

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**EFEITO IMUNOMODULADOR E ANTIPARASITÁRIO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Photorhabdus luminescens* E *Xenorhabdus nematophila*
SOBRE *Leishmania amazonensis* E *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*.**

ANA MARIA ANTONELLO

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva
Coorientador (a): Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Porto Alegre
Abril/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**EFEITO IMUNOMODULADOR E ANTIPARASITÁRIO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila*
SOBRE *Leishmania amazonensis* E *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*.**

Ana Maria Antonello
Mestre em Medicina Veterinária

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva
Co-orientadora: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres
Romão

“The higher we soar the smaller we appear to those who cannot fly.”
(Friedrich Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

Diante da aproximação do fim de uma jornada começamos a pensar em quem fez parte dela, quem a fez melhor, mais suave, mais proveitosa ou mais dura. Essa jornada não estaria concluída sem a participação de muitas pessoas, algumas de forma direta e outras que nem sabem o quanto ajudaram de forma indireta para que eu chegasse até aqui. Diante de tudo que aconteceu não conseguiria por um ponto final na conclusão sem antes agradecer algumas dessas pessoas.

Antes de tudo agradeço a minha família, que apesar dos tropeços, discordar em alguns assuntos e tudo mais, sempre esteve presente. À dona Sofia, minha mãe, que sem saber sobre o que estava falando sempre apoiou e empurrou para frente toda vez que se cogitava parar um pouco (vai fazer essa prova, vai que tu passa!). Ao meu irmão Ivan, e o resto da família, por argumentar de forma racional porque eu deveria ir em frente (vai querer voltar para casa?). Ainda no tópico da família gostaria de agradecer ao Eduardo e Daniela, por me confiarem o grau de Comadre, parece não ter relação nenhuma com o processo de doutoramento, mas foi um incentivo a mais para seguir o caminho as pedras.

Em segundo lugar, mas não nessa ordem gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa e apoio financeiro nos projetos desenvolvidos. À UFRGS, ICBS e PPGMAA, pela oportunidade de ingressar no curso de doutorado, pela disponibilidade da infraestrutura, dos equipamentos e do conhecimento adquiridos.

Anda em se falando de oportunidade, agradeço a professora Onilda pela confiança em me dar a oportunidade de realizar o doutorado nesta instituição de grande renome e ao professor Pedro Romão, pela acolhida e conhecimento compartilhado.

Um muito obrigada muito especial, que não pode faltar, aos amigos, mais que colegas, Parasitologia da UFRGS, da UFSCPA e da LMU pelas experiências compartilhadas, pelas dúvidas, angústias, tardes e noites compartilhadas também. Pelas brincadeiras, quando tudo parecia perdido, pelos conselhos, quando tudo estava escuro e pela cerveja quando tudo estava mais ou menos. Agradeço a todos que fizeram parte dessa história, mas não posso deixar de citar a Thais, Josi e Thiago, pelos ensinamentos, troca de experiências, *Trypanosomas/Leishmanias* contados e o compartilhamento de muitos problemas em comum (ou seria só um?!). Também devo agradecer ao Matheus, IC que foi providencial para o término de tudo. Nesse contexto também agradeço à Raísha, que chegou no momento mais crítico, na finaleira, a hora mais escura... muito obrigada por elevar o espírito, ampliar os horizontes e as amizades, por escutar os desabafos, pelas frustrações compartilhadas, pelas correções no português, nas tabelas, nos protocolos...

Obrigada à equipe de apoio, dos laboratórios adjacentes, que sem eles eu estaria ainda procurando a saída da sala escura que é a ciência, ao prof. Dr. Adriano

e o pessoal do lab, por ter aceito a parceria e aberto as portas do seu laboratório e à Ana Paula, pela ajuda, pelos ensinamentos, por acender a luz no fim do túnel. E ao Fabiano Barreto por ter aberto as portas do LANAGRO e ajudado a atravessar o túnel.

Claro que não pode faltar o muito obrigada ao pessoal de fora da vida acadêmica, meu irmão Ivan, pelo apoio no início, quando a moça do interior chegou à cidade grande, pelos ensinamentos de física, mecânica e internet (que um dia ainda posso precisar) e pelo incentivo de fazer uma refeição saudável ao gritar da janela “Ana, o que tu vai jantar hoje?”. À Jô e ao Neri, pelo bate papo, chimarrão, pelas informações sobre a cidade, por destrancar minha porta quando esquecia a chave dentro do apartamento, por desligar a chave de luz quando esquecia coisas na tomada e por enviar as contas por e-mail quando ia viajar antes do boleto chegar. Ao tio Vilso, tia Sonia, à Vitória e aos porteiros do 22, pelos churras e jantas e pelo endereço para correspondências.

Também fizeram parte importante dessa caminhada, as caronas para Santa Maria, do Luciano, tia Teca, Déia e as dos grupos sociais. E além deles, aos motoristas da Planalto, que paravam sempre no trevo do Santuário, encurtando a viagem e aos trabalhadores (do projeto à inauguração) da Av. do Parque, que encurtou ainda mais a viagem.

Um muito obrigada muito especial também ao pessoal que ficou! Que ficou em Santa Maria, e sempre me acolheu com um chimas no Ladopar, uma noitada em qualquer lugar e uma cama aconchegante e dividiram sua geladeira comigo. Muito obrigada Giovana, Pati, Leticia, Andressa e Stefano, Carol... E tem o pessoal que ficou na colônia, mas não em qualquer colônia, na Quarta Colônia, mais especificamente em São João do Polêsine, os sempre, que fazem uma janta só porque tu foi pra casa, que ficam bravos se vai e não avisa, que fazem vaquinha pra te pagar Oktober e que te chamam para as festas de família, porque afinal somos todos uma família, e nossa família está crescendo... muito obrigada a todos vocês Daia, Mariele, Daniana, Carla, Marquinhos, Betinho, Clândia, Tiago, Ana e Luiza.

Agradeço também ao PPGMAA e a seu Jorge Almeida Guimarães, presidente da Capes, por oferecer a oportunidade de um ano no exterior, e claro à própria instituição Capes e seus servidores por não ter maiores problemas, só alguns, menores. E a Santos Dumont, que inventou o avião, se não essa viagem teria sido muito mais trabalhosa, e obrigada também a todos pilotos e funcionários das empresas aéreas por terem tirado e colocado os aviões de volta sem maiores problemas.

E neste período em que estive fora não posso deixar passar o agradecimento ao PD Dr Ralf Heerman e à prof. Dra Kirsten Jung, melhor passar para o inglês nesta parte para que os envolvidos entendam. Thanks to PD. Dr Ralf Heerman and Professor Dr. Kirsten Jung for the acceptance and for open his lab doors for me for one entire year. Thanks also for the entire group of the LMU Biozentrum.

A very special acknowledgment to the colleagues from Martinsried lab, *WHO* helped me in all moments and assays. Leute, thank you very very much for your

patience, knowledge sharing, tips, suggestions and discussions about the assays, for the good welcome in the very firsts days, what makes the change shock much less hard. Someone told me once that it's hard to have a friendship with a German, but if you have it, it's forever, Vielen Danke!

Thanks also to Tatiana, the technician *WHO* helps in preparing the materials. Without her the work would be much harder and the results much less. Danke schön Tatiana.

E claro à família brasileira em Munique Dayane, Bruno e Gustavo pela acolhida, pelas dicas de sobrevivência e ensinamentos dos hábitos germânicos, cervejas na cozinha e finais de semana em München. Sem contar os cooking together, night bus, último vagão na Holzapfelkreuth entre outros casos...

Muito obrigada também aos caras que inventaram a internet e o Skype, e à sonora mulher do U-Bahn pelas aulas de alemão iniciais e claro à MVV por facilitar minha movimentação pela cidade.

E claro, muito obrigada à Alexandra Elbakyan, a Hobin Hood dos cientistas criadora do adorável Sci-Hub, site que disponibiliza todo e qualquer artigo científico desejado pelo pesquisador.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma auxiliaram na escrita, correção e discussão dessa tese, inclusive GraphPad Prisma, EndNote, o corretor ortográfico do Word e Raísha.

Muito obrigada!

EFEITO IMUNOMODULADOR E ANTIPARASITÁRIO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Photorhabdus luminescens* E *Xenorhabdus nematophila*¹

Autor: Ana Maria Antonello

Orientadora: Prof^a. Dra. Onilda Santos da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

RESUMO

Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da Doença de Chagas e leishmaniose possuem eficácia insatisfatória, principalmente devido à resistência parasitária e reações adversas severas. Duas entomobactérias, *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila*, produzem uma variedade de metabólitos secundários tóxicos a células eucarióticas. Diante disto, testou-se a toxicidade de metabólitos secretados por *P. luminescens* e *X. nematophila* sobre *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. Os meios condicionados de ambas bactérias mostraram significativo efeito parasiticida de forma concentração e tempo-dependente (*L. amazonensis*: IC₅₀ *P. luminescens* = 21,80 µg/mL e *X. nematophila* = 0,33 mg/mL; *T. cruzi*: IC₅₀ *P. luminescens* = 1,0 mg/mL e IC₅₀ *X. nematophila* = 0,34 mg/mL) e apresentaram alta seletividade ao parasito (*L. amazonensis*: SI_{*P. luminescens*} = 3,92 e SI_{*X. nematophila*} = 19,85; *T. cruzi*: SI_{*P. luminescens*} = 7,23 e SI_{*X. nematophila*} = 14,17 para promastigotas e tripomastigotas, respectivamente). Além disso, os metabólitos estimulam a atividade de macrófagos contra amastigotas por um mecanismo independente de óxido nítrico. Com relação à caracterização dos compostos antiparasitários, sugere-se que moléculas com diferentes características atuem sobre cada parasito. *P. luminescens* secreta uma molécula leishmanicida de natureza peptídica menor que 3 kDa e uma molécula tripanocida de natureza não proteica, resistente a aquecimento a 100 °C. *X. nematophila* produz uma molécula leishmanicida de polaridade inferior à tripanocida, uma vez que a atividade antiparasitária ficou em fases diferentes na extração com metanol. O mecanismo de ação de ambas bactérias sobre promastigotas parece estar relacionado à lesão mitocondrial, uma vez que ambas levaram à despolarização da membrana mitocondrial. *X. nematophila*, além disso, estimula a produção de ROS pelas formas promastigotas. A seletividade pelo parasito aliada a baixa citotoxicidade tornam estas bactérias promissoras fontes de compostos com potencial terapêutico contra leishmanioses e doença de Chagas.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (109 p.) abril, 2017.

IMMUNOMODULATOR AND ANTIPARASITIC EFFECT OF SECONDARY METABOLICS FROM *Photorhabdus luminescens* AND *Xenorhabdus nematophila*¹

Author: Ana Maria Antonello

Advisor: Prof. Dr. Onilda Santos da Silva
Co-Advisor: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

ABSTRACT

Drugs currently available for Chagas disease and leishmaniasis have unsatisfactory efficacy, mainly due to parasitic resistance and severe adverse reactions. Two entomobacteria, *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila*, produce a variety of secondary metabolites toxic to eukaryotic cells. So, the toxicity of the metabolites secreted by *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* were tested against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. The mean values of both bacteria showed a significant concentration-dependent and time-dependent effect 14.17 (*L. amazonensis*: $IC_{50}P. luminescens = 21.80 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $IC_{50}X. nematophila = 0.33 \text{ mg} / \text{mL}$, *T. cruzi*: $IC_{50}P. luminescens = 1,0 \text{ mg/mL}$ and $IC_{50}X. nematophila = 0,34 \text{ mg} / \text{mL}$), and showed a high selectivity to the parasite (*L. amazonensis*: $SI_{P. luminescens} = 3,92$ and $SI_{X. nematophila} = 19.85$, *T. cruzi*: $SI_{P. luminescens} = 7.23$ and $SI_{X. nematophila} = 14.17$ for promastigotes and trypomastigotes, respectively). In addition, cultures stimulate the activity of macrophages against amastigotes by an independent mechanism of nitric oxide. Regarding the characterization of antiparasitic compounds, it is suggested that molecules with different characteristics act on each parasite. *P. luminescens* secretes a leishmanicidal peptide molecule lesser than 3 kDa and a trypanocidal molecule of non-protein nature, resistant to heating at 100 °C. *X. nematophila* produces a leishmanicidal molecule of lower polarity than trypanocidal, since antiparasitic activity was at different phases in methanol extraction. The mechanism of action of both bacteria on promastigotes seems to be related to the mitochondrial injury, since both led to the depolarization of the mitochondrial membrane. *X. nematophila*, furthermore, stimulates the production of ROS by the promastigote. Selectivity by the parasite coupled with low cytotoxicity makes these bacteria promising sources of compounds with therapeutic potential against leishmaniasis or Chagas' disease.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (109 p.) April, 2017.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1	<i>Leishmania</i> e leishmanioses.....	5
3.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas	11
3.3	Bactérias entomopatogênicas <i>Photorhabdus luminescens</i> e <i>Xenorhabdus nematophila</i>	17
4.	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Cultivo e manutenção dos micro-organismos e linhagens celulares .	20
4.2	Atividade do meio condicionado da cultura bacteriana.....	21
4.3	Citotoxicidade do meio condicionado	22
4.4	Atividade imunomoduladora – ativação de macrófagos e mecanismo de ação 24	
4.5	Efeito da temperatura, do pH e da proteólise na atividade do meio condicionado de <i>X. nematophila</i> e <i>P. luminescens</i>	25
4.6	Purificação parcial dos compostos anti-parasitários secretados por entomobactérias	25
4.7	Análises estatísticas	28
5.	ARTIGOS	29
5.1	Artigo 1 – Entomopathogenic bacteria <i>Photorhabdus luminescens</i> as drug source against <i>Leishmania</i>	29
5.2.	Artigo 2 – Manuscrito: Trypanocidal and immunomodulatory activity of entomobacteria	39
5.3.	Resultados não apresentados na forma de artigo.	62
6.	DISCUSSÃO GERAL	71
7.	CONCLUSÃO	74
8.	REFERÊNCIAS	76

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Relação entre espécies de <i>Leishmania</i> e as manifestações clínicas da leishmaniose.	6
Tabela 2 - Atividade anti-parasitária e citotoxicidade em macrófagos do meio condicionado de <i>X. nematophila</i> em 48 horas.	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Leishmaniose em países de alta carga parasitária: uma atualização epidemiológica com base nos dados reportados em 2014 – Adaptado de WHO (2016)	7
Figura 2-Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. – Adaptado de KAYE e SCOTT (2011).8	
Figura 3- Resposta imune protetora contra <i>Leishmania</i> sp. Adaptado de SCOTT e NOVAIS (2016)	11
Figura 4 - Distribuição dos casos de Doença de Chagas reportados pela OMS entre 2010 e 2013. Adaptado de WHO (2015).....	12
Figura 5 – Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Adaptado de TYLER e ENGMAN (2001)	14
Figura 6- Resposta imune e a severidade da doença de Chagas. Adaptado de DUTRA et al. (2009)	16
Figura 7 - Ciclo de vida de bactérias entomopatogênicas. Adaptado de HEERMANN e FUCHS (2008).	19
Figura 8 - Método Stas-Otto	28
Figura 9 – Viabilidade de promastigotas em diferentes faixas precipitação proteica do meio condicionado em [(NH ₂) ₄ SO ₄] (A) e concentração proteica no ultrafiltrado do meio condicionado de <i>P. luminescens</i> (B).....	62
Figura 10 - Efeito tóxico do meio condicionado de <i>X. nematophila</i> em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	64
Figura 11 - Efeito de diferentes tratamentos na atividade leishmanicida do meio condicionado de <i>Xenorhabdus nematophila</i> e viabilidade de promastigotas em cada etapa do método de Stas-Otto.....	66
Figura 12 - Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de promastigotas.	67
Figura 13 - Níveis intracelulares de ROS de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	68
Figura 14 - Citotoxicidade do meio condicionado de <i>X. nematophila</i> em macrófagos e efeito hemolítico.....	69
Figura 15 - Efeito do meio condicionado de <i>Xenorhabdus nematophila</i> em amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e produção de óxido nítrico por macrófagos, <i>in vitro</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
CL	Do inglês cutaneous leishmaniasis
DC	Doença de Chagas
DCFH-DA	Reagente fluorescente 2'7'diacetato de diclorofluoresceína
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
EtOAc	Acetato de etila
IFN γ	Interferon gama
Jl	Juvenil infectivo
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MC	Meio condicionado
NO	Óxido nítrico
NTD	Sigla em inglês para doenças tropicais negligenciadas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLT	<i>Photorhabdus</i> -derived Leishmanicidal Protein
PMNC	Sigla em inglês para Células polimorfonucleares
Rh123	Rodamina 123
ROS	Do inglês reactive oxygen species
SI	Selectivity index
TBME	Tert-Butil metil éter
TNF α	Sigla em inglês para fator de necrose tumoral alfa
VL	Do inglês visceral leishmaniasis
WHO	World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também conhecida por Tripanossomíase Americana, e as Leishmanioses estão no rol de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) da Organização Mundial da Saúde (OMS). De acordo com a OMS estima-se que aproximadamente 1 bilhão de pessoas estejam infectadas com alguma DTN. Embora estas doenças sejam típicas de países pobres e em desenvolvimento, a ocorrência das mesmas vem crescendo em nações desenvolvidas, além de ocasionarem um impacto devastador na humanidade.

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e estão entre as mais importantes DTN. Estes parasitos são transmitidos pela picada infectante de fêmeas principalmente dos gêneros *Lutzomyia* no “Novo Mundo” (Américas) e *Phlebotomus* no “Velho Mundo” (Europa, África e Ásia) (HOSTOMSKÁ *et al.*, 2009; ABDELADHIM *et al.*, 2016).

As leishmanioses são consideradas endêmicas em 98 países de cinco continentes, onde cerca de 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (ALVAR *et al.*, 2012). A infecção por *Leishmania* spp. apresenta diferentes espectros de manifestações, que podem ser desde pequenas úlceras cutâneas à infecção generalizada e frequentemente fatal (MCMAHON-PRATT e ALEXANDER, 2004; GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012; SOONG *et al.*, 2012). Dados recentes sugerem que a cada ano surjam cerca de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) e 0,7 a 1,2 novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC). O Brasil, juntamente com outros países representam 70-75% dos casos de LC e mais de 90% dos casos de LV (ALVAR *et al.*, 2012).

Atualmente, não há vacina efetiva na prevenção de casos humanos e os fármacos disponíveis apresentam várias limitações como alta toxicidade, surgimento de resistência parasitária, falhas no tratamento e alto custo (SUNDAR, 2001; SANCHEZ-CANETE *et al.*, 2009; WHO, 2010).

O gênero *Trypanosoma* inclui diversas espécies patogênicas a uma gama de hospedeiros, incluindo humanos e animais domésticos. Dentre as espécies pertencentes a este gênero está *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas. Este protozoário replica-se no citoplasma da célula hospedeira e estabelece uma infecção crônica, silenciosa e permanente (FONSECA *et al.*, 2007).

A Doença de Chagas é uma zoonose, sendo cães e gatos considerados importantes reservatórios devido à sua proximidade com humanos. Os protozoários são transmitidos principalmente por triatomíneos após o repasto sanguíneo, quando o vetor defeca liberando nas fezes as formas infectivas tripomastigotas metacíclicas, que invadem o organismo do hospedeiro vertebrado pela lesão da picada (GÜRTLER *et al.*, 2007). Além da forma vetorial, a infecção também pode ser ocasionada por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou de forma congênita, embora esta seja menos frequente (WHO, 2017).

A enfermidade é endêmica na América Latina, embora os últimos registros demonstrem um aumento nos casos na América do Norte, Europa e Oriente devido principalmente ao aumento da mobilidade de pessoas entre a América Latina e outras partes do mundo (WHO, 2017). Conforme dados da OMS (WHO, 2017), estima-se que 6-7 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* ao redor do mundo, a maioria delas na América Latina. Entre as infecções crônicas, até 30% podem desenvolver problemas cardíacos. A OMS salienta ainda que no ano de 2008, em todo mundo, foram gastos aproximadamente U\$267 milhões em cuidados médicos e mais U\$5 milhões em inseticidas. Até o momento não há vacina efetiva contra o patógeno e a quimioterapia, baseada em benznidazole e nifurtimox (WHO, 2017) não é satisfatória e muito prolongada (de 60 dias a cinco meses), apresentando muitos efeitos adversos além de não garantir a cura completa do paciente (MAYA *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas houve um crescimento no interesse em produtos naturais à base de plantas e micro-organismos como fonte ou modelo para formulação de novos fármacos (FILHO *et al.*, 2004; PAVETO *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2014). Dentre os micro-organismos encontram-se as entomobactérias *Xenorhabdus nematophila* e *Photorhabdus luminescens*, promissoras fontes para novos compostos inseticidas e parasiticidas (BODE, 2009). Tais bactérias ocorrem em simbiose com nematódeos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente. Estas bactérias (gama-Proteobactérias gram-negativas) junto com o nematódeo (BOEMARE e AKHURST, 2006) formam um complexo entomopatogênico capaz de matar larvas de insetos de diferentes espécies (FORST *et al.*, 1997; BLACKBURN *et al.*, 1998; BLACKBURN *et al.*, 2005; SHEETS *et al.*,

2011; NIELSEN-LEROUX *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2012; SHRESTHA e LEE, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

Os fármacos de eleição para o tratamento da leishmaniose e tripanosomíase indicados pela OMS, além de provocarem graves efeitos adversos, são muitas vezes ineficazes em relação às diferentes formas do parasito. Assim, urge-se o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos. Desse modo, neste estudo investigou-se o efeito de metabólitos secretados por *X. nematophila* e *P. luminescens* contra *L. amazonensis* e *T. cruzi*, *in vitro*. Além disso, buscou-se caracterizar a(s) molécula(s) com ação anti-parasitária, bem como avaliar possíveis mecanismos de ação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de metabólitos secundários de bactérias entomopatogênicas (*Xenorhabdus nematophila* e *Photorhabdus luminescens*) sobre *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Verificar o efeito dos sobrenadantes das culturas bacterianas no crescimento *in vitro* de formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- 2.2.2 Investigar o efeito dos sobrenadantes de culturas bacterianas sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* e tripomastigotas de *T. cruzi in vitro*;
- 2.2.3 Verificar o efeito imunomodulador dos sobrenadantes bacterianos em macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *T. cruzi in vitro*;
- 2.2.4 Avaliar a citotoxicidade dos sobrenadantes bacterianos sobre macrófagos e hemácias humanas;
- 2.2.5 Calcular o índice de seletividade (IS) dos metabólitos bacterianos secretados;
- 2.2.6 Avaliar o efeito da proteinase K, temperatura e variação do pH na atividade

antiparasitária dos compostos bioativos;

2.2.7 Purificar e/ou caracterizar o(s) composto(s) ativo(s) de cada bactéria conforme a natureza dos mesmos;

2.2.8 Verificar possíveis mecanismos de ação para a atividade contra *L. amazonensis*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

As leishmanioses e a doença de Chagas ou tripanossomíase americana estão entre as principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). De acordo com a OMS (WHO, 2015) estima-se que aproximadamente um bilhão de pessoas estejam sofrendo devido a DTNs no mundo. Essas enfermidades têm um impacto devastador na humanidade e são típicas de países pobres ou em desenvolvimento, no entanto, sua ocorrência vem aumentando em países desenvolvidos.

Nos últimos 25 anos, apenas 1% de todos os medicamentos desenvolvidos foram para tratar alguma doença negligenciada (CHIRAC e TORREELE, 2006). Neste cenário, a identificação de novos compostos e a avaliação do impacto do tratamento antiparasitário sobre a prevenção da morbidade dos indivíduos infectados permanecem como os principais desafios na busca da promoção da saúde e controle da doença (URBINA, 2001; CALDAS, 2011).

3.1 *Leishmania* e leishmanioses

Leishmaniose é uma doença infecciosa não contagiosa, causada por um protozoário intracelular obrigatório do gênero *Leishmania*, descritos em 1903 por Leishman e Donovan na Índia e simultaneamente por Wright na Armênia. São protozoários flagelados pertencentes à classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A enfermidade ocorre como um complexo de doenças com diversidade epidemiológica e clínica, descritas como Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). Esta última se diferencia, por sua vez, em Leishmaniose Cutânea (LC) ou Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (SILVA, 2005). É uma infecção de caráter zoonótico que afeta diversas espécies animais além de humanos, os quais podem estar envolvidos de forma secundária. Cães são a principal espécie envolvida como reservatório e fonte de infecção da LV para humanos. No entanto equinos, asininos, bem como canídeos silvestres e animais sinantrópicos como roedores e gambás, também merecem destaque como reservatórios (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; WHO, 2015). A relação entre as diferentes espécies de *Leishmania* e a apresentação

clínica da infecção está resumida na tabela 1.

Tabela 1: Relação entre espécies de *Leishmania* e as manifestações clínicas da leishmaniose.

