup>b</sup>CC<sub>50</sub>: concentração dos sobrenadantes bacterianos que causa 50% de mortalidade de *L. amazonensis* e 50% de citotoxicidade em macrófagos, respectivamente.

<sup>c</sup>95 IC: Intervalo de Confiança de 95% .

<sup>d</sup>IS: Índice de Seletividade P (promastigota) e A (amastigota), calculado como a razão entre CC<sub>50</sub> contra células de mamíferos/Cl<sub>50</sub> contra *L. amazonensis*.

Para melhor caracterizar a atividade dos sobrenadantes, avaliou-se o efeito da concentração e do tempo na viabilidade dos parasitos. Na figura 11 observa-se que ambos os sobrenadantes reduziram a viabilidade de *L. amazonensis* de modo tempo e concentração-dependente. Verificou-se que mesmo em concentrações muito baixas, como 0,2% (v/v), os sobrenadantes induziram significativa mortalidade (*X. nematophila*: 35% de mortalidade em 48 horas; *P. luminescens*: mortalidade de 16,4% em 48 horas) (Figura 11). A partir da concentração de 2,5% (v/v) ambos os sobrenadantes de culturas das bactérias reduziram a viabilidade de promastigotas dentro das seis primeiras horas de incubação (Figura 11). Tal como ilustrado na Figura 12, os sobrenadantes de *P. luminescens* e *X. nematophila* na concentração de 50% (v/v) são capazes de causar a lise dos parasitos em 48 horas, indicando que agem na membrana do parasito.

