



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DIVAN HENRIQUE FERNANDES BARCELOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE BACTERIOCINAS

VITÓRIA

2018

DIVAN HENRIQUE FERNANDES BARCELOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE BACTERIOCINAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

VITÓRIA

2018

DIVAN HENRIQUE FERNANDES BARCELOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE BACTERIOCINAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 21 de março de 2018

Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno

Prof^a. Dr^a. Elvira Maria Saraiva Chequer Bou Habib
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Membro externo

VITÓRIA
2018

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que, de alguma forma, contribuíram, ou estiveram ao meu lado no decurso dos meus dois anos de mestrado.

A toda minha família que esteve presente em todos os momentos, em especial, aos meus pais que apoiaram minhas decisões durante este tempo, sempre demonstrando preocupação e carinho.

A minha namorada Carina, que sempre me deu muito apoio nos momentos difíceis, sendo paciente e compreensiva durante minhas várias crises de insônia e ansiedade.

Obrigado ao meu professor e orientador Daniel Claudio de Oliveira Gomes, pela oportunidade e orientação durante o desenvolvimento desta pesquisa.

A Juliana e Naira pela orientação e auxílio durante os experimentos e escrita da dissertação.

Meu agradecimento a todos os amigos do Laboratório de IMUNOBIOLOGIA, que estiveram comigo durante esse período e que tornaram os dias mais leves e agradáveis.

A minha irmã Iasmim e meu amigo Gabriel que viveram o mestrado comigo desde o princípio.

A meu amigo Estevão Barcelos, que me ajudou e me ensinou muito durante o mestrado.

Obrigada a todos os professores e a equipe do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFES), em especial a Mirian que me ajudou muito com as questões relacionadas à defesa.

A toda equipe do LUCAR, que me auxiliou e me ensinou muito durante alguns experimentos.

A CAPES, FAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

BARCELOS, D.H.F. **Avaliação do potencial leishmanicida de bacteriocinas**. 2018. 78f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil

As leishmanioses são um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, com 12 milhões de pessoas infectadas. Os tratamentos disponíveis embora eficientes, apresentam problemas como toxicidade, alto custo ou resistência pelo parasito. As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos no ribossomo por diversas bactérias. Sua ação de inibição *in vitro* já foi testada contra fungos, bactérias e protozoários, sendo por isso consideradas como uma substância de grande potencial biotecnológico. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade anti-leishmania das bacteriocinas A53; C55 e Nisina e da (substância inibitória do tipo bacteriocina) BLIS P16, contra as espécies de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*. Os resultados de IC₅₀ para *L. amazonensis* foram de: A53-24,78 µg/mL; C55-75,49 µg/mL e Nisina-3191 µg/mL. Já para o tratamento contra promastigotas de *L. infantum* foi observado IC₅₀ de: A53-12,57 µg/mL; C55-44,31 µg/mL. Nisina-317,2 µg/mL e P16- 2,9 µg/mL. O tratamento contra amastigotas de *L. infantum* se mostrou mais eficiente que contra as formas promastigotas, apresentando um IC₅₀ de 2,17 µg/mL para A53 e de 1,76 µg/mL para P16. Também foi avaliado a ação citotóxica de A53 e P16 sobre macrófagos da linhagem J774A.1, apresentando respectivamente IC₅₀ de 9,75 µg/mL e de 6,6 µg/mL. Para se avaliar a interação entre a A53 e a P16 com a membrana externa de promastigotas de *L. infantum* foi realizada microscopia eletrônica de varredura, a qual demonstrou que as substâncias testadas possuem a capacidade de alterar a morfologia externa do parasita. Foram realizados experimentos para se avaliar a capacidade do tratamento com P16 sobre a indução do estresse oxidativo em promastigotas de *L. infantum*. Foi verificado a capacidade de estimular apoptose nas formas promastigotas, bem como um estímulo a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma interferência na progressão do ciclo celular. Os dados do presente trabalho demonstram que as bacteriocinas são promissoras para testes que visem o desenvolvimento de novas drogas contra as leishmanioses.

Palavras-chave: Tratamento. Peptídeos antimicrobianos. Leishmanioses

ABSTRACT

BARCELOS, D.H.F. **Evaluation of the leishmanicidal potential of bacteriocins.** 2018. 78f. Thesis of Master in Biotechnology - Postgraduation Biotechnological Programm, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Leishmaniasis is a serious public health problem in Brazil and worldwide, with 12 million people infected. Available but efficient treatments present problems such as toxicity, high cost or parasite resistance. Bacteriocins are antimicrobial peptides produced in the ribosome by various bacteria. Its *in vitro* inhibition action has already been tested against fungi, bacteria and protozoa and, therefore, is considered as a substance with great biotechnological potential. The objective of this study was to evaluate the anti-leishmania capacity of bacteriocins A53; C55 and Nisin and BLIS P16, against the species of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis*. The results of IC₅₀ for *L. amazonensis* were: A53 – 24,78 µg/mL; C55- 75,49 µg/ml and Nisin - 3191 µg/mL. Already for the treatment against promastigotes of *L. infantum* IC₅₀ of: A53 – 12,57 µg/mL; C55 – 44,31 µg/mL. Nisin- 317,2 µg/mL and P16 - 2,9 µg/mL. Treatment against amastigotes of *L. infantum* was more efficient than against promastigotes, with an IC₅₀ of 2,17 µg/mL for A53 and 1,76 µg/mL for P16. The cytotoxic action of A53 and P16 on macrophages of the J774A.1 lineage was also evaluated, presenting respectively IC₅₀ of 9.75 µg/mL and 6.6 µg/mL. To evaluate the interaction between A53 and P16 with the external membrane of *L. infantum* promastigotes, scanning electron microscopy was performed, which demonstrated that the tested substances have the capacity to alter the external morphology of the parasite. Experiments were performed to evaluate the ability of P16 treatment to induce oxidative stress in promastigotes of *L. infantum*. The ability to stimulate apoptosis in promastigote forms has been verified, as well as a stimulus for overproduction of reactive oxygen species (ROS) and interference in cell cycle progression. The data of the present study demonstrate that the bacteriocins are promising for tests aimed at the development of new drugs against leishmaniasis.

Keywords: Treatment. Antimicrobial peptides. Leishmaniasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico heteroxênico de protozoários do gênero <i>Leishmania</i> sp.....	17
Figura 2: Endemicidade dos casos de leishmaniose visceral ocorridos ao redor do mundo no ano de 2013.....	18
Figura 3: Endemicidade dos casos de leishmaniose cutânea ocorridos ao redor do mundo no ano de 2013.....	19
Figura 4: Avaliação da viabilidade celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> frente ao tratamento com bacteriocinas.....	47
Figura 5: Avaliação da viabilidade de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com bacteriocinas e BLIS P16.....	48
Figura 6: Teste de viabilidade de formas amastigotas de <i>L. infantum</i> frente ao tratamento com a bacteriocina A53 e BLIS P16.....	49
Figura 7: Avaliação sobre os efeitos citotóxicos das bacteriocinas A53 e BLIS P16 sobre macrófagos de camundongos da linhagem celular J774A.1.....	50
Figura 8: Avaliação morfológica de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com 10 µg/mL de P16 e A53, durante 18 horas e lidas em microscópio eletrônico de varredura.....	51
Figura 9: Influência do tratamento com A53 e BLIS P16 sobre a produção de óxido nítrico (NO) por parte de macrófagos murinos J774A.1.....	52
Figura 10: Influência do tratamento com BLIS P16 sobre a apoptose de promastigotas de <i>L. infantum</i>	54
Figura 11: Detecção da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) por promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com a BLIS P16.....	56
Figura 12: Influência do tratamento com P16 sobre a progressão do ciclo celular de promastigotas de <i>L. infantum</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teste de avaliação do estresse oxidativo versus o tempo de incubação com bacteriocinas em que as amostras foram analisadas.....	43
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AT – Adenina e Timina

ATCC – (do inglês American Type Culture Collection)

B.O.D. - Demanda Bioquímica de Oxigênio

BLIS – Substância inibitória do tipo bacteriocina

cm² – centímetro quadrado

CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês Centers for Disease Control and Prevention)

d. C - Depois de Cristo

CO₂ - Dióxido de carbono

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid)

FDA – (do inglês Food and Drug Administration)

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

IC₅₀ - concentração média para inibição de 50%

K⁺ - Ions de potássio

KDa - Kilodalton

L. - *Leishmania*

LC – Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LM – Leishmaniose Mucocutânea

LPG - Lipofosfoglicano

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LT - Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

MDR1 - gene MDR1

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mg/kg/dia – miligrama por dia por kilo

mL - Mililitro

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

NaCO₃ - Carbonato de sódio

NDI – Núcleo de doenças infecciosas

NO – Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

OsO₄ - Tetróxido de ósmio

Pgp - Glicoproteína-P

PI – Iodeto de propídeo

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês Reactive oxygen species)

RPMI – (do inglês Roswell Park Memorial Institute medium)

PRP1 – gene PRP1

SbIII – Antimonial trivalente

Sb⁵⁺- Antimoniais pentavalentes

Sb/Kg – Antimonial por kilo

SFB – Soro fetal bovino

TSH - Proteína tripanotona

UA/mL - Unidades Arbitrárias por mililitro

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

VRE - *Enterococcus* resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Aspectos gerais das leishmanioses	13
1.2	Breve Histórico das Leishmanioses	14
1.2.1	Leishmaniose Visceral (LV)	14
1.2.2	Leishmaniose Tegumentar (LT)	15
1.3	Ciclo de vida do parasita	15
1.4	Epidemiologia das leishmanioses	17
1.4.1	Leishmaniose Visceral (LV)	17
1.4.2	Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	18
1.5	Características clínicas	20
1.5.1	Características clínicas da Leishmaniose Visceral	20
1.5.2	Características clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	20
1.6	Tratamento das Leishmanioses	21
1.6.1	Antimoniais pentavalente (Sb ⁵⁺)	22
1.6.2	Anfotericina B	24
1.6.3	Miltefosina	26
1.6.4	Pentamidinas	27
1.7	Novas opções terapêuticas	28
1.8	Bacteriocinas	30
1.8.1	Aplicações Biotecnológicas das Bacteriocinas	33
1.8.1.1	Bacteriocinas na agricultura	333
1.8.1.2	Bacteriocinas na biopreservação de alimentos	34
1.8.1.3	Bacteriocinas na clínica veterinária	35
1.8.1.4	Bacteriocinas na clínica humana	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivos Específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Aprovação ética	38
3.2	Amostras de <i>Leishmania</i> sp.	38
3.3	Obtenção das bacteriocinas	38

3.4	Teste de viabilidade de promastigotas de <i>Leishmania sp.</i>	39
3.5	Cálculo do IC ₅₀	40
3.6	Teste sobre a viabilidade de amastigota de <i>Leishmania sp.</i>	40
3.7	Cultivo de células J774A.1 e avaliação da citotoxicidade celular	41
3.8	Microscopia eletrônica de varredura.....	42
3.9	Dosagem de óxido nítrico (NO).....	42
3.10	Avaliação sobre estresse oxidativo	43
3.10.1	Detecção de Apoptose.....	44
3.10.2	Detecção de ROS (espécies reativas de oxigênio).....	44
3.10.3	Análise da progressão do ciclo celular em formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Avaliação do tratamento com bacteriocinas e BLIS P16 sobre a viabilidade de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	46
4.2	Avaliação dos efeitos de A53 e BLIS P16 sobre a viabilidade de formas amastigotas de <i>L. infantum</i>	48
4.3	Avaliação dos efeitos citotóxicos de A53 e BLIS P16 sobre linhagem celular de mamífero	49
4.4	Avaliação do efeito do tratamento com BLIS P16 e A53 sobre a morfologia de promastigotas de <i>L. infantum</i>	50
4.5	Avaliação sobre a produção de óxido nítrico (NO)	52
4.6	Avaliação do estresse oxidativo em virtude do tratamento com BLIS P16	52
4.6.1	Avaliação do uso da BLIS P16 sobre a indução de apoptose em promastigotas de <i>L. infantum</i>	53
4.6.2	Avaliação sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em função do tratamento com a BLIS P16	55
4.6.3	Avaliação da influência do tratamento com a BLIS P16 sobre a progressão do ciclo celular de promastigotas de <i>L. infantum</i>	56
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO	66
7	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais e subtropicais, que podem ser causadas por mais de 20 espécies de parasitas intracelulares obrigatórios, do gênero *Leishmania* sp. Os mesmos são transmitidos a humanos e outros animais mamíferos, por meio de picadas de insetos dípteros, fêmeas, dos gêneros *Lutzomyia* sp. (continente americano) e *Phlebotomus* sp. (continente europeu, asiático e africano) (CHOLEWIŃSKI; DERDA; HADAŚ, 2015). Elas são consideradas como negligenciadas, pois a maioria dos casos de infecção ocorre em países pobres, principalmente em função da falta de saneamento, que contribui para a multiplicação dos vetores, moradias irregulares perto de matas ou falta de políticas públicas que visam tratá-las em seu estágio inicial (WAITE et al., 2016).

Há relatos de leishmanioses em 98 países situados em quatro continentes (América, África, Europa e Ásia), afetando em torno de 12 milhões de pessoas, sendo estimado o surgimento de 1,6 milhões de casos por ano, que quando não tratados com o devido cuidado, levam a morte (RODRIGUES et al., 2015).

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das doenças mais importantes que acometem o mundo, devido a sua grande distribuição geográfica, abrangendo quatro continentes, onde se encontram uma grande parcela da população mundial. Essas doenças comumente ocorrem em regiões pobres, de países em desenvolvimento, atingindo assim pessoas que não dispõem de poder financeiro para arcar com os altos custos dos tratamentos, sendo esse um fator relevante para o pouco investimento em medicamentos para o seu tratamento, por parte das indústrias farmacêuticas, levando a mesma a ser uma doença considerada como negligenciada (PIGOTT et al., 2014).

1.2 Breve Histórico das Leishmanioses

1.2.1 Leishmaniose Visceral (LV)

A leishmaniose visceral foi descrita inicialmente na Grécia, no ano de 1835, sendo antes denominada “ponos”, em razão da figura mitológica grega de mesmo nome, responsável por representar o esforço e a fadiga (CHANIOTIS; TSELENTIS, 1994).

Em 1900, o médico britânico William Leishman estava servindo as forças armadas britânicas na Índia, quando notou a presença de protozoários durante a análise microscópica do baço de um soldado que havia morrido da febre “Dum Dum”. As anotações de Leishman foram publicadas em 1903, semanas depois, o médico Charles Donovan publicou suas anotações sobre ter encontrado os mesmos parasitas, conhecidos como “corpos de leishman”, em uma criança, correlacionando esse parasita como causador do “Kala-azar” (BAILEY; BISHOP, 1959).

No Brasil, o primeiro caso de Leishmaniose Visceral foi relatado por Migone em 1913, encontrado em um paciente da cidade de Boa Esperança, Mato Grosso. Os estudos sobre a distribuição geografia da Leishmaniose no Brasil, começaram em 1934, com o médico patologista Henrique Penna, que analisou lâminas de pacientes mortos por febre amarela e constatou 41 casos positivos para leishmaniose (COSTA et al., 1995).

Em 1937 Evandro Chagas descreveu o parasita responsável pelos casos de LV que ocorriam no novo mundo, chamando esse parasita de *Leishmania chagasi*. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação do DNA, foi possível se observar que as sequências do mesmo, encontradas em *L. chagasi* e em *L. infantum* eram as mesmas, isso fez com que ocorresse uma reclassificação desses parasitas, sendo considerados como uma única espécie e atualmente conhecida como *Leishmania infantum* (SILVEIRA et al., 2016).

1.2.2 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A leishmaniose tegumentar (LT) é um conjunto de doenças infecciosas, crônicas e não contagiosas, que pode ocorrer em hospedeiros vertebrados em várias regiões do mundo, através da picada da fêmea do flebótomo vetor. No continente americano ela é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA) (BRASIL, 2014a).

Há registros de LTA acometendo o homem desde a antiguidade. Escavações arqueológicas realizadas nas Américas encontraram estruturas de cerâmicas da era pré-colombina, datadas de 400 a 900 anos d.C., nas quais haviam desenhos de mutilações nos lábios e nariz com características que hoje consideramos parte da leishmaniose mucocutânea. Estudos nessas mesmas áreas encontraram múmias que apresentavam lesões características de LTA (BASANO; CAMARGO, 2004).

No Brasil, a primeira referência a LT data de 1827, citada no livro “Antiguidad de la Syphilis en el Peru”, onde o Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros faz relatos de visualizações de lesões características de LT, durante suas viagens pela selva amazônica. Em 1855, Cerqueira identificou lesões de pele, a qual chamou de botão de Biskra, porém a confirmação de que a origem desse tipo de lesão está associada a LT só veio em 1909, por Lindenberg, que localizou formas de *Leishmania* idênticas a *Leishmania tropica*, responsável pela LT cutânea no velho mundo. Gaspar Vianna identificou diferenças entre a *Leishmania* encontrada no Brasil e a *Leishmania tropica*, por isso a denominou de *Leishmania braziliensis* (VALE; FURTADO, 2005).

1.3 Ciclo de vida do parasita

O ciclo de vida do parasita responsável por causar leishmaniose é um ciclo heteroxênico, ocorrendo em dois hospedeiros diferentes, uma no trato digestivo de flebôtomos do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus* e a outra em animais vertebrados como cães, roedores e marsupiais (SARAIVA et al., 2010).

A primeira fase no intestino médio da fêmea de flebotomíneo infectada, é caracterizada pelo parasita se apresentar na forma promastigota, possuindo flagelo. (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). O parasita se adere à parede do intestino do flebótomo vetor, dando assim início a sua multiplicação por divisão binária. O próximo

passo no desenvolvimento da *Leishmania* sp. é sua transformação em promastigota metacíclica, em que a mesma é capaz de infectar células (KWEIDER et al., 1989).

Durante as modificações morfológicas que o parasita sofre na fase em que se encontra no flebótomo vetor, é válido ressaltar a modificação de duas importantes moléculas extracelulares que apresentam funções de virulência, lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63, sendo as mesmas de fundamental importância para a metaclicogênese, um processo no qual o protozoário de *Leishmania* sp. passa, no interior do flebótomo vetor, com o objetivo de se transformar em sua forma infectante.

A forma procíclica se adere no intestino do vetor, onde irá sofrer uma série de modificações, entre elas a mudança do lipofosfoglicano (LPG), um glicoconjugado presente na membrana do protozoário que tem sua função na interação entre parasita-hospedeiro. A variação na composição das cadeias laterais do LPG é diferente entre as espécies de *Leishmania*. O LPG é um dos fatores principais para determinar a relação insetor vetor – *Leishmania*, sendo responsável pela aderência do protozoário no epitélio do intestino médio do vetor, evitando assim sua eliminação (SACKS; PERKINS, 1984).

Após a entrada da *Leishmania* sp. no vertebrado tem início a segunda fase, em que a mesma é fagocitada por células do sistema fagocitário, como macrófagos e neutrófilos, onde irá estabelecer a infecção. Já no interior das células, o parasita sofrerá uma mudança para a forma amastigota, que não possui flagelo livre (ALCOLEA et al., 2010). Após a entrada nas células fagocitárias ocorre à multiplicação intensa dos parasitas por divisão binária, o que acarreta na lise celular e a consequente dispersão de vários parasitas para o meio extracelular, onde são novamente fagocitados, conseguindo dessa forma se reproduzir em grande escala no organismo do hospedeiro. O ciclo se completa com a picada do flebótomo, que ingere células infectadas com amastigotas e em seu intestino voltam a ser promastigotas (CARLSEN et al., 2015) (Figura 1).