Síndrome	Local	Grupo	Espécies
LC	Velho Mundo		<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i>
	Novo Mundo	<i>L. (Leishmania) /</i> Complexo <i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i>
LC/LMC	Novo Mundo	(<i>L. Vianna</i>) / Complexo <i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiense</i> <i>L. guayanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i>
LV	Velho Mundo	Complexo <i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>
	Novo Mundo		<i>L. chagasi</i>

LC = Leishmaniose cutânea

LMC = Leishmaniose muco-cutânea

LV = Leishmaniose visceral

Fonte: adaptado de BAILEY e LOCKWOOD (2007)

As leishmanioses são um problema de saúde pública em esfera mundial, sendo a segunda maior causa de mortalidade por doenças parasitárias, ficando atrás apenas da malária. Leishmanioses são consideradas endêmicas em 98 países de cinco continentes, onde aproximadamente 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção. Estima-se que ocorram de 900 mil a 1,3 milhões de novos casos e 20-30 mil mortes por ano (ALVAR *et al.*, 2012). A Figura 1 ilustra os países com maior prevalência de leishmanioses no mundo. Estima-se que 90% dos casos de LV no mundo ocorram em apenas seis países (Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul) e que mais de 70% de LC ocorram em 10 países (Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Iran, Peru, Sudão e Síria) (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2016). No Brasil, dados do Ministério da Saúde revelam que a incidência de LV vem aumentando gradativamente, em 1990 foram reportados 1994 casos de LV e 3289 em 2015. Na região Sul, casos começaram a surgir a partir de 2001 (BRASIL, 2017). Quanto à LC, observa-se uma oscilação no registro de casos, com 21.801 a 35.748 na década de 90 e 19.395 em 2015 (BRASIL, 2016).

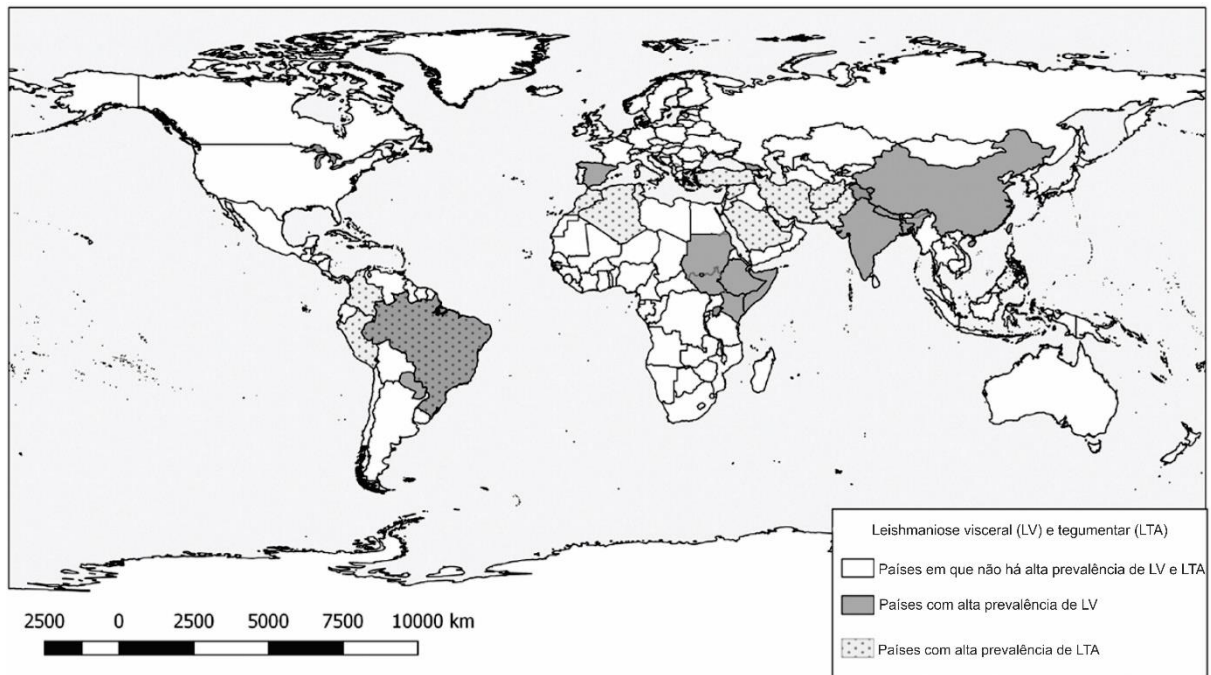


Figura 1- Leishmaniose em países de alta carga parasitária: uma atualização epidemiológica com base nos dados reportados em 2014 – Adaptado de WHO (2016)

Leishmania spp. possuem duas formas morfológicas: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas (flageladas) são consideradas infectivas e proliferam dentro do sistema digestivo do inseto vetor, aderidas à parede do intestino. Neste ambiente, as promastigotas procíclicas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas e migram para peças bucais do inseto de onde são inoculados no hospedeiro durante a hematofagia (BASU e RAY, 2005). Após a infecção, o parasito é fagocitado por células do sistema fagocitário mononuclear, predominantemente macrófagos. No interior das células as promastigotas metacíclicas diferenciam-se em formas amastigotas (esféricas e sem flagelo) capazes de se desenvolver e multiplicar no meio ácido do vacúolo digestivo (NEVES *et al.*, 2005). Com a intensa multiplicação, ocorre a lise da célula hospedeira, liberando os parasitos que voltam a infectar novas células. O ciclo se completa quando a fêmea de flebotomíneo alimenta-se do sangue de um hospedeiro infectado e as formas amastigotas voltam a se diferenciar em promastigotas no intestino do inseto (BASU e RAY, 2005; OLIVIER *et al.*, 2005; LANG *et al.*, 2009). Uma forma simplificada do ciclo biológico de *Leishmania amazonensis* está ilustrada na Figura

2.

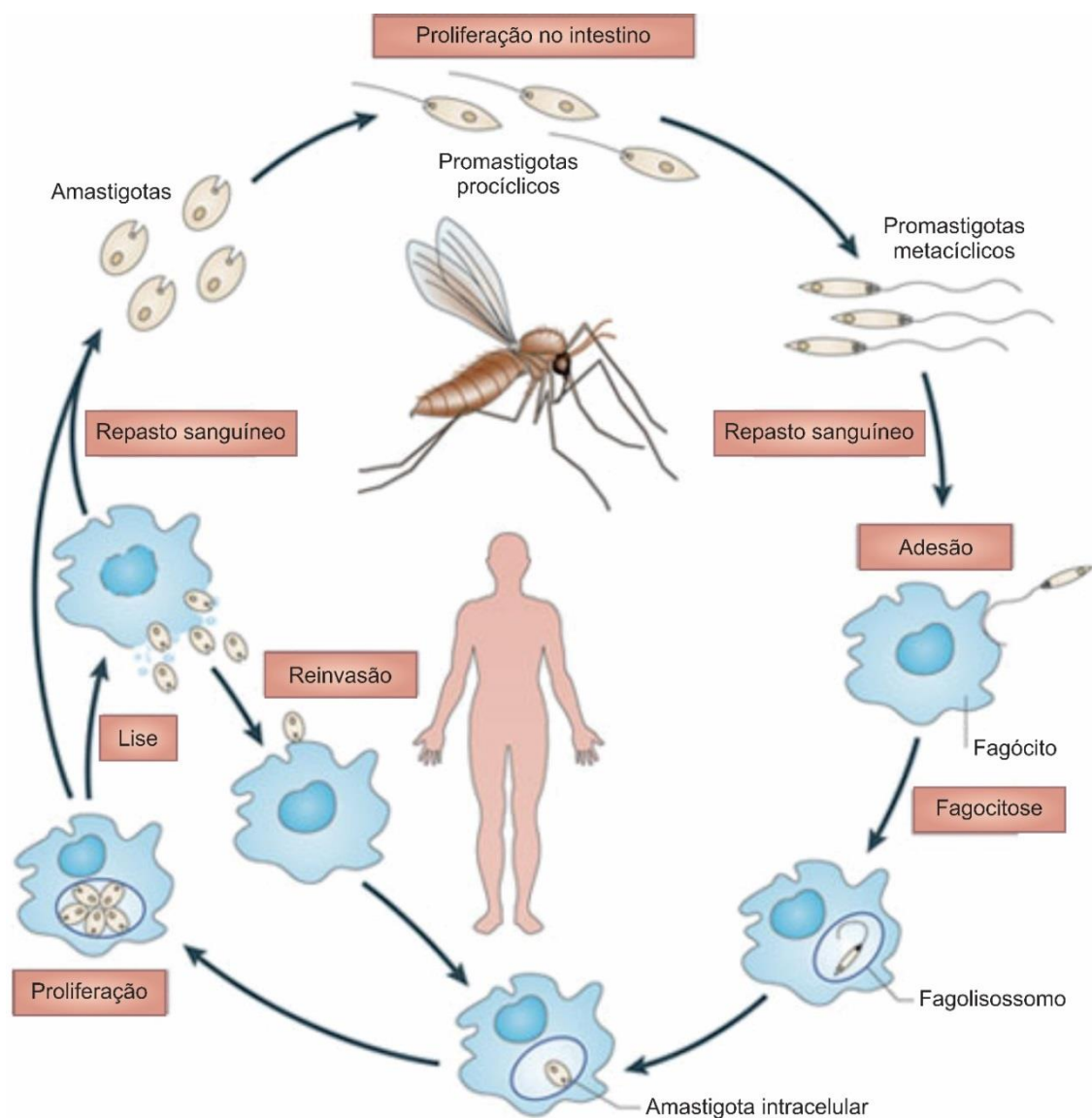


Figura 2-Ciclo de vida de *Leishmania* spp. – Adaptado de KAYE e SCOTT (2011)

Os vetores da leishmaniose são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, sub-família Phlebotominae. No Novo Mundo, o gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente por mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros é o principal vetor do protozoário. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão de LV é *Lutzomyia longipalpis* e de LTA são *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia wellcomei*,

Lutzomyia flaviscutellata e *Lutzomyia migonei* (LAINSON e RANGEL, 2005; BRASIL, 2010b).

A transmissão ocorre pela picada de uma fêmea de flebotomíneo contaminada, que se contaminou ao picar um animal infectado. Ao realizar o próximo repasto sanguíneo, esta transmite o parasito ao novo hospedeiro (BRASIL, 2010a). Embora a transmissão vetorial seja a principal forma de disseminação da leishmaniose, estudos têm confirmado outras formas de transmissão de LV, como: transfusão sanguínea, agulhas contaminadas, transplantes de órgãos, infecções laboratoriais, contato direto ou congênita (ROSYPAL e LINDSAY, 2005).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada pelos grupos dos Complexo *L. mexicana* e do Complexo *L. braziliensis*. Sendo conhecida popularmente por leishmaniose cutânea, Úlcera de Bauru, nariz de tapir, botão do Oriente. É uma das endemias de maior importância de saúde pública no Brasil devido à sua ampla distribuição no território nacional, ocorrência de formas graves e dificuldades no diagnóstico e tratamento da infecção (BAILEY e LOCKWOOD, 2007). A LTA apresenta-se classicamente por pápulas que podem evoluir para úlceras com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura, podendo ser únicas ou múltiplas, mas indolores. Também pode manifestar-se como placas verrucosas, papulosas, nodulares, localizadas ou difusas. A forma mucosa, secundária ou não à cutânea, caracteriza-se por infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe ou laringe. Quando a destruição dos tecidos é importante, podem ocorrer perfurações do septo nasal e/ou palato. (BRASIL, 2010a)

A infecção por *L. amazonensis* ocorre em diferentes regiões do Brasil, (MARLOW *et al.*, 2013; CASTELLUCCI *et al.*, 2014; FONSECA EDA *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2016) sendo descrita inclusive em animais (PASSOS *et al.*). Esta espécie é um dos agentes causadores de LC e, ocasionalmente leishmaniose cutânea-difusa (LCD) anérgica em indivíduos com deficiência imunológica inata. A LCD é considerada uma forma sem tratamento que pode levar a mutilações e se apresenta na forma de tubérculos, pápulas cutâneas extensas com grande quantidade de parasitos (BASANO e CAMARGO, 2004; SILVA, 2005).

A transmissão de *L. amazonensis* frequentemente associa-se à presença de animais silvestres como roedores, marsupiais e raposas. Os principais vetores

pertencem ao gênero *Bichromomya*, que possuem hábito noturno, voo baixo e são considerados pouco antropofílicos, o que leva a um menor contato com humanos e por consequência menor incidência de infecção humana. (TOLEZANO e SHAW; BASANO e CAMARGO, 2004; SILVA, 2005; BRASIL, 2010a)

Antimoniais pentavalentes (SbV), como estibogluconato de sódio (STB) e antimoniato de meglumina (MGA), são usados como tratamento de primeira linha em nas manifestações clínicas da doença. Estes fármacos, apesar de combaterem a leishmaniose, são altamente tóxicos, levando a efeitos adversos graves. Ainda não há um fármaco disponível que apresente elevada eficiência, baixa toxicidade e custo acessível às populações afetadas. Atualmente a investigação de novos fármacos está focada em compostos com atividade terapêutica dirigida a outras doenças, compostos de origem natural ou formulações de herbicidas (MATEUS, 2014).

Como em muitas infecções, a resposta imune à LC depende de diversos fatores do hospedeiro, do vetor e espécie de *Leishmania* infectante. Múltiplas vias contribuem para o desfecho da infecção por *Leishmania* sp. e a resposta imune é crucial para determinar o resultado da doença. O controle da infecção depende de um equilíbrio delicado entre resposta imune celular e humoral. A resposta primária é importante para determinar se a infecção cutânea será auto limitante ou crônica. Em geral IL-12 e IFN- γ é essencial para o desenvolvimento de células CD4⁺ Th1 protetoras, já IL-4 promove o desenvolvimento de células Th2 relacionada à susceptibilidade. Uma vez que o parasito é eliminado por macrófagos ativados por IFN- γ , indivíduos que desenvolvem uma resposta do perfil Th2 prevalecendo IL-10, não são capazes de controlar a infecção desenvolvendo a forma difusa da doença. No outro extremo, indivíduos que respondem com elevada citotoxicidade, por Th1, desenvolvem leishmaniose mucocutânea. Após a infecção, neutrófilos, monócitos e células dendríticas são recrutados para o local da infecção e, dependendo do microambiente, auxiliam no controle ou disseminação da infecção. Dentre as diferentes células envolvidas na resposta à infecção, as mais efetivas no seu controle são macrófagos ativados. O principal mecanismo de controle dos parasitos são a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) - pela explosão respiratória durante a fagocitose - e de óxido nítrico (NO) - gerados pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) após a ativação do macrófago por IFN- γ e TNF- α entre

outras citocinas (Figura 3) (SCOTT e NOVAIS, 2016).

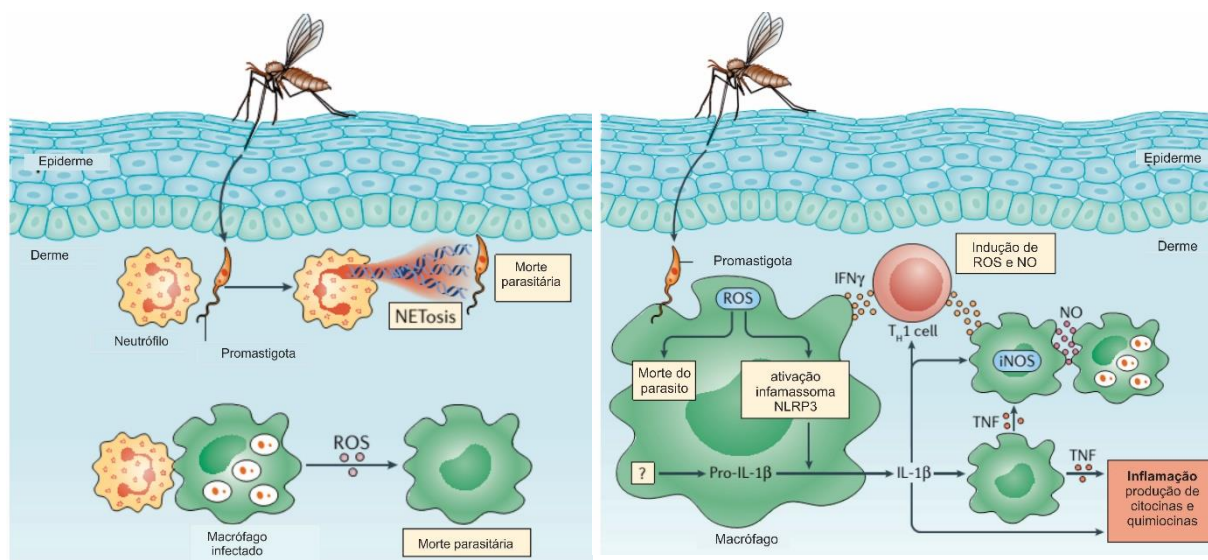


Figura 3- Resposta imune protetora contra *Leishmania* sp. Adaptado de SCOTT e NOVAIS (2016)

3.2 *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana foi descoberta em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1909). É uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. (EL-SAYED *et al.*, 2005).

Decorridos mais de 100 anos da sua descoberta, a doença é ainda um dos principais desafios na saúde pública na América Latina. Cerca de 7-8 milhões de pessoas estariam infectadas em todo mundo, principalmente na América Latina, onde é endêmica (WHO, 2015). Atualmente, além da importância em comunidades pobres, a infecção por *T. cruzi* vem ganhando importância em locais onde a tripanossomíase americana não é endêmica devido principalmente ao fluxo de imigrantes. (GASCON *et al.*, 2007). A transmissão pelo vetor é limitada às Américas, devido a ser o único continente em que os vetores estão presentes, conforme ilustrado na figura 4, que aponta os locais onde houve transmissão vetorial ao redor do mundo.

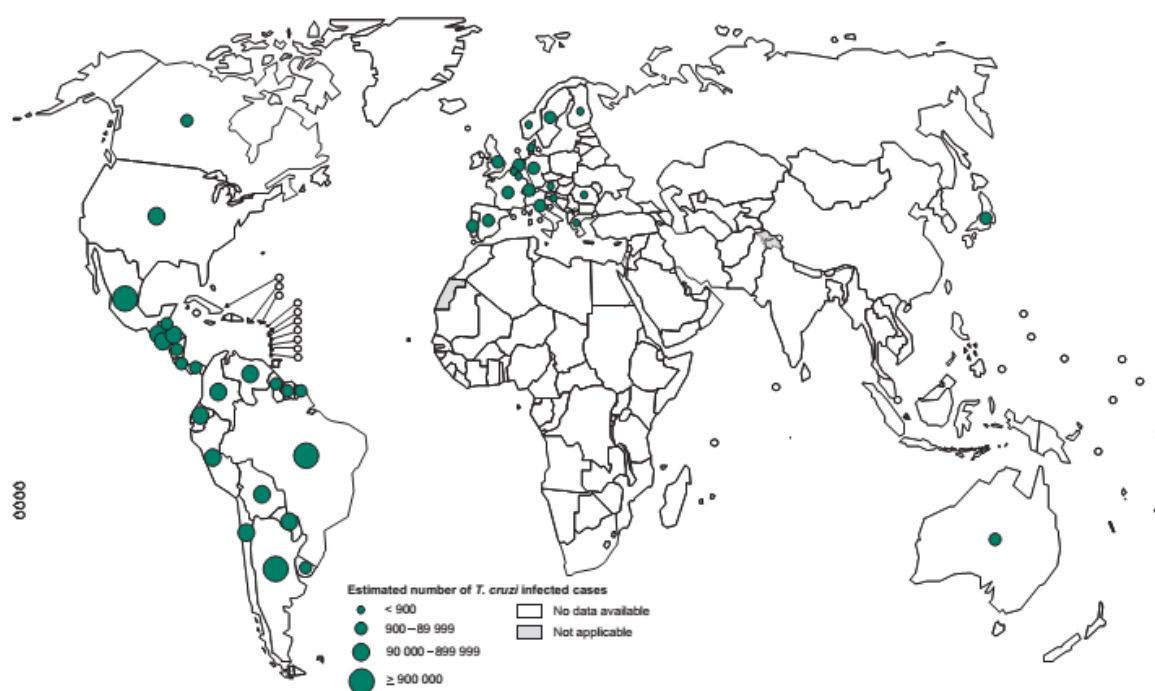


Figura 4 - Distribuição dos casos de Doença de Chagas reportados pela OMS entre 2010 e 2013. Adaptado de WHO (2015).

A doença de Chagas se apresenta em duas formas sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda da doença é geralmente assintomática ou auto-limitante com manifestações não específicas, que duram de quatro a oito semanas e caracterizada por parasitemia. Passada a fase aguda, a doença evolui para a fase crônica que se apresenta de forma assintomática ou se manifesta com envolvimento patológico do coração, esôfago e/ou colon. A forma assintomática é denominada forma indeterminada, onde há pouca ou nenhuma parasitemia e pode durar por anos até a manifestação de algum sinal clínico (RASSI JR *et al.*, 2009). Segundo a OMS (WHO, 2017), de 20% a 30% dos pacientes manifestam sintomas, caracterizando as formas cardíaca, digestiva e mista ou associada (cardíaca e digestiva) da enfermidade. A manifestação mais comum é a cardiopatia chagásica crônica, que pode resultar em arritmias cardíacas, aneurisma ventricular, insuficiência cardíaca

congestiva, tromboembolismo e morte súbita (GASCON *et al.*, 2007; RASSI JR *et al.*, 2009). A persistência do parasito, juntamente com o desequilíbrio da resposta imune em alguns indivíduos, leva a uma sustentada resposta inflamatória que fundamenta as lesões características da infecção (RASSI JR *et al.*, 2009).

Sob condições naturais, o ciclo de vida de *T. cruzi* se alterna entre hospedeiros invertebrados (triatomíneos da família Reduviidae, conhecidos por barbeiros), e hospedeiros vertebrados, caracterizando um ciclo heteroxeno, conforme a Figura 5. O protozoário apresenta três formas distintas dependendo do hospedeiro em que se encontre: amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas (com membrana ondulante e cinetoplasto posterior ao núcleo) em mamíferos e epimastigotas (com membrana ondulante curta e cinetoplasto anterior ao núcleo) e tripomastigotas metacíclicas (membrana ondulante) no inseto vetor. No triatomíneo, que se infecta pela ingestão de sangue de animais infectados durante o repasto sanguíneo, formas tripomastigotas de *T. cruzi* se diferenciam em epimastigotas ainda no estômago do inseto. Em seguida se aderem à superfície do intestino médio e posterior, multiplicando-se intensamente. Posteriormente, os epimastigotas migram para o intestino posterior atingindo o reto, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicas, os quais são eliminados nas fezes e urina do inseto vetor. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas infectam células do sistema fagócito mononuclear, onde diferenciam-se em amastigotas e dividem-se por fissão binária. Posteriormente, os amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas, as quais rompem as células hospedeiras e atingem a corrente sanguínea podendo infectar novas células do hospedeiro ou serem ingeridas por triatomíneos na ocasião de um novo repasto. Dentro do inseto vetor, os parasitos transformam-se em epimastigotas, reiniciando o ciclo. (BRENER *et al.*, 2000; TYLER e ENGMAN, 2001; BOWMAN, 2006)

Na América do Sul os principais transmissores são *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (WHO, 2017). Entre os reservatórios estão os vertebrados domésticos (homem, cão, gato e roedores) e silvestres (marsupiais, quirópteros, carnívoros, edentados, roedores e primatas) (CEBALLOS *et al.*, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2006; COURA, 2007). Além vetorial, outras formas de transmissão também

podem ocorrer, como transfusão sanguínea, transplantes de órgãos, transmissão vertical e por via oral (WHO, 2017). Esta última se tornou a causa mais frequente de casos agudos da doença, aparecendo geralmente na forma de surtos alimentares de difícil diagnóstico e alta mortalidade (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2016). Neste caso os tripomastigotas metacíclicos são ingeridos, e são capazes de invadir a mucosa gástrica, onde replicam na forma amastigota (YOSHIDA, 2009). Durante a fase aguda, parasitos podem ser detectados no sangue, no entanto, muitos indivíduos infectados demonstram poucas ou nenhuma indicação de infecção, ou os sinais são inespecíficos. Aproximadamente 1% dos infectados, a maioria crianças, desenvolvem miocardite e menos ainda (de 1 a 5% destes) desenvolvem complicações fatais (BONNEY e ENGMAN, 2015).