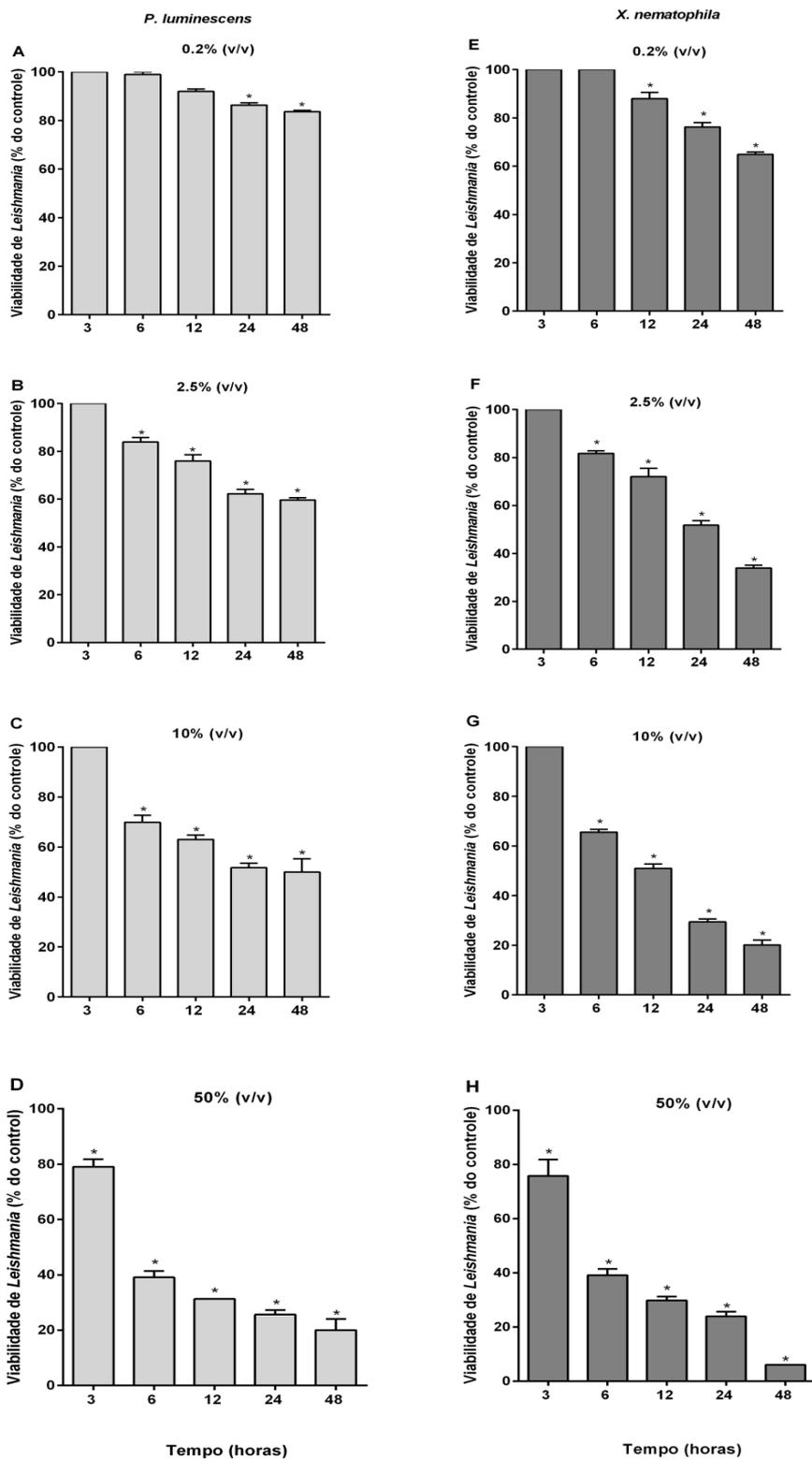


Figura 11: A atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* (AD) e *X. nematophila* (EH). *L. amazonensis* ( $3 \times 10^6$ /poço) foram incubadas em meio M199 (controle) ou M199 na presença dos sobrenadantes de culturas bacterianas (0,2-50% v/v) por diferentes períodos (3, 6, 12, 24 e 48 h). A sobrevivência de *Leishmania* foi determinada usando um hemocitômetro. Os dados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (quadruplicata) e são representativos de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

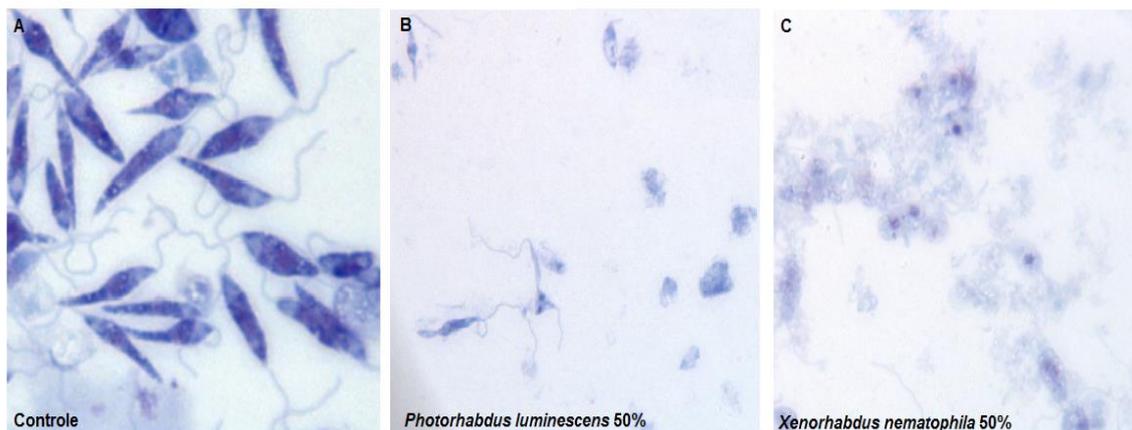


Figura 12: Efeito dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* na integridade de *L. amazonensis*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $3 \times 10^6$ ) foram incubadas durante 48 h com meio M199-controle (A) ou *P. luminescens* (B) e *X. nematophila* (C) na concentração de 50 % (v/v) e coradas com corante panótico (aumento de 1000X).

Já está comprovado que *P. luminescens* e *X. nematophila* secretam vários produtos incluindo lipases, fosfolipases, proteases e diferentes antibióticos de amplo espectro (Herbert e Godrich-Blair, 2007; Inman e Holmes, 2012; Waterfield et al., 2009). Estas bactérias são uma fonte promissora para novos quimioterápicos, já que as mesmas produzem um grande número de metabólitos secundários (Bode, 2009). Neste sentido, alguns estudos demonstraram que bactérias do gênero *Xenorhabdus* produzem compostos bioativos, como xenocoumacins, dithiolopyrrolonas e indóis (Zhou et al., 2013; Herbert e Goodrich-Blair, 2007). A atividade entomopatogênica dessas bactérias é bem elucidada, mas a atividade antiparasitária tem sido pouco investigada (Grundmann et al., 2014; Silva et al., 2013; Heermann e Fuchs, 2008; French-Constant et al., 2007; Munch et al., 2008).