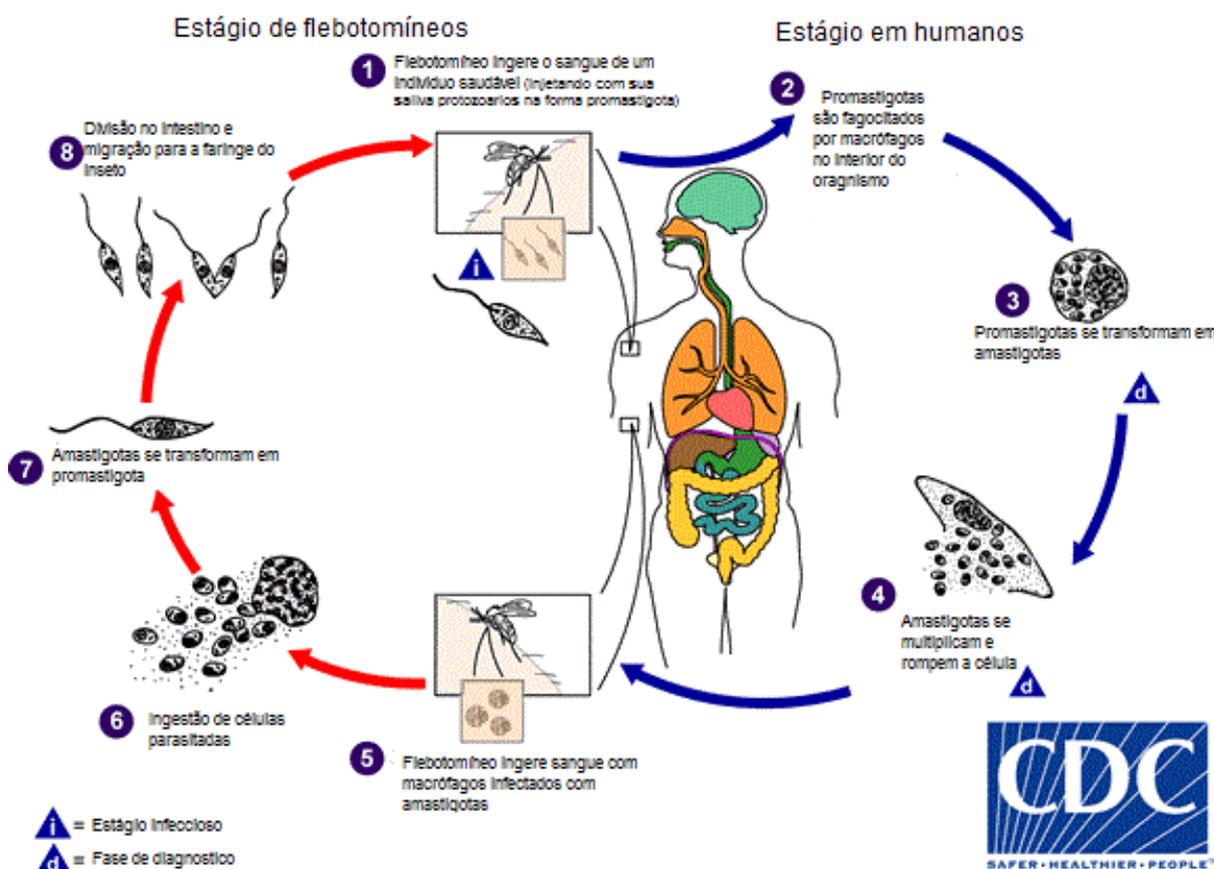


Figura 1: Ciclo biológico heteroxênico de protozoários do gênero *Leishmania* sp. Adaptado de (CDC, 2013)

1.4 Epidemiologia das leishmanioses

1.4.1 Leishmaniose Visceral (LV)

Leishmaniose Visceral acomete aproximadamente, de 200 a 300 mil pessoas todos os anos, levando a morte cerca de 50 mil infectados por ano (IMAMURA et al., 2016). Predominantemente, 90% dos casos de LV no mundo, ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (SINGH et al., 2016) (Figura 2).

De 11 países presentes no continente americano onde já foram relatados casos de LV, o Brasil detém a maior quantidade de registros, correspondendo a 90% dos casos. Esses dados correspondem a uma alta taxa de mortalidade, em torno de 10%, atingindo 1.460 municípios, sendo que destes, 10 são capitais e outras 56 cidades

possuem mais de 100.000 habitantes (COSTA et al., 2016). No Brasil os casos de leishmaniose se distribuem por todo o país, sendo que Norte e Nordeste apresenta a maioria das ocorrências. Como no caso da leishmaniose visceral, em que 50% dos registros foram feitos na região Nordeste (COSTA et al., 2016). Entre os anos de 2005 e 2015, o Espírito Santo Apresentou 30 casos confirmados de LV segundo dados do ministério da saúde (BRASIL, 2014b).

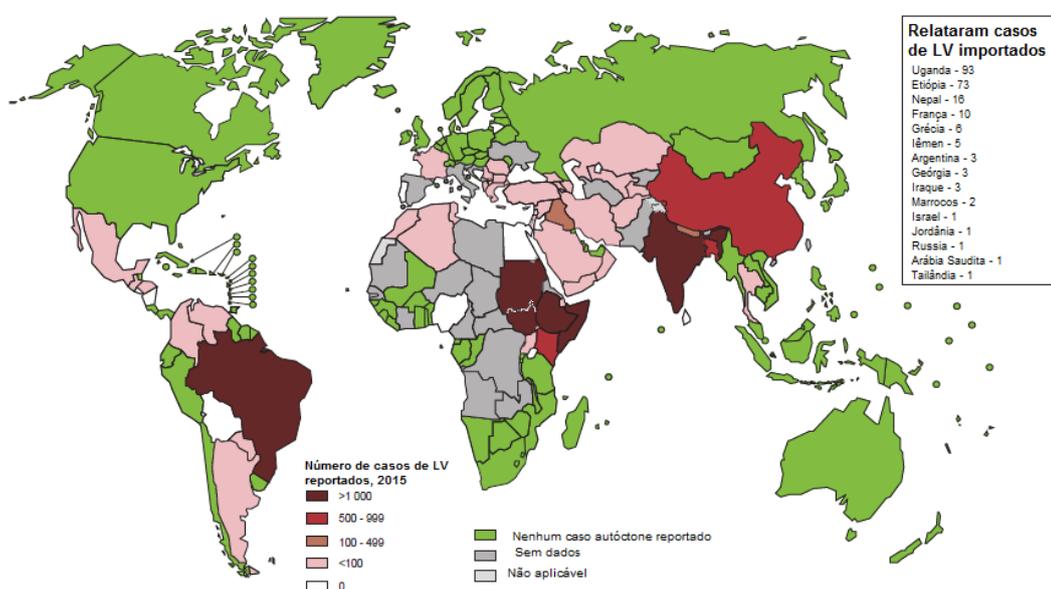


Figura 2: Endemicidade dos casos de leishmaniose visceral ocorridos ao redor do mundo no ano de 2013. Adaptado de (WHO, 2017)

1.4.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

No Brasil a LTA apresenta três formas de ocorrência epidemiológica: silvestre, forma na qual a doença ocorre em um ambiente de mata e é considerado uma zoonose de animais silvestres, atingindo o homem somente se o mesmo adentrar nesses ambientes; ocupacional, que está associado a exploração do meio ambiente, como derrubadas de madeiras e atividades agropecuárias e por último, rural e peri-urbano, no qual a transmissão da doença está associada ocupação de áreas próximas a resquícios de vegetação e em aglomerados urbanos (BRASIL, 2014a).

Segundo dados epidemiológicos da OMS, a maioria dos casos de leishmaniose cutânea está compreendida entre nove países: Afeganistão; Arábia Saudita; Argélia; Brasil; Colômbia; Irã; Paquistão; Peru e Síria. Nas Américas, a ocorrência de casos pode ir desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (ALVAR et al., 2012) (Figura 3).

No Brasil, até a década de 70 a maior parte dos casos de LTA era creditada a *Leishmania braziliensis*, porém com a evolução das técnicas moleculares de identificação do DNA, descobriu-se que na verdade existiam outras espécies de *Leishmania* causando a doença. Hoje no país é reconhecido sete espécies causadoras da LTA: *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (L.) amazonensis*; e mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* (BRASIL, 2014a).

Segundo o Ministério da Saúde, o número de registros de casos de leishmaniose cutânea no Brasil, entre os períodos de 2005 a 2015 foram de 237.145 casos, sendo distribuídos pelas regiões brasileiras da seguinte forma: Norte com 42,5% dos casos, Nordeste com 31%, Centro-Oeste com 15,5%, Sudeste com 9% e por último o Sul com 2%. Dentre os 9% da região Sudeste o Espírito Santo é responsável por 6,2% dos casos, o que em números reais equivale a 1341 casos (BRASIL, 2014b).

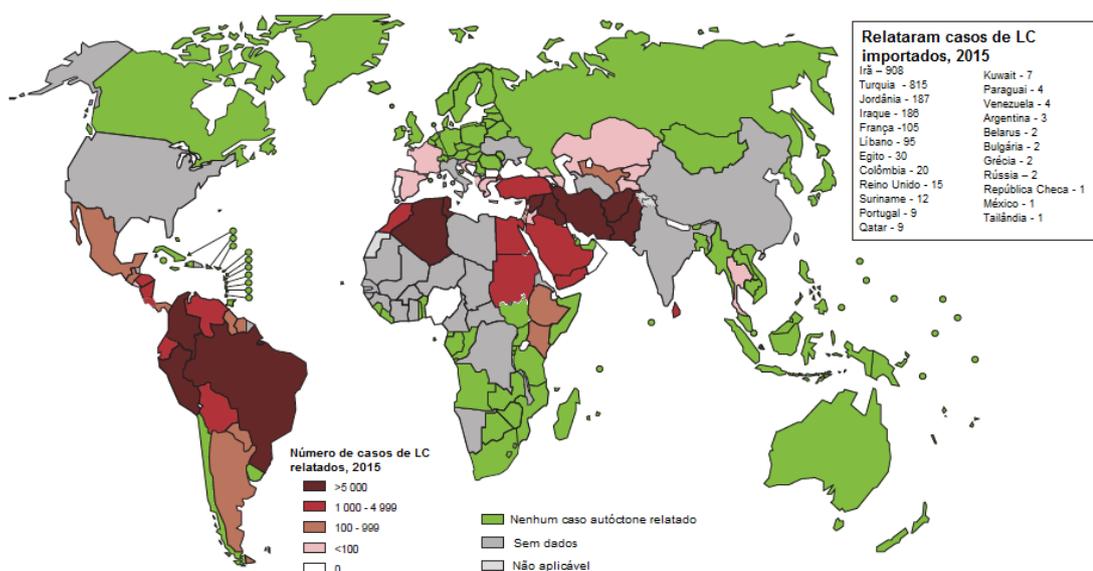


Figura 3: Endemicidade dos casos de leishmaniose cutânea ocorridos ao redor do mundo no ano de 2013. Adaptado de (WHO, 2017).

1.5 Características clínicas

1.5.1 Características clínicas da Leishmaniose Visceral

Nas regiões onde a LV é considerada de ocorrência endêmica, é possível a existência de casos assintomáticos, ou ainda a ocorrência da cura de forma espontânea, nesse último o indivíduo apresenta sintomas da doença de forma mais leve (DESJEUX, 2004).

A doença tem por características febre, perda do peso de forma significativa, anorexia, fraqueza, palidez, tosse, diarreia, linfadenopatia, hepatomegalia (aumento de tamanho do fígado), esplenomegalia (aumento de tamanho do baço), epistaxe (sangramento nasal) e em crianças pode causar um atraso de crescimento. Quando não tratada de forma correta o indivíduo infectado pode ir a óbito em cerca de dois anos. Os casos de óbito estão associados a infecções bacterianas secundárias e hemorragias (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; PACE, 2014).

1.5.2 Características clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA pode se manifestar clinicamente através de três formas, leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LM). Essa variação entre as formas de manifestação clínica se dá pela combinação da variedade de espécies específicas de *Leishmania* que são capazes de causar a LTA, combinado com a resposta do sistema imune do hospedeiro (BRASIL, 2014a ; ALMEIDA; SANTOS, 2011).

A leishmaniose cutânea se caracteriza por apresentar lesões do tipo arredondadas, com base eritematosa, bordas elevadas, fundo granuloso e se localiza geralmente nas regiões expostas do corpo, podendo ocorrer de forma única ou múltipla. Caso não sejam tratadas, essas lesões tendem a se curar de forma espontânea com o passar de meses ou anos (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Dentre as LCs há diferentes formas clínicas de apresentação. A forma cutânea localizada é a mais comum e se caracteriza por possuir lesões do tipo úlceras, que

podem ir de uma única até várias e apresentam uma boa resposta a ação dos tratamentos. A forma cutânea disseminada ocorre em poucos casos, cerca de 2%, sendo por isso considerada rara. Ela se inicia com lesões únicas ou múltiplas, que acaba evoluindo, para inúmeras lesões, se apresentando de forma papular e pode acometer grandes extensões da região cutânea. Essa forma está ligada a infecção pelos parasitas *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (ANTONIO et al., 2014; BRASIL, 2011).

A LCD é causada pela *L. amazonensis*, é uma forma clínica rara que atinge pacientes com defeitos no sistema imune, sendo que estes não apresentam resposta contra os antígenos da *Leishmania*. A evolução da doença ocorre de forma lenta, com baixa resposta ao tratamento, o que leva a formação de várias lesões não ulceradas e que recobrem grande parte da região cutânea (ZERPA et al., 2007; DESJEUX, 2004).

A LM é caracterizada por lesões destrutivas que ocorre nas mucosas das vias áreas superiores. Ela ocorre devido a uma LC mal tratada ou que sofreu cura espontânea, geralmente 3 a 5% desses casos irá evoluir para uma LM. Entre seus principais sintomas estão disfagia, odinofagia, tosse, rouquidão, epistaxe e obstrução nasal. A LM pode apresentar lesões crônicas, que levam a mutilação do paciente, como perda parcial ou total do nariz, lábios e pálpebras, o que ocasiona um estigma social aos mesmos (GOTO; LINDOSO, 2010; DAVID; CRAFT, 2009).

1.6 Tratamento das Leishmanioses

As formas de tratamento para as leishmanioses são de fundamental importância, uma vez que ainda não há vacinas para leishmaniose humana, disponíveis comercialmente. Sendo assim, o foco na inovação e aprimoramento da eficiência dos medicamentos se mostra como um ponto vital na melhoria de qualidade de vida e cura dos pacientes.

1.6.1 Antimoniais pentavalente (Sb^{5+})

Antimoniais são os principais medicamentos de escolha para se tratar as formas de leishmaniose, sendo usados há mais de 60 anos. Sua primeira forma de utilização se deu através do antimônio trivalente, em forma de sal, pelo médico brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna, com o intuito de tratar pacientes com leishmaniose cutânea. Anos depois, na Itália, começou também a ser utilizado no tratamento da leishmaniose visceral. Pelo seu alto nível de toxicidade, o composto trivalente foi substituído pelo pentavalente (OLIVEIRA et al., 2013). Atualmente os antimoniais mais utilizados no tratamento de leishmanioses são antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), que apresentam problemas com o tratamento de longa duração como a alta toxicidade e a diminuição de seus efeitos contra diversos tipos de *Leishmania* sp., sua dose é administrada 20 mg de Sb/Kg, através da via parenteral, diariamente, por cerca de 20 a 40 dias (MAHMOUDVAND et al., 2014).

No começo, o antimônio era utilizado sob a forma de sais trivalentes, conhecido como tártaro emético, porém ao longo dos anos foi observado que o mesmo era responsável por causar ao paciente diversos efeitos colaterais, como intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotóxicos, podendo inclusive causar a morte. Em 1920 Bramachari desenvolveu a primeira versão do composto pentavalente, conhecido como uréia estibamina. Na década de 30 foi desenvolvido uma nova formulação pentavalente para o antimônio, conhecida como estibogluconato de sódio (Pentostam®). Na década de 40, durante o período de guerra, surgiu o antimoniato de meglumina (Glucantime®), como uma versão alternativa ao uso de estibogluconato de sódio. Ambos medicamentos ainda são utilizados até os dias atuais (HEFNAWY et al., 2017).

Embora os antimoniais sejam utilizados há várias décadas, ainda hoje não se sabe direito sobre seus mecanismos de ação, porém há a hipótese de que o antimônio pentavalente (SbV) atue como uma pró-droga, ao longo do tempo também foi sugerido que para que o medicamento apresentasse um efeito leishmanicida era preciso que o mesmo sofresse uma mudança para o composto trivalente ($SbIII$), sendo que já foi demonstrando que o mesmo é capaz de induzir a apoptose em formas amastigotas (GOODWIN; PAGE, 1943; HEFNAWY et al., 2017; SERENO et al., 1998).

Nos últimos anos vem havendo relatos de casos de resistência ao tratamento com antimoniais, principalmente por cepas da espécie *L. donovani*, responsável por causar a forma visceral em países da Ásia e África, sendo que na Índia ele já é considerado ineficiente e está sendo substituído pela miltefosina (SUNDAR, 2001; HENDRICKX et al., 2016;). Essa resistência pode surgir em função de fatores como a resposta imune do hospedeiro, adaptação biológica da cepa de *Leishmania* sp. e fatores farmacológicos (GAZANION et al., 2016).

Pelo fato de a forma de ação dos antimoniais ainda não ter sido totalmente elucidada, pouco se sabe sobre como os mesmos causam citotoxicidade e efeitos adversos aos pacientes que os utilizam em seus tratamentos, o que também torna mais difícil o desenvolvimento de novas formulações que sejam mais seguras e eficientes (SERENO et al., 1998).

A velocidade de eliminação dos antimoniais é um fator relevante para a frequência e dose com que o mesmo é administrado e por consequência o aparecimento de efeitos adversos (HANTSON et al., 2000). A eliminação dos compostos antimoniais nos seres humanos ocorre por via renal e se dá por duas fases, uma de excreção rápida e uma mais lenta. Na fase mais rápida, 50% da droga que foi administrada é excretada em até três dias após a administração, enquanto a fase lenta pode durar por até 50 dias, o que pode levar a uma toxicidade cumulativa (MIEKELEY; MORTARI; SCHUBACH, 2002). Entre os principais efeitos citotóxicos causados pelo uso dessa droga estão vômitos, mialgia, problemas cardiotoxícos e nefrotóxicos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Nas regiões onde ocorrem as leishmanioses, incluindo o Brasil, há dificuldades no uso do antimoniais pentavalentes no tratamento de pacientes, principalmente em razão da baixa adesão dos pacientes aos mesmos, resistência aos medicamentos por parte dos parasitas e principalmente efeitos adversos como dores musculares, cefaleias, anorexia, problemas gastrointestinais e ainda a toxicidade cardíaca, hepática e pancreática (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Outro problema que vem ocorrendo com relação ao tratamento com antimoniais é a resistência por parte das cepas de *Leishmania* sp. A resistência desenvolvida por esses parasitas está relacionada a mutações genéticas, que levam os mesmos a se adaptarem ao tratamento. Entre os principais meios de resistência está a super expressão de proteínas alvos dos medicamentos, fazendo assim com que os mesmos

se liguem a essas proteínas, protegendo o alvo principal de sua ação, e mantendo o funcionamento do metabolismo da *Leishmania* sp. (MUKHERJEE et al., 2006; SUNDAR, 2006).

Um dos casos mais destacados sobre a resistência aos antimoniais ocorreu na Índia, no qual os tratamentos com esse tipo de droga foram substituídos por drogas de segunda linha, como a anfotericina B. O estudo de Sundar, 2001 demonstrou que aproximadamente 60% das pacientes com leishmaniose visceral apresentavam resistência ao tratamento com antimoniais.