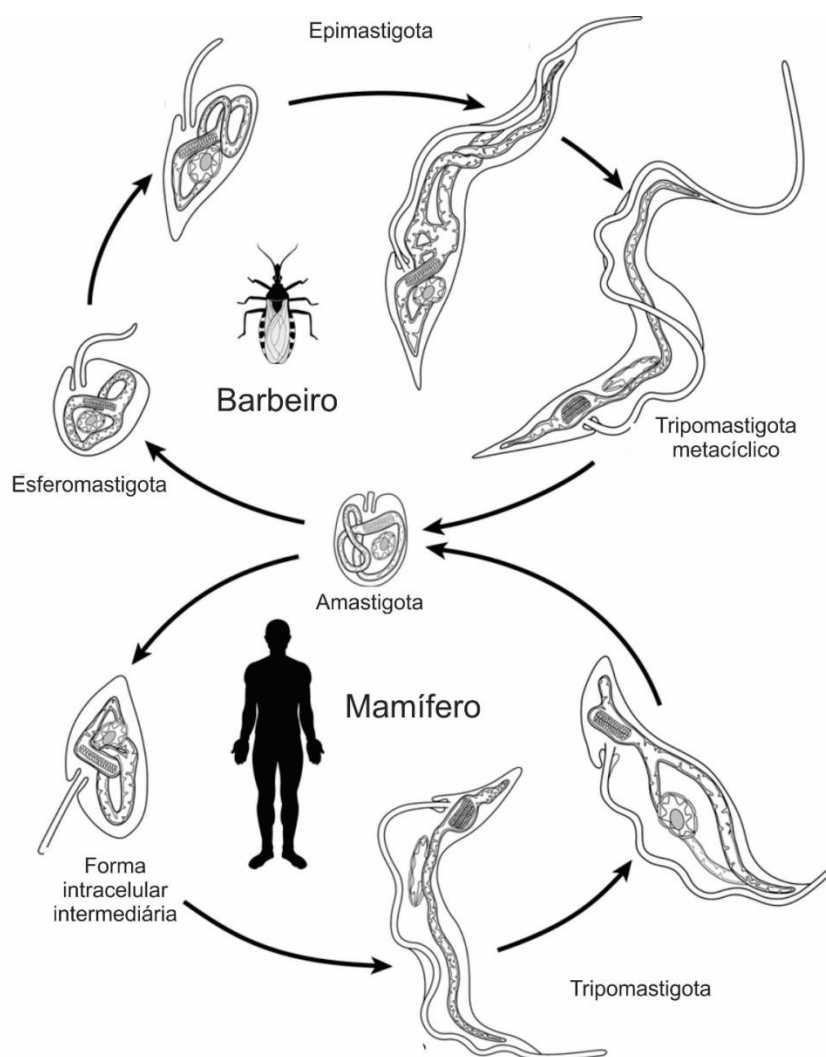


Figura 5 – Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de TYLER e ENGMAN (2001)

A patogênese da doença crônica é considerada multifatorial. Atualmente duas teorias se destacam na tentativa de elucidar a patogênese da DC: a da autoimunidade e a da persistência parasitária. A primeira, da autoimunidade, sugere que a lesão cardíaca leva a uma diminuição da auto-tolerância, resultando uma reação imune a proteínas próprias, já que diferentes estudos relatam uma variabilidade (e até ausência) de correlação parasitismo e cardiomiopatia. Enquanto a teoria da persistência parasitária propõe que exista uma correlação direta entre a presença do parasito e inflamação, baseada na detecção de antígenos de *T. cruzi* nas lesões de miocardite. Uma teoria não exclui a outra e há dados que suportam a ocorrência concomitante de ambas. (BONNEY e ENGMAN, 2015; RASSI *et al.*, 2017)

A DC é o resultado de uma complexa combinação entre o parasitismo por *T. cruzi* e a resposta imune do hospedeiro (Figura 6). Os danos aos órgãos durante a fase aguda ocorrem como resultado de parasitemia intensa e parasitismo tecidual, com resposta imune-inflamatória superposta ao parasito. Na fase crônica a lesão cardíaca imunomediada é causada pela infiltração de células mononucleares e liberação de citocinas inflamatórias, que desempenham um papel decisivo no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica (RASSI *et al.*, 2017). O equilíbrio da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi* é crítica para controlar a carga parasitária no coração e nos tecidos digestivos. A produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-6) é necessária para a ativação de LT efetores, importantes para controlar o parasitismo na fase aguda. Porém, a resposta inflamatória também está associada à patogênese da cardiomiopatia chagásica (CC). As citocinas reguladoras (principalmente a IL-10), por outro lado, estão relacionadas à proteção. Pacientes com CC costumam apresentar níveis mais altos de IFN- γ , TNF- α e IL-6 e mais baixos de IL-4 e IL-10, em comparação com indivíduos com a forma indeterminada da doença (GUEDES *et al.*, 2012).

A regulação da resposta inflamatória (IL-17 e Treg) durante a infecção tem papel decisivo na severidade da doença crônica. A IL-17 tem papel chave na modulação da doença cardíaca e é produzida por PBMC na presença do parasito. A IL-17 é capaz estimular a produção de citocinas inflamatórias, sendo importante no

controle da proliferação parasitária na fase aguda. Além disso, tem papel preventivo na manifestação da doença crônica controlando a inflamação cardíaca, provavelmente por um mecanismo de *feedback* negativo na produção de IFN- γ que previne a lesão tecidual imunomediada. (GUEDES *et al.*, 2012)

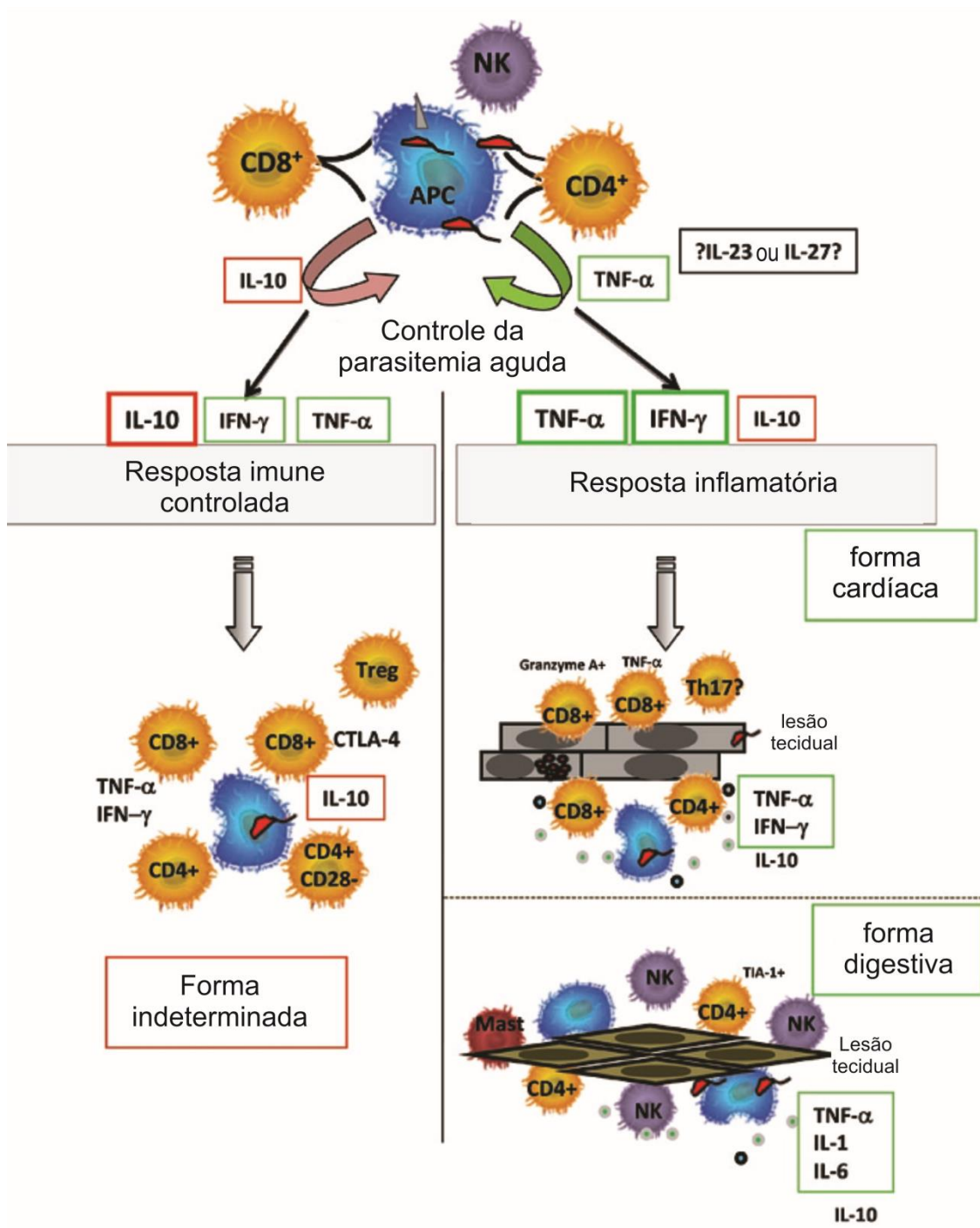


Figura 6- Resposta imune e a severidade da doença de Chagas. Adaptado de DUTRA *et al.* (2009)

Apesar dos esforços no controle da transmissão vetorial de *T. cruzi*, o desenvolvimento de novos fármacos, junto com as ações de integração social, científica e tecnológica são necessários. A principal limitação da quimioterapia anti-chagásica disponível atualmente é a dificuldade da eliminação das formas amastigotas. Somente dois medicamentos estão disponíveis para DC, nifurtimox e benznidazole, ambos levam a danos no DNA do parasito. Tais medicamentos possuem boa eficácia na fase aguda da DC. No entanto, essa eficácia é limitada em determinadas situações por necessitar repetidas administrações por um período longo de tempo. Além disso, pode provocar severos efeitos adversos que não são bem tolerados por todos pacientes, o que leva ao abandono do tratamento e falha na solução do problema (BONNEY e ENGMAN, 2015). Além disso, o tratamento na fase crônica ainda é controverso, visto que muitos dos portadores não desenvolvem a doença clínica. No entanto, a Rede Latino-Americana para Doença de Chagas (NHEPACHA) recomenda o tratamento de pacientes na fase indeterminada da doença, salvo determinadas condições, devido a permanência de formas infectivas viáveis responsáveis pela transmissão não-vetorial e devido a ocorrência de eventos de reativação clínica da doença em pacientes imunossuprimidos (VIOTTI *et al.*, 2014).

Por muitos anos a hipótese de que a doença crônica havia uma origem autoimune retrancou a pesquisa e o desenvolvimento de novos e efetivos aintiparasitários levando a falência do tratamento de muitos pacientes crônicos (VIOTTI *et al.*, 2014).

3.3 Bactérias entomopatogênicas *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila*

Xenorhabdus nematophila e *Photorhabdus luminescens* são enterobactérias (gama-Proteobactérias) gram-negativas, membros da família Enterobacteriaceae simbioses de nematódeos entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabtidae, respectivamente (BOEMARE e AKHURST, 2006). Algumas espécies de *Xenorhabdus* e de *Photorhabdus* foram inicialmente estudados e ganharam importância na agricultura, no controle biológico de pragas (KAYA e GAUGLER, 1993). Juntos, eles formam um complexo entomopatogênico

capaz de levar larvas de diversos insetos à morte (FORST *et al.*, 1997; BLACKBURN *et al.*, 1998; BLACKBURN *et al.*, 2005; SHEETS *et al.*, 2011; NIELSEN-LEROUX *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2012; SHRESTHA e LEE, 2012; SILVA *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2017).

Durante seu complexo ciclo de vida, ilustrado de forma resumida na Figura 7, as bactérias produzem metabólitos secundários, necessários em diferentes estádios do seu ciclo de vida, incluindo a fase simbiótica com o nematódeo ou na fase patogênica (BODE, 2009). Durante a fase simbiótica as bactérias permanecem no interior dos nematódeos, as bactérias do gênero *Xenorhabdus* localizam-se em vesículas no interior de larvas de nematódeos da família Steinernematidae, enquanto *Photorhabdus* se distribuem por toda extensão do intestino de nematódeos da família Heterorhabditidae (OWUAMA, 2001). Os nematódeos, no estágio infectivo juvenil (IJ), penetram nas larvas de insetos por aberturas naturais como boca, espiráculos ou ânus ou perfurando a própria cutícula, no caso de Heterorhabditidae. Já no interior da larva, os nematódeos liberam as bactérias na hemocele (BOEMARE e AKHURST, 2006). Na hemolinfa *Xenorhabdus/Photorhabdus* se multiplicam liberando uma variedade de agentes antimicrobianos que inibem o crescimento de outras bactérias, leveduras e fungos, eliminando potenciais competidores. A multiplicação bacteriana leva a uma septicemia letal à larva do inseto (OWUAMA, 2001). Na larva, os nematódeos completam seu desenvolvimento até a fase adulta e multiplicam-se. As novas L3, ao alimentarem-se da biomassa da larva, são colonizadas pelas bactérias e partem em busca de um novo hospedeiro (OWUAMA, 2001; BOEMARE e AKHURST, 2006).

Durante a cultura *in vitro*, duas fases distintas foram observadas em *Xenorhabdus/Photorhabdus*, sendo chamadas fases I e II (ou primária e secundária, respectivamente). A variação de fase é característica de ambos os gêneros e é uma resposta a mudanças ambientais. Na fase I, ambos os gêneros apresentam maiores níveis de lipases e proteases e secretam maior quantidade de antibióticos, maior motilidade que na fase II. Além disso, na fase I, absorvem os corantes dos meios de cultura alterando a cor da colônia (MacConkey – colônias avermelhadas a marrom; NBTA – colônias verdes) (OWUAMA, 2001; BOEMARE e AKHURST, 2006), o que é utilizado para a diferenciação da fase das bactérias utilizadas nos

ensaios. Além da produção em maior quantidade, algumas toxinas são produzidas somente na fase I, como lectinases, antimicrobianos não proteicos difundíveis em ágar, xenorhabdinas, xenocumacinas e endotoxinas (OWUAMA, 2001; BOEMARE e AKHURST, 2006; HEINRICH *et al.*, 2016).

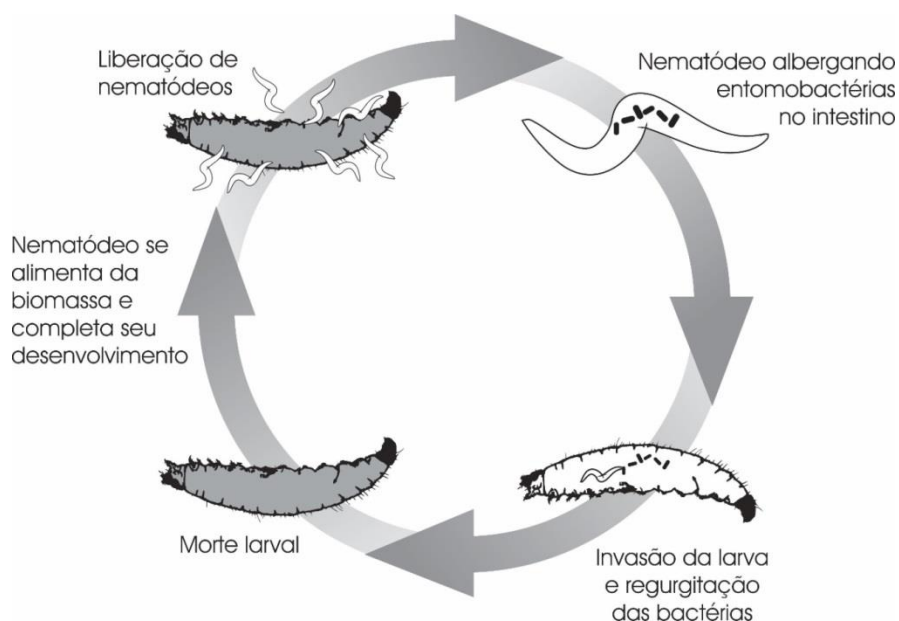


Figura 7 - Ciclo de vida de bactérias entomopatogênicas. Adaptado de HEERMANN e FUCHS (2008).

Recentemente, estas bactérias vêm ganhando espaço com sua atividade parasiticida (NOLLMANN *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2013; GRUNDMANN *et al.*, 2014). Nesses estudos, metabólitos bacterianos foram sintetizados ou isolados de *Xenorhabdus* spp. e testados *in vitro* em diferentes patógenos como protozoários, bactérias e fungos. Dentre os efeitos anti-protozoários destacam-se os compostos Szentiamida (1), um depsipeptideo com atividade contra estágio eritrocitário de *Plasmodium falciparum* ($IC_{50} = 0.995 \mu\text{g/mL}$), formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei rhodesiense* ($IC_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$) e amastigotas de *Leishmania donovani* ($IC_{50} = 11 \mu\text{g/mL}$) (NOLLMANN *et al.*, 2012); Xenoamicin A, que teve atividade contra *P. falciparum* NF 54 ($IC_{50} = 2,35 \mu\text{g/mL}$) e *T. b. rhodesiense* STIB900 ($IC_{50} = 6,41 \mu\text{g/mL}$), tripomastigotas de *T. cruzi* Tulahuen C4 ($IC_{50} = 30.5 \mu\text{g/mL}$) e *L. donovani* MHOM-ET-67L82 ($IC_{50} = 50.1 \mu\text{g/mL}$) (Zhou *et al.*, 2013); e depsipentapeptideos

chaiyaphumine 1, que teve atividade contra *P. falciparum* (IC₅₀ = 0,61 µM) e *T. b. rhodesiense* (IC₅₀ = 5,11 µM) (Grundmann et al., 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção dos micro-organismos e linhagens celulares

4.1.1 Entomobactérias

Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* TT01 DSM15139 (FISCHER-LE SAUX *et al.*, 1999) e *Xenorhabdus nematophila* ATCC 19061 (THOMAS e POINAR, 1979) foram cultivadas para obtenção dos meios condicionados usados neste estudo.

Cada bactéria foi inoculada em NBTA (agar nutriente, suplementado com 0,025% de azul de bromotimol e 0,004% trifeniltetrazóleo a fim de diferenciar entre as fases 1 e 2 das entomobactérias. As culturas cresceram a partir de uma colônia unitária na fase primária em caldo 5YS como descrito por (SHRESTHA e LEE, 2012) [5% extrato de levedura, 0.5% NaCl, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% NH₄H₂PO₄, 0.02 % MgSO₄ 7H₂O] sob agitação (180 rpm) a 28°C até a fase estacionária (48 horas). Após a incubação as culturas foram centrifugadas a 2000 x g por 20 minutos, o sobrenadante contendo os metabólitos secretados por cada bactéria foi filtrado através de membrana de 0.22 µm e congelado -20°C até o momento do uso.

4.1.2 *Trypanosoma cruzi*

Tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Phileno Pinge-Filho (Universidade Estadual de Londrina) e cultivados em células da linhagem LLCMK2 (26, 27) em meio RPMI enriquecido com 5% de soro fetal bovino e mantidos a uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (Hull et al., 1962).

Para os ensaios com as formas amastigotas de *T. cruzi*, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em RPMI com piruvato e soro fetal bovino e mantidos nas mesmas condições das culturas de *T. cruzi* e LLCMK2.

4.1.3 *Leishmania* spp.

Leishmania amazonensis - a cepa MHOM/BR/73/M2269 foi mantida na forma de promastigotas em meio M199 contendo HEPES 40 mM, adenine 0,1 mM, hemina 7,7 mM, soro fetal bovino 10% (v/v), penicilina 50 U/mL e estreptomicina 50 µg/mL. As culturas eram incubadas a 26°C e mantidas numa densidade celular de 1×10^5 a 3×10^7 parasitas/mL [24].

Leishmania tarantolae - espécie não patogênica a humanos, foi gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Michael Boshart. Para os ensaios, promastigotas eram cultivados em meio BHI a 26° C até a fase exponencial e então incubadas com meio condicionado de *X. nematophila* numa densidade de 3×10^6 promastigotas/ poço.

4.1.4 Cultura e manutenção de macrófagos

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram mantidos em cultura em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicillina e estreptomicina (100 µg/mL). As culturas eram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

4.2 Atividade do meio condicionado da cultura bacteriana

4.2.1 Atividade anti-*Trypanosoma*

As formas tripomastigotas eram colhidas por meio de duas centrifugações do sobrenadante da cultura. A primeira a 900 rpm por 10 minutos (na qual se descartava o *pellet* com *debris* celulares e amastigotas) e a segunda, com o sobrenadante da primeira, contendo tripomastigotas, era realizada a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante da segunda centrifugação é descartado e o *pellet*, ressuspenso para a contagem de tripomastigotas em câmara de Neubauer. Uma concentração de 2×10^5 tripomastigotas/poço foi distribuída em microplacas de 96 poços em um volume final de 100 µL contendo DMEM (controle) ou diferentes concentrações do meio condicionado (1,7; 3,4; 8,5; 17 e 34 µg/mL para *P. luminescens* e 0,05; 0,24; 0,48; 1,2 e 2,4 µg/mL para *X. nematophila*). As placas foram mantidas em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

Para avaliar o efeito dos metabólitos secretados por cada entomobactéria

sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*, macrófagos da linhagem RAW foram incubados em placas de 12 poços contendo uma lamínula redonda no fundo de cada poço. Foram incubadas 2×10^5 células/ poço *overnight* e após lavagem com PBS para retirada de células mortas não aderentes, foram adicionados parasitos na razão de 5 tripomastigotas:1 macrófago. Após 4 horas de incubação que permitiram a entrada dos tripomastigotas na célula, cada poço foi lavado cuidadosamente com PBS a fim de retirar os parasitos livres. Adicionou-se, então, os meios condicionados em diferentes concentrações, além de LPS (10 ng/mL) e IFN- γ (10 ng/mL) como controle de ativação de macrófagos e somente RPMI como controle negativo. Seguidas 48 horas de incubação, cada poço foi lavado com PBS e as lamínulas secas à temperatura ambiente e coradas por coloração hematológica. O índice de infecção foi dado pelo cálculo da porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos

4.2.2 Atividade anti-*Leishmania*

Foi avaliado o efeito do meio condicionado da cultura de cada bactéria na cinética de crescimento de *L. amazonensis*. Para tal, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram distribuídas em microplacas de 12 poços numa densidade de 1×10^5 /mL em meio M199 como controle ou M199 acrescido de diferentes concentrações do meio condicionado da cultura de cada bactéria. O crescimento de *L. amazonensis* foi observado diariamente até a fase estacionária pela observação da motilidade das promastigotas e a densidade celular foi determinada diariamente por hemocitometro.

O efeito citotóxico direto sobre promastigotas também foi avaliado. Promastigotas na fase estacionária de crescimento foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (3×10^6 /poço) e incubadas com M199 (controle) ou M199 acrescido de cada meio condicionado em diferentes concentrações. A viabilidade de foi avaliada em 3, 12, 24 e 48 horas pela contagem de promastigotas viáveis em hemocitômetro. Anfotericina B (Sigma, EUA) a 4 μ g/mL foi usado como fármaco padrão anti-*Leishmania* (100% de mortalidade em 48 h).

4.3 Citotoxicidade do meio condicionado

4.3.1 Citotoxicidade sobre macrófagos *in vitro*

A viabilidade de macrófagos foi mensurada por meio de colorimetria usando 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio bromide (MTT). Para a realização dos ensaios, 1×10^5 células foram distribuídas em microplacas de 96 poços e incubadas *overnight* a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após a incubação as placas foram lavadas com PBS e então cultivadas por 44 horas a 37°C em RPMI ou diferentes concentrações do meio condicionado de cada bactéria. Em seguida, 20 µL MTT (5 mg/mL em PBS) foi adicionado em cada poço e continuou-se a incubação por mais 4 horas, totalizando uma incubação das células com os meios condicionados de 48 horas. O produto formado pela ação enzimática nas células vivas foi solubilizado pela adição de 100 µL isopropanol ácido e a absorbância foi medida a 570 nm usando Spectramax M2 [25,26]. A concentração de cada meio condicionado que causa 50% de citotoxicidade nos macrófagos (CC₅₀) foi determinada por regressão não linear pelo GraphPad Software versão 5.0. O índice de seletividade (SI) dos meios condicionados foi determinado pela equação: CC₅₀ macrófagos/IC₅₀ *L. amazonensis* de promastigotas e amastigotas.

4.3.2 Ensaio de hemólise

O ensaio foi realizado de acordo com GAUTHIER *et al.* (2009), com algumas modificações. Dois mililitros de sangue total humano do tipo O+ foram coletados com EDTA e, em seguida, foi centrifugado a 2000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 400 µL do *pellet* foi ressuspensão em 10 mL de PBS. Procederam-se quatro centrifugações a 2000 rpm por 1 minuto para lavagem do material. O *pellet* foi ressuspensão em PBS e distribuído em microplaca de 96 poços a uma concentração final de 0,8 % de hemácias e volume final de 200 µL com meio condicionado em diferentes concentrações, PBS (controle de hemólise negativo) ou dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (controle de hemólise positivo). A microplaca permaneceu incubada a 37°C por 60 minutos. O sobrenadante de cada poço foi então transferido para uma nova microplaca e a absorbância foi medida a 540 nm (RANGEL *et al.*, 2011; PATHAICHINDACHOTE *et al.*, 2013) em um leitor de placas (Spectramax 4M). Como branco da leitura, foi utilizado PBS 1X sem hemácias

(PATHAICHINDACHOTE *et al.*, 2013).

4.4 Atividade imunomoduladora – ativação de macrófagos e mecanismo de ação

4.4.1 Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados

O sobrenadante dos ensaios com amastigotas foram colhidos para a medir a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos infectados. A concentração de NO foi determinada pela reação de Griess, de acordo com ROMAO *et al.* (1999).

4.4.2 Determinação de espécies reativas de oxigênio em promastigotas

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi utilizado o reagente 2'7'diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), um reagente que se torna altamente fluorescente quando oxidado por espécies reativas de oxigênio (WU e YOTNDA, 2011). Promastigotas na fase exponencial (1×10^6) foram tratadas por 12 h com meio parcialmente purificado de *X. nematophila* (3,35 mg/mL da fase aquosa do Stas-Otto). Após centrifugação e lavagem com PBS as promastigotas foram incubadas com 0,5 ml de DCFH-DA 10 μ M por 30 minutos a 37°C. A análise foi realizada por citometria de fluxo BD FACSCalibur (Becton–Dickinson, Rutherford, NJ, USA) e do software CellQuest Pro (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) usando o laser azul de argônio de 488 nm e o filtro do canal FL1. Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região que corresponde às promastigotas.