Embora os estudos mostrem que *Photobacterium* spp. contenham uma grande variedade de toxinas e de enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, que são utilizados para matar insetos (Waterfield et al., 2005; Duchaud et al., 2003), há escassez de trabalhos investigando a atividade antiparasitária de

compostos produzidos por esta bactéria. No estudo de Nollmann et al. (2015), foram isolados GameXpeptídeos de *P. luminescens* TT01 e alguns deles (1, 2 e 4) apresentaram boa atividade contra *P. falciparum*.

Por outro lado, para *Xenorhabdus* spp. há alguns trabalhos relatando a produção de compostos antiparasitários, embora estes ainda não sejam bem estudados como os agentes antibacterianos (Bode, 2009). Szentiamide (1) é um depsipeptídeo isolado a partir de *X. szentirmaii* que exibe atividade contra *P. falciparum* (CI<sub>50</sub>= 0,995 ug/mL), *T. b. rhodesiense* (CI<sub>50</sub>= 10 ug/mL) e *L. donovani* (CI<sub>50</sub>= 11 ug/ml) (Nolmann et al., 2012). O composto Xenoamicin A, mostrou atividade contra *P. falciparum* NF 54 (IC<sub>50</sub>= 2,35 µg/mL) e *T. b. rhodesiense* STIB900 (CI<sub>50</sub>= 6,41 ug/mL), *T. cruzi* Tulahuen C4 (CI<sub>50</sub>= 30,5 ug/mL) e *L. donovani* MHOM-ET-67L82 (CI<sub>50</sub>= 50,1 µg/ml) (Zhou et al., 2013). Os depsipentapeptídeos isolados a partir de *Xenorhabdus* sp. PB61.4, chaiyaphumine 1 foi potente contra *P. falciparum* (CI<sub>50</sub>= 0,61 mM) e ativa contra *T. b. rhodesiense* (CI<sub>50</sub>= 5,11 µM) (Grundmann et al., 2014).

Os resultados obtidos neste estudo somados aos encontrados na literatura, demonstram que *P. luminescens* e *X. nematophila* secretam substâncias com atividade antiparasitária.

### **5.3 Efeito dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* aquecidos sobre a viabilidade de *L. amazonensis***

Para testar se os compostos bacterianos que matam eficazmente promastigotas de *L. amazonensis* são estáveis ao calor, os sobrenadantes de ambas as culturas bacterianas foram submetidos ao aquecimento a 100°C. A atividade leishmanicida do sobrenadante aquecido de *P. luminescens* foi muito

reduzida em comparação ao sobrenadante de cultura filtrado e não aquecido (Figura 13A). No entanto, a atividade leishmanicida do sobrenadante aquecido de *X. nematophila* foi significativamente reduzida apenas na concentração de 0,2% (v/v) (Figura 13B). A atividade leishmanicida de *P. luminescens* (1-25% v/v) foi quase completamente anulada através do tratamento pelo calor. Na concentração de 50% (v/v) esta atividade foi inibida em 45,84% (Figura 13A).

Desse modo, os constituintes do sobrenadante de *X. nematophila* foram menos suscetíveis ao tratamento térmico do que aqueles produzidos por *P. luminescens*. É provável que a atividade leishmanicida de *P. luminescens* se deva principalmente a compostos termolábeis, enquanto que *X. nematophila* produza principalmente compostos termoestáveis.

Inman e Holmes (2012), demonstraram que *X. nematophila* produz tanto compostos termoestáveis quanto termolábeis que são eficazes contra diferentes espécies bacterianas, mas que os compostos termoestáveis produziam maiores halos de inibição do crescimento bacteriano no teste de Kirby-Bauer modificado, do que os compostos termolábeis. Em adição, Khandelwal e Banerjee-Bhatnagar (2003), mostraram que *X. nematophila* secreta um grande número de proteínas no sobrenadante de cultura, como proteínas solúveis, e também grandes complexos de proteínas moleculares associados à membrana da parede celular externa. Estes autores demonstraram que as proteínas associadas a vesículas de membrana externa tinham a sua atividade inseticida completamente inativada por aquecimento (80 °C durante 15 minutos). Considerando estes dados, podemos supor que o (s) composto (s) tóxico (s) secretado (s) pela bactéria *X. nematophila*, com atividade leishmanicida, seja provavelmente um metabólito não proteico.