Um importante mecanismo de resistência aos antimoniais está associado a baixa expressão da proteína de membrana aquagliceroporina, uma vez que esta é associada a entrada do medicamento no parasita. Essa diminuição irá acarretar em uma menor disponibilidade de antimonial no meio intracelular do parasita (GOURBAL et al., 2004).

Outra forma descrita de resistência é através da superexpressão da proteína tripanotona (TSH), uma vez que a mesma é responsável pelo aumento do potencial tiol redox, além de sua capacidade de conjugação com o SbIII. Quando a TSH é conjugada ao SbIII, se forma um complexo que é capaz de ser eliminado pela membrana plasmática (LEPROHON; LÉGARÉ; OUELLETTE, 2009).

1.6.2 Anfotericina B

É um antibiótico poliênico que possui a capacidade de interagir com o ergosterol da membrana celular da *Leishmania* sp., causando poros, que irão levar a um desbalanceamento iônico e a consequente morte do parasita. Ela é considerada um medicamento de segunda escolha, sendo utilizada quando não se obteve êxito com o tratamento de antimoniais ou quando, por alguma razão, o uso deste é impossibilitado. É recomendada a utilização de 0,5 mg/kg/dia, podendo chegar a 1mg/kg/dia, por via intravenosa, utilizando soro glicosado como veículo, sendo que a administração deve ocorrer de forma lenta e gradual, afim de evitar ao máximo a ocorrência de efeitos adversos (PURKAIT et al., 2012; SUNDAR et al., 2014).

Um dos maiores problemas no começo de sua utilização foi o fato de que essa droga possui duas faces hidrofóbicas, o que levava a formação de agregados, esse também é o motivo pelo qual a mesma não é utilizada na forma oral, já que durante sua ingestão seria formado agregados, fazendo com que a droga perdesse seus efeitos (BARRATT; LEGRAND, 2005).

Esse antifúngico, produzido pela bactéria *Streptomyces nodosus*, apresenta eficácia contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp., estando disponível em duas formas comerciais: desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal. A versão lipossomal surgiu como uma alternativa aos efeitos tóxicos causados pela versão livre da droga, substituindo o desoxicolato por outros lipídios, diminuindo assim seu tempo de exposição de forma livre no organismo (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

A anfotericina B apresenta um alto nível de toxicidade, podendo causar náuseas, insuficiência renal, anemia e problemas cardíacos, sendo que, este último a torna imprópria para a administração em pacientes que possuem problemas cardiovasculares. Ainda há o problema da toxicidade crônica, que é manifestada graças aos efeitos nefrotóxicos da droga (ANTONIADOU; DUPONT, 2005). Por causa de seus efeitos coletivos, é necessário um acompanhamento do paciente, isso acaba por elevar os custos do tratamento (KAFETZIS et al., 2005).

Em regiões onde ocorrem casos de resistência aos antimoniais, a Anfotericina B se tornou a primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral, como é o caso de algumas regiões da Índia. Justamente pela grande utilização deste medicamento, já foi possível se encontrar isolados clínicos de *L. donovani* resistentes ao mesmo, na região de Bihar, Índia (PURKAIT et al., 2012; SUNDAR, SHYAMGARWAL; RAI; MURRAY, 2010). Um componente importante para a eficácia de resistência é a anulação das espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS), causadas pela entrada da anfotericina B no interior da *Leishmania*. Esse efeito é causado pela reação da molécula de triparedoxina com as ROS. Uma vez que as ROS não reagem com os ergosteróis de membrana, a mesma consegue se conservar intacta, impedindo assim a liberação dos ions de K^+ (PURKAIT et al., 2012)

Em outro estudo Mwenechanya et al., (2017) identificaram cepas de *L. mexicana* resistentes ao tratamento com Anfotericina B. Essa resistência ocorre através da

expressão da proteína 14 α - desmetilase, que leva a restauração da síntese de ergosterol e uma consequente resistência ao tratamento.

1.6.3 Miltefosina

A miltefosina, hexadecilfosfocolina, faz parte do grupo dos alquil-lisofosfolipídios, um grupo de drogas usadas no tratamento do câncer que apresentam efeitos na região da membrana celular. Em 2002 ela foi aprovada para o uso contra leishmaniose cutânea, na Índia, possuindo efeito, contra as fases promastigotas e amastigotas de variadas espécies de *Leishmania sp.* (CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; GRIEWANK et al., 2010). Em 2006 entrou para a lista de drogas regulamentadas pela FDA (Food and Drugs Administration) e atualmente faz parte da lista de medicamentos essenciais da (W H O, 2011). Recomendasse 2,5 mg/kg/dia, durante até 28 dias (DORLO et al., 2012).

É considerado o primeiro medicamento, de uso oral, eficiente contra leishmaniose. Foi originalmente concebida para ter ação antitumoral, porém em baixas doses apresenta ação contra *Leishmania sp.*, por isso foi testada na Índia para ser uma alternativa as drogas comumente utilizadas, já que as mesmas estavam encontrando resistência por parte dos parasitas. Desde então, vem sendo usada como droga de tratamento para leishmaniose visceral (LV), inclusive como opção de droga de primeira linha em países como Índia, Nepal e Bangladesh (SUNDAR et al., 2012).

Os mecanismos de ação da miltefosina ainda não foram totalmente elucidados, porém há a possibilidade que sua forma de ação acontece em função de suas propriedades anfifílicas, sendo assim possível que a mesma interaja com a membrana plasmática, causando perda em sua fluidez (PARIS et al., 2004). Essa hipótese se justifica pelo fato de sua característica anfifílica permitir com que haja um acúmulo da mesma dentro da célula de leishmania, permitindo assim que haja uma interação com a modulação da superfície celular, bem como com a ativação de fosfolipases. O metabolismo da miltefosina dentro da célula ocorre de forma lenta, exigindo assim altas concentrações da droga para que ocorra a morte do parasita (PEREZ-VICTORIA et al., 2003).

Entre as principais formas de ocorrência da resistência a miltefosina em testes *in vitro* está a ação da bomba de efluxo glicoproteína (Pgp), codificada pelo gene MDR1 e a diminuição da absorção intracelular da droga. A ação da bomba de efluxo Pgp já foi amplamente descrita na literatura científica, como sendo a responsável por inúmeros casos de ocorrência de resistência a drogas, uma vez que a mesma diminui a concentração intracelular do medicamento (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006).

1.6.4 Pentamidinas

É uma dinâmica aromática, conhecida comercialmente pelo nome de Lomidina®, que apresenta efeitos contra LV, sendo uma droga de segunda linha na opção terapêutica. É utilizada em casos em que os antimoniais não obtiveram bons resultados ou quando os pacientes apresentam algum efeito adverso ao uso dos mesmos. Sua administração é feita de forma parenteral, 4mg/kg três vezes por dia, durando de 12 a 15 dias. Dentre seus principais efeitos colaterais estão hipertensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (ANDERSEN et al., 2005).

Sua ação ocorre através da ligação em regiões ricas em AT, no DNA. No caso de *Leishmania* sp., o DNA mitocondrial é mais rico nessas regiões em comparação ao DNA nuclear, podendo assim afetar principalmente esse local. Estudos mais recentes comprovaram a afinidade entre as pentamidinas e a região mitocondrial da leishmania, fazendo deste um alvo preferencial (BRAY et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2006).

O mecanismo da resistência as pentamidinas ainda não foi completamente elucidado, porém alguns estudos já apresentaram algumas hipóteses. O estudo de Coelho et al., (2008) mostrou que a expressão de PRP1, um gene responsável por codificar transportadores de membrana, influenciava na resistência, uma vez que quanto maior a expressão desse gene pelas cepas de *L. amazonensis* testadas, maior era a resistência apresentada. Outra hipótese muito aceita foi descrita por Kandpal et al., (1996), na qual foi demonstrada a importância do aumento de arginina intracelular, uma vez que a pentamidina compete com o transportador de arginina pelo mesmo sítio de entrada na célula de *Leishmania*.

1.7 Novas opções terapêuticas

As dificuldades encontradas no uso dos tratamentos tradicionais contra leishmaniose, tem levado a pesquisa de novas substâncias que apresentem uma maior efetividade no tratamento associado a um menor número de feitos colaterais (ENNES-VIDAL et al., 2017).

Os compostos de origem vegetal vêm sendo utilizados como agentes farmacêuticos a séculos pelas populações de diversos locais do mundo. Atualmente os mesmos vêm sendo bastante testados como uma alternativa aos tratamentos tradicionais, principalmente aqueles que já se encontram defasados devido a sua baixa eficiência ou aos seus severos efeitos colaterais. Esses compostos apresentam grandes vantagens em sua utilização para testes laboratoriais, pois os mesmos apresentam uma grande variedade de produtos químicos e biológicos com funções distintas em sua composição, bem como são adquiridos com facilidade e baixo custo na natureza (KAMBLE; PATIL, 2008).

Uma das primeiras substâncias de origem vegetal a ter sua atividade antileishmania testadas nos últimos anos são os óleos essenciais, que são compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, sendo que sua utilização a princípio se baseava na Etnofarmacologia (OLIVEIRA et al., 2008). Um ponto que torna viável a utilização destes em estudos é sua fácil forma de obtenção, uma vez que existem várias técnicas para isso e fazendo com que seu custo não se apresente elevado (PEREIRA; MEIRELES, 2007).

No que diz respeito a utilização de óleos essenciais e sua capacidade antileishmania, já há uma gama de estudos que compraram a eficácia dos mesmos contra diferentes cepas de *Leishmania* sp. Andrade et al., (2016), testaram o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de 16 diferentes plantas contra promastigotas de *L. amazonensis*, obtendo significativos resultados de inibição. Outro a ter resultados promissores foi de Bosquiroli et al., (2015), que analisou os efeitos *in vitro* do óleo essencial extraído da planta *Piper angustifolium*, popularmente conhecida com pimenta-de-macaco e tipicamente encontrada na região do cerrado brasileiro. O óleo de *P. angustifolium* mostrou-se capaz de inibir tanto promastigotas quanto amastigotas de *L. infantum*.

Entre as substâncias naturais mais testadas nos últimos anos estão as chalconas, que são precursores da via de síntese de flavonoides nas plantas e são encontradas principalmente nas flores (FERRER et al., 1999). Devido a sua estrutura química simples, vários de seus derivados tiveram sua capacidade antimicrobiana, antifúngica e antileishmania testadas ao longo dos últimos anos (BOECK et al., 2006). Alguns estudos demonstram que esses compostos tem uma ação *in vitro* bastante eficaz contra algumas cepas de *Leishmania* sp., como por exemplo *L. amazonensis* e *L. infantum* (APONTE et al., 2009; PASSALACQUA et al., 2015).

Outro composto vegetal que apresenta bastante potencial no tratamento das leishmanioses é resveratrol, um polifenol presente em várias espécies de plantas, sendo mais conhecido nas uvas e apresenta diversos efeitos biológicos (WALLE et al., 2004). Graças a sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória essa substância já foi testada contra diversas enfermidades como câncer, obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares e também contra parasitas e micro-organismos (BHATT; THOMAS; NANJAN, 2012; CHAN, 2002; JANG, 1997; UNGVARI et al., 2007).

No uso contra as leishmanioses já há diversos relatos científicos da eficácia, *in vitro*, do tratamento com resveratrol. A sua eficácia foi demonstrada contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (FERREIRA et al., 2014), *L. donovani* (DINESH et al., 2014) e *L. major* (KEDZIERSKI et al., 2007).

Em decorrência dos problemas apresentados pelo uso dos tratamentos tradicionais, associado ao fato de não haver medidas profiláticas eficazes e aprovadas para o uso em humanos, a pesquisa em novos fármacos para tratamento das leishmanioses é de fundamental importância, tendo em vista melhorar principalmente a qualidade de vida dos pacientes que estão em tratamento e nesse contexto a utilização de bacteriocinas pode ser algo inovador e de grande potencial, já tendo sido anteriormente utilizada no tratamento *in vitro* de outros parasitas e patógenos, como por exemplo, *Giardia lamblia*; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*; *Leishmania donovani*; entre outros (ABENGÓZAR et al., 2017; AMER; MOSSALLAM; MAHROUS, 2014; PIPER et al., 2009; VARELLA COELHO et al., 2007).

1.8 Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos produzidos por bactérias que tem a capacidade de inibir o crescimento de outras bactérias através de diversos mecanismos, como inibição da síntese proteica, rompimento da membrana celular e atuação como DNases e RNases. Sua identificação ocorreu em 1925, sendo que as primeiras bacteriocinas a serem utilizadas foram as colicinas, isoladas de algumas espécies de enterobactérias e com ação principalmente contra a *Escherichia coli* (CASCALES et al., 2007). A produção das bacteriocinas ocorre no final da fase log e início da fase estacionária (CAVERA et al., 2015).

Em relação aos antibióticos, que também são produzidos por bactérias, as bacteriocinas apresentam algumas características únicas, como por exemplo, o fato de serem sintetizadas nos ribossomos, enquanto os antibióticos são sintetizados por um complexo multienzimático; a forma de atuação, pois as bacteriocinas possuem uma ação restrita contra indivíduos da mesma espécie ou espécies próximas filogeneticamente enquanto os antibióticos possuem uma ampla gama de ação e a questão da dose efetiva, ao passo em que as bacteriocinas atuam em concentrações micromolares enquanto os antibióticos precisam de concentrações maiores para uma efetividade mínima (CAVERA et al., 2015; COTTER; ROSS; HILL, 2012).

A classificação e a forma de ação das bacteriocinas variam de acordo com seu peso e constituição molecular:

➤ Classe I: são bacteriocinas pequenas (<5 kDa), maioria lantibióticas, termoestáveis e possuem em sua composição aminoácidos que são pouco encontrados na natureza. Em sua composição são encontrados entre 19 e 38 aminoácidos, em geral sua principal atividade ocorre contra bactérias Gram-positivas. A bacteriocina Nisina foi o primeiro lantibiótico a ser descrito, sendo a mesma extraída de culturas de *Lactococcus lactis* (MATTICK; HIRSCH; BERRIDGE, 1947). A classe I apresenta às subdivisões A (moléculas lineares) e B (moléculas globulares). A bacteriocina mais utilizada no mercado é a nisina, pertencente a essa classe e a subdivisão A (BARBOSA; CAETANO; MENDO, 2015). Essa bacteriocina é isolada a partir de cepas de *Lactococcus lactis*, composta por 34 aminoácidos e possui peso molecular de 3,5 KDa. Ela possui efeitos inibitórios contra várias espécies de

bactérias, como *Lactococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Listeria* sp., *Bacillus* sp., entre outras (WOLF; GIBBONS, 1996). Essa bacteriocina apresenta cinco variações (A, B, C, D e E), que se diferenciam entre si por pequenas alterações de aminoácidos em suas respectivas composições e que apresentam diferenças entre suas capacidades biológicas. Há também uma variação natural conhecida como nisina Z, se diferenciando da nisina A somente pela substituição do aminoácido histidina pela asparagina na posição 27. Elas apresentam o mesmo efeito biológico, porém uma capacidade de difusão diferente (DELVES-BROUGHTON, 1996). Essa bacteriocina foi utilizada nos experimentos do presente trabalho.

➤ Classe II: composta de peptídeos (< 10 kDa) termoestáveis, possui natureza anfipática, o que permite a inserção das mesmas na membrana celular dos organismos alvos, causando assim a despolarização da membrana seguida de morte celular. Para essa classe são consideradas quatro subdivisões (KAUR; KAUR, 2015; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014). Subdivisão IIa: que tem a capacidade de se inserir com a porção C-terminal no alvo, graças a sua carga positiva, formando poros que levam à dissipação de prótons e conseqüentemente a morte da célula. Dentro desse grupo as bacteriocinas mais utilizadas são as pedicinas. Sua composição varia de 37 a 48 aminoácidos. Um exemplo de bacteriocina dessa classe é a Maltracina CPN, que possui atividade anti *Listeria* (HAMMI et al., 2016). Subdivisão IIb: as bacteriocinas dessa subdivisão são heterodiméricas, só funcionando se houver dois peptídeos em quantidades próximas. Sua forma de ação ocorre através da permeabilização da membrana alvo à certas moléculas, como cátions monovalentes e alguns íons, como é o caso da bacteriocina M18, extraída de *Streptococcus pyogenes* (ARMSTRONG et al., 2016). Subdivisão IIc: apresentam uma ligação entre suas unidades N-terminal e C-terminal, conferindo assim uma forma circular, como por exemplo a bacteriocina enterocina EJ97, produzida pela cepa *Enterococcus faecalis* EJ97 (SANCHEZ-HIDALGO et al., 2003). Subdivisão IId: são formadas por bacteriocinas lineares e não requerem outro peptídeo para sua atividade, sendo composta por um único peptídeo linear (NETZ et al., 2002).

A bacteriocina C55 é isolada a partir de cepas de *Staphylococcus aureus* C55. Ela é formada por três peptídeos distintos, C55 α ; C55 β e C55 γ , sendo que somente os dois primeiros possuem atividade de lantibiótico quando atuam em sinergia (NAVARATNA; SAHL; TAGG, 1998). C55 α e C55 β possuem respectivamente pesos moleculares de

3,3 kDa e 2,9 kDa e pertence ao grupo IIb. Já foi demonstrada sua atividade contra 120 cepas de *Staphylococcus aureus*, incluindo algumas que apresentam multirresistência a antibióticos (SYLVIE GARNEAU, NATHANIEL I. MARTIN, 2002). Essa bacteriocina foi utilizada nos experimentos do presente trabalho.

Entre os exemplos de bacteriocina de classe IIc, está a aureocina A53, isolada a partir da cepa *Staphylococcus aureus* A53. Ela possui uma massa molecular em torno de 6 kDa e é formada por 51 aminoácidos. Essa bacteriocina possui atividade de inibição relatada *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), cepas de *Staphylococcus* sp. responsáveis por causar a mastite bovina e *Listeria monocytogenes* (NETZ et al., 2002). Essa bacteriocina foi utilizada nos experimentos do presente trabalho.

➤ Classe III: peptídeos grandes (> 30 kDa), termolábeis, apresentam uma forma de ação diferenciada das demais bacteriocinas, pois sua porção N-terminal é responsável pela catálise da parede celular do alvo e sua porção C-terminal pelo reconhecimento da mesma (EGAN et al., 2016; KARPIŃSKI; SZKARADKIEWICZ, 2013). Essa classe apresenta as subdivisões A e B, sendo que as bacteriocinas da primeira atuam como enzimas bacteriolíticas, causando a lise da célula alvo, a mais conhecida é a lisostafina, extraída de *Staphylococcus simulans*, com aproximadamente 246 aminoácidos em sua composição. Já as bacteriocinas da subdivisão B são consideradas como não-líticas, causando a morte da célula alvo sem que ocorra a lise da mesma (HATHAWAY et al., 2017).

➤ Classe IV: o peso molecular das bacteriocinas que compõe essa classe varia entre 3,4 e 7,2 kDa e sua composição pode apresentar entre 52 e 78 aminoácidos e apresentam uma estrutura cíclica. Essa classe apresenta as subdivisões A e B, que são classificadas entre si pela sequência aproximada de aminoácidos e características bioquímicas. As bacteriocinas dessa classe interagem com a célula alvo fazendo com que a mesma sofra uma interrupção da força próton-motora, que é causada pela perda de íons. Essa interrupção irá levar a morte celular (STEPPER et al., 2011; VAUGHAN et al., 2001).