4.4.3 Determinação do potencial de membrana

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi estimado de acordo com FERLINI e SCAMBIA (2007), utilizando o corante fluorescente rhodamin123 (Rh123, R8004, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), que difundem passivamente através da membrana plasmática e se acumulam em substâncias metabólicas ativas na mitocôndria. Foram incubadas formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 na fase logarítmica) com meio M199, peróxido de hidrogênio (H_2O_2 2 mM, controle positivo), com 13,5 μ g / mL de *P. luminescens* (ultra-filtrado 3 kDa) ou *X. nematophila*

(3,35 mg/mL da fase aquosa do Stas-Otto) durante 12 h a 26 ° C. As células foram então lavadas com PBS e incubadas com 500 µL de Rh123 (1 µg / mL) durante 10 min a 37°C. As células foram lavadas e ressuspensas em 0,5 mL de PBS. A análise foi realizada utilizando um citometro de fluxo BD FACSCalibur (Becton-Dickinson®, Rutherford, NJ, EUA) e o software CellQuest® Pro (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA) utilizando o laser azul de íon de árgon a 488 nm com o canal de filtro FL1. Um total de 30.000 eventos foram adquiridos na região que correspondeu aos parasitos. As alterações na fluorescência de Rh123 foram quantificadas usando um índice de variação (IV) obtido a partir da equação $IV = (Mt - Mc) / Mc$, em que Mt é a fluorescência mediana dos parasitos tratados e Mc é a fluorescência mediana dos parasitos não tratados. Valores negativos de IV correspondem à despolarização e valores positivos, hiperpolarização da membrana mitocondrial. Os histogramas foram construídos utilizando o software CellQuest Pro (Joseph Trotter, Instituto de Investigação Scripps, La Jolla, CA, EUA).

4.5 Efeito da temperatura, do pH e da proteólise na atividade do meio condicionado de *X. nematophila* e *P. luminescens*

Para avaliar a estabilidade da molécula bioativa contra *L. amazonensis* e *T. cruzi*, a atividade do meio condicionado da cultura de *X. nematophila* e *P. luminescens* foi testado após alterações de temperatura, pH e tratamento com proteinase K. A estabilidade à alta temperatura foi avaliada aquecendo-se o meio condicionado a 100°C por 10 minutos. Para avaliar o efeito do pH na atividade anti-parasitária, duas alíquotas do meio condicionado foram separadas, sendo uma acidificada a pH 1,0 com 5 M de HCl e a outra alcalinizada a pH 12,0 com 5 M de NaOH. Após 40 minutos de incubação sob agitação a temperatura ambiente, cada alíquota foi ajustada ao pH inicial de 8. A sensibilidade à proteólise foi avaliada expondo o meio condicionado de cada cultura bacteriana à proteinase K (2 mg/mL), conforme BIZANI e BRANDELLI (2002).

4.6 Purificação parcial dos compostos anti-parasitários secretados por entomobactérias

4.6.1 *P. luminescens*

Como foi observada a natureza proteica do composto leishmanicida de *P. luminescens*, seguiu-se para a purificação do meio condicionado. Primeiramente a concentração proteica de cada fração foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Na sequência, foi realizada a precipitação proteica em diferentes faixas de concentração de sulfato de amônio [(NH₂)₄SO₄], conforme (WINGFIELD, 2001). Brevemente, adicionou-se lentamente diferentes concentrações (p-v) de sulfato de amônio ao meio condicionado de *P. luminescens*. Após 30 min. de agitação sob refrigeração, as soluções foram centrifugadas a 10000 rpm. Os sobrenadantes recuperados foram testados em promastigotas na concentração de 25% (v/v), que equivalem a 85 µg/mL de proteína no meio condicionado original.

O meio condicionado da cultura de *P. luminescens* passou por ultrafiltração em membranas de 50, 10 e 3 kDa (Ultrafree CL®, Millipore) para separação por tamanho da molécula. O filtrado de 10 kDa (moléculas menores que 10 kDa) foi submetido a gel-filtração em coluna Sephadex G-25 (20.5 x 0.5 cm), com taxa de fluxo de 0,3 mL/min. A coluna foi eluída com Tris-HCl 20 mM pH 8,0, 42 frações de 1 mL foram coletadas e a concentração proteica foi monitorada a 280 nm. Os bioensaios para avaliação da atividade anti-*Leishmania* foram realizados conforme descrito anteriormente para o respectivo protozoário.

4.6.2 *X. nematophila*

Para a purificação da molécula bioativa secretada por *X. nematophila*, o meio condicionado da cultura bacteriana foi incubado *overnight* com 5% (m/v) de *beads* Amberlite® XAD-16 (Sigma-Aldrich, Alemanha). Esta é uma resina macrorreticular aniônica que adsorve moléculas por interações hidrofóbicas e polares. Os *beads* da resina, contendo as moléculas de menor polaridade adsorvidas em sua superfície, foram separados do meio por filtração. O filtrado (porção aquosa) foi estocado a -20°C. A fração adsorvida na resina foi extraída com metanol em uma nova incubação *overnight*. O metanol foi removido por evaporação a vácuo e o conteúdo ressuspense com água ultrafiltrada até volume inicial. Ambas

as frações, aquosa e metanólica, foram testadas contra os parasitos e a que mostrou efeito tóxico prosseguiu para as etapas subsequentes.

A fração ativa foi submetida ao método de Stas-Otto, resumido na Figura 8. Tal método consiste em quatro etapas para separação de alcalóides por meio da alteração de pH e solventes orgânicos. Brevemente, cada etapa do processo seguiu da seguinte maneira: etapa 1) o meio condicionado foi levado a pH 1,0, adicionou-se tert-butil éter metil (TBME), produzindo duas fases; etapa 2: o pH da fase aquosa da etapa 1 foi corrigido para 4.0, adicionou-se o solvente (acetato de etila); etapa 3: a fase aquosa do passo 2 foi alcalinizada até pH 12.0 e o solvente (TBME) foi adicionado; etapa 4: a fase aquosa do passo 3 foi levada a pH 9.0, o solvente é adicionado (acetato de etila). Em cada etapa, solvente e meio eram agitados vigorosamente e a separação entre fase aquosa e a fase orgânica ocorria. O solvente orgânico era removido por rotavaporização e o volume restaurado ao volume inicial com água ultrafiltrada.

Para os bioensaios, foram adicionados 25 % (v/v) de cada fração parcialmente purificada, volume equivalente a 1,2 mg/mL de extrato do meio condicionado. Ao final, as oito frações geradas foram testadas contra promastigotas.

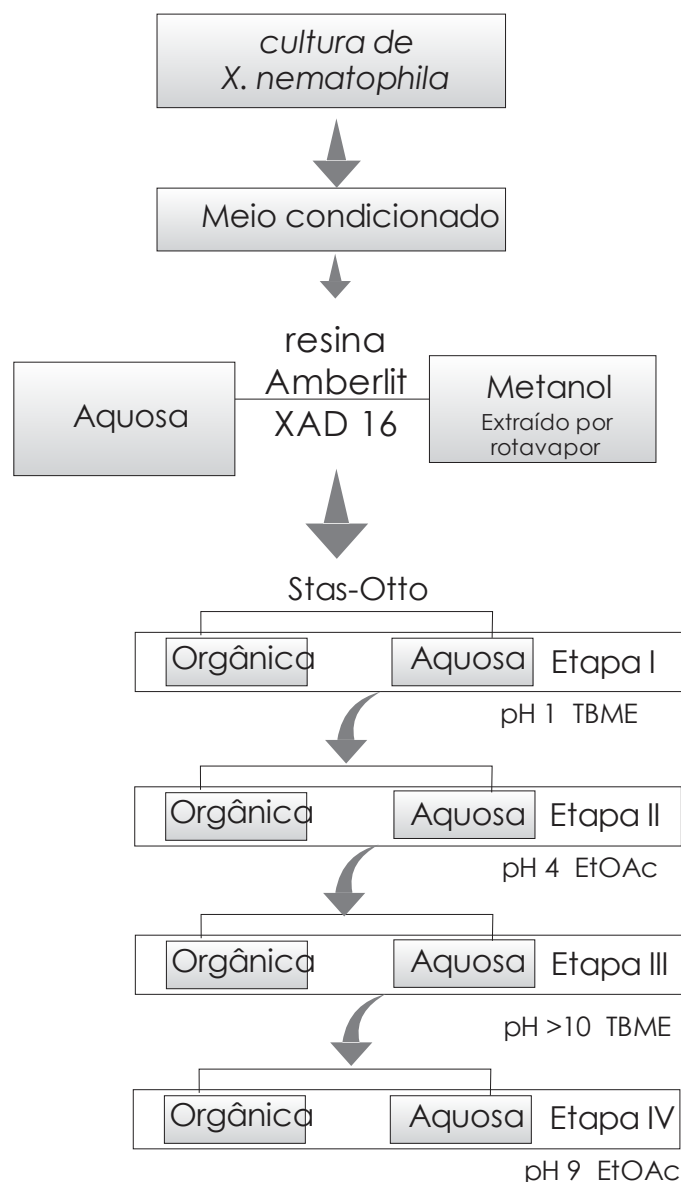


Figura 8 - Método Stas-Otto

4.7 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão e a análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. As análises foram realizadas com GraphPad Software versão 5.0 e valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Todos os experimentos foram realizados três vezes em quadruplicatas.

5. ARTIGOS

5.1 Artigo 1 – Entomopathogenic bacteria *Photobacterium luminescens* as drug source against *Leishmania*.

Publicado no periódico Parasitology em 21 de novembro de 2017

ISSN: 0031-1820 (impresso), 1469-8161 (Online)

Research Article

Cite this article: Antonello AM, Sartori T, Folmer Correa AP, Brandelli A, Heermann R, Rodrigues Júnior LC, Peres A, Romão PRT, Da Silva OS. Entomopathogenic bacteria *Photorhabdus luminescens* as drug source against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology* <https://doi.org/10.1017/S0031182017002001>

Received: 8 May 2017

Revised: 7 October 2017

Accepted: 8 October 2017

Key words:

Secondary metabolites; leishmaniasis; leishmanicidal activity; macrophages; mitochondrial dysfunction

Author for correspondence:

Pedro Roosevelt Torres Romão and Onilda Santos da Silva, E-mail: pedror@ufcspa.edu.br and onilda.silva@ufrgs.br

Entomopathogenic bacteria *Photorhabdus luminescens* as drug source against *Leishmania amazonensis*

Ana Maria Antonello^{1,2}, Thaís Sartori^{1,2}, Ana Paula Folmer Correa³, Adriano Brandelli³, Ralf Heermann⁴, Luiz Carlos Rodrigues Júnior², Alessandra Peres^{2,5}, Pedro Roosevelt Torres Romão^{2,6,7} and Onilda Santos Da Silva¹

¹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rua Sarmento Leite 500 – 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Rua Sarmento Leite 245 – 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁴Biozentrum, Bereich Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany; ⁵Programa de Pós-Graduação em Reabilitação, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Rua Sarmento Leite 245 – 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁶Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Rua Sarmento Leite 245 – 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil and ⁷Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Rua Sarmento Leite 245 – 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

Leishmaniasis is a widely spread and zoonotic disease with serious problems as low effectiveness of drugs, emergence of parasite resistance and severe adverse reactions. In recent years, considerable attention has been given to secondary metabolites produced by *Photorhabdus luminescens*, an entomopathogenic bacterium. Here, we assessed the leishmanicidal activity of *P. luminescens* culture fluids. Initially, promastigotes of *Leishmania amazonensis* were incubated with cell free conditioned medium of *P. luminescens* and parasite survival was monitored. Different pre-treatments of the conditioned medium revealed that the leishmanicidal activity is due to a secreted peptide smaller than 3 kDa. The *Photorhabdus*-derived leishmanicidal toxin (PLT) was enriched from conditioned medium and its effect on mitochondrial membrane potential of promastigotes, was determined. Moreover, the biological activity of PLT against amastigotes was evaluated. PLT inhibited the parasite growth and showed significant leishmanicidal activity against promastigote and amastigotes of *L. amazonensis*. PLT also caused mitochondrial dysfunction in parasites, but low toxicity to mammalian cell and human erythrocytes. Moreover, the anti-amastigote activity was independent of nitric oxide production. In summary, our results highlight that *P. luminescens* secretes *Leishmania*-toxic peptide(s) that are promising novel drugs for therapy against leishmaniasis.

Introduction

Leishmaniasis causes human suffering on a global scale, especially in the poorest countries where the problem of access to medicines persists. In fact, there is no effective vaccine to prevent human leishmaniasis and drugs available for chemotherapy present various limitations such as high toxicity, resistance emergency, treatment failure and high cost (Sundar, 2001; World Health Organization, 2010).

In the last decades, there has been a renewed interest in natural compounds derived from plants and microorganisms as source of new drugs, including anti-infective substances (Kondo *et al.* 2002; Xu *et al.* 2004; Cragg and Newman, 2013; Zhou *et al.* 2013; Dagnino *et al.* 2015). In this context, entomopathogenic bacteria such as *Photorhabdus luminescens* have been considered as a promising source for novel natural compounds (Bode, 2009). These bacteria are rich in gene clusters that encode putative biosynthetic enzyme pathways, which are assumed to produce novel natural compounds with diverse biological activities. The chemical diversity of some of these compounds has been explored resulting in different classes of compounds (Chaston *et al.* 2011). Most of these metabolites are involved in symbiosis with the nematode (Heterorhabditidae family), pathogenicity to the insect and antimicrobial activity (Tobias *et al.* 2016). Different compounds with activity against bacterial and fungal pathogens of medical and agricultural interest have already been isolated (Challinor and Bode, 2015). Although some studies have shown that *P. luminescens* secretes compounds like stilbenes that show biological activity against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* (Kronenwerth *et al.* 2014) or with anti-*Plasmodium* activity (so called GameXPeptides) (Challinor and Bode, 2015), the effect of most metabolites produced by *P. luminescens* against parasites is under-explored. Here we investigated the bioactivity of cell-free conditioned medium from *P. luminescens* against both promastigote (infective stage transmitted by sandfly vector) and amastigote forms (inside host cells) of *Leishmania amazonensis*. In addition, possible mechanisms of action were evaluated. We found that the leishmanicidal activity is caused by a peptide-based molecule smaller than 3 kDa.

Materials and methods

Cultivation of *P. luminescens* and preparation of conditioned medium

Photorhabdus luminescens subsp. *laumondii* TT01 DSM15139 (Fischer-Le Saux et al. 1999) was used in the leishmanicidal bioassays. For that purpose, *Photorhabdus luminescens* was inoculated on NBTa medium [nutrient agar supplemented with 0.025% (w/v) bromothymol blue and 0.004% (w/v) triphenyltetrazolium chloride] in order to differentiate phenotypic phase variants. A start-culture was grown from a single primary phase colony in 5YS medium broth as described before (Shrestha and Lee, 2012) [5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) NaCl, 0.05% (w/v) K₂HPO₄, 0.05% (w/v) NH₄H₂PO₄, 0.02% (w/v) MgSO₄·7H₂O] on a shaker (180 rpm) at 28 °C. After an overnight incubation, the bacterial density was determined by absorbance at 600 nm. The main culture was started at OD₆₀₀ = 0.1 and incubated for 48 h to reach the stationary phase. After that, the cells were removed by centrifugation at 2295 g for 20 min, and cell free culture supernatants were filter-sterilized through 0.22 µm membrane and kept at -20 °C until use. The protein concentration of this conditioned medium was determined using the Bradford method (Bradford, 1976). As controls, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and human pathogenic *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™) were used and grown in tryptone soy agar medium (Castellani and Chalmers, 1919). A single colony from each culture was inoculated in 5YS medium. Broth culture, centrifugation and filtering were carried out under similar conditions as used for *P. luminescens*.

Leishmania (*Leishmania*) *amazonensis* culture

Leishmania amazonensis (WHO reference strain MHOM/BR/73/M2269) were routinely maintained as promastigote forms in M199 medium containing 40 mM of 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt (HEPES), 0.1 mM adenine, 7.7 mM hemin, 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2% (v/v) human urine, 50 U mL⁻¹ of penicilin and 50 µg mL⁻¹ of streptomycin. Cultures were incubated at 26 °C, and cells were kept at densities ranging between 1 × 10⁵ and 3 × 10⁷ parasites mL⁻¹ (Romao et al. 2006).

Effects of *P. luminescens* conditioned medium on growth of *L. amazonensis*

Promastigote forms of *L. amazonensis* were distributed in 12-well microplate at density of 1 × 10⁵ mL⁻¹ in M199 medium (control) or M199 plus 3.4 and 34 µg of protein mL⁻¹ of the *P. luminescens* conditioned medium. *Leishmania amazonensis* growth was determined daily until stationary phase by motility and cell density using a haemocytometer.

Activity of *P. luminescens* conditioned medium against promastigotes of *L. amazonensis*

The direct cytotoxic effect of *P. luminescens* conditioned medium on *L. amazonensis* was evaluated. For that purpose, promastigote forms of *L. amazonensis* in stationary growth phase were dropped in 96-well microplates (3 × 10⁶ well⁻¹) and then incubated with M199 medium (control) or different concentrations of *P. luminescens* culture fluid (0.68 to 170 µg of protein mL⁻¹). The conditioned medium of *E. faecalis* and *E. coli* at the same concentrations was used as negative controls. The viability of promastigotes was evaluated at different time points (3, 6, 12, 24 and 48 h) by counting the viable promastigote forms using a haemocytometer.

Effect of proteolytic enzyme, heating and pH on leishmanicidal activity of *P. luminescens* conditioned medium

To investigate the stability of the bioactive molecule(s) acting on *L. amazonensis*, *P. luminescens* conditioned medium was heated at 100 °C for 10 min, and then cooled to room temperature before use. To verify the protein nature of *P. luminescens* bioactive molecule(s), the conditioned medium was treated with proteinase K (2 mg mL⁻¹ final concentration) (Bizani and Brandelli, 2002). To assess the effect of pH, samples of cell-free supernatant were acidified with 5 M HCl until pH 1.0 or alkalinized to pH 12.0 with 5 M NaOH. After incubation for 40 min at room temperature the pH was adjusted to its initial value (pH 8.0). All bioassays were performed using *P. luminescens* conditioned medium at concentration of 85 µg of protein mL⁻¹.

Enrichment of bioactive molecule(s) from *P. luminescens* conditioned medium

As first step, *P. luminescens* conditioned medium was ultra-filtrated through membranes of 50, 10 and 3 kDa exclusion size (Ultrafree CL®, Millipore) to roughly classify the compound size of the leishmanicidal molecule(s). After restoring each fraction retained to its initial volume, promastigotes of *L. amazonensis* were incubated with 25 µL (equivalent to 85 µg of protein mL⁻¹ of the conditioned medium) of each fraction for 24 h and the parasite viability determined as described before.

Moreover, <10 kDa ultra-filtered fraction was concentrated 7 times by lyophilization and 1 mL was loaded onto Sephadex column (20.5 × 0.5 cm²), with a flow rate of 0.3 mL min⁻¹. This procedure was repeated 12 times and yielded an amount of 224 µg of protein loaded onto the column. Forty-two fractions of 1 mL were collected from each column and the presence of protein was monitored at 280 nm. Each recovered fraction was lyophilized and the respective fractions of all 12 columns were pooled. Then, the protein concentration of each pooled-fraction was determined using Bradford assay and the leishmanicidal activity against promastigotes was assessed using a final protein concentration of 14 µg of protein mL⁻¹.

Determination of the mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m)

The mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m) was quantified according to the method described by Ferlini and Scambia (2007), using the fluorescent dye rhodamine 123 (Rh 123, R8004, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), which passively diffuses through the plasma membrane and accumulates in metabolic active mitochondria. Briefly, promastigote forms of *L. amazonensis* (1 × 10⁶ on log phase) were incubated with M199 medium, hydrogen peroxide (H₂O₂ 2 mM; positive control) or with 3.25 µg of protein mL⁻¹ of the smaller than 3 kDa ultra-filtrated fraction for 12 h at 26 °C. The cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with 500 µL of Rh 123 (1 µg mL⁻¹) for 10 min at 37 °C. After a washing step, cells were resuspended in 0.5 mL of PBS. The analysis was performed using a BD FACSCalibur (Becton–Dickinson®, Rutherford, NJ, USA) flow cytometer and CellQuest® Pro software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) using the blue argon-ion 488 nm laser with the FL1 filter channel. A total of 30 000 events were acquired in the region that corresponded to the parasites. Alterations in Rh 123 fluorescence were quantified using an index of variation (IV) obtained from the equation IV = (Mt - Mc)/Mc, in which Mt is the median fluorescence of treated parasites, and Mc is the median fluorescence of untreated parasites. Negative IV values correspond to

depolarization and positive values, hyperpolarization of the mitochondrial membrane. Histograms were built using the CellQuest Pro software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Cytotoxic effect of *P. luminescens* conditioned medium against macrophages

Cytotoxicity on macrophages was determined using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Macrophages RAW 264.7 cell line were maintained in culture in RPMI 1640 plus 10% FBS, penicillin (100 U mL⁻¹) and streptomycin (100 µg mL⁻¹). First, 1 × 10⁵ cells were distributed in 96-well microplate plates and incubated overnight at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. Then, plates were washed with PBS and incubated in the presence of RPMI or RPMI plus different concentrations of *P. luminescens* conditioned medium (17 to 170 µg of protein mL⁻¹). Following, 20 µL of MTT (5 mg mL⁻¹ in PBS) was added into each well and incubations were continued for a further 4 h. The purple formazan product that is formed by the action of mitochondrial enzymes in living cells was solubilized by the addition of acidic isopropanol, and the absorbance at 570 nm measured using Spectramax® M2 software.

Hemolytic assay

The hemolytic assay was performed using a modified method according to Gauthier *et al.* (2009). Briefly, human blood O+ type was obtained from healthy voluntary donors. The Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Research Ethical Committee approved procedures and project under authorization (CAAE 63282416.6.0000.5345). The human erythrocytes samples were washed three times with PBS (pH 7.0) and resuspended to obtain a 1% (v/v) erythrocytes suspension. This suspension was placed into a 96-well microplate and different concentrations of the conditioned medium (17–170 µg of protein mL⁻¹). PBS as negative control or sodium dodecyl sulphate (SDS) 0.01% as positive control were added to obtain a 0.8% erythrocyte suspension. Microplates were incubated on an orbital shaker for 60 min at 37 °C. Microplates were then centrifuged at 3000 rpm for 5 min and the supernatant was transferred to a new microplate. Absorbance of the supernatant was measured at 540 nm in SpectraMax M2 (molecular devices). Each experiment was carried out twice in triplicate.

Leishmanicidal activity of macrophages stimulated with conditioned medium

The leishmanicidal assay was performed as previously described (Romao *et al.* 1999). Briefly, Macrophages RAW 264.7 cell line were cultivated for 12–16 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. Non-adherent cells were removed and the adherent cells washed three-times with pre-warmed medium. Macrophages were infected with *L. amazonensis* (5 parasites cell⁻¹) and 4 h later, the cell cultures were washed to remove not internalized *Leishmania*. Following, the cells were incubated with the appropriate stimulus, interferon γ (IFN-γ) (10 ng mL⁻¹) plus lipopolysaccharide (LPS) (10 ng mL⁻¹) as positive control, conditioned medium at concentrations ranging from 0.68 to 170 µg of protein mL⁻¹ or ultra-filtered fraction <3 kDa PLT (1.6 and 3.25 µg of protein mL⁻¹) for 48 h. Then, the supernatants were removed from each well and kept at -20 °C for nitric oxide (NO) and TNF-α determination. Then, the cell cultures were washed with PBS and 100 µL of 0.01% (w/v) SDS solution in serum-free-medium was added to each well and the cells incubated at 37 °C for 20 min. Then, the cells were supplemented

with M199 30% (v/v) FBS (100 µL well⁻¹), and incubated at 26 °C until parasite releasing to determine the number of promastigote forms recovered, once only viable amastigotes are capable to differentiate to motile promastigote forms. The leishmanicidal activity of macrophages was analyzed by determining the number of viable parasites (4 replicates) using a hemocytometer.

Effect of *P. luminescens* conditioned medium on the expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules on macrophages

All of the experimental procedures with mice were performed in accordance with the guidelines of the National Institute of Health and the Brazilian Society for Science on Animals of Laboratory with the approval of local Ethics Committee (CEUA UFCSPA number 505/17). To investigate better the immunomodulatory activity of PLT on macrophages we assessed the expression of surface costimulatory molecules CD80 and CD86 on *L. amazonensis*-infected macrophages. BALB/c mice (*n* = 3) were euthanized under lidocaine (10 mg kg⁻¹ i.p.) and thiopental (100 mg kg⁻¹ i.p.) and the peritoneal cavity were harvested by washing the cavity with 3 mL of PBS. Peritoneal cells (2 × 10⁵ cells well⁻¹) were distributed in 96-well microplate and incubated overnight in RPMI medium at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. Then, the cells were washed with PBS to remove non-adherent cells, and adherent macrophages were infected with *L. amazonensis* (5 parasites cell⁻¹). Four hours later, the cultures were washed to remove not internalized *Leishmania* and cells were incubated with RPMI medium or with <3 kDa PLT at concentration of 3.25 µg of protein mL⁻¹ for 24 h. After that, cells were stained with monoclonal antibodies conjugated with anti-mouse CD80-Fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone 16-10A1; BIOGEMS, USA) or anti-mouse CD86-Phycoerythrin (PE) (clone GL1; BIOGEMS, USA), anti-CD14-FITC (clone Sa2-8; eBioscience). Thirty minutes after incubation, cells were resuspended in 0.4 mL of 1% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS and analyzed by flow cytometry. Fluorescent signals were collected in logarithmic mode (six decade logarithmic amplifier). Macrophages were identified and gated according to their forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) profiles related to the CD14 expression. The expression of CD80 and CD86 were evaluated in CD14+ macrophages, based on fluorescence-1 (FL1-FITC) vs. fluorescence 2 (FL2-PE) dot plots. A minimal of 20 000 events of gated cells was acquired for analysis. The analysis was performed using software FlowJo 7.6.3 (Becton Dickinson)

Quantification of NO and TNF-α production by macrophages

The NO production was quantified in the cell culture supernatants of *L. amazonensis*-infected macrophages using the Griess method (Romao *et al.* 1999) and the levels of TNF-α content was determined by ELISA kit (eBioscience, USA) in accordance with manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.) and were analyzed using the Kolmogorov–Smirnov normality test and one-way analysis of variance followed by Bonferroni's test. In all tests, differences were considered statistically significant when *P* < 0.05, and were performed using GraphPad Prism Software version 5.03. All experiments were performed two or three times and in quadruplicate.