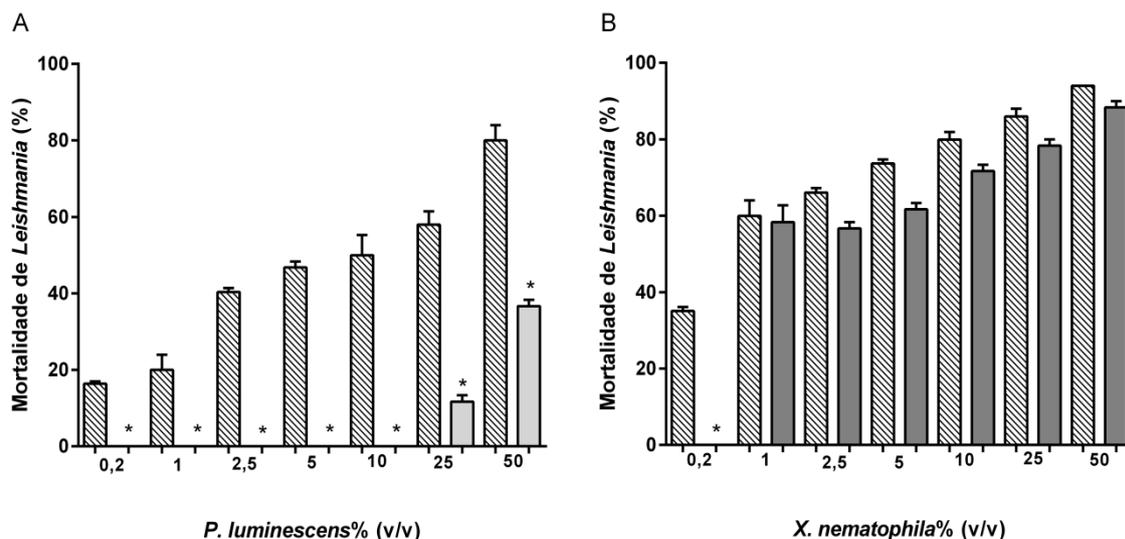


Figura 13: Atividade leishmanicida dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* (A) e *X. nematophila* (B) aquecidos a 100°C. Formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $3 \times 10^6$ /poço) foram incubadas *in vitro* com os sobrenadantes filtrados (colunas tracejadas) ou com os sobrenadantes tratados com calor (colunas cinzas) (0,2-50% v/v) durante 48 h. O índice de mortalidade de *Leishmania* foi determinado usando-se um hemocítometro. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (quadruplicata) e são representativos de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle.

#### 5.4 Efeito dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* sobre a viabilidade de macrófagos

Para testar a seletividade dos sobrenadantes em relação aos parasitos, avaliou-se seu efeito sobre a viabilidade de macrófagos, os quais albergam formas intracelulares de *Leishmania* spp. Como representado na figura 14, ambos os sobrenadantes bacterianos apresentaram citotoxicidade elevada apenas em altas concentrações (25 e 50% v/v). A partir dos valores de  $Cl_{50}$  e  $CC_{50}$  determinou-se o índice de seletividade para os sobrenadantes. Observou-se que ambos os produtos bacterianos apresentaram moderada (*P. luminescens* IS= 8,82) a alta seletividade contra o parasito (*X. nematophila* IS= 13,15) (Tabela 1). Estes resultados sugerem que ambas as bactérias entomopatogênicas podem ser usadas como futura fonte de agentes

quimioterápicos, já que os sobrenadantes apresentaram baixa toxicidade *in vitro*. No entanto, ensaios de toxicidade aguda e crônica em camundongos precisam ser realizados para confirmar a baixa citotoxicidade.