➤ BLIS (substância inibitória do tipo bacteriocina): essa categoria inclui peptídeos antimicrobianos que ainda não foram totalmente classificados, sendo assim não podendo ser considerados como bacteriocinas uma que cumpriram todos os critérios

necessários para serem considerados bacteriocinas, porém ainda assim apresentam atividades inibitória contra outros micro-organismos (TAGG; RAGLAND, 1991).

Nos experimentos do presente trabalho foi utilizada a BLIS P16. Esse peptídeo antimicrobiano isolado de *Staphylococcus schleiferi* P16 ainda não foi descrito na literatura científica, porém o mesmo está sendo alvo de estudos do grupo de pesquisa da professora Maria do Carmo de Freire Bastos, do Departamento geral de microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Apesar de ainda não ter sido totalmente caracterizado como uma bacteriocina, o trabalho de Santos (2016), já relatou algumas de suas formas de atuação, como por exemplo efeito microbicida contra a cepa *Micrococcus luteus* ATCC 4698.

1.8.1 Aplicações Biotecnológicas das Bacteriocinas

Testes já indicaram o potencial microbicida de diferentes bacteriocinas contra variados tipos de micro-organismos (*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, entre outros) (ARTHUR; CAVERA; CHIKINDAS, 2014). Essa grande gama de atuações se dá graças as diferentes classes de bacteriocinas, que apresentam entre si diferença de peso molecular e constituição bioquímica, o que faz com que as mesmas tenham um grande potencial de tratamento e cura de diversas enfermidades (VAN HEEL; MONTALBAN-LOPEZ; KUIPERS, 2011).

Já se tem registros de bacteriocinas atuando contra micro-organismos relevantes para a saúde humana em diferentes áreas que apresentam potencial de aplicação biotecnológica, como biopreservação de alimentos, clínica humana, clínica veterinária e agricultura (MARUGG, 1991).

1.8.1.1 Bacteriocinas na agricultura

Um dos principais problemas que atinge a área da agricultura é a presença de fitopatógenos, responsáveis por atrapalhar o desenvolvimento de colheitas, o que acarreta em um grande prejuízo financeiro por conta do dinheiro investido, assim como um prejuízo social, quando estes afetam a agricultura familiar que é a principal fonte de renda e alimentação para diversas famílias ao redor do mundo. Na

agricultura, as bacteriocinas Corein 8A, Bac-GM17 e Bac 14B mostraram-se eficazes na melhora da interação entre a membrana celular das células de raízes de plantas e os nutrientes do solo, e também no controle de fungos, que diminuem a capacidade de absorção de nutrientes das raízes (SUBRAMANIAN; SMITH, 2015).

Outro caso de uso de bacteriocina na agricultura é o da agrocina 84. Essa bacteriocina é obtida a partir da bactéria *Agrobacterium radiobacter k84* e possui efeitos contra estirpes de bactérias do gênero *Agrobacterium*, por isso é utilizada no controle da doença conhecida como galha, que é responsável pela formação de tumores nas plantas, na região entre o caule e a raiz, causando um desequilíbrio hormonal na planta. Atualmente ela já é usada de forma comercial através dos produtos Nogall e Galltrol (JUNAID et al., 2013; KIM et al., 2006).

1.8.1.2 Bacteriocinas na biopreservação de alimentos

Ao longo dos anos, houve uma grande evolução tecnológica na indústria de alimentos, com o objetivo de preservar ao máximo a qualidade do mesmo e impedir a degradação por meio de micro-organismos em geral, porém, isso não foi o suficiente para fazer com que esses problemas desaparecessem. Outro problema ligado à preservação alimentar é o fato de que muitos micro-organismos são ao mesmo tempo responsáveis pela deterioração de alimentos e patógenos humanos relevantes, como é o caso da *Salmonella* sp. Isso faz com que a utilização de conservantes seja necessária, porém há também o problema de estes estarem ligados a algum tipo de malefício para a saúde humana (SETTANNI; CORSETTI, 2008). Nesse contexto, a utilização de bacteriocinas se tornou algo viável, pois as mesmas podem ser utilizadas como biopreservadores de alimentos, uma vez que possuem ação contra uma diversa gama de micro-organismos e ao mesmo tempo é segura para a saúde humana (DEEGAN et al., 2006).

Já é possível encontrar no mercado bacteriocinas sendo utilizadas como biopreservadores de alimentos, como a nisina, que já é testada para esse fim a mais de 50 anos. Essa bacteriocina tem um bom efeito de proteção a alimentos, uma vez que consegue agir como um inibidor do crescimento e multiplicação de micro-

organismos e da formação de biofilme, sendo inclusive já aceito pela FDA (Food and Drug Administration) (BENMECHERNE et al., 2013).

1.8.1.3 Bacteriocinas na clínica veterinária

Muitas das doenças de importância veterinária são causadas por micro-organismos, isso faz com que o uso de bacteriocinas na clínica veterinária tenha um relevante potencial. Atualmente várias doenças veterinárias, que quando ocorrem, causam prejuízos econômicos e de saúde, já estão sendo tratadas com o auxílio das bacteriocinas, entre elas a mastite bovina (NASCIMENTO et al., 2005).

A mastite bovina é uma doença provocada por diversos patógenos, como as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp., que causam a inflamação das glândulas mamárias de bovinos. Ela apresenta grande importância econômica, sendo que é considerada a doença mais relevante do ponto de vista da criação de gado leiteiro. Um dos principais problemas dessa doença é que além de afetar a produção do leite do animal que está infectado, a mesma pode ser contagiosa, podendo assim, se espalhar pelo rebanho (BRADLEY, 2002).

Atualmente a principal forma de tratamento é a utilização de antibióticos, porém sua eficácia já pode ser considerada questionável, uma vez que grande parte das bactérias responsáveis por causar a mastite já apresentam resistência aos mesmos, o que leva o tratamento a ser ineficiente e caro (PARK et al., 2012).

Já existem pesquisas com bacteriocinas que visam aplicar as mesmas em um tratamento mais eficiente contra a mastite, entre elas está a Lacticina 3147, produzida por *Lactococcus lactis*. Essa bacteriocina já foi testada *in vitro* e *in vivo* contra bactérias causadoras da mastite bovina, e apresentou resultados consideráveis na prevenção da doença (NASCIMENTO et al., 2005; RYAN et al., 1998)

1.8.1.4 Bacteriocinas na clínica humana

No campo do tratamento humano, já há registros na literatura científica da utilização de bacteriocinas contra diversos tipos de doenças que afligem o homem. Há estudos

in vitro contra bactérias multirresistentes, no qual as bacteriocinas possuem efeitos de inibição do crescimento bacteriano, inclusive tendo efeitos melhores se comparados a antimicrobianos já utilizados, e no tratamento de cânceres, no qual as bacteriocinas se ligam e destroem células cancerígenas, por afinidade a carga negativa que estas células apresentam, apesar de que ainda não se sabe tudo sobre como esse processo ocorre (KAUR; KAUR, 2015).

Entre as bacteriocinas que apresentam um futuro promissor como possível tratamento, está a pumilicina 4, que possui efeito inibitório contra cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina). Essa bacteriocina é isolada a partir da bactéria *Bacillus pumilus* WAPB4 e apresentou em testes *in vitro* resultados com relevante potencial, fazendo com que a mesma possa ser no futuro uma alternativa ao uso de antimicrobianos (AUNPAD; NA-BANGCHANG, 2007).

Outra bacteriocina que já apresentou potencial no tratamento contra alguma enfermidade humana é a Laterosporulin10 (LS10), que foi testada *in vitro* contra algumas linhagens celulares cancerígenas e contra patógenos humanos. A LS 10 é uma bacteriocina classe IId, extraída da bactéria *Brevibacillus* sp., cepa SKDU10, ela apresentou relevantes efeitos inibitórios sobre os patógenos *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb H37Rv) (RANJAN et al., 2016). Outro importante teste feito com a LS 10 foi a susceptibilidade de linhagens celulares oriundas de cânceres em relação ao tratamento com a mesma. Nesses testes a bacteriocina apresentou efeito citotóxico contra as linhagens MCF-7, HEK293T, HT1080, HeLa e H1299, mostrando que a mesma apresenta um grande potencial futuro de utilização como uma possível droga anti-câncer (BAINDARA et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial anti-leishmania *in vitro* de bacteriocinas contra parasitas do gênero *Leishmania* sp.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a inibição de crescimento em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, frente ao tratamento com as bacteriocinas;
- Calcular o IC₅₀ das bacteriocinas, através dos resultados de viabilidade das formas promastigotas e amastigotas;
- Avaliar o potencial citotóxico das bacteriocinas na linhagem celular de macrófagos de camundongo (J774A.1);
- Determinar os efeitos do tratamento com bacteriocinas, sobre a morfologia de promastigotas, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) a partir do sobrenadante das culturas de macrófagos infectados e tratados com as bacteriocinas;
- Avaliar os efeitos do tratamento com bacteriocinas, sobre o estresse oxidativo em formas promastigotas de *Leishmania* sp. (Apoptose, ROS e Ciclo celular);

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aprovação ética

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Imunobiologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) no Centro de Ciências da Saúde (CCS) e no laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da UFES. O presente trabalho recebeu autorização junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Espírito Santo, sobre o protocolo de número 33/2016.

3.2 Amostras de *Leishmania* sp.

As amostras de *L. infantum* PP75 (MHOM/BR/74/PP75) e de *L. amazonensis* PH8 (MHOM/BR/PH8) foram gentilmente cedidas pela Profa. Bartira Bergman da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e mantidas no Laboratório de Imunobiologia até o uso. As amostras foram descongeladas e ressuspensas em 5mL de meio de cultura LIT (Infusão de Fígado e Triptose), em garrafa de cultura celular de 25 cm² e colocadas para crescimento em uma estufa B.O.D. a uma temperatura de 25°C, de acordo com o tempo necessário para cada experimento. As mesmas foram utilizadas entre as passagens dois e seis para a realização dos testes.

As cepas de *Leishmania* sp. foram utilizadas para os testes durante sua fase logarítmica.

3.3 Obtenção das bacteriocinas

As bacteriocinas e a BLIS P16 utilizadas neste estudo foram cedidas gentilmente pela professora Maria do Carmo de Freire Bastos, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com exceção da Nisina (Sigma-Aldrich). As mesmas estavam eluídas em solução tampão de NaCl nas

contrações de 1M e foram dialisadas, a fim de se eliminar os possíveis efeitos do mesmo contra as cepas de *Leishmania* sp. Para se remover o excesso de sal, a preparação obtida após a cromatografia de troca catiônica, foi submetida à diálise em membrana com limite de exclusão de 2.000 Da ou 3.500 Da, por 72 h a 4°C, contra 1 litro de água ultrapura estéril, trocando-se diariamente a água do recipiente. A amostra dialisada foi esterilizada por aquecimento (65°C por 15 min). Após a diálise, as bacteriocinas foram dosadas pelo método de Bradford e armazenadas a -20°C até sua utilização.

A estirpe *Micrococcus luteus* ATCC 4698, sabidamente sensível à ação da BLIS P16 e das bacteriocinas utilizadas neste trabalho, foi usada como indicadora da produção dessas substâncias antimicrobianas. Os resultados foram expressos em forma de Unidades Arbitrárias por mL (UA/mL). As bacteriocinas nas respectivas concentrações: P16 20480 UA/mL; A53 20480 UA/mL e C55 10240 UA/mL.

3.4 Teste de viabilidade de promastigotas de *Leishmania* sp.

Para o teste de viabilidade de *Leishmania* sp. em fase promastigota, foi preparada uma cultura com a concentração de 1×10^6 células/mL. Os tratamentos foram realizados com diferentes concentrações, sendo o tratamento realizado com a bacteriocina A53 nas concentrações de 61,5; 30; 15; 7,5 e 3,75 µg/mL, com a bacteriocina C55 nas concentrações de 169; 84,5; 42,25; 21,12 e 10,5 µg/mL e o tratamento com a bacteriocina Nisina nas concentrações de 3200; 1600; 800; 400; 200 e 100 µg/mL. A BLIS P16 foi utilizada nas concentrações de 42,5; 21,25; 10,6; 5,3; 2,6 e 1,3 µg/mL, para o tratamento da cepa de *L. infantum*.

As bacteriocinas foram utilizadas com diluição em uma placa de 96 poços, utilizando o meio LIT. Após a distribuição das concentrações das bacteriocinas nos poços, foi adicionado a cultura de *Leishmania* sp. na concentração de 1×10^6 células/mL, por poço. Após a montagem, a placa foi levada para uma estufa B.O.D., a 25°C e incubadas por 72 horas.

Para a avaliação da viabilidade das formas promastigotas foi utilizado ensaio colorimétrico empregando o reagente resazurina (alamarBlue®, SigmaAldrich®, Missouri, EUA). A leitura das amostras foi feita no equipamento Varioskan® Flash

(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), com excitação de 540nm e emissão de 590nm. Os resultados foram demonstrados na forma de porcentagem de inibição ou de sobrevivência das promastigotas, frente ao tratamento com as diferentes concentrações das bacteriocinas, conforme a expressão matemática abaixo:

$$\text{Intensidade} = \text{média da fluorescência}_{\text{tratado}} - \text{média da fluorescência}_{\text{branco}}$$

$$\% \text{ inibição} = \left(\left(\frac{\text{intensidade}_{\text{tratamento}}}{\text{intensidade}_{\text{controle}}} \right) - 1 \right) \times 100$$

3.5 Cálculo do IC₅₀

O programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EUA) foi utilizado para a análise de regressão não-linear, onde foi possível se chegar ao IC₅₀ das bacteriocinas testadas. Os dados foram expressos em média ± erro padrão.

3.6 Teste sobre a viabilidade de amastigota de *Leishmania* sp.

Para os testes com amastigotas foi utilizada a linhagem celular J774A.1, cultivadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.7. As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/mL, em lamínulas localizadas em placa de 24 poços e em seguida, incubadas a 37°C, com 5% de CO₂, por 24 horas, para que se aderissem as lamínulas. Após esse procedimento os poços foram lavados para a retirada das células não aderidas, em seguida foi acrescentado 2×10^6 células/mL da cultura de *Leishmania* sp. na forma promastigota, em fase logarítmica tardia, por 4 horas para que ocorresse a infecção. Foi feito uma lavagem para a retirada dos parasitas que não foram fagocitados e a placa foi incubada novamente por 24 h, em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, para que fosse estabelecida a infecção. O próximo passo foi o tratamento com a bacteriocina A53 e BLIS P16 nas concentrações de 0; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg/mL,

seguido da incubação das amostras por 48 horas, novamente em estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

As lamínulas foram retiradas dos poços, coradas com Panótico rápido (Interlab, São Paulo, Brasil) de acordo com as especificações do fabricante e posteriormente analisadas em microscópio óptico, utilizando a objetiva de 100x. Durante a análise no microscópio óptico foram contados 100 macrófagos (infectados ou não) bem como o número de amastigotas que estavam infectando os mesmos. A porcentagem de sobrevivência foi obtida através da utilização da fórmula matemática abaixo.

<p>Fórmula de infectividade:</p> $\left(\frac{\text{N}^\circ \text{ total de Leishmania por macrófagos}}{\text{N}^\circ \text{ de macrófagos contados}} \right) \times \% \text{ de macrófagos infectados} = \text{infectividade}$ <p>Fórmula de sobrevivência de amastigotas:</p> $\left(\frac{\text{Infectividade}}{\text{Infectividade do controle}} \right) \times 100 = \% \text{ de sobrevivência}$

3.7 Cultivo de células J774A.1 e avaliação da citotoxicidade celular

As células J774A.1 foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 125 cm², com meio RPMI-1640 (SigmaAldrich®, Missouri, EUA) sem antibiótico, suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (200mM) e NaCO₃. As células foram colocadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ para crescimento. A remoção das células, para serem utilizadas nos testes, foi feito com *cell scraper*, seguindo da contagem das mesmas em câmara de Neubauer com a coloração pelo corante azul de Trypan. As células foram plaqueadas na concentração de 1x10⁵ células/mL e incubadas a 35°C por 24 horas, em estufa com 5% de CO₂ para que pudessem aderir ao fundo da placa. Após esse processo foi adicionado a bacteriocina A53 e BLIS P16 e as células foram novamente incubadas por 72 horas.

Para se verificar o grau de citotoxicidade foi considerado o protocolo padronizado ISO 10993-5, que considera citotoxicidade como viabilidade <70% em relação ao controle

não tratado. A viabilidade celular foi verificada através da resazurina (AlamarBlue®, SigmaAldrich®, Missouri, EUA). As amostras foram lidas no aparelho espectrofotômetro Varioskan® Flash e analisadas de acordo com os parâmetros previamente descritos no item 3.4.

3.8 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), localizado no Centro de Ciências da Saúde-UFES.

As amostras de promastigotas foram lavadas e fixadas com o tampão para células livres (Glutaraldeído 2,5% + Tampão cacodilato 0,1M) e armazenadas a +4°C por 24 horas para a fixação. Após a fixação as amostras foram lavadas com o tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2-7,4) por 3 vezes; incubada durante uma hora ao abrigo de luz com OsO₄ 1% em cacodilato 0,1 M adicionado de ferrocianeto de potássio 1,25%; em seguida foram novamente lavadas com tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2-7,4) seguido de água deionizada.

O processo seguinte foi o de desidratação das amostras, através da adição de etanol a 30%, seguido de etanol a 50%; 70%; 90% e por último 100%. Terminado o processo de desidratação as amostras foram encaminhadas para a realização do ponto crítico, que visa manter a estrutura da morfologia externa, em seguida foram metalizadas com partículas de ouro e lidas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6610LV, nos aumentos de 4000x e 10.000x.

3.9 Dosagem de óxido nítrico (NO)

O sobrenadante dos experimentos com amastigotas de *Leishmania* sp foi coletado para análise da produção de NO. Foi realizada uma análise de forma indireta, através da medição da concentração de nitrito, pelo método colorimétrico de Griess. A curva padrão foi feita utilizando N₂NO₃, com uma diluição a partir de 50 µM. O reagente de Griess foi preparado através da adição de volumes iguais da solução H₃PO₄

Sulfanilamida (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA), a 2,5% e a solução contendo com 1% de 40 α -Naftiletilenoaminohidrocloro (NEED) (SigmaAldrich®, Missouri, EUA) na concentração de 0,1%. Alíquotas de 50 μ L do sobrenadante foram adicionados em placas de 96 poços, em duplicata, seguindo da adição de 50 μ L do reagente de Griess. A solução foi incubada por 10 minutos, em temperatura ambiente e lida no espectrofotômetro Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), na absorvância de 540 nm.

3.10 Avaliação sobre estresse oxidativo

Para os testes de estresse oxidativo as culturas de promastigotas de *Leishmania infantum* foram cultivados em placa de 48 poços, contendo 500 μ L da cultura ajustada para 1×10^7 células/mL, somado a 500 μ L da BLIS P16 na concentração desejada para os testes. Essas culturas foram utilizadas nos testes de Apoptose, ROS e Ciclo celular. Os tempos de tratamento utilizados para os testes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Teste de avaliação do estresse oxidativo versus o tempo de incubação com bacteriocinas em que as amostras foram analisadas.

Tempo	ROS	Ciclo celular	Apoptose
1 hora	X		X
2 horas	X		X
3 horas		X	
4 horas	X		X
6 horas		X	
8 horas	X		X
24 horas	X	X	X
48 horas	X	X	X
72 horas	X	X	X

3.10.1 Detecção de Apoptose

Formas promastigotas da cepa de referência da espécie *Leishmania infantum*, em cultivo a 1×10^7 *Leishmania*/mL com diferentes concentrações da BLIS P16 (0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Uma cultura na ausência da P16 foi utilizada como controle do sistema em todos os tempos analisados. Também foi utilizada como controle positivo, uma cultura tratada com a droga Miltefosina a 16,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram tratadas durante os períodos de 1, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas.