The concentrations of bacterial culture fluids that cause 50% of macrophage cytotoxicity (CC₅₀) or parasite mortality (IC₅₀) were

determined by non-linear regression analysis using GraphPad Prism® 5.03 version software.

Results

Photorhabdus luminescens conditioned medium inhibits *L. amazonensis* growth

To test the toxicity of bacterial conditioned medium on parasites as first step, *L. amazonensis* promastigotes growth was analyzed *in vitro* in the presence of bacterial culture fluid. Our data show that metabolites secreted by *P. luminescens* in culture broth lead to a significant inhibition of parasite growth in both concentrations tested (Fig. 1A). Therefore, we will refer to the putative *Photorhabdus*-derived leishmanicidal toxin(s) as PLT in the following.

Leishmanicidal activity of *P. luminescens* conditioned medium on *L. amazonensis* promastigotes

PLT effectively killed the parasites in a concentration and time-dependent manner. It caused significant mortality even in the lowest concentration tested (0.68 µg mL⁻¹ of protein: 16.4% of mortality within 48 h) (Fig. 1B), whereas culture fluids of pathogenic *E. coli* as well as *E. faecalis* had no significant effect (data not shown). The IC₅₀ value of PLT on promastigotes of *L. amazonensis* was calculated to be 21.8 µg of protein mL⁻¹ (Table 1). As illustrated in Fig. 1C, PLT at concentration of 170 µg of protein mL⁻¹ led to total lysis of promastigotes.

Proteinase K treatment, heating, acidification and alkalization affect the leishmanicidal activity of photorhabdus-derived leishmanicidal toxin

To pre-characterize the chemical nature of the PLT, the conditioned medium was pre-treated by heating, with proteinase K, acidification and alkalization, respectively, before tested for leishmanicidal activity. As we can see in Fig. 2A, the leishmanicidal activity of PLT was drastically reduced after the treatment with proteinase K or heating (Fig. 2A). This reveals that the chemical nature of the leishmanicidal compound(s) in the conditioned medium is similar to a protein or a peptide. Regarding the effect of pH variation on leishmanicidal activity, the acidification of the bacterial fluid to pH 1.0 also caused a significant decrease in *Leishmania* mortality compared with respective non-treated *P. luminescens* conditioned medium (pH 8.0), whereas alkalization to pH 12.0 had no significant effect on leishmanicidal activity of *P. luminescens* culture fluids (Fig. 2A).

Enrichment of *P. luminescens* protein-based leishmanicidal compound

To characterize the size of the PLT, the cell-free culture of *P. luminescens* was initially submitted to ultrafiltration using 50, 10 and 3 kDa cut-off membranes. Higher levels of leishmanicidal activity of PLT were observed in the fraction corresponding to molecular weight smaller than 3 kDa (Fig. 2B). Therefore, we will refer to this fraction as <3 kDa-PLT in the following.

To further enrich the PLT, the ultra-filtrate from 10 kDa membrane (smaller than 10 kDa fraction) was fractionated by size exclusion chromatography yielding 42 fractions of 1 mL each which were tested against promastigotes of *L. amazonensis*. After separation using a Sephadex G-25 column, three major protein peaks were observed. From the 42 fractions, only the 10, 11 and 12 (Fig. 2C) showed potent leishmanicidal activity, causing 80.7, 98.2 and 69.2% of mortality, respectively. In the bioactive

fractions 10, 11 and 12, the amount of protein recovered was 20, 15 and 20 µg mL⁻¹, respectively (55 µg mL⁻¹ in total), corresponding to 24.67% of protein recovered.

PLT induces depolarization of the mitochondrial transmembrane potential of *L. amazonensis*

The effect of the PLT on the mitochondrial membrane potential was investigated. The treatment of parasites with <3 kDa-PLT at 3.25 µg of protein mL⁻¹ led to a significant decrease in the Rh 123 fluorescence after 12 h of incubation (Fig. 3A and 3B). Promastigotes treatment with <3 kDa-PLT induced ΔΨ_m depolarization with IV value of -0.18. As expected, the incubation of parasites with H₂O₂ at 2 mM caused potent depolarization of ΔΨ_m (IV = -0.43).

Photorhabdus luminescens conditioned medium present low cytotoxicity on macrophages and erythrocytes

To assess the cytotoxic effect of PLT, we tested its toxicity toward macrophages and erythrocytes. As depicted in Fig. 4A, PLT showed low cytotoxicity against macrophages. Only the highest protein concentrations (85 and 170 µg mL⁻¹) caused high levels of macrophage mortality. The concentration of PLT that causes 50% of macrophages cytotoxicity was determined as 85.48 µg mL⁻¹ (Table 1). Moreover, PLT also showed low cytotoxicity against human erythrocytes (Fig. 4B).

PLT stimulates the leishmanicidal activity of macrophages by mechanisms independent of NO and TNF-α production

Since *Leishmania* parasites survive and proliferate inside infected cells as amastigotes, we tested the effects of the bacterial culture fluids on intracellular *Leishmania*. Based on IC₅₀ value found for *P. luminescens* against promastigotes, the biological activity of PLT on intracellular amastigotes was investigated at concentrations ranging from 0.68 to 34 µg of protein mL⁻¹. It was verified that the PLT stimulated the leishmanicidal activity of macrophages reducing the amastigotes survival in an order of 15–85.5% (Fig. 5A). The IC₅₀ value obtained was 8.85 µg of protein mL⁻¹ and the selectivity index calculated as the ratio of CC₅₀ (macrophages cytotoxicity)/IC₅₀ (anti-amastigote activity) was close to 10 (SI = 9.66), indicating a moderate to high selectivity to amastigotes (Table 1). Comparatively, the enriched <3 kDa-PLT at concentration of 1.6 µg of protein mL⁻¹ caused almost 100% of amastigote mortality (Fig. 5A).

Unlike the leishmanicidal effect induced by stimulation with LPS/IFN-γ (85.2% mortality) that was NO-dependent, PLT or <3 kDa-PLT did not stimulate the NO production by *L. amazonensis*-infected macrophages (Fig. 5B). Moreover, the anti-amastigote activity induced by <3 kDa PLT fraction was not associated with the augment of costimulatory CD80 (control macrophages: Mean Fluorescence Intensity = 695.66 ± 0.57; *L. amazonensis* infected-macrophages: MFI = 696.3 ± 7.23; *L. amazonensis*-infected and <3 kDa-PLT-treated macrophages: MFI = 691.3 ± 6.02) and CD86 (control macrophages: MFI = 696.1 ± 8.71; *L. amazonensis* infected-macrophages: MFI = 696.53 ± 6.62; *L. amazonensis*-infected and <3 kDa-PLT-treated macrophages: MFI = 694.66 ± 5.50) molecules. On the other hand, in contrast to the stimulation of peritoneal macrophages with LPS (10 ng mL⁻¹) plus IFN-γ (10 ng mL⁻¹), the incubation of *L. amazonensis*-infected macrophages with <3 kDa-PLT at 3.25 µg of protein mL⁻¹ did not increase the TNF-α production (data not shown).

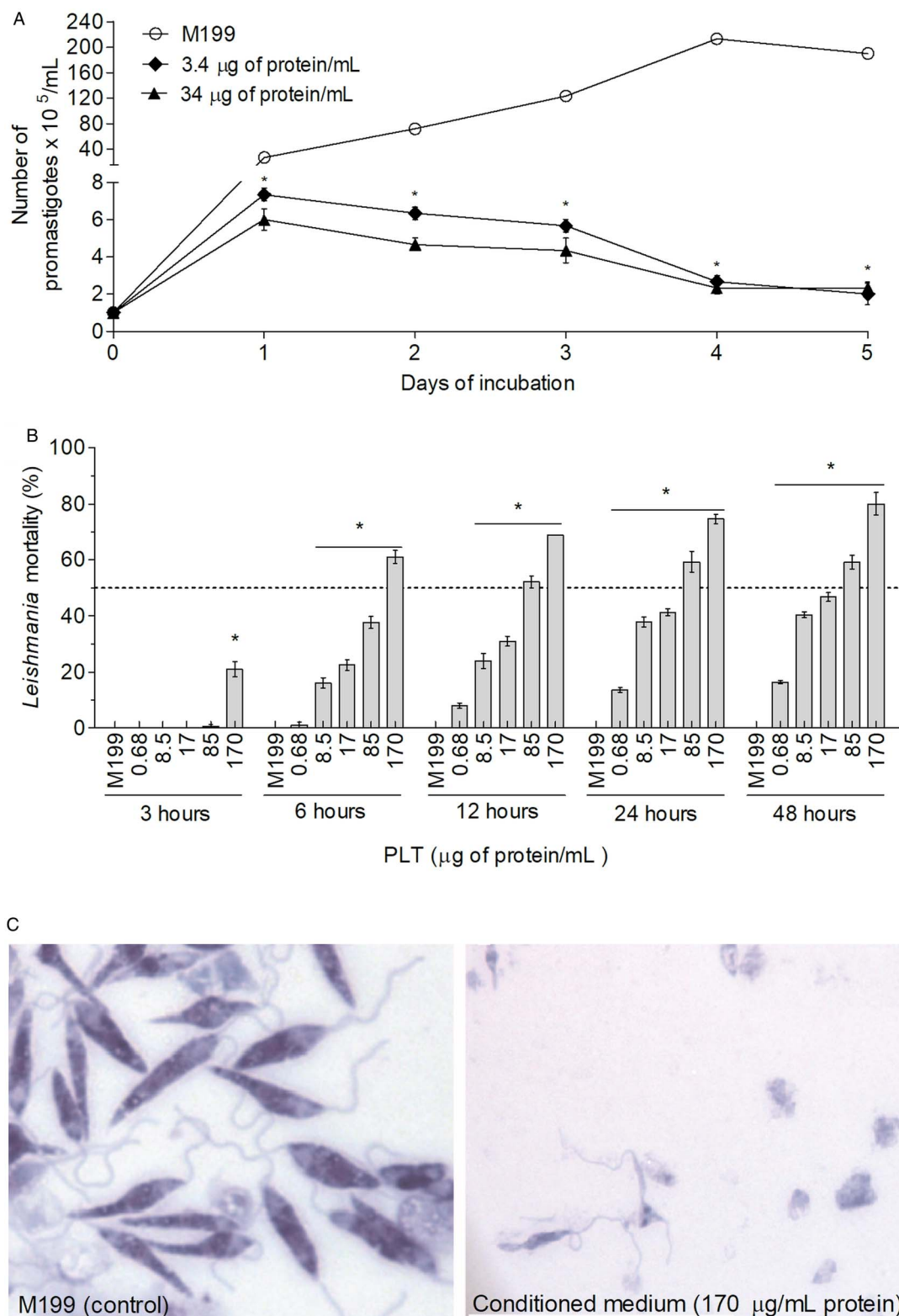


Fig. 1. Effect of PLT on *L. amazonensis* promastigotes. (A) Growth kinetics of promastigotes treated with PLT. Promastigote forms of *L. amazonensis* ($1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) in M199 medium (control) or M199 plus PLT (at 3.4 and 34 μg of protein mL^{-1}) were incubated at 26 °C and the parasite growth determined using a hemocytometer. (B) Leishmanicidal activity of PLT. *Leishmania amazonensis* ($3 \times 10^6 \text{ well}^{-1}$) were incubated in M199 medium (control) or M199 plus PLT in different concentrations of protein for 48 h. *Leishmania* survival was determined using a hemocytometer. Data are reported as means \pm s.e.m. ($n = 4$) and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control (M199 medium). (C) Effect of PLT on *L. amazonensis* integrity. Promastigote forms of *L. amazonensis* were treated with M199 medium or PLT at concentration of 170 μg of protein mL^{-1} for 48 h. *L. amazonensis* integrity after exposure to medium or PLT can be visualized in left and right panels, respectively (eosin-hematoxylin – 1000 \times magnification). PLT, *Photorhabdus*-derived leishmanicidal toxin.

Discussion

Photorhabdus bacteria contain a high number of genes that are assumed to encode enzymes involved in biosynthesis of novel secondary metabolites or bioactive compounds. Some of those novel

metabolites have already been investigated and found to be involved in symbiosis with the nematodes, insect pathogenicity or showed antimicrobial activity (Tobias *et al.* 2016). In the last decades, the chemical diversity of *Photorhabdus* metabolites has

Table 1. Leishmanicidal activity and macrophages cytotoxicity of *Photobhabdus*-derived leishmanicidal toxin at 48 h

	Promastigote, IC ₅₀ , μg mL ⁻¹ (95% CI)	Amastigote, IC ₅₀ , μg mL ⁻¹ (95% CI)	CC ₅₀ , μg mL ⁻¹ (95% CI)	SI _P	SI _A
PLT	21.80 (18.4–25.98)	8.85 (7.84–9.98)	85.48 (78.04–93.61)	3.92	9.66

IC₅₀ and CC₅₀: concentration of bacterial culture fluids that causes 50% of *L. amazonensis* mortality and 50% of macrophage cytotoxicity, respectively.
95% CI: 95% confidence interval.

SI_P and SI_A selectivity index for promastigotes and amastigotes respectively, calculated as ratio of CC₅₀ against mammalian cells/IC₅₀ against *L. amazonensis*.

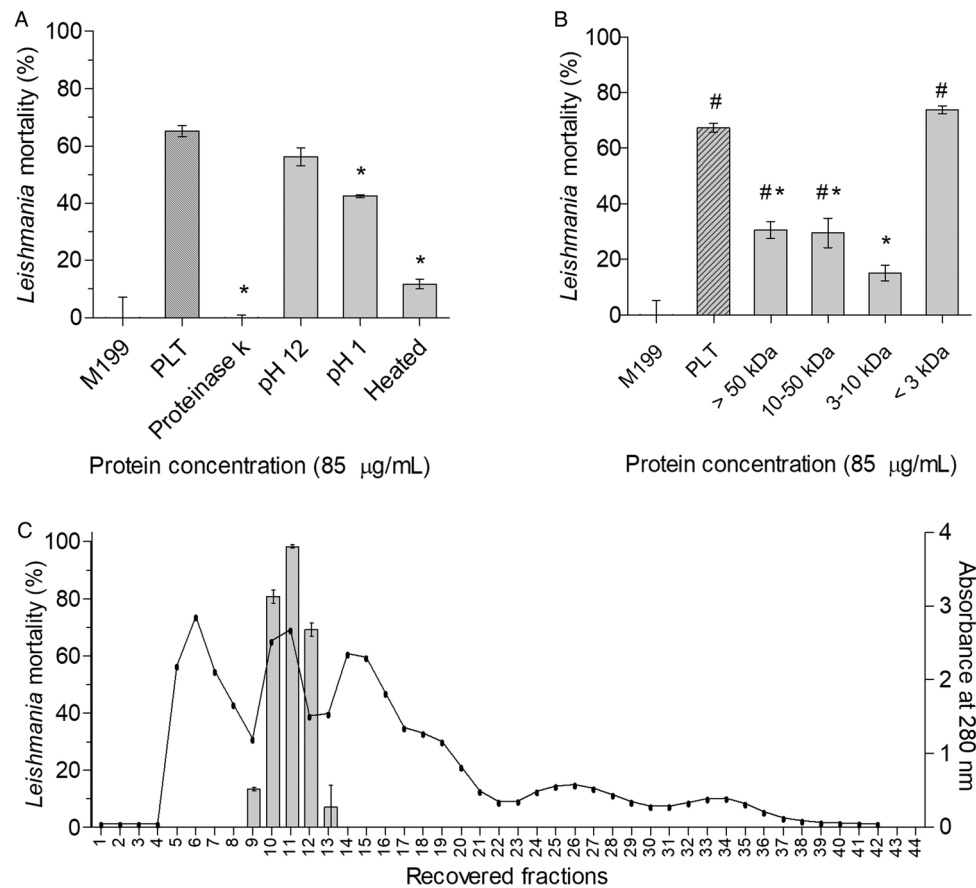


Fig. 2. Characterization and enrichment of PLT. (A) Effect of proteolysis, heating and pH changing on leishmanicidal activity of PLT. *Leishmania amazonensis* (3×10^6 promastigotes well⁻¹) were incubated for 24 h with M199 (control), untreated PLT ($85 \mu\text{g}$ of protein mL⁻¹), PLT treated with proteinase K, submitted to alkalization or acidification following to restoring to initial pH = 8.0, or with heated PLT. After 24 h of incubation, *Leishmania* mortality was determined using a hemocytometer. Data are reported as means \pm s.e.m. ($n = 4$) and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with untreated conditioned medium. (B) Anti-leishmanial activity of ultrafiltered PLT. Cell-free conditioned medium of *P. luminescens* culture was ultra-filtered through membranes of 50, 10 and 3 kDa exclusion size (Ultrafree CL, Millipore). After restoring each fraction to its initial volume, promastigote forms of *L. amazonensis* were incubated with $85 \mu\text{g}$ of protein mL⁻¹ of the conditioned medium of each fraction during 24 h. *Leishmania* survival was determined using a hemocytometer. Data are reported as means \pm s.e.m. ($n = 4$) and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with *P. luminescens* conditioned medium. # $P < 0.05$ compared with M199 medium. (C) Protein determination (line) and leishmanicidal activity (bars) of fractions eluted from Sephadex G-25 column. The smaller than 10 kDa ultra-filtrate fraction (total of $224 \mu\text{g}$ of protein) was eluted through size exclusion chromatography column and the amount of protein monitored at absorbance of 280 nm (line) and the leishmanicidal activity (mortality) of each recovered fraction was assessed at 24 h. Data are reported as means \pm s.e.m. ($n = 2$). PLT, *Photobhabdus*-derived leishmanicidal toxin.

been explored resulting in different classes of compounds. Furthermore, these bacteria have many gene clusters that encode enzymes apparently involved in secondary metabolism (Chaston et al. 2011). To the best of our knowledge, this is the first study reporting the leishmanicidal activity for *P. luminescens* secondary metabolites on both stages of *Leishmania* parasites. We demonstrated that PLT is effective to kill both promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*, one of the main agent of cutaneous leishmaniasis (Carvalho et al. 1994; Franca-Costa et al. 2012). Our data showed that *P. luminescens* secretes a small protein or a peptide with significant leishmanicidal activity (IC₅₀ promastigote = $21.87 \mu\text{g mL}^{-1}$; IC₅₀ amastigote = $8.85 \mu\text{g mL}^{-1}$). It is important to point out that we found an IC₅₀ value for the anti-*Leishmania* drug pentamidine of $16.85 \mu\text{g mL}^{-1}$ (95% CI = 11.95–23.80) for promastigote of *L. amazonensis*.

It is well known that *P. luminescens* produces a huge number of secondary metabolites, including lipases, phospholipases, proteases, which are active against insects, as well as bacteria and fungi, which makes them a promising source of novel therapeutics (Herbert and Goodrich-Blair, 2007; Bode, 2009; Waterfield et al. 2009; Kronenwerth et al. 2014; Tobias et al. 2016). Insecticidal activity of *P. luminescens* has been reported including *Aedes aegypti* larvae (LC₅₀ = 21.18% v/v) (Nielsen-LeRoux et al. 2012; da Silva et al. 2013, 2017) and *Galleria mellonella* larvae (LD₅₀ of 28 bacteria per larvae) (Wu et al. 2014). Moreover, Orozco et al. (2016) reported that metabolic crude extracts from *P. luminescens sonorensis* (Caborca and CH35 strains), at $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, presented variable antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas syringae* (radius of inhibition = 4.6–4.5 mm and 2.8–6.1, respectively for Caborca and CH35 strains). Additionally, in

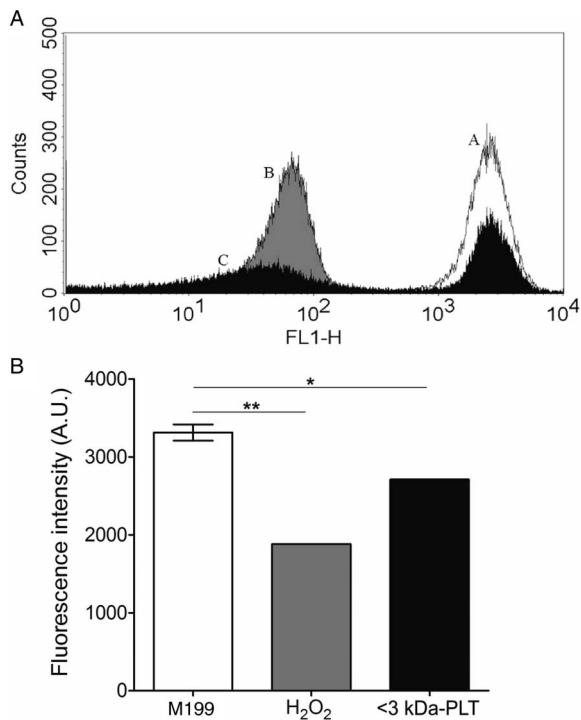


Fig. 3. Effect of <3 kDa PLT on mitochondrial membrane potential measured by flow cytometry. Histograms (A) and graphic representation of mean fluorescence intensity (B) in arbitrary units (A.U.) of *L. amazonensis* promastigotes untreated control (A – white), treated with 2 mM H₂O₂ (B – grey) or with <3 kDa-PLT (ultra-filtered fraction) at concentration of 3.25 µg of protein mL⁻¹ (C – black) for 12 h. Data represent mean ± S.E.M. and are representative of two independent experiments. **P* < 0.05 compared with M199 (control); ***P* < 0.001 compared with M199. PLT, *Photorhabdus*-derived leishmanicidal toxin.

another study with different bacterial genera (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, and *Bacillus*), an inhibition zone ranging from 7.7 to 14.3 mm was found depending on bacterial genus and *P. luminescens* strain (El-Sadawy *et al.* 2016). Moreover, it was reported that *P. luminescens* crude extract from strains CH35 and Caborca, at 40 µg mL⁻¹, also presented effect on *Fusarium oxysporum* with radius of inhibition of 3.6 and 4.0 mm, respectively (Orozco *et al.* 2016). Shi *et al.* (2017) tested 7 compounds extracted from *Photorhabdus temperate* SN259 against phytopathogenic fungi, and the compound

7,2-isopropyl-5-[(*E*)-2-phenylethenyl]benzene-1,3-diol presented the best activity against mycelial growth (IC₅₀ *Pythium aphanidermatum* = 2.0 µg mL⁻¹; IC₅₀ *Rhizoctonia solani* Kuhn = 6.3 µg mL⁻¹; IC₅₀ *Exserohilum turcicum* = 8.1 µg mL⁻¹; IC₅₀ *F. oxysporum* = 5.3 µg mL⁻¹). Although a number of reports on insecticidal and antimicrobial activities, few studies have investigated the antiparasitic effects of *Photorhabdus* species.

Our data indicate that the PLT are heat-labile peptide-based molecule(s), since heating almost completely abolished the leishmanicidal activity of PLT against promastigotes. In addition, the peptide nature was confirmed by the inactivation of its leishmanicidal activity by proteinase K treatment. In an attempt to characterize the chemical nature of the molecule(s) responsible for the leishmanicidal activity, we performed an enrichment of the PLT from the bacterial culture fluid. Our data suggest that PLT(s) are small peptide(s) with a molecular weight smaller than 3 kDa. However, the exact chemical nature of the leishmanicidal compound(s) remains to be elusive. It is known that *Photorhabdus* species produce a variety of linear peptide antibiotics, as mevalgmapptides and possibly carbapenem-like antibiotics, nonribosomal peptide synthetases (NRPS)-derived, as GameXPeptides, that showed anti-*Plasmodium* activity, and also polyketide synthase (PKS)-derived peptide, as stilbenes or anthraquinones (Brachmann and Bode, 2013; Challinor and Bode, 2015). NRPSs are multifunctional enzymes involved in the production of drugs as cyclosporine, penicillin and vancomycin for example. They modify side chains of amino acids into linear or cyclic amino acid derivatives (Sieber and Marahiel, 2005), due to these modifications and different amino acids, several different non-ribosomally derived peptides are known (Cai *et al.* 2017). Naturally occurring peptide libraries include the cyanobactins (Donia *et al.* 2008), polylysine (Maruyama *et al.* 2012) and streptothricin (Yamanaka *et al.* 2008) derivatives from different microorganisms. Cai *et al.* (2017) also describe rhabdopeptide/xenortide class of non-ribosomally derived peptides (RXPs) in entomopathogenic bacteria as the largest class of peptides derived from NRPSs, composed of 2–8 amino acids with an overall molecular weight range between 395 Da and 1054 Da. Bode *et al.* (2015) described the bioactivity of mevalgmapptides (from *P. luminescens*) and others RXPs against different protozoa (IC₅₀: *Trypanosoma brucei rhodesiense* 129.7 µM; *Trypanosoma cruzi* Tulahuen C4 118.0 µM; *L. donovani* 60.7 µM; *Plasmodium falciparum* NF 54 38.4 µM) and mammalian cells (IC₅₀ Rat L6 cells >150 µM).