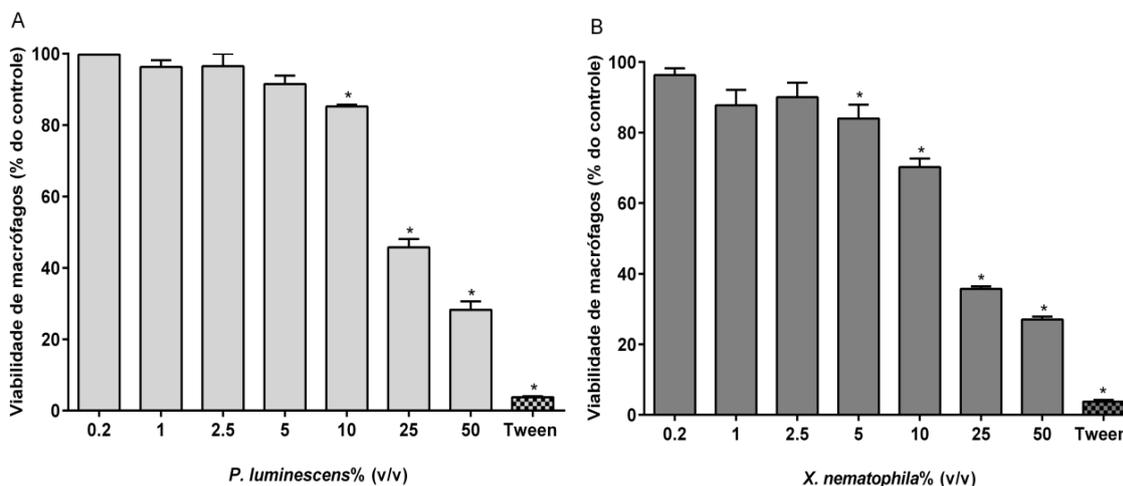


Figura 14: Efeito citotóxico dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* (A) e *X. nematophila* (B) em macrófagos. Os macrófagos foram incubados com meio RPMI (controle) ou com os sobrenadantes de cultura das bactérias (0,2-50% v/v). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT após 48 h de incubação. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (quadruplicata) e são representativos de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle.

## 5.5 Atividade leishmanicida de macrófagos por mecanismos independentes de Óxido Nítrico

Considerando que nos hospedeiros mamíferos as leishmanias proliferam e podem se manter vivas no interior de macrófagos, na forma de amastigotas (Chappuis et al., 2007; Sacks e Kamhawi, 2001), avaliou-se o efeito leishmanicida dos sobrenadantes sobre formas amastigotas intracelulares. Com base nos valores baixos de  $CI_{50}$  encontrados para *X. nematophila* e *P. luminescens* contra formas promastigotas do parasito e nos dados de citotoxicidade contra os macrófagos, a atividade contra amastigotas foi testada nas concentrações de 0,2 a 10% (v/v) .

Verificou-se que em todas as concentrações testadas os sobrenadantes estimularam a atividade leishmanicida de macrófagos, reduzindo a viabilidade de amastigotas na ordem de 15 a 85,5% para *P. luminescens* (Figura 15A) e 13 a 97,7% para *X. nematophila* (Figura 15B). Estes resultados demonstram que o (s) composto (s) secretado (s) por estas bactérias são eficazes para matar tanto formas promastigotas quanto amastigotas de *L. amazonensis*, um dos principais agentes da leishmaniose cutânea (Carvalho et al., 1994; França-Costa et al., 2012). Nestas análises, como controle da atividade anti-amastigota, utilizou-se a ativação de macrófagos com LPS e IFN- $\gamma$ . Na figura 15 observa-se que estes estímulos induzem o controle intracelular da infecção (85,2% de mortalidade) por mecanismo dependente de NO. Entre os mecanismos de controle da *Leishmania* está a produção de NO e de espécies reativas de oxigênio (ROS) por fagócitos (Novais et al., 2014; Degrossoli et al., 2011; Fonseca et al., 2003; Stenger et al., 1996). Neste estudo a atividade leishmanicida dos sobrenadantes bacterianos se deu por mecanismos independentes de NO (Figura 15C e 15D), podendo estar correlacionado com a produção de ROS por macrófagos. Neste sentido vários autores demonstraram que substâncias de origem natural e sintética induzem o aumento dos níveis de ROS, importante no controle do crescimento de *Leishmania*, como a hipericina (Singh et al, 2015), o extrato de tubérculo de batata (Paik et al, 2014) e os derivados de isobenzofuranona sobre *L. donovani* (Mishra et al, 2014).