Para a detecção de apoptose foi utilizado o kit a Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Alexis (Lausen, Suíça), que possui a capacidade de detectar mudanças morfológicas na membrana celular através da exposição de fosfatidilserina. Também foi utilizada Iodeto de Propídeo (PI), responsável pela marcação de DNA fragmentado, para a diferenciação dos estágios da apoptose em que as promastigotas se encontravam.

As promastigotas tratadas com a BLIS P16 foram lavadas com tampão HBSS marcadas com Anexina V-FITC e PI, incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz, lavadas novamente com o tampão e encaminhadas para análise por citometria de fluxo, através do citômetro de fluxo Attune® (Life Technologies™, Applied Biosystems™, EUA). Foram coletados 10.000 eventos e analisados no programa Flowjo v10 (TreeStar, Ashland, Oregon, EUA).

3.10.2 Detecção de ROS (espécies reativas de oxigênio)

Formas promastigotas da cepa de *Leishmania infantum*, em cultivo a 1×10^7 *Leishmania*/mL com diferentes concentrações da BLIS P16 (0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Uma cultura na ausência da P16 foi utilizada como controle do sistema em todos os tempos analisados. Também foi utilizada como controle positivo uma cultura tratada com a droga Miltefosina a 16,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os experimentos foram realizados nos períodos de: 1, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas.

As amostras das culturas tratadas de *Leishmania* sp. foram lavadas com tampão PBS e incubadas com a sonda 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA)

durante 40 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação as amostras foram novamente lavadas e em seguida marcadas com Iodeto de Propídio (PI), para a separação entre as células viáveis e não viáveis, e encaminhadas para a leitura no citômetro de fluxo Attune® (Life Technologies™, Aplyed Biosystems™, EUA). Foi adquirido um número de 10.000 eventos, analisados no programa Flowjo v10 (TreeStar, Ashland, Oregon EUA). Os dados foram expressos em porcentagem, com base no índice médio de fluorescência (MFI) e plotados em gráfico com o auxílio do programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EUA).

3.10.3 Análise da progressão do ciclo celular em formas promastigotas de *Leishmania infantum*

Formas promastigotas da cepa de referência da espécie *Leishmania infantum chagas*, em cultivo a 1×10^7 *Leishmania*/mL com diferentes concentrações da BLIS P16 (0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e expostas ao tratamento pelos períodos de 3, 6, 24, 48 e 72 para se avaliar a influência na progressão do ciclo celular no parasita. Uma cultura na ausência da P16 foi utilizada como controle do sistema em todos os tempos analisados. Também foi utilizada como controle positivo uma cultura tratada com a droga Miltefosina a 16,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A progressão do ciclo celular na forma promastigota dos parasitas de *Leishmania* foi analisada utilizando o PI, o qual se liga ao DNA das células fixadas e permeabilizadas com metanol. Para a análise, 1×10^7 células do parasita previamente submetidas ao tratamento com a P16 foram lavadas com PBS-EDTA (PBS suplementado com 5 mM de EDTA). Após a ressuspensão das células em 300 μL de PBS-EDTA 700 μL de metanol foi adicionado em 4 etapas de 175 μL com homogeneização entre as etapas. Em seguida as amostras foram incubadas a 4°C *overnight* ao abrigo da luz. Após o período de incubação as células foram lavadas com PBS-EDTA, sob as mesmas condições de centrifugação, e ressuspensas em 1 mL de PBS-EDTA contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase A e incubadas a 37°C por 45 minutos ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Attune® (Life Technologies™, Aplyed Biosystems™, EUA), onde foram adquiridos 40.000 eventos, analisados no programa Flowjo v10 (TreeStar, Ashland, Oregon, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do tratamento com bacteriocinas e BLIS P16 sobre a viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

O tratamento com as bacteriocinas e com a BLIS P16 demonstrou ser capaz de causar atividade anti-leishmania sobre as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*. A influência desse tratamento se mostrou dose-dependente, uma vez que a porcentagem de inibição variou de acordo com a concentração utilizada (Figuras 4 e 5).

Os tratamentos foram realizados com diferentes concentrações, sendo o tratamento realizado com a bacteriocina A53 (3,75 a 61,5 µg/mL) (Figura 4A e 5A), com a bacteriocina C55 (10,5 a 169 µg/mL) (Figura 4B e 5B) e o tratamento com a bacteriocina Nisina (100 a 3200 µg/mL) (Figura 4C e 5C). Para os experimentos com a cepa de *L. infantum* foi acrescentado o tratamento com a BLIS P16 nas concentrações de 1,3 a 42,5 µg/mL (Figura 5D).

A *L. amazonensis* apresentou 100% de inibição nos tratamentos com as bacteriocinas A53 e C55 e 50% de inibição com o tratamento com a Nisina. Em relação ao tratamento contra a *L. infantum*, com as bacteriocinas e a BLIS P16, foi observado uma inibição de 100%, ambas em suas maiores concentrações testadas.

Para os testes com a cepa de *L. amazonensis* o IC₅₀ das bacteriocinas foi de respectivamente: A53 - 24,78 µg/mL; C55 - 75,49 µg/mL e Nisina - 3191 µg/mL. De acordo com estes resultados a bacteriocina A53 se mostrou mais eficiente por apresentar um IC₅₀ menor, exigindo assim uma menor quantidade da substância para causar a morte do parasita.

Em relação aos testes com a cepa de *L. infantum*, os ensaios apresentaram as seguintes concentrações de IC₅₀: A53 - 12,57 µg/mL; C55 - 44,31 µg/mL, Nisina - 317,2µg/mL e P16 - 2,9 µg/mL. Através destes, foi possível se observar que a BLIS P16 se mostrou mais eficiente, necessitando de uma menor quantidade para a inibição da cepa de *L. infantum*.

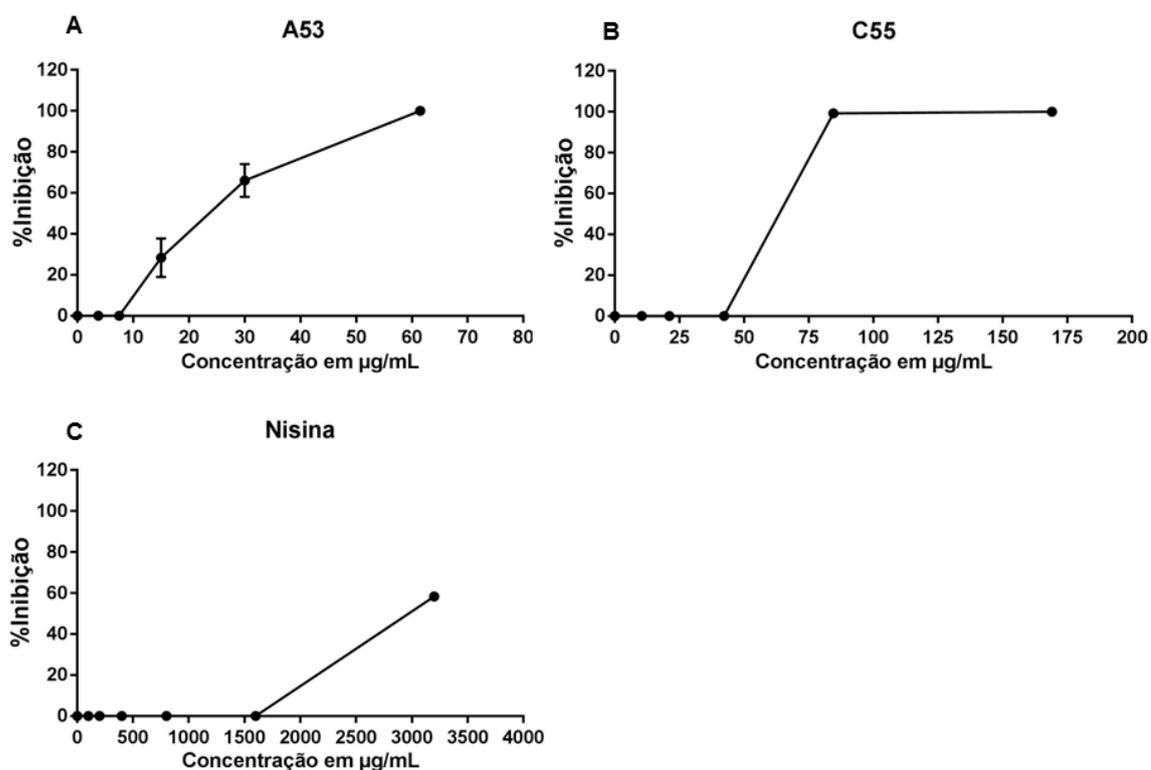


Figura 4: Avaliação da viabilidade celular de promastigotas de *L. amazonensis* frente ao tratamento com bacteriocinas. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL, tratadas com diferentes concentrações das bacteriocinas e incubadas durante 72 horas a 25°C. Foram realizados três experimentos de forma independente, em triplicatas, e expressos em média \pm SEM.

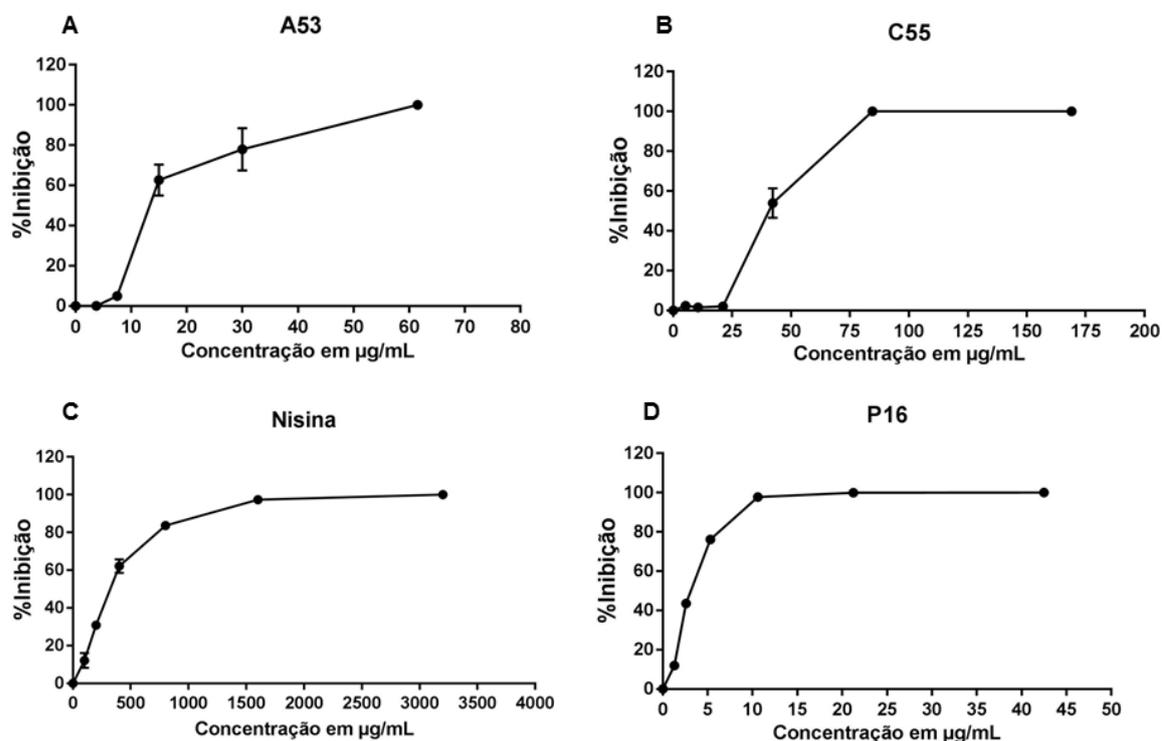


Figura 5: Avaliação da viabilidade de promastigotas de *L. infantum* tratadas com bacteriocinas e BLIS P16. Formas promastigotas de *L. infantum* foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL, tratadas com diferentes concentrações de bacteriocinas e da BLIS P16 e incubadas durante 72 horas a 25°C. Foram realizados três experimentos de forma independente, em triplicatas, e expressos em média \pm SEM.

4.2 Avaliação dos efeitos de A53 e BLIS P16 sobre a viabilidade de formas amastigotas de *L. infantum*

As formas amastigotas foram obtidas através da infecção da linhagem celular J774A.1 com promastigotas de *L. infantum* e tratadas com diferentes concentrações de A53 (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg/mL) e P16 (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg/mL).

Nos tratamentos com a BLIS P16 foi observado uma inibição em torno de 80% utilizando a concentração de 5 µg/mL. Em outras concentrações de tratamento, como 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL, também ocorreu uma inibição das formas amastigotas. O IC₅₀ da P16 para amastigota foi de 1,76 µg/mL (Figura 6B).

No que se refere ao tratamento com a bacteriocina A53, foi observado que nas concentrações consideradas não citotóxicas (resultados apresentados no item 4.3),

houve inibição das formas amastigotas, sendo a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ a mais eficiente, seguido de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1,25 $\mu\text{g/mL}$, que também apresentaram efeitos inibitórios. O IC_{50} do tratamento com a A53 foi de 2,17 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6A).

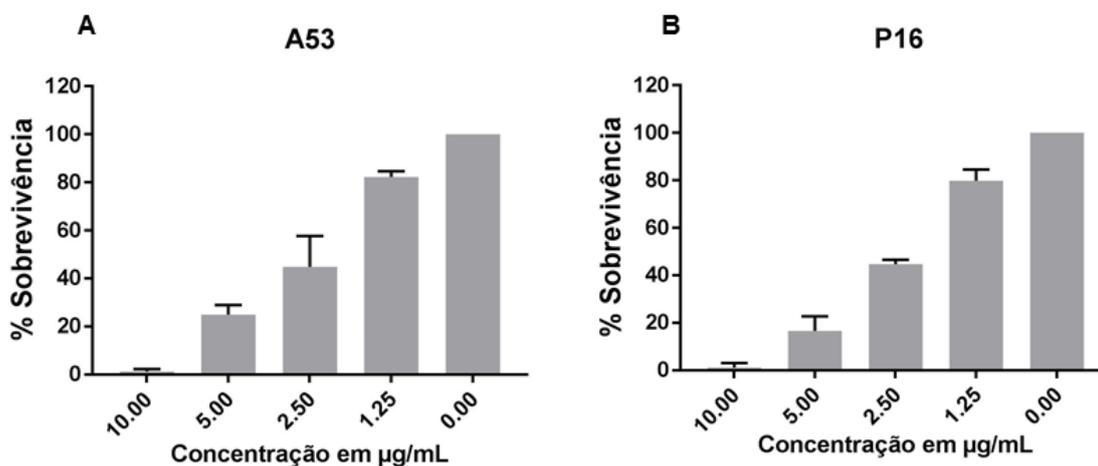


Figura 6: Teste de viabilidade de formas amastigotas de *L. infantum* frente ao tratamento com a bacteriocina A53 e BLIS P16. Macrófagos de camundongo da linhagem J774A.1 infectados com *L. infantum* na proporção de 1:10. A infecção foi estabelecida durante 24 horas, seguindo do tratamento com diferentes concentrações de P16 e A53 durante 48 horas. Os resultados foram comparados ao controle sem tratamento para que se determinasse a porcentagem de sobrevivência das formas amastigotas. Foram realizados três experimentos de forma independente, em triplicatas, e expressos em média \pm SEM.

4.3 Avaliação dos efeitos citotóxicos de A53 e BLIS P16 sobre linhagem celular de mamífero

Para o teste de citotoxicidade, macrófagos murinos da linhagem J774A.1 foram tratados com diferentes concentrações de A53 (0; 1,25; 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e P16 (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$), seguido de incubação por 72 horas.

Foi possível se identificar que a bacteriocina A53 teve seu limiar de citotoxicidade na concentração aproximada de 6 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a BLIS P16 teve seu limiar de citotoxicidade na concentração aproximada de 5 $\mu\text{g/mL}$, pois inibiram mais de 30% das células, sendo as concentrações abaixo destas consideradas como não citotóxicas. Os IC_{50} foram de 9,75 $\mu\text{g/mL}$ para a A53 e de 6,6 $\mu\text{g/mL}$ para a P16 (Figura 7).

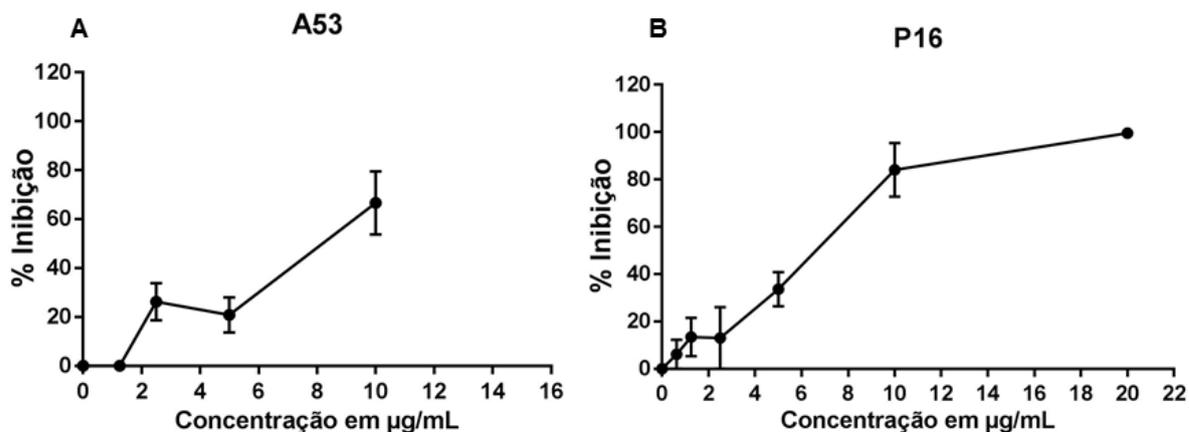


Figura 7: Avaliação sobre os efeitos citotóxicos das bacteriocinas A53 e BLIS P16 sobre macrófagos de camundongos da linhagem celular J774A.1. Macrófagos murinos na concentração de 1×10^5 foram incubadas com a bacteriocina A53 e a BLIS P16 em diferentes concentrações, durante 72 horas, para se avaliar a capacidade citotóxica das mesmas. Foram realizados três experimentos de forma independente, em triplicatas, e expressos em média \pm SEM.

4.4 Avaliação do efeito do tratamento com BLIS P16 e A53 sobre a morfologia de promastigotas de *L. infantum*

As formas promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com a bacteriocina A53 e a BLIS P16, com concentrações de acordo com o IC_{50} previamente obtido e incubadas a 25°C, por 18 horas.

Através das imagens geradas pela microscopia eletrônica de varredura foi possível se observar as alterações morfológicas causadas pelo tratamento com a bacteriocina A53 e a BLIS P16. Quando as imagens dos parasitas tratados são comparadas as do controle, é possível notar uma mudança na morfologia externa dos parasitas (Figura 8).