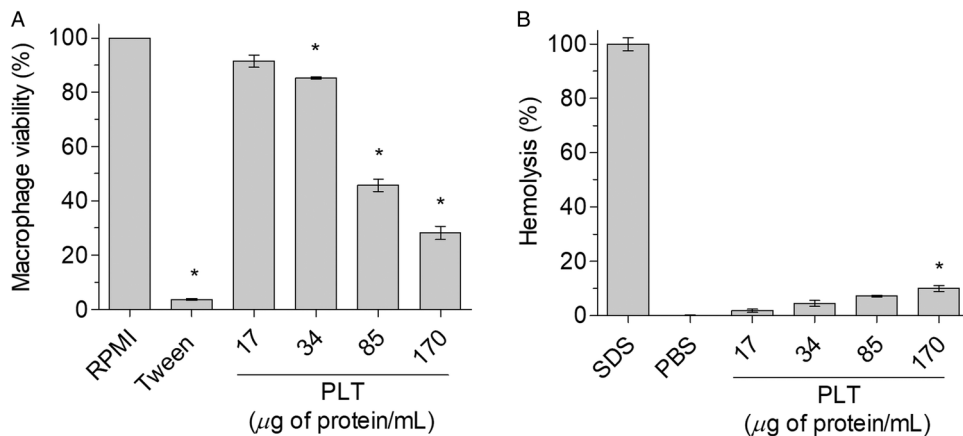


Fig. 4. Cytotoxic effects of *P. luminescens* conditioned medium on macrophages (A) and erythrocytes (B). (A) Macrophages were treated with RPMI medium (control) or bacterial conditioned medium (8.5–170 µg of protein mL⁻¹) and the cell viability were determined by MTT assay after 48 h of incubation. (B) Hemolytic activity was performed using human erythrocytes incubated with *P. luminescens* conditioned medium, PBS (negative control) or SDS 0.01% (positive control) for 60 min. Hemolysis was determined by measuring the absorbance of the cells supernatants at 540 nm. Data are expressed as means ± S.E.M. of four replicates and are representative of three independent experiments. **P* < 0.05 compared with RPMI medium (panel A) or PBS (panel B). PBS, phosphate buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulphate.

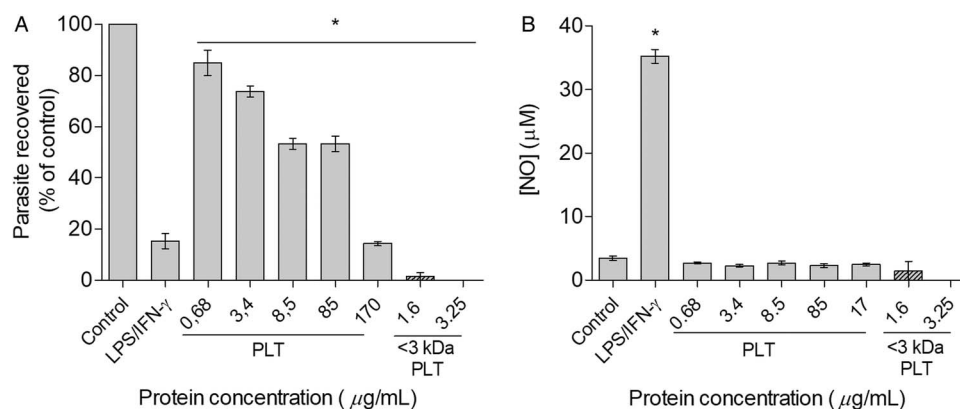


Fig. 5. Effects of PLT on the viability of amastigotes of *L. amazonensis* and nitric oxide production *in vitro*. Macrophages were infected with *L. amazonensis* and incubated in the presence of M199 medium (control), LPS (10 ng mL⁻¹) plus IFN-γ (10 ng mL⁻¹), PLT (0.68–34 µg of protein mL⁻¹) or <3 kDa PLT (1.6 and 3.25 µg of protein mL⁻¹). After 48 h cells were lysed for the parasite viability determination as described in materials and methods (A) and the supernatant was used for NO measurement using Griess method. Data are expressed as means ± s.e.m. of four replicates and are representative of three independent experiments. **P* < 0.05 compared with control (M199 medium). PLT, *Photorhabdus*-derived leishmanicidal toxin; IFN-γ, interferon γ.

Depending on the biological environment, these secreted compounds are thought to have different effects, as isopropylstilbene that can act as an antibiotic against fungi and bacteria as well as being cytotoxic to insect cells. Kronenwerth *et al.* (2014) demonstrated that stilbene derivatives 13 and 14 were active against *L. donovani* with IC₅₀ values of 3.71 and 7.47 µM, respectively and *T. cruzi* (IC₅₀ values of 16.3 and 8.80 µM, respectively). However, in contrast to our data, these compounds presented high cytotoxicity on L6 cells, a myoblast cell line and they are therefore not suitable as a potential drug against leishmaniasis. The authors did not describe the parasite stage used in the study, but they highlighted the potential of stilbene compounds on pathogenic protozoa.

To evaluate more precisely the leishmanicidal potential of the PLT we also investigated the effect on intracellular amastigote forms. We showed that PLT reduces the intracellular survival of *L. amazonensis* in a dose-dependent manner by a mechanism independent of NO. Some authors, including our group, have demonstrated that reactive oxygen and nitrogen species plays important role in the parasite control (Fonseca *et al.* 2003; Degrossoli *et al.* 2011; Novais *et al.* 2014). Moreover, activated macrophages produce several proteolytic enzymes in the phagolysosome that destroy microorganisms (Houghton *et al.* 2009; Weiss and Schaible, 2015) and also produces peroxynitrite a highly reactive oxidizing agent that destroy *Leishmania* (Giorgio *et al.* 1996).

Considering that in mammalian host, the promastigotes of *Leishmania* inoculated by sandflies during the bite infect immune cells and differentiate into amastigotes inside the phagolysosomal vacuoles (Sacks and Kamhawi, 2001; Chappuis *et al.* 2007), the cytotoxic effects of PLT on macrophages was evaluated. Our data showed that the metabolite(s) secreted by *P. luminescens* presented a slight toxicity on macrophages (more than 85% of viability at 34 µg mL⁻¹ and IS = 9.66) and human erythrocytes (less than 10% of hemolysis at highest concentration tested), indicating a moderate to good safety profile of cytotoxicity (Oh *et al.* 2014). In this regard, we found that the SI of PLT for amastigotes was higher than those calculated for promastigotes, indicating a higher selectivity of PLT for amastigotes. Moreover, the <3 kDa ultra-filtered PLT at concentration that inhibited the amastigote survival in almost 100% did not cause any cytotoxicity against macrophages.

The maintenance of mitochondrial membrane potential is vital for metabolic process as well as for cell survival. Thus, we investigated the effects of PLT fraction smaller than 3 kDa on mitochondrial membrane potential of *L. amazonensis* using rhodamine 123, which accumulates in energized mitochondria. In our study, the treatment of promastigotes of *L. amazonensis*

for 12 h with <3 kDa PLT caused significant mitochondrial transmembrane depolarization. The decrease in Rh 123 fluorescence suggests an increase in proton permeability across the inner mitochondrial membrane, which can lead to parasite death due to decreased ATP synthesis (Rodrigues *et al.* 2014; Garcia *et al.* 2017). Indeed, *Leishmania* mitochondria is a target extensively explored, being essential to its survival (Sen *et al.* 2007; de Souza and Rodrigues, 2009). Thereby, experimental evidences showed that antileishmanial drugs such as amphotericin B and pentamidine causes ΔΨ_m decrease and collapses respectively (Lee *et al.* 2002).

In summary, here we demonstrated that *P. luminescens* metabolite(s) inhibited the parasite growth, presented potent leishmanicidal activity against promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and low cytotoxicity to the host cells. The enrichment and first characterization of the chemical nature of PLT suggest that it seems to be related to a peptide molecule, which can induce macrophages control of intracellular parasites by a mechanism independent of NO, as well as acts on parasite causing mitochondrial dysfunction. In summary, our results further indicate that these PLT are promising candidates for chemotherapeutics against leishmaniasis.

Acknowledgements. The authors thank Dr Marisa da Costa for technical support with bacterial cultures, Dr Tiana Tasca, Dr Marilise Brittes Rott and Dr Adriana Seixas for scientific advices and Dr Josiane Somariva Prophiro for technical and scientific support with parasite cultures. They also thank Dr Vivian de Oliveira Nunes Teixeira, MSc. Gilson Pires Dorneles and Raisha Costa Martins for technical support with bioassays.

Financial support. The authors are grateful to the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support. PRTR and AB also thank CNPq for fellowships. Research of R.H. was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HE 5247/4-2).

Author disclosure statement. The authors declare that this article content has no conflict of interest.

References

Bizani D and Brandelli A (2002) Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 512–519.

- Bode E, Brachmann AO, Kegler C, Simsek R, Dauth C, Zhou Q, Kaiser M, Klemmt P and Bode HB (2015) Simple 'on-demand' production of bioactive natural products. *Chembiochem* **16**, 1115–1119.
- Bode HB (2009) Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**, 224–230.
- Brachmann AO and Bode HB (2013) Identification and bioanalysis of natural products from insect symbionts and pathogens. In Vilcinskas A (ed.). *Yellow Biotechnology I-Insect Biotechnology in Drug Discovery and Preclinical Research*, vol. 135. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 123–155.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Cai X, Nowak S, Wesche F, Bischoff I, Kaiser M, Fürst R and Bode HB (2017) Entomopathogenic bacteria use multiple mechanisms for bioactive peptide library design. *Nature Chemistry* **9**, 379–386. <http://www.nature.com/nchem/journal/v9/n4/abs/nchem.2671.html#supplementary-information>.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A and Marsden P (1994) Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* **56**, 315–325.
- Castellani A and Chalmers AJ (1919) *Manual of Tropical Medicine*. 3rd edn. New York: William Wood, 2436 pp.
- Challinor VL and Bode HB (2015) Bioactive natural products from novel microbial sources. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1354**, 82–97.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J and Boelaert M (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* **5**, 873–882.
- Chaston JM, Suen G, Tucker SL, Andersen AW, Bhasin A, Bode E, Bode HB, Brachmann AO, Cowles CE, Cowles KN, Darby C, de Leon I, Drace K, Du Z, Givaudan A, Herbert Tran EE, Jewell KA, Knack JJ, Krasomil-Osterfeld KC, Kukor R, Lanois A, Latreille P, Leimgruber NK, Lipke CM, Liu R, Lu X, Martens EC, Marri PR, Medigue C, Menard ML, Miller NM, Morales-Soto N, Norton S, Ogier JC, Orchard SS, Park D, Park Y, Quorollo BA, Sugar DR, Richards GR, Rouy Z, Slominski B, Slominski K, Snyder H, Tjaden BC, van der Hoeven R, Welch RD, Wheeler C, Xiang B, Barbazul B, Gaudriault S, Goodner B, Slater SC, Forst S, Goldman BS and Goodrich-Blair H (2011) The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS ONE* **6**, e27909.
- Cragg GM and Newman DJ (2013) Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3670–3695.
- Dagnino AP, Barros FMCd, Ccana-Ccapatinta GV, Prophiro JS, Poser GLV and Romão PRT (2015) Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* species. *Phytomedicine* **22**, 71–76.
- da Silva OS, Prado GR, da Silva JL, Silva CE, da Costa M and Heermann R (2013) Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* **112**, 2891–2896.
- da Silva JL, Undurraga Schwalm F, Eugenio Silva C, da Costa M, Heermann R and Santos da Silva O (2017) Larvicidal and growth-inhibitory activity of entomopathogenic bacteria culture fluids against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology* **110**, 378–385.
- Degrossoli A, Arrais-Silva WW, Colhone MC, Gadelha FR, Joazeiro PP and Giorgio S (2011) The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. *Scandinavian Journal of Immunology* **74**, 165–175.
- de Souza W and Rodrigues JC (2009) Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* **2009**, 642502.
- Donia MS, Ravel J and Schmidt EW (2008) A global assembly line for cyanobactins. *Nature Chemical Biology* **4**, 341–343.
- El-Sadawy HA, Forst S, Abouelhag HA, Ahmed AM, Alajmi RA and Ayaad TH (2016) Molecular and phenotypic characterization of two bacteria, *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* HRM1 and HS1 isolated from two entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis indica* RM1 and *Heterorhabditis* sp. S1. *Pakistan Journal of Zoology* **48**, 51–58.
- Ferlini C and Scambia G (2007) Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange. *Nature Protocols* **2**, 3111–3114.
- Fischer-Le Saux M, Viallard V, Brunel B, Normand P and Boemare NE (1999) Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic Microbiology* **49**(Pt 4), 1645–1656.
- Fonseca SG, Romao PR, Figueiredo F, Morais RH, Lima HC, Ferreira SH and Cunha FQ (2003) TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology* **33**, 2297–2306.
- Franca-Costa J, Wanderley JL, Deolindo P, Zarattini JB, Costa J, Soong L, Barcinski MA, Barral A and Borges VM (2012) Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PLoS ONE* **7**, e36595.
- Garcia FP, Henrique da Silva Rodrigues J, Din ZU, Rodrigues-Filho E, Ueda-Nakamura T, Auzely-Velty R and Nakamura CV (2017) A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. *Apoptosis* **22**, 57–71.
- Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K, Mshvildadze V and Pichette A (2009) Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, 2002–2008.
- Giorgio S, Linares E, de Capurro ML, de Bianchi AG and Augusto O (1996) Formation of nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine during murine leishmaniasis. *Photochemistry Photobiology* **63**, 750–754.
- Herbert EE and Goodrich-Blair H (2007) Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 634–646.
- Houghton AM, Hartzell WO, Robbins CS, Gomis-Ruth FX and Shapiro SD (2009) Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature* **460**, 637–641.
- Kondo S, Mizuki E, Akao T and Ohba M (2002) Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitology Research* **88**, 1090–1092.
- Kronenwerth M, Brachmann AO, Kaiser M and Bode HB (2014) Bioactive derivatives of isopropylstilbene from mutasynthesis and chemical synthesis. *Chembiochem* **15**, 2689–2691.
- Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R and Nakhasi HL (2002) Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differentiation* **9**, 53–64.
- Maruyama C, Toyoda J, Kato Y, Izumikawa M, Takagi M, Shin-ya K, Katano H, Utagawa T and Hamano Y (2012) A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in streptothricin biosynthesis. *Nature Chemical Biology* **8**, 791–797.
- Nielsen-LeRoux C, Gaudriault S, Ramarao N, Lereclus D and Givaudan A (2012) How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current Opinion in Microbiology* **15**, 220–231.
- Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, Carvalho EM and Scott P (2014) Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *Journal of Infectious Diseases* **209**, 1288–1296.
- Oh S, Kim S, Kong S, Yang G, Lee N, Han D, Goo J, Siqueira-Neto JL, Freitas-Junior LH and Song R (2014) Synthesis and biological evaluation of 2,3-dihydroimidazo[1,2-a]benzimidazole derivatives against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **84**, 395–403.
- Orozco RA, Molnar I, Bode H and Stock SP (2016) Bioprospecting for secondary metabolites in the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **141**, 45–52.
- Rodrigues JHdS, Ueda-Nakamura T, Corrêa AG, Sangi DP and Nakamura CV (2014) A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benzimidazole, against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* **9**, e85706.
- Romao PR, Fonseca SG, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH and Cunha FQ (1999) Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. *Parasitology* **118**, 559–566.
- Romao PR, Tovar J, Fonseca SG, Moraes RH, Cruz AK, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH and Cunha FQ (2006) Glutathione and

- the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **39**, 355–363.
- Sacks D and Kamhawi S** (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology* **55**, 453–483.
- Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P and Chatterjee M** (2007) Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Medical Microbiology* **56**, 1213–1218.
- Shi D, An R, Zhang W, Zhang G and Yu Z** (2017) Stilbene derivatives from *photorhabdus temperata* SN259 and their antifungal activities against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**, 60–65.
- Shrestha YK and Lee KY** (2012) Oral toxicity of *Photorhabdus* culture media on gene expression of the adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 91–96.
- Sieber SA and Marahiel MA** (2005) Molecular mechanisms underlying non-ribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical Reviews* **105**, 715–738.
- Sundar S** (2001) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health* **6**, 849–854.
- Tobias NJ, Mishra B, Gupta DK, Sharma R, Thines M, Stinear TP and Bode HB** (2016) Genome comparisons provide insights into the role of secondary metabolites in the pathogenic phase of the *Photorhabdus* life cycle. *BMC Genomics* **17**, 537.
- Waterfield NR, Ciche T and Clarke D** (2009) *Photorhabdus* and a host of hosts. *Annual Review of Microbiology* **63**, 557–574.
- Weiss G and Schaible UE** (2015) Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological Reviews* **264**, 182–203.
- World Health Organization** (2010) *Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wu G, Zhao Z, Liu C and Qiu L** (2014) Priming *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photorhabdus luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process. *Journal of Economic Entomology* **107**, 559–569.
- Xu Z, Yao B, Sun M and Yu Z** (2004) Protection of mice infected with *Plasmodium berghei* by *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Parasitology Research* **92**, 53–57.
- Yamanaka K, Maruyama C, Takagi H and Hamano Y** (2008) Epsilon-poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase. *Nature Chemical Biology* **4**, 766–772.
- Zhou Q, Grundmann F, Kaiser M, Schiell M, Gaudriault S, Batzer A, Kurz M and Bode HB** (2013) Structure and biosynthesis of xenoamicins from entomopathogenic *Xenorhabdus*. *Chemistry – A European Journal* **19**, 16772–16779.

5.2. Artigo 2 – Manuscrito: Trypanocidal and immunomodulatory activity of entomobacteria

Submetido à Parasitology Research

ISSN: 0932-0113 (impresso) 1432-1955 (online)

1 **Trypanocidal and immunomodulatory activity of enterobacteria**

2 Ana Maria Antonello^a, Thaís Sartori^a, Matheus da Silva Brasil^d, Harry Luiz Pilz-Junior^a;
3 Ralf Heermann^c, Onilda Santos da Silva^{a*}, Pedro Roosevelt Torres Romão^{d*}

4

5 **ABSTRACT**

6 Only two drugs are currently available for treatment of Chagas disease and their
7 effectiveness are unsatisfactory. In the effort to find new sources to control the disease,
8 there are *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila*, two entomobacteria
9 highly pathogenic to a broad range of insects by producing huge numbers of secondary
10 metabolites with toxic effects on eukaryotic cells. Therefore, we tested the activity of
11 secreted metabolites against *Trypanosoma cruzi* and *in vitro*. The conditioned medium of
12 these bacteria showed significant parasitocidal activity in a concentration-dependent
13 manner ($IC_{50} XN = 0.34$ mg/mL, $IC_{50} PL = 1.0$ mg/mL). The parasitocidal compound is a
14 small molecule stable to heating and pH changes ranging from 2 to 12. Moreover, anti-
15 *Trypanosoma* molecules secreted by both bacteria stimulate the parasitocidal activity of
16 macrophages by a mechanism independent of nitric oxide. Summarizing, our studies
17 reveal that *P. luminescens* and *X. nematophila* are potential sources of putative novel
18 drugs against Chagas disease.

19

20

21

22

23 INTRODUCTION

24 There is almost a century of Chagas disease discover and it still is a serious health and
25 economic problem in Latin America. The World Health Organization's (WHO, 2017)
26 reported that about 6 to 7 million people worldwide, especially in Latin America, are
27 infected with *Trypanosoma cruzi*, the protozoa that causes Chagas disease.

28 Chagas disease is considered a zoonotic disease. Some studies have shown this
29 prevalence and incidence is associated with the presence of infected dogs or cats in the
30 household. (Gürtler *et al.*, 2007). In endemic areas, the transmission occurs through
31 infected bloodsucking insects. Though the most common transmission is through the
32 feces of insect vectors lead to a chronic disease, the oral infection has become the most
33 frequent cause of acute cases of Chagas disease (Alarcón de Noya *et al.*, 2016) usually
34 coming up as outbreaks with difficult diagnose and high mortality.

35 *Trypanosoma cruzi* infect their hosts as trypomastigote forms and, once in the in
36 the cytoplasm of host cells replicates as amastigotes and establishes a chronic, low-grade,
37 lifelong infection, which can undergo to cardiomyopathy and lead to a fatal
38 course. Among chronicle infected people, until 30% can develop cardiac problems (Viotti
39 *et al.*, 2009; WHO, 2017). Up to now there is no effective vaccine against the pathogen
40 and the chemotherapy, based on the two only available drugs, benzimidazole or
41 nifurtimox (Viotti *et al.*, 2014; WHO, 2017) is unadequed and patients usually
42 discontinue the treatment because of adverse events (Maya *et al.*, 2007; Morillo *et al.*,
43 2015), highlighting the need to find or develop a drug with higher trypanocidal activity
44 and less toxic to the host.

45 There has been a renewed interest in natural compounds derived from plants and
46 microorganisms as source of new drugs for Chagas disease (Cragg & Newman, 2013;
47 Dagnino *et al.*, 2015; Kondo *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2013). In this

48 context, entomopathogenic bacteria such as *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus*
49 *nematophila* have been considered as a promising source for novel natural compounds
50 (Bode, 2009). These bacteria carry numerous gene clusters in their DNA encoding
51 putative biosynthetic enzyme pathways that can produce several compounds with
52 biological activities. Exploring these molecules lead to different classes of compounds
53 (Chaston *et al.*, 2011) with activity against microorganisms of medical and agricultural
54 interest (Challinor & Bode, 2015). For example, there are xenoamicins class from
55 *Xenorhabdus mauleonii*, active against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei*
56 *rhodesiense* (Zhou *et al.*, 2013), chaiyaphumines from *Xenorhabdus* sp. against *P.*
57 *falciparum* (Grundmann *et al.*, 2014), szentiamide (1) a from *Xenorhabdus szentirmaii*
58 against *P. falciparum*, *T. b. rhodesiense* and *Leishmania (Leishmania) donovani*
59 (Nollmann *et al.*, 2012), against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*
60 (Kronenwerth *et al.*, 2014) or with anti-*Plasmodium* activity (so called GameXPeptides)
61 (Challinor & Bode, 2015). Peptide of *P. luminescens* inhibited the parasite growth and
62 showed significant leishmanicidal activity against promastigote and amastigotes of *L.*
63 *amazonensis* (Antonello *et al.*, 2017).

64 Although these studies are showing the biological activity of *P. luminescens*
65 and/or *X. nematophila* secreted compounds against *L. donovani*, *L. amazonensis* and *T.*
66 *cruzi* and *P. falciparum* activity, the anti-parasitic effect of most metabolites produced by
67 these bacteria are under-explored. Considering the current problems related to anti-
68 *Trypanosoma* drugs and the increasing needing for alternatives control, here we
69 investigated the bioactivity of cell-free conditioned medium from *P. luminescens* and *X.*
70 *nematophila* against both trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*.

71

72 MATERIAL AND METHODS

73 **Bacteria cultures and conditioned media**

74 *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 DSM15139 (Fischer-Le Saux *et al.*,
75 1999) and *Xenorhabdus nematophila* ATCC 19061 (Thomas & Poinar, 1979) were used
76 for the conditioned media preparation to perform the trypanicidal bioassays as Antonello
77 *et al.* (2017). Briefly, each bacteria were inoculated on NBTA medium [nutrient agar
78 supplemented with 0.025% (w/v) bromothymol blue and 0.004% (w/v)
79 triphenyltetrazolium chloride] in order to differentiate phenotypic phase variants 1 and 2.
80 A single colony in primary phase was grown in 5YS medium broth as a start-culture as
81 described before (Shrestha & Lee, 2012) [5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) NaCl,
82 0.05% (w/v) K₂HPO₄, 0.05% (w/v) NH₄H₂PO₄, 0.02 % (w/v) MgSO₄ 7H₂O] on a shaker
83 (180 rpm) at 28°C. An overnight incubation followed and the bacterial density was
84 determined by absorbance at 600 nm. The main culture was started at OD₆₀₀ = 0.1. It was
85 incubated for 48 hours until the stationary phase. Bacterial cells were removed by
86 centrifugation and 0.22 µm filter-sterilizing membrane and kept at -20°C until use. The
87 concentration of each conditioned medium was determined by weighing conditioned
88 medium after lyophilization.

89

90 ***Trypanosoma cruzi* culture**

91 *Trypanosoma cruzi* Y strain ceded by Dr. Phileno Pinge-Filho (Universidade Estadual de
92 Londrina) were cultured in LLCMK2 cells (dos Santos *et al.*, 2012; Hull *et al.*, 1962) in
93 RPMI medium enriched with bovine fetal serum and maintained in 0.5% CO₂ at 37°C.

94

95 **Anti-trypomastigote activity of conditioned media**

96 To assess the effect of each conditioned media directly on trypomastigote forms, we
97 inoculate the parasites in 96 well plates with conditioned media of each bacterium (0.15
98 to 7.25 mg/mL - *P. luminescens*; 0.24 to 2.4 mg/mL - *X. nematophila*) or only culture
99 medium as control. Parasite mortality was accessed up to 24 hours.