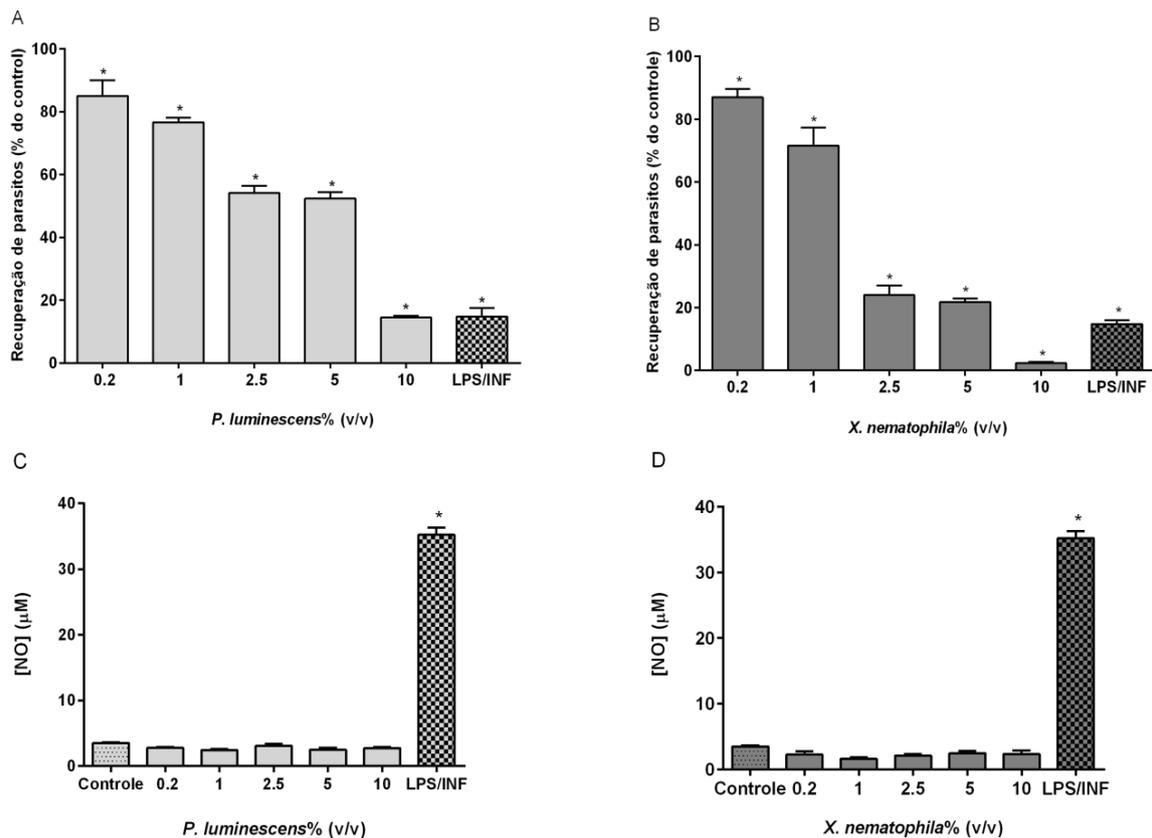


Figura 15: Efeito dos sobrenadantes de culturas de *P. luminescens* e *X. nematophila* sobre a viabilidade das formas amastigotas de *L. amazonensis* (A e B) e produção de NO, *in vitro* (C e D). Macrófagos foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com os sobrenadantes de cultura bacterianos (0,2-10% v/v) ou LPS+IFN- $\gamma$  (10ng/mL). A atividade anti-amastigota foi determinada como descrito em materiais e métodos. A concentração de NO produzido pelos macrófagos foi determinada pela reação de Griess. Os valores são expressos em média  $\pm$  E.P.M. (quaduplicata) e são representativos de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que compostos secretados por *X. nematophila* e *P. luminescens* apresentam significativa atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

O sobrenadante de cultura de *X. nematophila* exerceu maior atividade leishmanicida e foi mais estável ao calor do que o sobrenadante de cultura de *P. luminescens*.

Os sobrenadantes das culturas de ambas as bactérias, até a concentração de 10% (v/v), apresentaram baixa toxicidade contra macrófagos.

Os sobrenadantes mataram os parasitos de modo tempo e concentração dependente e estimularam a atividade leishmanicida de macrófagos por um mecanismo independente de NO.

Estas bactérias parecem ser fontes promissoras para a concepção de novos agentes quimioterápicos contra a leishmaniose.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para o avanço dos estudos da atividade leishmanicida de produtos de *P. luminescens* e *X. nematophila* é fundamental identificar os componentes ativos responsáveis pela atividade leishmanicida *in vitro*, bem como identificar seu alvo molecular no parasito. Estudos posteriores devem incluir a identificação das moléculas, isolamento e ou síntese, avaliação dos isolados *in vitro* e *in vivo* e elucidação dos mecanismos de ação.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL DG. *Leishmania* species: models of intracelular parasitismo. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 18, p. 2993-3002, 1999.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE** 7: e35671, 2012.