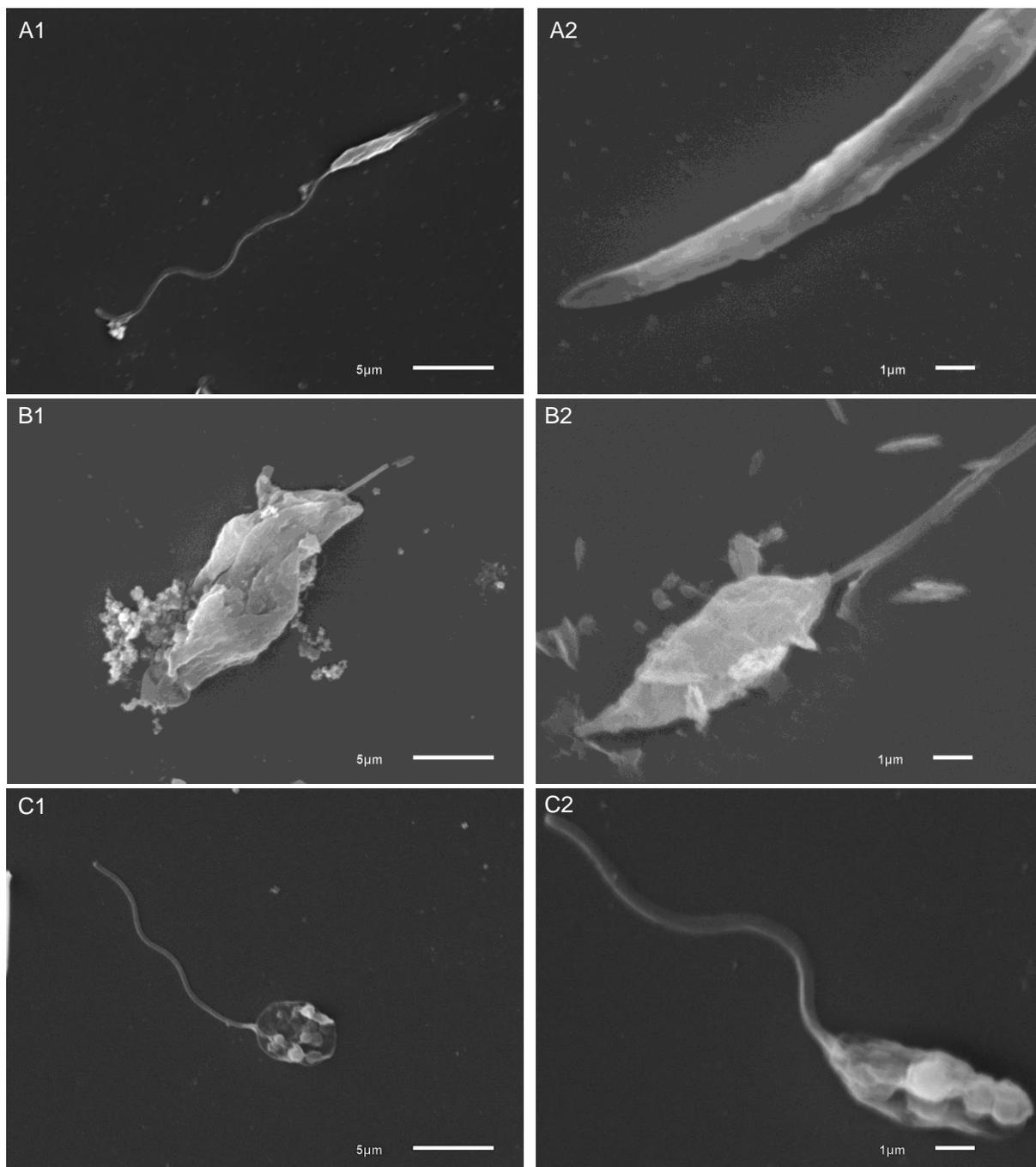


Figura 8: Avaliação morfológica de promastigotas de *L. infantum* tratadas com 10 µg/mL de P16 e A53, durante 18 horas e lidas em microscópio eletrônico de varredura. Controle não tratados (A1 e A2), parasitas tratados com P16 (B1 e B2), parasitas tratados com A53 (C1 e C2). Aumentos de 4.000x (5µm) e 10.000x (1µm).

Ao se comparar as imagens é possível notar uma diferença morfológica entre os parasitas tratados com a A53 e os tratados com a P16 quando comparados ao controle. No tratamento com a A53 houve mudanças morfológicas, porém sem ruptura da membrana celular (Figura 8 C1 e C2). No tratamento com P16 foi possível se

observar rupturas da membrana celular, assim como uma fratura do flagelo (Figura 8 B1 e B2)

4.5 Avaliação sobre a produção de óxido nítrico (NO)

Através da dosagem de produção de óxido nítrico (NO), foi verificado que os macrófagos infectados com a cepa *L. infantum* e tratadas com a bacteriocina A53 e a BLIS P16, não apresentaram alterações na produção do NO, em relação ao controle não tratado (Figura 9).

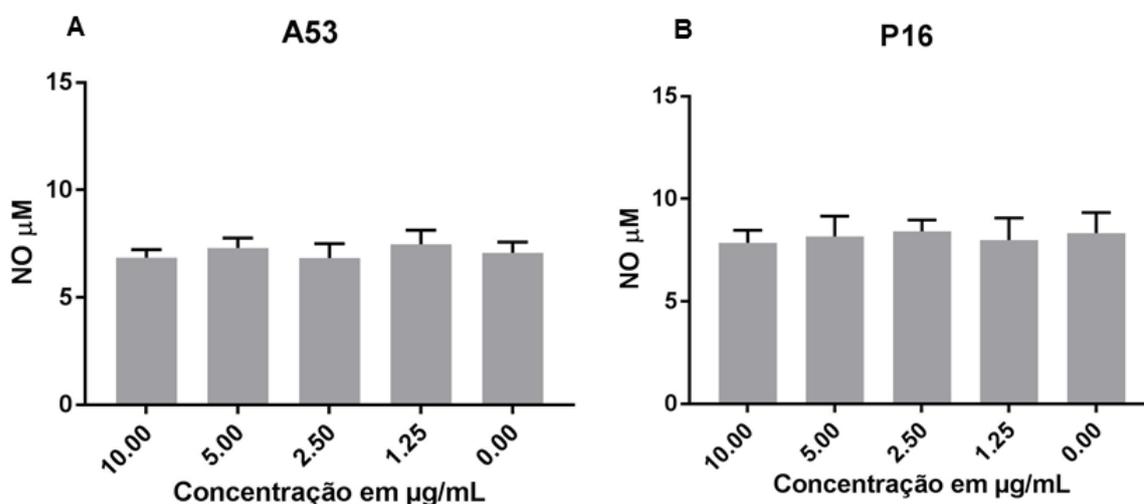


Figura 9: Influência do tratamento com A53 e BLIS P16 sobre a produção de óxido nítrico (NO) por parte de macrófagos murinos J774A.1. Macrófagos infectados com a cepa *L. infantum* na proporção de 1:10, foram incubados com diferentes concentrações de A53 e P16. A produção de NO foi avaliada no sobrenadante após 48 horas de tratamento pelo método de Griess. Como controle foi utilizado macrófagos infectados sem tratamento. Foram realizados três experimentos de forma independente, em triplicatas, e expressos em média \pm SEM.

4.6 Avaliação do estresse oxidativo em virtude do tratamento com BLIS P16

A caracterização *in vitro* dos efeitos da P16 na dinâmica do estresse oxidativo em formas promastigotas da cepa de *L. infantum*, foi realizada após diferentes tempos de exposição dos parasitas a diferentes concentrações. Os resultados da análise de

susceptibilidade *in vitro* das formas promastigotas mostraram um efeito dose-dependente da P16 sobre a indução do estresse oxidativo no parasita *L. infantum*.

Os resultados mostraram uma relação inversa e sobreposta entre o aumento de ROS e a viabilidade celular, indicando que possivelmente a morte celular do parasita ocorre por estresse oxidativo, levando a ocorrência da apoptose, bem como a fragmentação do DNA celular.

4.6.1 Avaliação do uso da BLIS P16 sobre a indução de apoptose em promastigotas de *L. infantum*

A fim de se analisar a ação de diferentes concentrações de P16 contra promastigotas de *L. infantum*, foi utilizado os marcadores Anexina-V e PI para se demonstrar os possíveis efeitos desse tratamento na ocorrência de apoptose. Para efeitos de controle positivo foi utilizado a droga Miltefosina a 16,3 µg/mL.

O principal efeito da P16 sobre a viabilidade celular foi a indução de apoptose tardia (Anexina-V+/PI+), atingindo uma porcentagem maior que 50% das células no tratamento com 20 µg/mL e 10 µg/mL. É importante considerar que, apesar de não ter sido observado uma cinética que mostrasse a progressão de células em fase inicial (Anexina-V+/PI-) de morte celular programada para a fase tardia (Anexina-V+/PI+), consideramos as células com marcação dupla (Anexina-V+/PI+) como sendo células em processo de morte celular programada em fase tardia, uma vez que os resultados dos ensaios de ciclo celular mostraram uma sobreposição entre a aparecimento de células em fase SubG1 (células com DNA fragmentado, característico de células em processo de morte celular programada) e de células Anexina-V+/PI+ (Figuras 10 e 12).

A BLIS P16 é capaz de estimular a apoptose já nas primeiras horas de tratamento, nas concentrações de 20 µg/mL e 10 µg/mL, inclusive já apresentando um resultado relevante logo na primeira hora em comparação a Miltefosina. Ao se comparar o efeito da P16 e da Miltefosina durante todo o tratamento é possível se observar que a primeira apresentou uma atuação mais rápida em relação a segunda (Figura 10).

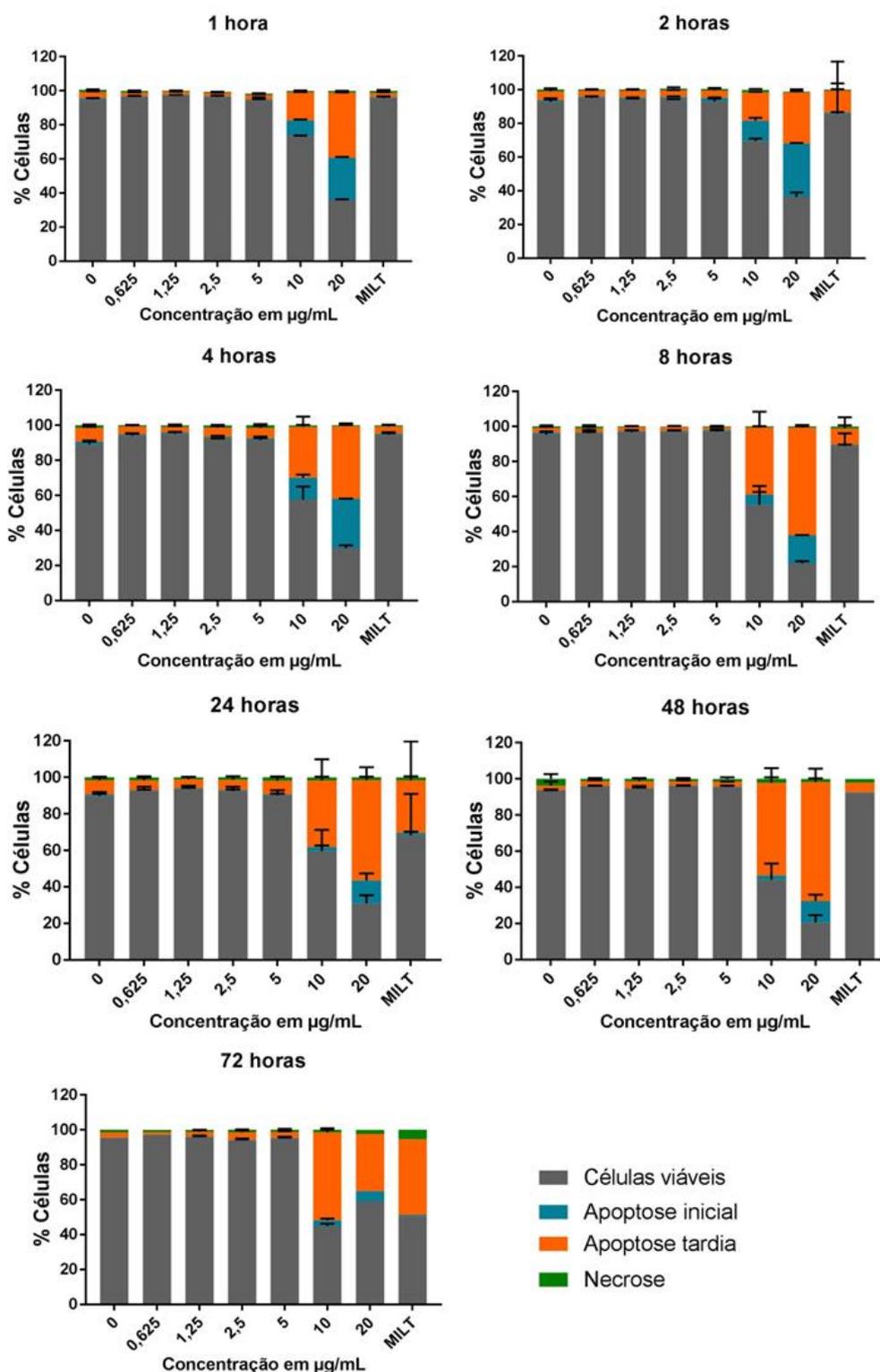


Figura 10: Influência do tratamento com BLIS P16 sobre a apoptose de promastigotas de *L. infantum*. A Anexina-V foi utilizada para detectar a exposição da fosfatidilserina, enquanto o iodeto de propídeo (PI) foi utilizado para marcar células em processo de morte celular por necrose (Anexina-V-/PI+). As células duplo negativas (Anexina-V-/PI-) representam as células viáveis dentro da população analisada. Controle positivo de Miltefosina a 16,3 µg/mL (MILT). Foram realizados três experimentos de forma independente, em triplicatas, e expressos em média ± SEM.

4.6.2 Avaliação sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em função do tratamento com a BLIS P16

A sonda H₂DCFDA foi utilizada para se avaliar a desregulação do balanço redox através da fluorescência, detectada pela formação de 2',7'-Diclorofluoresceína (DCF). Através da análise do índice médio de fluorescência (MFI) foi traçado uma correlação entre a fluorescência do DCF e a sobrevivência celular, sendo assim quanto maior o número de sobrevivência, menor era a produção de ROS.

Considerando que a presença de ROS nas células pode levar a uma perturbação a nível irreversível de restauração da homeostase, culminando com a morte celular, o presente estudo também verificou os efeitos *in vitro* da P16 no estímulo a expressão dessas moléculas sobre as formas promastigotas de *L. infantum*, cultivada na presença de diferentes concentrações de P16 (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg/mL) após diferentes tempos de exposição (1, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas). Os resultados dessa análise revelaram que a BLIS P16 apresenta um efeito tempo e dose-dependente (Figura 11).

É possível se observar que durante as primeiras horas de tratamento a P16, nas concentrações de 20 µg/mL e 10 µg/mL se mostrou mais eficiente que o controle positivo, Miltefosina a 16,3 µg/mL. Com o passar das horas a quantidade de promastigota mortas através do tratamento com Miltefosina foi aumentando. Nas horas seguintes aos maiores valores de inibição dos tratamentos (2 horas para P16 e 8 horas para miltefosina) houve uma redução na detecção de ROS, em virtude do fato de que grande parte da cultura já estava morta.

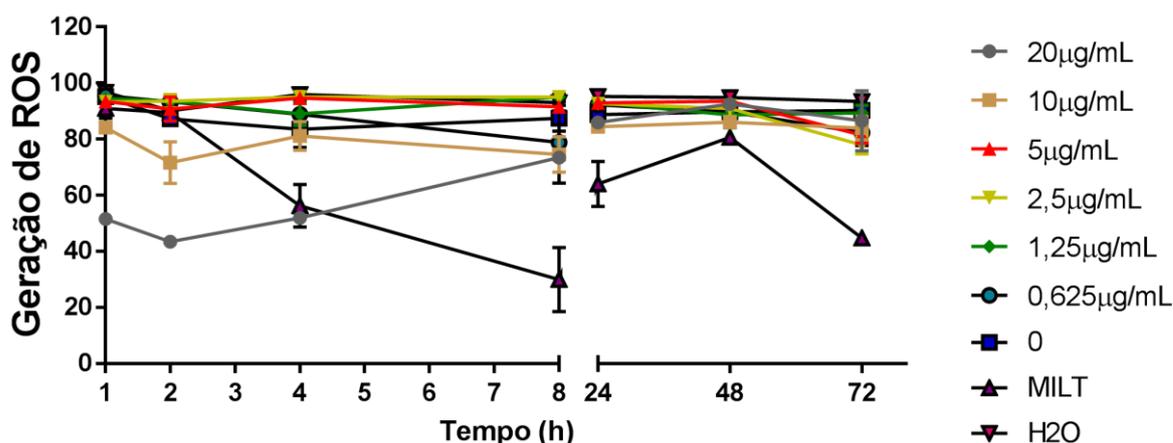


Figura 11: Detecção da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) por promastigotas de *L. infantum* tratadas com a BLIS P16. Porcentagem de produção de ROS de promastigotas de *L. infantum* calculados através da fluorescência do DCF. O controle positivo foi utilizado a Miltefosina a 16,3 µg/mL (MILT) e as diferentes concentrações de P16 foram tratadas durante variadas horas. Foram realizados três experimentos de forma independente, em triplicatas, e expressos em média ± SEM.

4.6.3 Avaliação da influência do tratamento com a BLIS P16 sobre a progressão do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum*

Tendo em vista que o processo de morte celular programada é acompanhado por fragmentação do DNA, o presente estudo analisou esse fenômeno por meio da detecção de células em fase SubG1 do ciclo celular. A caracterização *in vitro* dos efeitos da BLIS P16 na progressão do ciclo celular foram realizadas sobre as formas promastigotas da cepa de *L. infantum*, cultivadas na presença de diferentes concentrações (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg/mL) após diferentes tempos de exposição (3, 6, 24, 48 e 72 horas).

Os resultados mostraram que a P16 apresenta um efeito tempo e dose-dependente na progressão do ciclo celular em formas promastigotas do parasita *L. infantum*. Foi observado um aumento no número de células na fase SubG1, com redução no número de células na fase G0-G1 com a evolução do tratamento nas concentrações de 10 e 20 µg/mL de P16 (Figura 12).

Em uma comparação entre os efeitos do tratamento com Miltefosina e a BLIS P16, foi possível se observar que a última possui um tempo de ação mais rápido, acometendo cerca de 50% das células já nas primeiras 6 horas de tratamento, enquanto na

primeira esse efeito ocorre por volta das 24 horas. Novamente as concentrações de 20 µg/mL e 10 µg/mL foram as mais efetivas (Figura 12).