100 To carry it on, tripomastigotes were harvested by centrifugation of supernatant culture
101 at 900 rpm for 10 minutes. After discard the pellet, with cells debris and amastigote forms,
102 it undergone to a second centrifugation at 4000 rpm for 30 minutes. Then the supernatant
103 was discarded and the remaining pellet resuspended and 1×10^5 trypomastigotes/well
104 were distributed in 96-well microplate with conditioned media in the tested
105 concentrations and only RPMI medium for control. The microplate was maintained in 5%
106 CO₂ atmosphere at 37°C until time points of 3, 6, 12, 24 and 48 hours.

107

108 **Cytotoxic effect - conditioned media toxicity toward macrophages and hemolytic**
109 **effect**

110 The cytotoxic effect of bacterial metabolites was performed as described before by
111 Antonello *et al.* (2017). Macrophages cell line RAW 264.7 were maintained in RPMI
112 1640 plus 10% FBS, 100 U/mL penicillin and streptomycin (100 µg/mL). The bioassays
113 were performed as follow: 1×10^5 cells/well were distributed in 96-well microplates and
114 incubated overnight at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Plates were washed with PBS and
115 cultured for 48 h in RPMI or different concentrations of bacterial conditioned media (1.45
116 to 14.5 mg/mL- *P. luminescens*; 1.2 to 12 mg/mL – *X. nematophila*). After that,
117 macrophages viability was measured by a colorimetric assay using 3-[4,5-

118 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at final concentration of
119 1 mg/mL. The purple formazan product formed by the action of mitochondrial enzymes
120 in living cells was solubilized by the addition of acidic isopropanol (HCl 0.04 N), and the
121 absorbance was measured using a Spectramax M2 at 570 nm (Romao *et al.*, 1999).
122 Conditioned media concentration causing 50% of macrophage cytotoxicity (CC₅₀) and
123 50% of parasite mortality (IC₅₀) was determined by non-linear regression analysis using
124 GraphPad Prisma[®] version 5.0. The selectivity index (SI) of bacterial supernatants was
125 determined considering the following equation: $SI = CC_{50} \text{ macrophage} / IC_{50} \text{ parasite}$.

126 The hemolysis assay was performed according to Gauthier *et al.* (2009) with some
127 modifications. Briefly, human type O+ blood within EDTA was centrifuged at 2000 rpm
128 for 5 min and resuspended in PBS to obtain a 1% (v/v) erythrocytes solution. This solution
129 was plated in a 96-well microplate and different concentrations of conditioned media
130 (1.45 to 14.5 mg/mL- *P. luminescens*; 1.2 to 12 mg/mL – *X. nematophila*) or PBS (as
131 negative) and SDS 0.01% solution (as positive control) was added to obtain a final
132 erythrocyte concentration of 0.8% (v/v). Microplates were incubated at 37 °C on an
133 orbital shaker for 60 min. Afterward, it was centrifuged at 3000 rpm for 5 min and the
134 supernatant of each well was transferred to a new microplate. Absorbance of the
135 supernatant was measured at 540 nm with a (Spectramax[®] M2). Each experiment was
136 carried out twice in triplicate.

137

138 **Trypanocidal activity of macrophages stimulated with bacterial conditioned** 139 **media**

140 To access the bacterial metabolites against *T. cruzi* amastigote forms, RAW macrophages
141 were incubated in 12-wells plate containing a cover lip in the bottom of each well. In each

142 well, 2×10^5 macrophages were incubated overnight and trypomastigote forms were added in
143 a rate 5 parasites: 1 macrophage. Following a second overnight incubation each well was
144 washed with PBS, in order to remove trypomastigote forms and the conditioned media
145 was added in different concentrations (0.72 to 3 mg/mL- *P. luminescens*; 1.2 to 4.8
146 mg/mL – *X. nematophila*). For macrophage activating control, only RPMI was used as
147 negative control or IFN- γ (10 ng/mL) plus TNF- α (10 ng/mL) as positive control. After
148 48 hour of incubation, the supernatant of each well was harvested to measure the nitric
149 oxide (NO) concentration by Griess reaction Romao et al. (1999). The cover lips were
150 withdrawn and stained with haematoxylin-eosin stain. One hundred macrophages were
151 counted by haemocytometer. The percentage of infected cell ($MO_{\text{infected}}/MO_{\text{total}}$) and the
152 number of amastigote per macrophage ($\text{amastigotes}/MO_{\text{infected}}$) were determined to
153 calculate the infection index which was the product of infected macrophages by the
154 number of amastigotes per macrophage [$MO_{\text{infected}} \times (\text{Amastigote}/MO_{\text{infec}})$].

155

156 **Effect of temperature, pH changing and proteolytic enzyme on anti-** 157 **trypomastigote compounds**

158 To assess the effect of different conditions on bacterial metabolites the assays were
159 performed as described before by Antonello *et al.* (2017). The stability of anti- *T. cruzi*
160 metabolites in high temperature was evaluated by heating each conditioned media at
161 100°C for 10 minutes. The effect of pH was assessed by acidification of the conditioned
162 medium pH 2 (5 M HCl) and alkalization to pH 12 (5 M NaOH). The solutions were
163 incubated for 40 minutes and the pH was adjusted to its initial value (pH 8). Conditioned
164 media were also treated with proteinase K at 2 mg/mL final concentration for 40 min
165 (Bizani & Brandelli, 2002). All bioassays were performed with *P. luminescens*
166 conditioned medium at concentration of 3 mg/mL or *X. nematophila* conditioned medium

167 at 5 mg/mL.

168

169 **RESULTS**

170 **Trypanocidal activity of the conditioned media**

171 Both bacterial conditioned media, *P. luminescens* and *X. nematophila*, effectively killed
172 the trypomastigote forms in a concentration-dependent (Fig. 1). Trypomastigote mortality
173 was detected in after 3 hours of incubation. After 24 hours, even the lowest concentration
174 lead to a significant mortality in both conditioned media (Fig. 1). The IC₅₀ in
175 trypomastigotes was 1.0 mg / mL for *P. luminescens* and 0,34 mg / mL for *X. nematophila*
176 conditioned medium (Tabel 1).

177

178 **Conditioned media present low cytotoxicity on macrophages and erythrocytes**

179 The cytotoxic effect of each conditioned media in macrophages RAW and human
180 erythrocytes was also verified. As it is showed in Fig. 2A, both conditioned media
181 showed low cytotoxicity against macrophages. Only the highest concentrations (*P.*
182 *luminescens* = 7.5 and 14.5 mg/mL and *X. nematophila* = 4.8 and 12 mg/mL) lead to
183 considerable mortality. The concentration leading to 50% of macrophages cytotoxicity
184 was determined as 7.23 mg/mL for *P. luminescens* and 4.82 mg/mL for *X. nematophila*
185 conditioned medium (Table 1). Moreover, both conditioned media also showed low
186 cytotoxicity against human erythrocytes (Fig. B), showing significant hemolysis only at
187 highest concentrations used.

188 The selective index values (macrophages CC_{50} /amastigotes IC_{50}) for *P. luminescens*
189 and *X. nematophila* were determined as 7.23 and 14.17, respectively, indicating that both
190 bacteria displayed marked parasite selectivity.

191

192 **Bacterial conditioned medium stimulate trypanocidal activity of macrophages**
193 **by mechanisms independent of nitric oxide**

194 Whereas Tripanosomatidae parasites survive and multiply in mammals hosts inside
195 infected cells as amastigotes, we assessed the toxicity of the bacterial culture fluids
196 against the intracellular amastigote forms of *T. cruzi* based on low IC_{50} values found
197 (Table 1). It was verified that in all tested concentrations, the bacterial conditioned media
198 stimulated the trypanocidal activity of macrophages. The infection index of amastigotes
199 was reduced (Fig. 3) by reducing the number of infected macrophages and the number of
200 amastigote per macrophages after 48 hours (data not shown). Moreover, conditioned
201 media did not stimulate the NO production in any of stimulated macrophages (Fig. 3).

202

203 **Effect of temperature, pH and enzymatic reaction on trypanocidal compounds**
204 **from bacterial conditioned media**

205 To verify some chemical features of secreted trypanocidal compounds, *P. luminescens*
206 and *X. nematophila* conditioned media were heated, submitted to acid or alkaline pH or
207 incubated with proteinase K. The activity of heated metabolites was not affected by
208 heating (Fig 4). Regarding the effect of pH variation on trypanocidal activity, it was
209 verified that the acidification or alkalization had no significant effect on trypanocidal
210 activity (Fig. 4). Moreover, the incubation of conditioned media with proteinase K did
211 not affected the trypanocidal activity (Fig4).

212

213 **DISCUSSION**

214 *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria contain a high number of genes assumed to
215 encode enzymes involved in biosynthesis of secondary metabolites. Some of them are
216 involved in symbiosis with the nematodes, insect pathogenicity or showed antimicrobial
217 activity (Tobias *et al.*, 2016). In the last decades, the chemical diversity of *Photorhabdus*
218 and *Xenorhabdus* metabolites have been explored resulting in different classes of
219 compounds (Chaston *et al.*, 2011) including lipases, phospholipases, proteases, which are
220 active against insects, as well as bacteria and fungi, which makes them a promising source
221 of novel therapeutics (Bode, 2009; Herbert & Goodrich-Blair, 2007; Inman & Holmes,
222 2012; Kronenwerth *et al.*, 2014; Tobias *et al.*, 2016; Waterfield *et al.*, 2009).

223 Biological activity of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* have already been
224 reported against insects, bacteria and fungi. For instance, *Aedes aegypti* larvae (da Silva
225 *et al.*, 2017; Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012) and *Galleria mellonella* larvae (Wu *et al.*,
226 2014) are susceptible to metabolites from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species.
227 Metabolic extracts from *Photorhabdus* presented antibacterial activity against different
228 bacterial genera, including *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Escherichia*,
229 *Salmonella*, *Klebsiella*, and *Bacillus* and *Pseudomonas syringae* (El-Sadawy *et al.*, 2016;
230 Orozco *et al.*, 2016). Additionally, the anti-fungal activity of *Photorhabdus* metabolites
231 was also shown. Metabolic extracts from *Photorhabdus* was active also against *Fusarium*
232 *oxysporum* (Orozco *et al.*, 2016), *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*,
233 *Exserohilum turcicum* and *Fusarium oxysporum* (Shi *et al.*, 2017). Kronenwerth *et al.*
234 (2014) demonstrated that stilbene derivatives against protozoans *L. donovani* and *T. cruzi*,
235 however, these compounds presented high cytotoxicity on L6 cells, a myoblast cell line,

236 and they are therefore not suitable as a potential drug against Chagas disease.

237 In addition, some reports have demonstrated that *Xenorhabdus* spp. produce bioactive
238 compounds such as xenocoumacins, indoles and dithiolopyrrolones (Herbert & Goodrich-
239 Blair, 2007; Zhou *et al.*, 2013). Szentiamide and chaiyaphumine 1a, from *Xenorhabdus*
240 sp., showed activity against a broad parasites like *P. falciparum*, *T. b. rhodesiense* and *L.*
241 *donovani* (Nollmann *et al.*, 2012). The compound Xenoamicin A, showed activity against
242 *P. falciparum* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi* and *L. donovani*
243 (Grundmann *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2013).

244 Despite the entomopathogenic (Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2013;
245 2017), and antibiotic activity of these bacteria be already well known, their anti-parasitic
246 activity is still neglected (ffrench-Constant *et al.*, 2007; Grundmann *et al.*, 2014;
247 Heermann & Fuchs, 2008; Munch *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013). Here, we demonstrated
248 that *P. luminescens* and *X. nematophila* secreted metabolites that are effective to kill both
249 promastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, in a concentration and time-dependent
250 manner and have low cytotoxicity against macrophages and erythrocytes indicating a high
251 selectivity to the parasite.

252 Considering that the trypanomastigote of *T. cruzi* differentiate into amastigotes
253 inside the phagolysosomal vacuoles in mammalian host (Sacks & Kamhawi, 2001;
254 Chappuis *et al.*, 2007), the cytotoxic effects of conditioned media on macrophages was
255 evaluated. Our data showed that the metabolite(s) secreted by *P. luminescens* and *X.*
256 *nematophila* presented a slight toxicity on macrophages (more than 85% of viability at
257 3.0 mg/mL, IS = 7.23 and 1.2 mg/mL, IS = 14.17, respectively) and human erythrocytes
258 (less than 10% of hemolysis at highest concentration tested), indicating a moderate to
259 good safety profile of cytotoxicity (Oh *et al.*, 2014).

260 Reactive oxygen and nitrogen species plays important role in the parasite control
261 (Gutierrez *et al.*, 2009; Vespa *et al.*, 1994). The effect of the metabolites on intracellular
262 amastigote forms was also evaluated. However, our results show that both conditioned
263 media reduce the intracellular survival of *T. cruzi* in a dose-dependent manner by a
264 mechanism independent of nitric oxide. Moreover, activated macrophages produce
265 several proteolytic enzymes in the phagolysosome that destroy microorganisms
266 (Houghton *et al.*, 2009; Weiss & Schaible, 2015) and also produces peroxynitrite a highly
267 reactive oxidizing agent that destroy *Trypanosoma* (Alvarez *et al.*, 2011).

268 The hallmark of the pro-inflammatory macrophages is the production of high
269 levels of NO and tumor necrosis alpha (TNF- α), yet this pro-inflammatory profile is also
270 related to tissue lesion and cardiomyopathy (Ferreira *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2003;
271 Medina *et al.*, 2017). We have shown, however, that both conditioned media were capable
272 to stimulate the trypanocidal activity of infected macrophages despite no detectable NO
273 production. Once the balance in the immunologic response to *T. cruzi* infection dictates
274 the disease outcome, these findings suggest secreted anti-trypanosoma compounds are
275 capable to reduce the amastigote infection in a non-inflammatory manner, reducing the risk
276 of tissue damage. In a review by Zanluqui *et al.* (2015), the infection by *T. cruzi* lead to
277 a M1 (classic) and M2 (alternative) macrophages activation. Although the pro-
278 inflammatory M1 are largely associated to parasite control in early phases, M2
279 polarization (anti-inflammatory) is also associated with the control of acute infection and
280 could be effective in preventing the progression of oxidative and inflammatory pathology
281 in Chagas disease.

282 Anti-*Trypanosoma* metabolites secreted by *P. luminescens* and *X. nematophila*
283 are heat-stable, once heating the conditioned medium did not completely inactivate its anti-
284 parasite activity. Indeed, *X. nematophila* synthesizes both thermo-labile and thermo-

285 stable compounds that are effective against different species of bacteria (Inman &
286 Holmes, 2012). These antimicrobials can be secreted in the culture medium as soluble
287 proteins or large complexes associated with the membrane (Khandelwal & Banerjee-
288 Bhatnagar, 2003). These proteins had their insecticide activity completely inactivated
289 when heated to 80 ° C for 15 minutes. Whereas many protein toxins produced by bacteria
290 can be completely inactivated by heating, it may be assumed that such metabolites anti-
291 *Trypanosoma* secreted by *X. nematophila* are non-proteic small molecules.

292

293 CONCLUSION

294 The metabolites secreted by *P. luminescens* and *X. nematophila* present strong
295 trypanocidal activity against flagellate and amastigote forms of *T. cruzi*. The mechanism
296 whereby the secreted metabolites induce anti-amastigota activity in the infected
297 macrophage was independent of the production of nitric oxide. The selectiveness for the
298 parasite allied to low cytotoxicity make these bacteria promising compounds with
299 therapeutic potential that can be applied in Chagas disease control.

300

301 REFERENCES

- 302 **Alarcón de Noya, B., Colmenares, C., Díaz-Bello, Z., Ruiz-Guevara, R.,**
303 **Medina, K., Muñoz-Calderón, A., Mauriello, L., Cabrera, E., Montiel,**
304 **L., Losada, S., Martínez, J., Espinosa, R. and Abate, T.** (2016). Orally-
305 transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and
306 molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la
307 Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiology and Control*, **1**, 188-198. doi:
308 <http://dx.doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.005>.
- 309 **Alvarez, M. N., Peluffo, G., Piacenza, L. and Radi, R.** (2011).
310 Intraphagosomal Peroxynitrite as a Macrophage-derived Cytotoxin
311 against Internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative
312 killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J. Biol. Chem.*,
313 **286**, 6627-6640. doi: 10.1074/jbc.M110.167247.

- 314 **Antonello, A. M., Sartori, T., Folmer Correa, A. P., Brandelli, A., Heermann,**
315 **R., Rodrigues Júnior, L. C., Peres, A., Romão, P. R. T. and Da Silva,**
316 **O. S.** (2017). Entomopathogenic bacteria *Photothabdus luminescens* as
317 drug source against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology*, in press, 1-
318 10. doi: 10.1017/S0031182017002001.
- 319 **Bizani, D. and Brandelli, A.** (2002). Characterization of a bacteriocin produced
320 by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *J Appl Microbiol*, **93**, 512-519.
321 doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01720.x.
- 322 **Bode, H. B.** (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary
323 metabolites. *Curr Opin Chem Biol*, **13**, 224-230. doi:
324 10.1016/j.cbpa.2009.02.037.
- 325 **Challinor, V. L. and Bode, H. B.** (2015). Bioactive natural products from novel
326 microbial sources. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1354**,
327 82-97. doi: 10.1111/nyas.12954.
- 328 **Chaston, J. M., Suen, G., Tucker, S. L., Andersen, A. W., Bhasin, A., Bode,**
329 **E., Bode, H. B., Brachmann, A. O., Cowles, C. E., Cowles, K. N.,**
330 **Darby, C., de Leon, L., Drace, K., Du, Z., Givaudan, A., Herbert Tran,**
331 **E. E., Jewell, K. A., Knack, J. J., Krasomil-Osterfeld, K. C., Kukor, R.,**
332 **Lanois, A., Latreille, P., Leimgruber, N. K., Lipke, C. M., Liu, R., Lu,**
333 **X., Martens, E. C., Marri, P. R., Medigue, C., Menard, M. L., Miller, N.**
334 **M., Morales-Soto, N., Norton, S., Ogier, J. C., Orchard, S. S., Park,**
335 **D., Park, Y., Qurollo, B. A., Sugar, D. R., Richards, G. R., Rouy, Z.,**
336 **Slominski, B., Slominski, K., Snyder, H., Tjaden, B. C., van der**
337 **Hoeven, R., Welch, R. D., Wheeler, C., Xiang, B., Barbazuk, B.,**
338 **Gaudriault, S., Goodner, B., Slater, S. C., Forst, S., Goldman, B. S.**
339 **and Goodrich-Blair, H.** (2011). The entomopathogenic bacterial
340 endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photothabdus*: convergent lifestyles
341 from divergent genomes. *PLoS One*, **6**, e27909. doi:
342 10.1371/journal.pone.0027909.
- 343 **Cragg, G. M. and Newman, D. J.** (2013). Natural products: a continuing source
344 of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3670-3695. doi:
345 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- 346 **da Silva, J. L., Undurraga Schwalm, F., Eugenio Silva, C., da Costa, M.,**
347 **Heermann, R. and Santos da Silva, O.** (2017). Larvicidal and growth-
348 inhibitory activity of entomopathogenic bacteria culture fluids against
349 *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Econ Entomol*. doi:
350 10.1093/jee/tow224.
- 351 **Dagnino, A. P., Barros, F. M. C. d., Ccana-Ccapatinta, G. V., Prophiro, J. S.,**
352 **Poser, G. L. v. and Romão, P. R. T.** (2015). Leishmanicidal activity of
353 lipophilic extracts of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, **22**, 71-76.
354 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.10.004>.
- 355 **dos Santos, S. L., Freitas, L. M., Lobo, F. P., Rodrigues-Luiz, G. F.,**
356 **Mendes, T. A. d. O., Oliveira, A. C. S., Andrade, L. O., Chiari, É.,**
357 **Gazzinelli, R. T., Teixeira, S. M. R., Fujiwara, R. T. and Bartholomeu,**
358 **D. C.** (2012). The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene
359 Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental

- 360 Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**, e1779. doi:
361 10.1371/journal.pntd.0001779.
- 362 **El-Sadawy, H. A., Forst, S., Abouelhag, H. A., Ahmed, A. M., Alajmi, R. A.**
363 **and Ayaad, T. H.** (2016). Molecular and phenotypic characterization of
364 two bacteria, *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii* HRM1 and
365 HS1 Isolated from two entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis*
366 *indica* RM1 and *Heterorhabditis* sp. S1. *Pak J Zool*, **48**, 51-58. doi: 51-58
367 (6) QPJZ-0157-20151 12-9-15.
- 368 **Ferreira, L. R. P., Frade, A. F., Baron, M. A., Navarro, I. C., Kalil, J.,**
369 **Chevillard, C. and Cunha-Neto, E.** (2014). Interferon- γ and other
370 inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas
371 disease cardiomyopathy. *World J Cardiol*, **6**, 782-790. doi:
372 10.4330/wjc.v6.i8.782.
- 373 **ffrench-Constant, R. H., Dowling, A. and Waterfield, N. R.** (2007).
374 Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in
375 agriculture. *Toxicon*, **49**, 436-451. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.019.
- 376 **Fischer-Le Saux, M., Viallard, V., Brunel, B., Normand, P. and Boemare, N.**
377 **E.** (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and
378 proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov.,
379 *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp.
380 *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp.
381 *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*,
382 **49 Pt 4**, 1645-1656. doi: 10.1099/00207713-49-4-1645.
- 383 **Gauthier, C., Legault, J., Girard-Lalancette, K., Mshvildadze, V. and**
384 **Pichette, A.** (2009). Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell
385 permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-
386 type saponins. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 2002-2008. doi:
387 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.022>.
- 388 **Gomes, J. A. S., Bahia-Oliveira, L. M. G., Rocha, M. O. C., Martins-Filho, O.**
389 **A., Gazzinelli, G. and Correa-Oliveira, R.** (2003). Evidence that
390 Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is
391 Due to a Th1-Specific Immune Response. *Infect Immun*, **71**, 1185-1193.
392 doi: 10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003.
- 393 **Grundmann, F., Kaiser, M., Schiell, M., Batzer, A., Kurz, M., Thanwisai, A.,**
394 **Chantratita, N. and Bode, H. B.** (2014). Antiparasitic Chaiyaphumines
395 from Entomopathogenic *Xenorhabdus* sp. PB61.4. *Journal of Natural*
396 *Products*, **77**, 779-783. doi: 10.1021/np4007525.
- 397 **Gürtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Cardinal, M. V., Kitron, U.**
398 **and Cohen, J. E.** (2007). Domestic dogs and cats as sources of
399 *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina.
400 *Parasitology*, **134**, 69-82. doi: 10.1017/S0031182006001259.
- 401 **Gutierrez, F. R., Mineo, T. W., Pavanelli, W. R., Guedes, P. M. and Silva, J.**
402 **S.** (2009). The effects of nitric oxide on the immune system during
403 *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104**, 236-245.
- 404 **Heermann, R. and Fuchs, T. M.** (2008). Comparative analysis of the
405 *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes:

- 406 uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. *BMC*
407 *Genomics*, **9**, 40. doi: 10.1186/1471-2164-9-40.
- 408 **Herbert, E. E. and Goodrich-Blair, H.** (2007). Friend and foe: the two faces of
409 *Xenorhabdus nematophila*. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 634-646. doi:
410 10.1038/nrmicro1706.
- 411 **Hull, R. N., Cherry, W. R. and Tritch, O. J.** (1962). Growth characteristics of
412 monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-
413 3196) and their utility in virus research. *J Exp Med*, **115**, 903-918.
- 414 **Inman, F. L. and Holmes, L.** (2012). Effect of heat sterilization on the
415 bioactivity of antibacterial metabolites secreted by *Xenorhabdus*
416 *nematophila*. *Pakistan journal of biological sciences*, **15**, 997-1000.
- 417 **Khandelwal, P. and Banerjee-Bhatnagar, N.** (2003). Insecticidal activity
418 associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus*
419 *nematophilus*. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 2032-2037.
- 420 **Kondo, S., Mizuki, E., Akao, T. and Ohba, M.** (2002). Antitrichomonal strains
421 of *Bacillus thuringiensis*. *J Parasitol Res.*, **88**, 1090-1092. doi:
422 10.1007/s00436-002-0692-6.
- 423 **Kronenwerth, M., Brachmann, A. O., Kaiser, M. and Bode, H. B.** (2014).
424 Bioactive derivatives of isopropylstilbene from mutasynthesis and
425 chemical synthesis. *Chembiochem*, **15**, 2689-2691. doi:
426 10.1002/cbic.201402447.
- 427 **Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M.,**
428 **Galanti, N., Ferreira, A. and Morello, A.** (2007). Mode of action of
429 natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their
430 interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and*
431 *Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **146**, 601-620. doi:
432 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>.
- 433 **Medina, T. S., Oliveira, G. G., Silva, M. C., David, B. A., Silva, G. K.,**
434 **Fonseca, D. M., Sesti-Costa, R., Frade, A. F., Baron, M. A., Ianni, B.,**
435 **Pereira, A. C., Chevillard, C., Cunha-Neto, E., Marin-Neto, J. A. and**
436 **Silva, J. S.** (2017). Ebi3 Prevents *Trypanosoma cruzi*-Induced
437 Myocarditis by Dampening IFN- γ -Driven Inflammation. *Front Immunol*, **8**,
438 1213. doi: 10.3389/fimmu.2017.01213.
- 439 **Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A. J.,**
440 **Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F.,**
441 **Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J.,**
442 **Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S. J. and Yusuf, S.**
443 (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas'
444 Cardiomyopathy. *N Engl J Med*, **373**, 1295-1306. doi:
445 10.1056/NEJMoa1507574.
- 446 **Munch, A., Stingl, L., Jung, K. and Heermann, R.** (2008). *Photorhabdus*
447 *luminescens* genes induced upon insect infection. *BMC Genomics*, **9**,
448 229. doi: 10.1186/1471-2164-9-229.
- 449 **Nielsen-LeRoux, C., Gaudriault, S., Ramarao, N., Lereclus, D. and**
450 **Givaudan, A.** (2012). How the insect pathogen bacteria *Bacillus*