ANSTEAD G. M. et al. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, v.69, n.8, p. 4709-4718, 2001.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current Opinion Chemical Biology**, v. 13, n. 2, p. 224-230, 2009.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, v.28, n.1, p.121-134, 1998.

BRACHMANN, A. O.; et al. Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 12, 1830-1832, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manualeish\\_visceral2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manualeish_visceral2006.pdf), Acesso em: 16 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 179 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_Ita\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_Ita_2ed.pdf) Acesso em: 16 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 78p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2013, 2013a.** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>. Acesso em 16 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Óbitos de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2013, 2013b** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV---bitos.pdf>. Acesso em 16 dez. 2014.

BUCHANAN, R. E; GIBBONS, N. E. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins. **Baltimore, Md**, p. 548-549, 1974.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315-325, 1994.

CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out?. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1890-1897, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAWFORD, J. M.; et al. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 27, p. 19821-19826, 2012.

DE FREITAS, J. C. C; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 105, p. 11-20, 2010.

DEGROSSOLI, A. et al. The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 2, p. 165-175, 2011.

DELORENZI, J. C. et al. Antileishmanial Activity of an Indole Alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n.5, p. 1349-1354, 2001.

DUCHAU, E. et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nature Biotechnology**, v. 2, n. 11, 1307-1313, 2003.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DOWLING, A.; WATERFIELD, N.R. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 436-451, 2007.

FRANÇA-COSTA, J. et al. Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Parasite Infectivity. **PLoS ONE** 7: e36595, 2012.

FISCHER-LE SAUX, M. et al. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 49, n. 4, p. 1645-1656, 1999.

FONSECA, S. G. et al. TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 8, p. 2297-2306, 2003.

FORST, S. et al. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 47-72, 1997.

FOURNET, A. et al. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American *Leishmania* sp. in BALB/c mice. **Phytoteraphy Research**, v. 7, p. 281-284, 1993.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, R. et al. *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 6: e1974, 2012.

GOODRICH-BLAIR, H.; CLARKE, D. J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 260-268, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36:71-80, 2003.

GRUNDMANN, F. et al. Antiparasitic Chaiyaphumines from Entomopathogenic *Xenorhabdus* sp. PB61.4. **Journal of Natural Products**, v. 77, n.4, 779-783, 2014.

GULCU, B.; HAZIR, S.; KAYA, H. K. Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 3, p. 326-333, 2012.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Research Focus**, v. 5, n.7, 2000.

HEERMANN, R.; FUCHS, T. M. Comparative analysis of the *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate

genes involved in insect pathogenicity. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 40, 2008.

HERBERT, E. E.; GOODRICH-BLAIR, H. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 634-646, 2007.

HJELMGAARD, T.; GIVSKOV, M.; NIELSEN, J. Expedient total synthesis of pyrrothine natural products and analogs. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.5, n.2, p. 344-348, 2007.

IRAJI, F.; SADEGHINIA, A. Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n.1, p. 3–9, 2005.

ILG, T. et al. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n.5, p. 6834-6840, 1992.

INMAN, F.L.; HOLMES, L. Effect of heat sterilization on the bioactivity of antibacterial metabolites secreted by *Xenorhabdus nematophila*. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 15, n. 20, p. 997-1000, 2012.

Jl, D. et al. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 2, p.241-248, 2004.

KHANDELWAL, P.; BANERJEE-BHATNAGAR, N. Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2032-2037, 2003.

KONDO, S.; MIZUKI, E.; AKAO, T. M. O. Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. **Parasitology Research**, v. 88, p. 1090-1092, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1 W Peters, R Killick-Kendrick (eds), Academic Press, London, p. 1-120, 1987.

Lang, G. 2008. Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. **Journal of Natural Products**, v. 71 n. 6, p.1074-1077, 2008.

Li, J. et al. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 8, 770-773, 1997.

MARTENS, E. C. GOODRICH-BLAIR, H. The *Steinernema carpocapse* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. **Cellular microbiology**, v.7, n. 12, p. 1723-1735, 2005.

MCINERNEY, B. V. et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. **Journal of Natural Products**, v.54, n. 3, p.785-795, 1991.

MACMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol Rev** 201: 206-224, 2004.