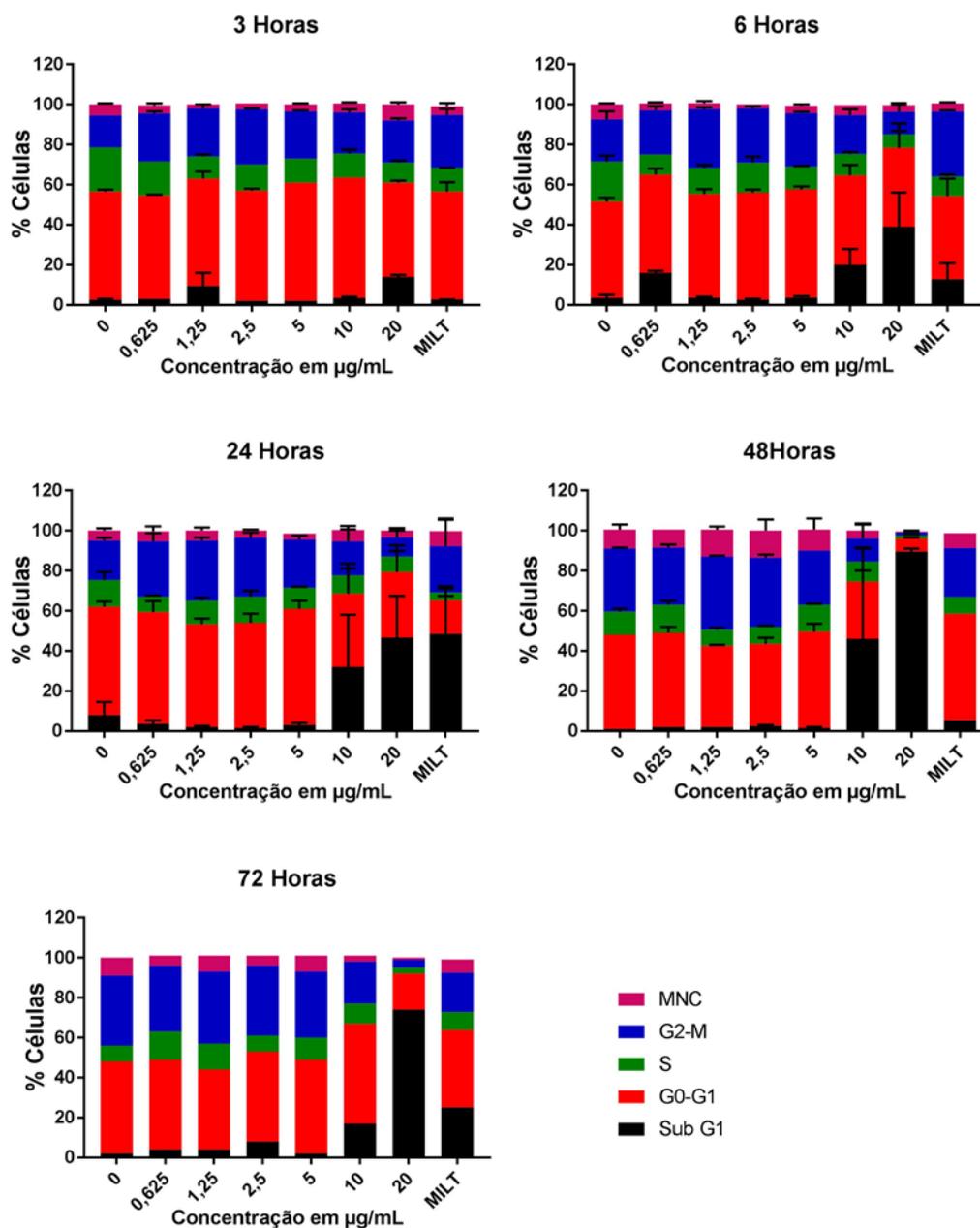


Figura 12: Influencia do tratamento com P16 sobre a progressão do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum*. A análise do ciclo celular foi realizada após marcação do DNA com iodeto de propídeo. SubG1: células que apresentam DNA fragmentado; G0-G1, células com conteúdo de DNA 2n, em fase de preparação para a síntese de DNA; S: células em fase de síntese de DNA; G2-M: células com DNA duplicado e em fase de mitose (M); MNC: células multinucleadas. Controle positivo de Miltefosina a 16,3 µg/mL (MILT). Foram realizados três experimentos de forma independente, em triplicatas, e expressos em média ± SEM.

5 DISCUSSÃO

Pesquisas que visam o desenvolvimento de novos tratamentos contra as leishmanioses a partir de produtos naturais e biomoléculas são comuns, demonstrando assim um interesse e expectativa nessa área como uma possível fonte de desenvolvimento de um novo fármaco (TIUMAN et al., 2011). Dentro do contexto do desenvolvimento das pesquisas com biomoléculas, se encontram as bacteriocinas, que apresentam efeitos contra diferentes espécies bacterianas, muito bem descrita na literatura científica, tornando estas uma fonte viável de pesquisas em novos campos (NISHIE; NAGAO; SONOMOTO, 2012).

O número de pesquisas relativas a utilização das bacteriocinas como agente antiprotozoários é inferior a aquelas testadas contra células eucarióticas, como fungos ou células tumorais. Entretanto, já existem descritos, ao menos dois trabalhos, mostrando a atividade de bacteriocinas contra protozoários, como *L. donovani* e *Giardia lamblia* (ABENGÓZAR et al., 2017; AMER; MOSSALLAM; MAHROUS, 2014). Desta forma, o presente trabalho avaliou o uso, *in vitro*, de diferentes tipos de bacteriocinas contra cepas de *L. infantum* e *L. amazonensis*.

O mecanismo de ação é específico para cada tipo de bacteriocina, mas no geral a principal forma de ação é através da alteração da permeabilidade celular, bem como a inibição da síntese do DNA, RNA e outras biomoléculas (CHAVAN et al., 2005; MONTVILLE; WINKOWSKI ; LUDESCHER, 1995).

O estudo de Do Nascimento et al., (2015), utilizou um peptídeo chamado de PvD1, extraído da espécie de planta *Phaseolus vulgaris*, para testar seu efeito anti-leishmania *in vitro* contra *L. amazonensis*. Esse peptídeo apresentou níveis relevantes de inibição na concentração de 300µg/mL. Outro peptídeo testado contra *L. amazonensis* foi o Vu-Defr, extraído a partir de sementes de *Vigna unguiculata*, este obteve atividade inibitória, em torno de 50%, na concentração de 100 µg/mL (SOUZA et al., 2013). Analisando os resultados da inibição de viabilidade das promastigotas de *L. amazonensis* do presente trabalho e comparando com outros peptídeos, é possível observar que, as bacteriocinas testadas apresentaram um melhor desempenho, uma vez que seus IC₅₀ são de: A53 com 24,78 µg/mL e C55 com 75,49 µg/mL. Somente a Nisina se apresentou menos eficiente, com 3191 µg/mL.

O trabalho de Savoia et al., (2006) testou a atividade anti-leishmania de um decapeptídeo (KP) sintetizado em laboratório, contra promastigotas de *L. infantum* e obteve um IC₅₀ para a inibição de promastigotas na faixa de 72 µg/mL. O presente trabalho, obteve resultados mais eficientes, obtendo IC₅₀ inferiores (BLIS P16 2,9 µg/mL, A53 12,57 µg/mL, C55 44,31 µg/mL), exceto para Nisina, que apresentou um IC₅₀ de 317,2 µg/mL. Zampa et al., (2009) avaliaram atividade anti-leishmania do peptídeo DS 01, obtido através das secreções de pelo da espécie de anfíbio *Phyllomedusa hypochondrialis*, contra promastigotas de *L. infantum*. Este teve sua média de atividade inibitória em 21.7µg/mL, durante o maior tempo de incubação, apresentando assim, um resultado menos eficiente que os dois principais peptídeos antimicrobianos testados, a bacteriocina A53 e a BLIS P16. Diante do exposto, é possível se observar que as bacteriocinas do presente trabalho, apresentaram maior eficiência no tratamento *in vitro* contra as promastigotas de *L. infantum*, uma vez que a maioria dos seus IC₅₀ foram menores.

O antibiótico azitromicina foi testado contra cepas de *L. Amazonensis* e *L. Infantum* com o intuito de avaliar sua atividade anti-leishmania, e foi obtido um IC₅₀ de 789,3 µg/mL e 1201 µg/mL respectivamente (DE OLIVEIRA-SILVA; DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO, 2008). Em uma comparação com os efeitos anti-leishmania das bacteriocinas testadas no presente trabalho, é possível se observar que os números de IC₅₀ obtidos se mostraram menores e mais eficientes em comparação aos obtidos em experimentos com um medicamento já disponível de forma comercial e com seus efeitos já bem estabelecidos, corroborando assim, com a possibilidade de que o investimento na pesquisa de novas substâncias seja mais eficiente que a utilização de medicamentos já existentes (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

As bacteriocinas testadas no presente trabalho apresentaram atividade distinta entre elas e entre o tipo de espécie de *Leishmania* sp., apresentando também atividade inibitória diferenciada contra formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* bem como contra forma amastigota de *L. infantum*.

Uma vez que os tratamentos com as bacteriocinas se mostraram mais promissores na cepa de *L. infantum*, a mesma foi escolhida para dar continuidade nos ensaios. Além disso, também foi levado em consideração o potencial de tratamento

apresentado pelas bacteriocinas, sendo observado que a A53 e a BLIS P16 se mostraram mais eficientes em relação as outras.

A bacteriocina A53 e a BLIS P16 já tem demonstrado apresentar um amplo espectro de ação inibindo vários micro-organismos, como: *B. coagulans*, micro-organismos deteriorantes de alimento com *Enterococcus* spp. e *Listeria monocytogenes*, assim como micro-organismos de importância clínica como *Staphylococcus* spp., incluindo estirpes multirresistentes a drogas e as responsáveis por causar a mastite bovina (FAGUNDES et al., 2016; SANTOS, 2016; VARELLA COELHO et al., 2007).

Na continuidade dos experimentos, foi avaliado o potencial das bacteriocinas (A53 e BLIS P16) contra a forma amastigota de *L. infantum*, para isso foram utilizadas doses baseadas nos testes com promastigotas. Apesar de se levar em consideração as doses dos primeiros testes, com a forma promastigota, não era esperado que as porcentagens de inibição fossem parecidas, uma vez que as duas formas apresentam uma diferença de composição da membrana celular externa, o que leva a uma forma de ação diferente por parte das bacteriocinas (GUIMARAES-COSTA et al., 2009).

A viabilidade de amastigota de *L. infantum* frente ao tratamento com novas substâncias também foi avaliada por outros autores. Rondon et al., (2011) avaliaram a capacidade de extratos vegetais extraídos de *Coriandrum sativum*, *Aloe vera* e *Ricinus communis* obtiveram IC₅₀ de 27,3; 1,03 e 17,28 µg/mL, respectivamente. Na pesquisa de Barros et al., (2015) isolaram o peptídeo PLA₂ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e o testou contra amastigotas de *L. infantum*, obtendo uma inibição de 50% na concentração em torno de 16.98 µg/mL. Em comparação com os IC₅₀ do presente trabalho (A53 - 2,17 µg/mL e P16 - 1,76 µg/mL) as substâncias testadas pelos trabalhos citados anteriormente apresentaram menor eficiência (com exceção da *Aloe vera*), podendo chegar a necessitar de uma concentração 10 vezes maior para inibir 50% das amastigotas.

Os IC₅₀ obtidos através do tratamento da A53 e BLIS P16 contra amastigotas de *L. infantum*, se mostraram menor em comparação com a sua forma promastigota. Esse resultado se mostrou oposto ao que é comumente visto em trabalhos que avaliam a viabilidade das duas formas (ESTEVEZ et al., 2007; PEREIRA et al., 2010; VALADARES et al., 2011). Uma hipótese para esse fato, se dá em relação a forma como ocorre a atração e a ligação das bacteriocinas com seu alvo, uma vez que estas são atraídas por proteínas específicas (MONTVILLE; WINKOWSKI; LUDESCHER,

1995) e diferenças entre a estrutura proteica externa entre promastigota e amastigota são conhecidas (LEPROHON et al., 2006).

Para uma substância ser considerada com potencial de tratamento, a mesma deve possuir a capacidade de ação focada no alvo específico e apresentar pouco, ou nenhum, efeito citotóxico significativo para as células do organismo que está em tratamento (ISO/EN10993-5, 2009). Para se avaliar o potencial citotóxico das bacteriocinas, foi utilizada a linhagem celular de macrófagos de camundongo, J774A.1. Esta linhagem foi escolhida, pois é através de macrófagos, a principal forma de interação celular de *Leishmania* sp. no organismo de indivíduos infectados, sendo inclusive utilizadas para a multiplicação dos parasitas (SILVERMAN et al., 2010).

Foi avaliado o potencial citotóxico das bacteriocinas A53 e BLIS P16, pois, ambas apresentaram melhores resultados *in vitro* contra os promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Através dos experimentos foi possível se observar que, em doses mais altas, as bacteriocinas apresentavam um elevado potencial de citotoxicidade, causando a morte de mais de 30% das células de J774A.1, fazendo assim essas doses inviáveis para tratamentos, porém em doses menores as mesmas mostraram baixos efeitos citotóxicos. A BLIS P16 apresentou melhores resultados, pois seu IC₅₀ foi menor que o da A53.

Fagundes et al., (2016) testaram a atividade citotóxica da bacteriocina A53, contra linhagem celular de fibroblasto murino L-929 e contra células Vero de rins de macaco-verde africano. Foi observado que a mesma não apresentava atividade citotóxica, mantendo inclusive a morfologia celular externa intacta. Também foi avaliada a atividade hemolítica da A53 sobre eritrócitos de carneiro, a qual não houve ação, mantendo estas células intactas ao tratamento.

A BLIS P16 não apresentou atividade hemolítica contra hemácias de carneiro, porém se mostrou citotóxica contra as linhagens celulares de macrófagos murinos Raw e contra fibroblasto murino L-929, quando testadas em maiores concentrações (SANTOS, 2016). Esse fator também foi observado no presente trabalho, uma vez que a P16 se mostrou citotóxicas em altas concentrações.

Outros trabalhos que visavam testar novos compostos com atividade anti-leishmania também realizaram testes de citotoxicidade contra os macrófagos murinos J774A.1. No trabalho de Ghosal et al., (2012), foram testados a atividade anti-leishmania de

compostos alcaloides extraídos de frutos da espécie *Piper longum*. As médias do IC₅₀ dos testes citotóxicos ficaram em torno de 5 µg/mL. Em outro trabalho, Ramadani et al., (2017) testaram os efeitos anti-leishmania de três extratos, um de *Tithonia diversifolia* e dois de *Plinia cauliflora* (sendo um isolado com a utilização de diclorometano e o outro com metanol) e apresentaram IC₅₀ de citotoxicidade nos valores de 3,3 µg/mL, 5,8 µg/mL e 12,4 µg/mL, respectivamente. Ambos autores consideram que suas substâncias apresentavam baixo potencial de citotoxicidade, uma vez que os resultados do presente trabalho obtiveram índices de inibição parecidos, os mesmos podem ser considerados pouco citotóxicos.

Durante os testes com a BLIS P16 e a bacteriocina A53, foi possível se observar que as mesmas possuíam uma ação sobre a morfologia externa celular da *Leishmania*, o que já era esperado, uma vez que a literatura científica já descreveu a capacidade de interação de bacteriocinas e membranas (CLEVELAND et al., 2001). Para a confirmação do observado, foi realizado a microscopia eletrônica de varredura, visando se avaliar a integridade externa da membrana celular de *L. infantum*.

Durante a visualização por microscópio óptico, foi observado que a medida em que as promastigotas de *L. infantum* ficavam expostas a um maior tempo com o tratamento das bacteriocinas, era possível se notar uma maior degradação das mesmas, sendo inclusive observado a presença de restos celulares já após 24 horas de tratamentos. Baseado nas observações anteriores, foi escolhido o tempo de 18 horas como o ideal para se avaliar a membrana em diferentes estágios. O tratamento por 18 horas permitiu observar fases intermediárias da ação das bacteriocinas sobre a morfologia externa das promastigotas de *L. infantum*, sendo assim utilizado como padrão para o tratamento das amostras analisadas através de microscopia eletrônica de varredura.

Analisando os resultados de microscopia eletrônica é possível se notar que a bacteriocina A53 e a BLIS P16 apresentaram afinidade com a membrana da *L. infantum*, causando uma mudança na morfologia externa do parasita, porém é válido ressaltar que as formas de ação das mesmas apresentam algumas diferenças básicas, como o fato de a BLIS P16 ser capaz de causar uma maior alteração morfológica da membrana, assim como uma interação com o flagelo, sendo possível se observar cortes e fragmentações ao longo do mesmo. Já a A53, apesar de ter causado relevantes mudanças na forma externas das promastigotas, não causou alterações na membrana celular, nem no flagelo, porém isso não quer dizer que a

mesma não possui essas capacidades, uma vez que a análise com tempos maiores de tratamento poderiam demonstrar maiores degradações. Como a A53 e a P16 apresentam composições de aminoácidos diferentes entre si, é normal e esperado que sua ação contra as promastigotas de *L. infantum* não ocorra da mesma forma, pois a ordem e a quantidade dos aminoácidos irá influenciar diretamente na força de ligação entre as mesmas e o alvo tratado, como já foi mencionado em outros trabalhos com bacteriocinas (HÉCHARD; SAHL, 2002; SABLON; CONTRERAS; VANDAMME, 2000; VENEMA et al., 1993).

A ação da viabilidade das bacteriocinas e da BLIS sobre as formas promastigota (*L. infantum* e *L. amazonensis*) e amastigota (*L. infantum*) ao longo do trabalho, pode ser explicada pelo fato de que esta ação está diretamente ligada à composição proteica da membrana citoplasmática, causando assim a ruptura da mesma, bem como a inibição da biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos, sendo assim, a diferença entre os tipos de proteínas expressas e a quantitativa destas proteínas, poderiam influenciar na capacidade de interação das bacteriocinas com a célula estudada (SABLON; CONTRERAS; VANDAMME, 2000).

Algumas drogas utilizadas contra parasitas, possuem entre seus principais efeitos o estímulo do aumento da produção de ROS. Esse aumento pode ocorrer nas células de defesa do sistema imune do hospedeiro infectado, auxiliando assim um aumento nos efeitos da resposta do sistema imune, bem como no próprio parasita, que irá sofrer danos em suas biomoléculas, podendo levar assim a ocorrência de apoptose (CARVALHO et al., 2011; MOUGEOT et al., 2010).

Durante a ocorrência de infecções os macrófagos aumentam a produção de óxido nítrico (NO), como uma forma de defesa, podendo ocasionar a morte dos parasitas através da indução da apoptose ou da fragmentação do DNA (GRISHIN et al., 2016). O presente trabalho demonstrou que tanto o tratamento com a A53 quanto a P16 não tiveram influência positiva ou negativa sobre a produção de NO. Quando o tratamento com uma substância atua de forma direta sobre os macrófagos, ocorre a produção do NO (REYES-FARIAS et al., 2015), sendo assim é possível que o tratamento com a A53 e P16 não atuem sobre o macrófago, e sim sobre o parasita.

O conceito de estresse oxidativo pode ser determinado como um excesso na formação de moléculas reativas, por alguma célula. Entre as principais moléculas responsáveis pelo estresse oxidativo, se encontra as espécies reativas de oxigênio

(ROS) (BIRBEN et al., 2012). Quando as moléculas de ROS estão nas normalidades de suas funções, elas são capazes de desempenhar papéis importantes na sinalização responsável pela proliferação, diferenciação e morte celular. Porém, quando sua produção se encontra desregulada, apresentando um excesso de ROS, a mesma pode causar severos danos celulares, como oxidação proteica e lipídica; danos ao DNA e apoptose, para as células que apresentam esse excesso (KRYSTON et al., 2011; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Pelos resultados apresentados foi possível se observar que a BLIS P16 possui a capacidade de estimular um aumento da produção de ROS nos promastigotas de *L. infantum*. Esse aumento, logo nas primeiras horas de tratamento, leva a danos nas biomoléculas formadoras da membrana celular do parasita, resultado este que pode ser comprovado pela comparação com os testes de apoptose, o qual apresentou elevados níveis durante os períodos de tratamento, ocasionando a morte do parasita. Outro provável efeito causado pelo aumento de ROS proporcionado pelo tratamento com a BLIS P16 é o dano ao DNA do parasita, que ocorre através da fragmentação da molécula de DNA, levando conseqüentemente a uma interrupção na progressão do ciclo celular. Este dado por ser confirmado através da análise dos resultados do teste de progressão do ciclo celular, onde é possível se observar que certas doses do tratamento aumentaram a quantidade de células na fase Sub-G1, indicando assim que houve uma inibição da proliferação do ciclo celular, causando a morte dos parasitas.