MISHRA, A. et al. Isobenzofuranone derivatives exhibit antileishmanial effect by inhibiting type II DNA topoisomerase and inducing host response. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 2, n.6, 2014.

MOORE, E. M.; LOCKWOOD, D. N. Leishmaniasis. **Clinical Medicine**, v.11, n.5, p. 492-497, 2011.

MUNCH, A. et al. *Photorhabdus luminescens* genes induced upon insect infection. **BMC Genomics**, v. 9, p. 229-246, 2008.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p.1561-1577, 2005.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v.10, n.2, p. 301-308, 2007.

NEUMAN, D. J. et al. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOLLMANN, F. I. et al. Synthesis of szentiamide a depsipeptide from entomopathogenic *Xenorhabdus szentirmanii* with activity against *Plasmodium falciparum*. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 913-919, 2012.

NOLLMANN, F. I. et al. Insect-Specific Production of New GameXPptides in *Photorhabdus luminescens* TTO1, Widespread Natural Products in Entomopathogenic Bacteria. **European Journal of Chemical Biology**, v. 16, n.2, p. 205-208, 2015.

NOVAIS, F. O. et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **The Journal of Infectious Disease**, v. 209, n.8, p. 1288-96, 2014.

OLIVEIRA-NETO M. P. et al. American tegumentar leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 7, p. 506-514, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Genebra: Organização Mundial da Saúde. 172 p., 2010a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Genebra: Organização Mundial da Saúde. 202 p., 2010b.

OWUAMA, C. I. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 505-515, 2001.

PAL, D. et al. Antileishmanial activity of *Polyalthia longifolia* leaf extract on the in vitro growth of *Leishmania donovani* promastigotes. **Global Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 97–100, 2011.

PAIK, D. et al. In vitro anti-leishmanial efficacy of potato tuber extract (PTEx): leishmanial serine protease(s) as putative target. **Experimental Parasitology**, v. 146, p. 11-19, 2014.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**, 11.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

REIS, L. C., et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v.35, n. 2, p. 103-115, 2006.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v.13, n.1, 2011. 8p.

ROMÃO, P. R. T. et al. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxidemediated cytotoxicity. **Parasitology**, v. 118, n. 6, p. 559-566, 1999.

ROMÃO, P. R. T. et al. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 355-363, 2006.

SANTOS, C. S.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, v.2, 2014

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P. et al. Low Plasma Membrane Expression of the Miltefosine Transport Complex Renders *Leishmania braziliensis* Refractory to the Drug. **Antimicrob Agents and Chemother** 53: 1305-1313, 2009.

SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus*

*faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 31-34, 1984.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, p. 412-423, 2009.

SHRESTHA, Y. K.; LEE, K. Y. Oral toxicity of *Photorhabdus* culture media on gene expression of the adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. **Journal of invertebrate pathology**, v.109, n. 1, p. 91-96, 2012.

SILVA, O. et al. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, n.8, p. 2891-2896, 2013.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n.6, p. 307-315, 2004.

SINGH, S. et al. Probing the Molecular Mechanism of Hypericin-Induced Parasite Death Provides Insight into the Role of Spermidine beyond Redox Metabolism in *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n.1, p.15-24, 2015.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, 735-751, 2012.

STENGER, N. et al. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 4, p. 1501-1514, 1996.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n.11, p. 849-854, 2001.

THALER, J. O.; BAGHDIGUIAN, S.; BOEMARE, N. Purification and characterization of Xenorhabdicolin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2049-2052, 1995.

THOMAS, G. M.; POINAR, G. O. J. *Xenorhabdus* gen. nov., a Genus of Entomopathogenic, Thermophilic Bacteria of the Family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, n. 4, p. 352-360, 1979.

TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CASE, C. L. Microbiologia, 10. ed., São Paulo: **Artmed**, 2012. 894 p.

WATERFIELD, N. et al. Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal Toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. **Cell Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 373-382, 2005.

WATERFIELD, N. R.; CICHE, T.; CLARKE, D. *Photorhabdus* and a host of hosts. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 557-574, 2009.

XU, Z. et al. Protection of mice infected with *Plasmodium berghei* by *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Parasitology Research**, v. 92, n.1, p. 53-57, 2004.

YAO, C. J. E.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1-16, 2003

ZHOU, Q. et al. Structure and biosynthesis of xenoamicins from entomopathogenic *Xenorhabdus*. **Chemistry European Journal**, v.19, n.49, p.16772-16779, 2013.