Outros trabalhos já demonstraram a capacidade das bacteriocinas de causar estresse oxidativo em células tratadas com as mesmas. O trabalho de Li et al., (2013), que demonstrou a capacidade da bacteriocina Lacticina Q de estimular a superprodução de diversas moléculas de ROS em testes contra *Lactobacillus lactis* e *Pediococcus pentosaceus*. Sharma; Srivasta (2014) demonstraram que a bacteriocina PlnJ é capaz de induzir apoptose contra *Candida albicans* através do acúmulo em excesso de ROS. Vizán et al., (1991) demonstraram em seu trabalho que a bacteriocina microcina B17 possui a capacidade de interagir e quebrar a molécula de DNA de *Escherichia coli*. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos pelo presente trabalho.

Através da análise combinada dos resultados dos testes de estresse oxidativo é possível se observar que a BLIS P16 estimulou a produção de ROS em níveis comparados a droga controle, miltefosina, a qual o estímulo à produção de ROS já foi relatado em diversos trabalhos na literatura científica, sendo essa característica uma

das principais para seu sucesso e emprego no tratamento da leishmaniose, principalmente em locais onde se há uma grande ocorrência de resistência aos tratamentos mais convencionais, por parte dos parasitas (PARIS et al., 2004).

A atividade de bacteriocinas contra *Leishmania* sp. também foi avaliada por Abengózar et al., (2017), assim como o presente estudo. Foi demonstrada a ação da bacteriocina AS-48, isolada a partir de culturas de *Enterococcus faecalis*. Ela possui atividade anti-leishmania contra cepas de *L. donovani* e *L. pifanoi*. Comparando com os resultados deste trabalho, é possível observar que ambas as bacteriocinas utilizadas nos tratamentos apresentaram menores IC₅₀ que outros peptídeos e extratos vegetais testados em outros experimentos. Outro ponto em comum diz respeito a forma de ação contra as formas amastigotas, já que a As-48 também apresenta uma ação direta na amastigota, mantendo o macrófago preservado. Também foi observado nos dois trabalhos que as bacteriocinas são capazes de estimular uma superprodução de ROS, o que pode ser um dos motivos que levam a apoptose.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com as bacteriocinas é capaz de induzir uma atividade anti-leishmania em formas promastigota de *L. infantum* e *L. amazonensis*, bem como nas formas amastigotas de *L. infantum*. Com exceção da Nisina as bacteriocinas apresentaram um IC₅₀ baixo contra as formas promastigotas das duas cepas de *Leishmania* testadas, assim como contra a forma amastigota de *L. infantum*. A bacteriocina A53 e a BLIS P16 se mostraram mais eficientes durante os tratamentos, sendo que suas concentrações efetivas foram consideradas como não citotóxicas. Pela análise da microscopia eletrônica foi possível se observar A53 e P16 possuíam capacidade de interação com a membrana celular de promastigotas de *L. infantum*. O tratamento com P16 contra promastigotas de *L. infantum* foi capaz de induzir o estresse oxidativo ocasionando efeitos como a superprodução de espécies reativas de oxigênio, apoptose e fragmentação do DNA. Através dos resultados foi possível se observar que as bacteriocinas se apresentam como uma substância candidata a ser utilizada no tratamento das leishmanioses, uma vez que as mesmas são eficientes em baixas concentrações e possuem baixo efeito citotóxico.

7 REFERÊNCIAS

(CDC), C. FOR D. C. AND P. **Parasites - Leishmaniasis.**

ABENGÓZAR, M. Á. et al. Enterocin AS-48 as Evidence for the Use of Bacteriocins as New Leishmanicidal Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02288-16, abr. 2017.

ALCOLEA, P. J. et al. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1497–1516, nov. 2010.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497–506, jun. 2011.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, maio 2012.

AMER, E. I.; MOSSALLAM, S. F.; MAHROUS, H. Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. **Experimental Parasitology**, v. 146, p. 52–63, nov. 2014.

ANDERSEN, E. M. et al. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 2, p. 133–7, fev. 2005.

ANDRADE, M. A. et al. Essential oils: In vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016.

ANTONIADOU, A.; DUPONT, B. Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 15, n. 4, p. 230–238, dez. 2005.

ANTONIO, L. DE F. et al. MONTENEGRO SKIN TEST AND AGE OF SKIN LESION AS PREDICTORS OF TREATMENT FAILURE IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 375–380, set. 2014.

APONTE, J. C. et al. In vitro and in vivo anti-*Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p. 100–103, 2009.

ARMSTRONG, B. D. et al. Identification of a two- component Class IIb bacteriocin in *Streptococcus pyogenes* by expression technology. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. 36233, p. 1–13, 2016.

ARTHUR, T. D.; CAVERA, V. L.; CHIKINDAS, M. L. On bacteriocin delivery systems and potential applications. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 235–248, fev. 2014.

AUNPAD, R.; NA-BANGCHANG, K. Pumilicin 4, A Novel Bacteriocin with Anti-MRSA and Anti-VRE Activity Produced by Newly Isolated Bacteria *Bacillus pumilus* Strain WAPB4. **Current Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 308–313, out. 2007.

BAILEY, H.; BISHOP, W. J. Leishman-Donovan bodies and donovaniasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951. **The British journal of venereal diseases**, v. 35, n. 1, p. 8–9, mar. 1959.

BAINDARA, P. et al. Anticancer properties of a defensin like class IId bacteriocin Laterosporulin10. **Scientific Reports**, v. 7, p. 46541, abr. 2017.

BARBOSA, J.; CAETANO, T.; MENDO, S. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 11, p. 2850–2866, nov. 2015.

BARRATT, G.; LEGRAND, P. Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 527–530, dez. 2005.

BARROS, G. A. C. et al. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2015.

BASANO, S. DE 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, set. 2004.

BENMECHERNENE, Z. et al. Recent Patents on Bacteriocins: Food and Biomedical Applications. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences**, v. 7, n. 1, p. 66–73, fev. 2013.

BHATT, J. K.; THOMAS, S.; NANJAN, M. J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition Research**, v. 32, n. 7, p. 537–541, 2012.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

BOECK, P. et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1538–1545, 2006.

BOSQUIROLI, L. S. S. et al. In vitro anti-leishmania infantum activity of essential oil from *piper angustifolium*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, p. 124–128, 2015.

BRADLEY, A. J. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116–128, set. 2002.

BRASIL. **Leishmania Visceral: Recomendações clínicas para redução da**

letalidade. 1ª edição ed. Brasília/DF: [s.n.].

BRASIL, M. DA S. **Guia de vigilância em saúde.** Volume uni ed. Brasília-DF: 2014, 2014a.

BRASIL, M. DA S. **Situação Epidemiológica - Dados.** 2014b.

BRAY, P. G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232–239, maio 2003.

CARLSEN, E. D. et al. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 182, n. 2, p. 109–118, nov. 2015.

CARVALHO, L. et al. The 8-Aminoquinoline Analogue Sitamaquine Causes Oxidative Stress in *Leishmania donovani* Promastigotes by Targeting Succinate Dehydrogenase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4204–4210, set. 2011.

CASCALES, E. et al. Colicin Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 1, p. 158–229, 2007.

CAVERA, V. L. et al. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 5, p. 494–501, nov. 2015.

CHAN, M. M. Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 99–104, 2002.

CHANIOTIS, B.; TSELENTIS, Y. **Leishmaniasis, Sandfly fever, and Phlebotomine sandflies in Greece: An Annotated Bibliography**Who, 1994.

CHOLEWIŃSKI, M.; DERDA, M.; HADAŚ, E. Parasitic diseases in humans transmitted by vectors Review articles Parasitic diseases in humans transmitted by vectors. v. 61, n. October, p. 137–157, 2015.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1–20, 2001.

COELHO, A. C. et al. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 98–102, 2008.

COSTA, C. H. N. et al. Risk Profiles for *Leishmania infantum* Infection in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1276–1281, jun. 2016.

COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil: a evolução de uma epidemia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 2, p. 321–324, jun. 1995.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to

antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95–105, dez. 2012.

CROFT, S.; BARRETT, M.; URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, nov. 2005.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, nov. 2009.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1058–1071, set. 2006.

DELVES-BROUGHTON, J. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 193–202, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, set. 2004.

DINESH, N. et al. Exploring *Leishmania donovani* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) as a potential drug target by biochemical, biophysical and inhibition studies. **Microbial Pathogenesis**, v. 66, p. 14–23, 2014.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, nov. 2012.

EGAN, K. et al. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. April, abr. 2016.

ENNES-VIDAL, V. et al. Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to search for new therapeutic options to treat leishmaniasis? **Parasitology**, v. 144, n. 2, p. 117–123, 2017.

ESTEVEZ, Y. et al. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 254–259, 2007.

FAGUNDES, P. C. et al. The antimicrobial peptide aureocin A53 as an alternative agent for biopreservation of dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 435–444, 2016.

FERREIRA, C. et al. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: in vitro effect of its association with Amphotericin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6197–6208, 2014.

FERRER, J. L. et al. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 8, p. 775–784, 1999.

GAZANION, É. et al. Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences, v. 113, n. 21, p. 3012–3021, 2016.

GHOSAL, S. et al. Leishmanicidal compounds from the fruits of *Piper longum*. **Planta Medica**, v. 78, n. 9, p. 906–908, 2012.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, jan. 2003.

GOODWIN, L. G.; PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochemical Journal**, v. 37, p. 198–209, 1943.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, set. 2003.

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

GOURBAL, B. et al. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31010–31017, 2004.

GRIEWANK, K. et al. Miltefosine Efficiently Eliminates *Leishmania major* Amastigotes from Infected Murine Dendritic Cells without Altering Their Immune Functions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 652–659, fev. 2010.

GRISHIN, A. et al. Roles of nitric oxide and intestinal microbiota in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 51, n. 1, p. 13–17, 2016.

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

HAMMI, I. et al. Maltaricin CPN, a new class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CPN isolated from mold ripened cheese. **J Appl Microbiol.**, v. 121, n. 5, p. 1268–1274, 2016.

HANTSON, P. et al. Antimony Excretion in a Patient with Renal Impairment During Meglumine Antimoniate Therapy. **Pharmacotherapy**, v. 20, n. 9, p. 1141–1143, set. 2000.

HATHAWAY, H. et al. Thermally triggered release of the bacteriophage endolysin CHAPK and the bacteriocin lysostaphin for the control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Controlled Release**, v. 245, p. 108–115, jan. 2017.

HÉCHARD, Y.; SAHL, H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, v. 84, n. 5–6, p. 545–557, 2002.

HEFNAWY, A. et al. Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 162–174, 2017.

HENDRICKX, S. et al. Evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis: the challenges. **Parasitology**, n. Mil, p. 1–11, nov. 2016.

IMAMURA, H. et al. Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **eLife**, v. 5, p. 1–39, mar. 2016.

ISO/EN10993-5. B. **International Standard ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods**, v. 3 Ed, p. 42, 2009.

JANG, M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218–220, 1997.

JUNAID, J. M. et al. Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. **International Journal of Modern Plant & Animal Sciences International Journal of Modern Plant & Animal Sciences Journal homepage: www.ModernScientificPress.com/Journals/IJPlant.aspx Int. J. Modern Plant & Anim. Sci**, v. 1, n. 12, p. 39–57, 2013.

KAFETZIS, D. A. et al. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 1, p. 26–30, jan. 2005.

KAMBLE, V. A.; PATIL, S. D. Spice-derived essential oils: Effective antifungal and possible therapeutic agents. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 14, n. 3–4, p. 129–143, 2008.

KANDPAL, M. et al. Correlation between inhibition of growth and arginine transport of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro by diamidines. **Life Sciences**, v. 59, n. 7, p. 175–180, 1996.

KARPIŃSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Characteristic of bacteriocines and their application. **Polish journal of microbiology**, v. 62, n. 3, p. 223–35, 2013.

KAUR, S.; KAUR, S. Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. NOV, p. 1–11, nov. 2015.

KEDZIERSKI, L. et al. In vitro antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. **Parasitology Research**, v. 102, n. 1, p. 91–97, 2007.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, jul. 2015.

KIM, J.-G. et al. Bases of biocontrol: Sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan Horse antibiotic that controls crown gall. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 23, p. 8846–8851, jun. 2006.

KRYSTON, T. B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1–2, p. 193–201, jun. 2011.

KWEIDER, M. et al. Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. **Parasite Immunology**, v. 11, n. 3, p. 197–209, 1989.

LEPROHON, P. et al. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1713–1725, 2006.

LEPROHON, P.; LÉGARÉ, D.; OUELLETTE, M. Intracellular localization of the ABCC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2646–2649, 2009.

LI, M. et al. Lethal hydroxyl radical accumulation by a lactococcal bacteriocin, lacticin q. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3897–3902, 2013.

MAHMOUDVAND, H. et al. Anti-leishmania effects of methotrexate (MTX) alone and in combination with meglumine antimoniate (MA) against Iranian isolate of sensitive and MA-resistant *Leishmania tropica* : An in-vitro assay. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 412–420, p. 6, 2014.

MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. **Food Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 305–312, jan. 1991.

MATTICK, A. T. R.; HIRSCH, A.; BERRIDGE, N. J. FURTHER OBSERVATIONS ON AN INHIBITORY SUBSTANCE (NISIN) FROM LACTIC STREPTOCOCCI. **The Lancet**, v. 250, n. 6462, p. 5–8, jul. 1947.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S.; SCHUBACH, A. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, n. 3, p. 495–502, fev. 2002.

MONTVILLE, T. J.; WINKOWSKI, K.; LUDESCHER, R. D. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 8, p. 797–814, 1995.

MOUGEOT, F. et al. Oxidative stress and the effect of parasites on a carotenoid-based ornament. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 10, p. 1796, 2010.

MUKHERJEE, A. et al. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 1–10, jan. 2006.

MWENECHANYA, R. et al. Sterol 14 α -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–21, 2017.

NASCIMENTO, J. et al. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 1–2, p. 61–71, mar. 2005.

NAVARATNA, M. A. D. B.; SAHL, H.-G.; TAGG, J. R. Two-Component Anti-*Staphylococcus aureus* Lantibiotic Activity Produced by *Staphylococcus aureus* C55. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4803–4808, 1998.

NETZ, D. J. A. et al. Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 3, p. 745–756, 2002.

OLIVEIRA, L. F. G. et al. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. **Revista Fitos**, v. 8, n. 1, p. 33–42, 2013.

OLIVEIRA, V. C. S. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1053–1059, 2008.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, nov. 2014.

PARIS, C. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852–859, mar. 2004.

PARK, Y. K. et al. Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 103, 2012.

PASSALACQUA, T. G. et al. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 16, p. 3342–3345, 2015.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 5, p. 407–413, set. 2007.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339–345, 2010.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. Suppl 1, p. S3, 2014.

PEREZ-VICTORIA, F. J. et al. Functional Cloning of the Miltefosine Transporter: A NOVEL P-TYPE PHOSPHOLIPID TRANSLOCASE FROM LEISHMANIA INVOLVED IN DRUG RESISTANCE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 50, p. 49965–

49971, dez. 2003.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resistance Updates**, v. 9, n. 1–2, p. 26–39, 2006.

PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. 1–21, jun. 2014.

PIPER, C. et al. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 546–551, set. 2009.

PURKAIT, B. et al. Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1031–1041, fev. 2012.

RAMADANI, A. P. et al. Antiprotozoal properties of Indonesian medicinal plant extracts. **Journal of Herbal Medicine**, n. May 2016, p. 1–7, 2017.

RANJAN, M. et al. Laterosporulin10: a novel defensin like Class IId bacteriocin from *Brevibacillus* sp. strain SKDU10 with inhibitory activity against microbial pathogens. **Microbiology**, v. 162, n. 8, p. 1286–1299, ago. 2016.

REYES-FARIAS, M. et al. Chilean Native Fruit Extracts Inhibit Inflammation Linked to the Pathogenic Interaction Between Adipocytes and Macrophages. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 5, p. 601–608, 2015.

RODRIGUES, I. A. et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

RONDON, F. C. M. et al. In vitro effect of Aloe vera, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3–4, p. 235–240, 2011.

RYAN, M. P. et al. Evaluation of lactacin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2287–90, jun. 1998.

S. SUNDAR, M. C. Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities. **Indian Journal Med Res**, v. 123, p. 345–352, 2006.

SABLON, E.; CONTRERAS, B.; VANDAMME, E. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. **Advances in Biochemical Engineering/Botechnology**, v. 68, p. 21–60, 2000.

SACKS, D.; PERKINS, P. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 30 mar. 1984.

SANCHEZ-HIDALGO, M. et al. The Genes Coding for Enterocin EJ97 Production by

Enterococcus faecalis EJ97 Are Located on a Conjugative Plasmid. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 69, n. 3, p. 1633–1641, 2003.

SANTOS, I. N. D. S. **ESTUDO DE BLIS (SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS DO TIPO- - BACTERIOCINA) PRODUZIDAS POR STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE CÃES**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.

SARAIVA, L. et al. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1033–1039, dez. 2010.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, maio 2014.

SERENO, D. et al. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 12, p. 3097–102, dez. 1998.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 123–138, jan. 2008.

SHARMA, A.; SRIVASTAVA, S. Anti-*Candida* activity of two-peptide bacteriocins, plantaricins (PIn E/F and J/K) and their mode of action. **Fungal Biology**, v. 118, n. 2, p. 264–275, 2014.

SILVEIRA, F. T. et al. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. esp, p. 15–22, dez. 2016.

SILVERMAN, J. M. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 6, p. 842–852, mar. 2010.

SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, p. 19, dez. 2016.

STEPPER, J. et al. Cysteine S -glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. **FEBS Letters**, v. 585, n. 4, p. 645–650, fev. 2011.

SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D. L. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome – from an agriculture perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. October, p. 909, out. 2015.

SUNDAR, SHYAMGARWAL, D.; RAI, M.; MURRAY, H. W. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 2, p. 504–512, 2010.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical medicine &**

international health : TM & IH, v. 6, n. 11, p. 849–54, nov. 2001.

SUNDAR, S. et al. Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India After a Decade of Use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543–550, ago. 2012.

SUNDAR, S. et al. Efficacy and Safety of Amphotericin B Emulsion versus Liposomal Formulation in Indian Patients with Visceral Leishmaniasis: A Randomized, Open-Label Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3169, set. 2014.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, dez. 2010.

SYLVIE GARNEAU, NATHANIEL I. MARTIN, J. C. V. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 84, p. 577–592, 2002.

TAGG, J. R.; RAGLAND, N. L. Applications of BLIS typing to studies of the survival on surfaces of salivary streptococci and staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 4, p. 339–342, 1991.

UNGVARI, Z. et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 5, p. H2417–H2424, 2007.

VALADARES, D. G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 357–363, 2011.

VALE, E. C. S. DO; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421–428, ago. 2005.

VAN HEEL, A. J.; MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 7, n. 6, p. 675–680, 2011.

VARELLA COELHO, M. L. et al. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. **Research in Microbiology**, v. 158, n. 7, p. 625–630, set. 2007.

VAUGHAN, A. et al. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 131–138, jul. 2001.

VENEMA, K. et al. CHAPTER III Mode of action of lactococcin B , a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis* . CHAPTER III Mode of action of lactococcin B , a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis* . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1041–1048, 1993.

VIZAN, J. L. et al. The peptide antibiotic microcin Bi 7 induces double-strand cleavage

of DNA mediated by E.coli DNA gyrase. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 2, p. 467–476, 1991.

W H O. **WHO Model List of Essential Medicines**, 2011.

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

WALLE, T. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug metabolism and disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377–1382, 2004.

WHO, W. O. H. **WHO | Leishmaniasis**.

WOLF, C. E.; GIBBONS, W. R. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, n. 4, p. 453–457, 1996.

ZERPA, O. et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. **British Journal of Dermatology**, v. 156, n. 6, p. 1328–1335, jun. 2007.