- 451 *thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts.
452 *Current opinion in microbiology*, **15**, 220-231. doi:
453 10.1016/j.mib.2012.04.006.
- 454 **Nollmann, F. I., Dowling, A., Kaiser, M., Deckmann, K., Grosch, S., Ffrench-**
455 **Constant, R. and Bode, H. B.** (2012). Synthesis of szentiamide, a
456 depsipeptide from entomopathogenic *Xenorhabdus szentirmaii* with
457 activity against *Plasmodium falciparum*. *Beilstein J Org Chem*, **8**, 528-
458 533. doi: 10.3762/bjoc.8.60.
- 459 **Orozco, R. A., Molnar, I., Bode, H. and Stock, S. P.** (2016). Bioprospecting for
460 secondary metabolites in the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus*
461 *luminescens* subsp. *sonorensis*. *J Invertebr Pathol*, **141**, 45-52. doi:
462 10.1016/j.jip.2016.09.008.
- 463 **Romao, P. R., Fonseca, S. G., Hothersall, J. S., Noronha-Dutra, A. A.,**
464 **Ferreira, S. H. and Cunha, F. Q.** (1999). Glutathione protects
465 macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated
466 cytotoxicity. *Parasitology*, **118**, 559-566. doi:
467 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006000300006>
- 468 **Shi, D., An, R., Zhang, W., Zhang, G. and Yu, Z.** (2017). Stilbene derivatives
469 from *Photorhabdus temperata* SN259 and their antifungal activities
470 against phytopathogenic fungi. *J Agric Food Chem*, **65**, 60-65. doi:
471 10.1021/acs.jafc.6b04303.
- 472 **Shrestha, Y. K. and Lee, K. Y.** (2012). Oral toxicity of *Photorhabdus* culture
473 media on gene expression of the adult sweetpotato whitefly, *Bemisia*
474 *tabaci*. *J Invertebr Pathol*, **109**, 91-96. doi: 10.1016/j.jip.2011.10.011.
- 475 **Silva, O., Prado, G., Silva, J., Silva, C., Costa, M. and Heermann, R.** (2013).
476 Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus*
477 *nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera:
478 Culicidae). *Parasitol Res*, 1-6. doi: 10.1007/s00436-013-3460-x.
- 479 **Thomas, G. M. and Poinar, G. O.** (1979). *Xenorhabdus* gen. nov., a Genus of
480 Entomopathogenic, Nematophilic Bacteria of the Family
481 Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
482 *Microbiology*, **29**, 352-360. doi: doi:10.1099/00207713-29-4-352.
- 483 **Tobias, N. J., Mishra, B., Gupta, D. K., Sharma, R., Thines, M., Stinear, T. P.**
484 **and Bode, H. B.** (2016). Genome comparisons provide insights into the
485 role of secondary metabolites in the pathogenic phase of the
486 *Photorhabdus* life cycle. *BMC Genomics*, **17**, 537.
- 487 **Vespa, G. N., Cunha, F. Q. and Silva, J. S.** (1994). Nitric oxide is involved in
488 control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the
489 parasite in vitro. *Infect Immun*, **62**, 5177-5182.
- 490 **Viotti, R., Alarcón de Noya, B., Araujo-Jorge, T., Grijalva, M. J., Guhl, F.,**
491 **López, M. C., Ramsey, J. M., Ribeiro, I., Schijman, A. G., Sosa-**
492 **Estani, S., Torrico, F. and Gascon, J.** (2014). Towards a Paradigm
493 Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. *Antimicrobial Agents*
494 *and Chemotherapy*, **58**, 635-639. doi: 10.1128/AAC.01662-13.

- 495 **Viotti, R., Vigliano, C. A., Álvarez, M. G., Lococo, B. E., Petti, M. A.,**
496 **Bertocchi, G. L. and Armenti, A. H.** (2009). El impacto de las
497 condiciones socioeconómicas en la evolución de la enfermedad de
498 Chagas crónica. *Rev Esp Cardiol*, **62**, 1224-1232. doi:
499 [https://doi.org/10.1016/S0300-8932\(09\)73074-X](https://doi.org/10.1016/S0300-8932(09)73074-X).
- 500 **Waterfield, N. R., Ciche, T. and Clarke, D.** (2009). *Photorhabdus* and a host of
501 hosts. *Annu Rev Microbiol*, **63**, 557-574. doi:
502 [10.1146/annurev.micro.091208.073507](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073507).
- 503 **WHO.** (2017_). World Health Organization. Chagas disease (American
504 trypanosomiasis). *Fact Sheet 340*, Disponible em: <
505 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Accessed: 29/01/2018.
- 506 **Wu, G., Zhao, Z., Liu, C. and Qiu, L.** (2014). Priming *Galleria mellonella*
507 (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an
508 enhanced immune protection against *Photorhabdus luminescens* TT01
509 and the role of innate immunity in the process. *J Econ Entomol*, **107**,
510 559-569. doi: [10.1603/EC13455](https://doi.org/10.1603/EC13455).
- 511 **Xu, Z., Yao, B., Sun, M. and Yu, Z.** (2004). Protection of mice infected with
512 *Plasmodium berghei* by *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Parasitol*
513 *Res.*, **92**, 53-57. doi: [10.1007/s00436-003-0990-7](https://doi.org/10.1007/s00436-003-0990-7).
- 514 **Zanluqui, N. G., Wowk, P. F. and Pinge Filho, P.** (2015). Macrophage
515 Polarization in Chagas Disease. *J Clin Cell Immunol* **6**. doi:
516 [10.4172/2155-9899.1000317](https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000317).
- 517 **Zhou, Q., Grundmann, F., Kaiser, M., Schiell, M., Gaudriault, S., Batzer, A.,**
518 **Kurz, M. and Bode, H. B.** (2013). Structure and biosynthesis of
519 xenoamicins from entomopathogenic *Xenorhabdus*. *Chemistry*, **19**,
520 16772-16779. doi: [10.1002/chem.201302481](https://doi.org/10.1002/chem.201302481).

521

522

523 **Tables and figures**

524

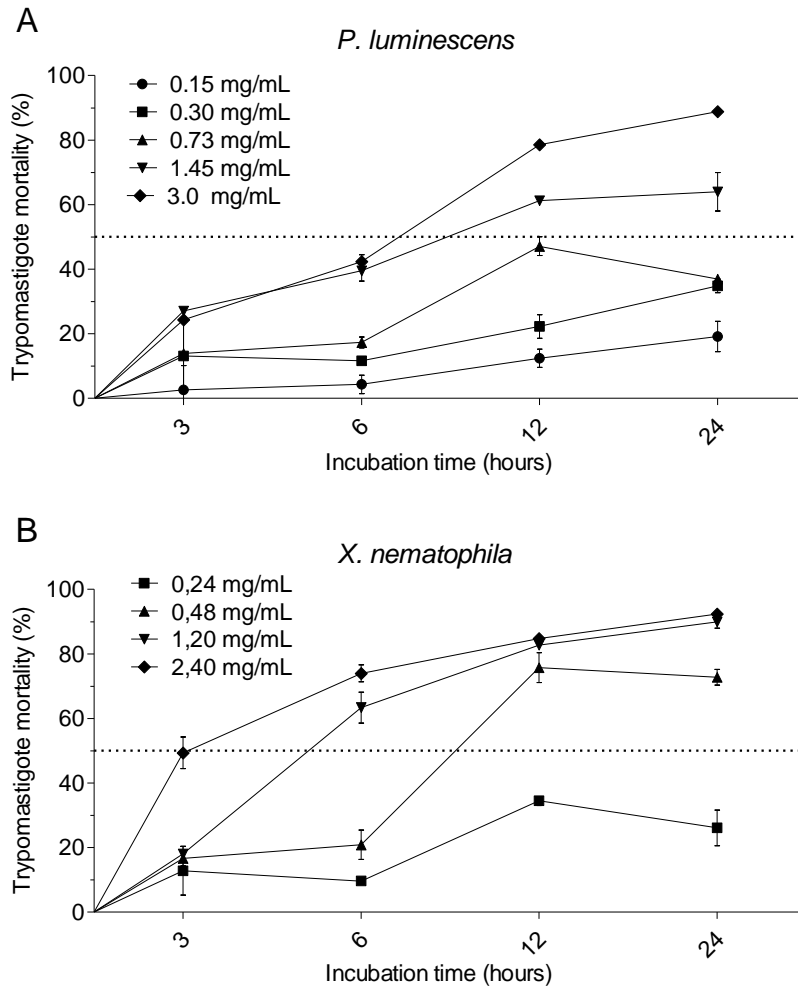
525 **Tabela 1 – Conditioned media toxicity values in 24 hours.**

	IC ₅₀ mg/mL (95% CI) (Tripomastigote)	CC ₅₀ mg/mL (95% CI) (Macrophage)	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
<i>Photorhabdus</i>	1.0 (0.94 – 1.16)	7.23 (5.38 – 9.71)	7.23
<i>Xenorhabdus</i>	0.34 (0.30 – 0.40)	4.82 (3.89 – 5.96)	14.17

526 IC₅₀ and CC₅₀: concentration of bacterial culture fluids that causes 50% of *T. cruzi* mortality
 527 and 50% of macrophage cytotoxicity. respectively.

528 95% CI: 95% confidence interval.

529 SI selectivity index for tripomastigotes calculated as ratio of CC₅₀ against mammalian
 530 cells/IC₅₀ against *T. cruzi*.



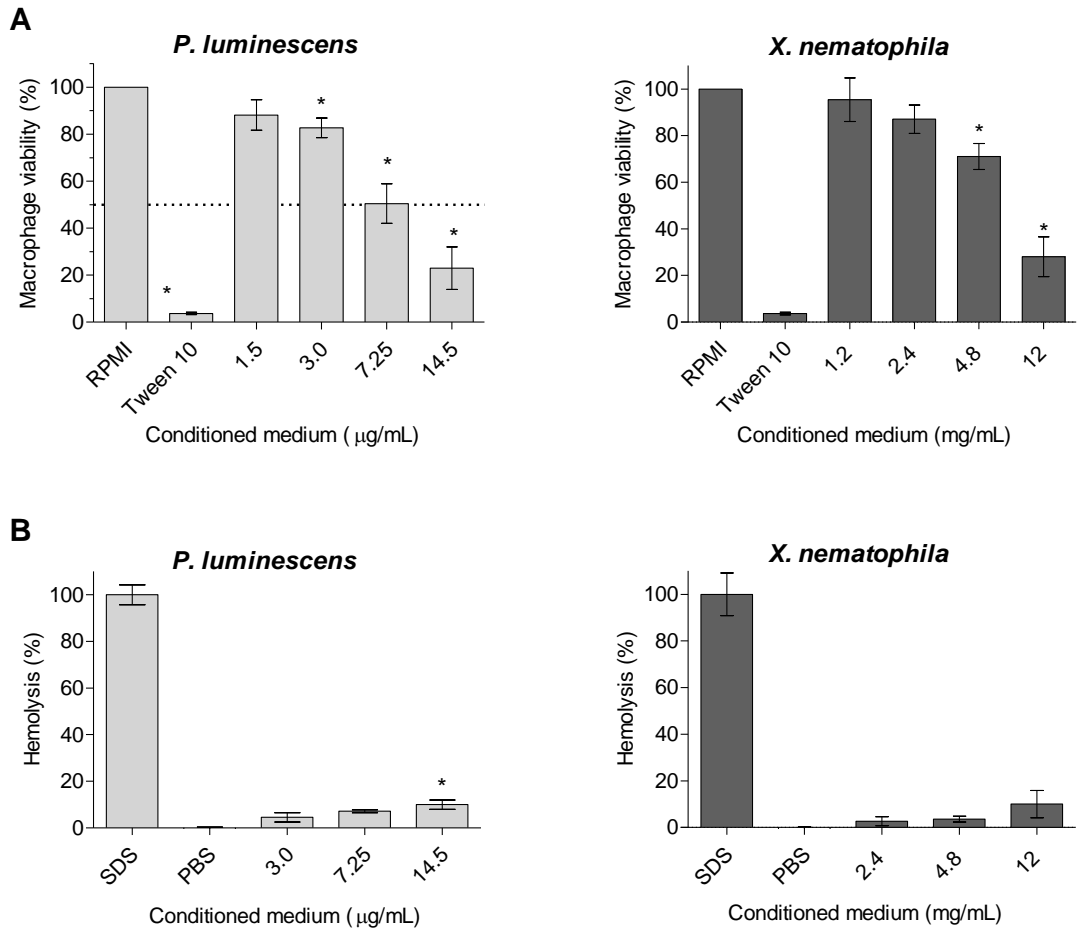
531

532 **Figure 1 – Trypanocidal activity of the conditioned medium from *P. luminescens***
 533 **and *X. nematophila***

534 *T. cruzi* trypomastigotes (1×10^5 / well) were incubated with DMEM (control) or *P.*
 535 *luminescens* (A) ou *X. nematophila* (B) conditioned medium for 24 hours. The
 536 trypomastigote survival was determined by hemocytometer. Data are reported as mean
 537 \pm SEM (n = 4) and are representative of three independent experiments. * P < 0.05
 538 comparing to control.

539

540



541

542

543 **Figure 2 - Cytotoxic effects of conditioned media on macrophages and erythrocytes.**

544 A) Macrophages were treated with RPMI medium (control) or conditioned media. Cell

545 viability were determined by MTT assay after 48 h of incubation. B) Hemolytic activity

546 was performed using human erythrocytes incubated with conditioned media. PBS

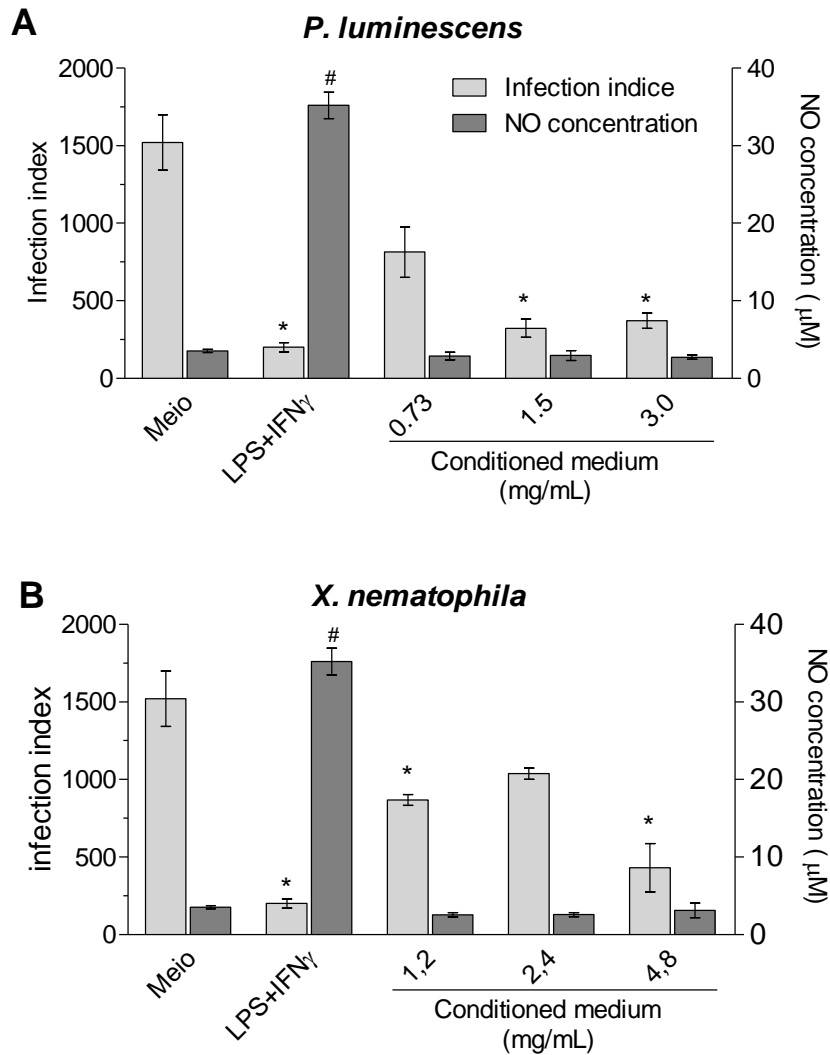
547 (negative control) or SDS 0.01% (positive control) for 60 min. Hemolysis was determined

548 by measuring the absorbance of the cells supernatants at 540 nm. Data are expressed as

549 means \pm SEM of three replicates and are representative of three independent experiments.

550 * $p < 0.05$ compared with RPMI medium (panel A) or PBS (panel B).

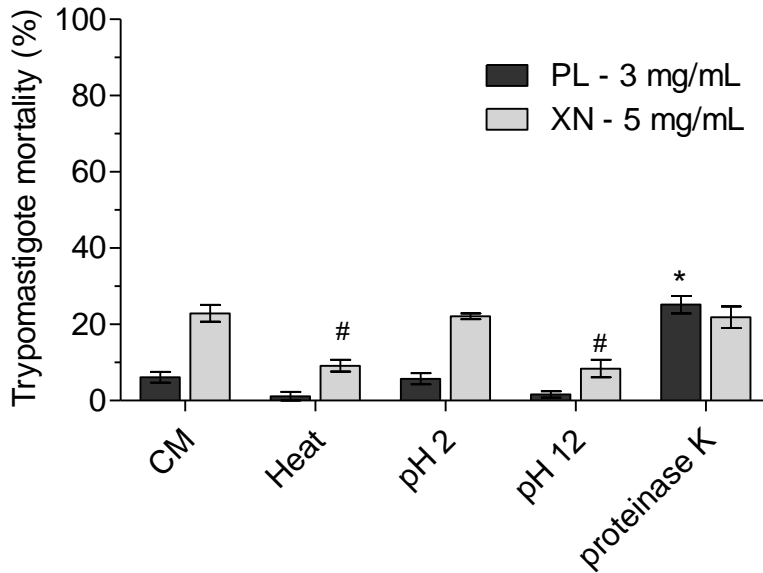
551



552 **Figure 3** - Effects of conditioned media on the viability of *T. cruzi* amastigotes and
 553 nitric oxide production in vitro.

554 Macrophages were infected with *T. cruzi* and incubated with RPMI medium (control),
 555 LPS (10 ng/mL) plus IFN- γ (10 ng/mL) or *P. luminescens* (A) or *X. nematophila* (B)
 556 conditioned medium in a 12-well plate containing a cover lip in the bottom of each well.
 557 After 48 h slides were withdrawn, stained with hematoxylin-eosin stain to infection index
 558 determination ($MO_{\text{infectado}} \times Amastigota_{MO_{\text{infec}}}$), as described in materials and methods,
 559 and the supernatant was used for NO measurement using Griess method. Data are
 560 expressed as means \pm SEM of three replicates and are representative of three independent

561 experiments. * $p < 0.05$ infection index compared to RPMI control; # NO concentration
562 compared to control.
563



564
565 **Figure 4** - Effect of heating, pH changing and proteolysis, on trypanocidal activity of
566 conditioned media.

567 *T. cruzi* (1×10^5 trypomastigotes/well) were incubated for 24 h with DMEM (control),
568 untreated conditioned media. Each conditioned medium was submitted to alkalization
569 or acidification following to restoring to initial pH = 8.0, heated for 10 min or treated
570 with proteinase K as described in material and methods. After 24 h of incubation. *T.*
571 *cruzi* mortality was determined using a hemocytometer. Data are reported as means \pm
572 SEM (n=3) and are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$ compared
573 with respective untreated conditioned media.

574

5.3. Resultados não apresentados na forma de artigo.

5.3.1. Efeito leishmanicida do meio condicionado *P. luminescens*

Após a verificação da natureza proteica do composto leishmanicida de *P. luminescens*, seguiu-se a purificação do meio condicionado. Primeiramente foi realizada a precipitação proteica em diferentes faixas de concentração de sulfato de amônio. Como não foi obtida diferença significativa entre as diferentes faixas (Figura 9A), optou-se pela ultrafiltração a fim de separar as proteínas presentes pelo tamanho molecular. A concentração proteica, determinada pelo método de BRADFORD (1976) está exposta na Figura 9B.

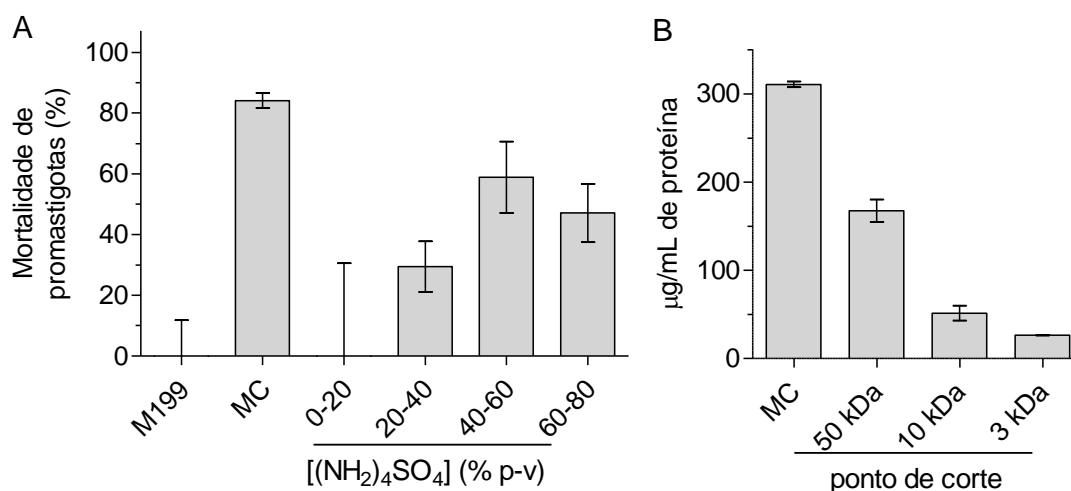


Figura 9 – Viabilidade de promastigotas em diferentes faixas de precipitação proteica do meio condicionado em [(NH₂)₄SO₄] (A) e concentração proteica no ultrafiltrado do meio condicionado de *P. luminescens* (B).

A) O sobrenadante das soluções [sulfato de amônio + meio condicionado] foi testado em promastigotas. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações testadas *p<0,05. B) quantificação proteica do ultrafiltrado de *P. luminescens* pelo método de Bradford após passar pelas membranas de 50, 10 e 3 kDa..

5.3.2. Efeito leishmanicida do meio condicionado de *X. nematophila*

5.3.2.1. O meio condicionado de *X. nematophila* inibe o crescimento e mata formas promastigota de *L. amazonensis*

O meio condicionado de *X. nematophila*, produzido conforme descrito anteriormente (4.1.1), foi liofilizado e pesado a fim de determinar a massa do conteúdo, que rendeu 48 mg/mL. Metabólitos secretados por *X. nematophila* no meio de cultura levaram a uma inibição significativa do crescimento de promastigotas em ambas as concentrações testadas (Figura 10A). A adição do meio condicionado de *X. nematophila* diretamente sobre formas promastigotas de *Leishmania* efetivamente matou os parasitos de forma tempo e concentração-dependente (Figura 1B). Em 48 horas de incubação, *X. nematophila*, mesmo em baixa concentração, apresentou significativa atividade leishmanicida (0,1 mg / mL = 35% de mortalidade) (Figura 10B). O valor de IC₅₀ para promastigotas foi calculado em 0,33 mg/mL (Tabela 2). Como ilustrado na figura 10C, o meio condicionado de *X. nematophila* de 24 mg / mL levou à total lise dos parasitos. Estes resultados indicaram que *X. nematophila* secreta compostos tóxicos à *Leishmania*.

Tabela 2 - Atividade anti-parasitária e citotoxicidade em macrófagos do meio condicionado de *X. nematophila* em 48 horas.

Meio condicionado	Promastigota/ IC ₅₀ mg/mL (CI de 95%)	Amastigote IC ₅₀ mg/mL (CI de 95%)	Macrófagos CC ₅₀ mg/mL (CI de 95%)	SI _P	SI _A
<i>L. amazonensis</i>	0,33 (De 0,28 a 0,39)	0,63 (0,54-0,74)	6,55 (5,50 para 7,79)	19,85	10,39

IC₅₀ e CC₅₀: concentração de fluidos de cultura bacteriana que causa 50% de mortalidade de *L. amazonensis* e 50% de citotoxicidade do macrófago, respectivamente.

CI de 95%: 95% de intervalo de confiança.

SI_P e SI_A índice de seletividade para promastigotas e amastigotas, respectivamente, calculado como a proporção de CC₅₀ contra células de mamíferos/IC₅₀ contra *L. amazonensis*.

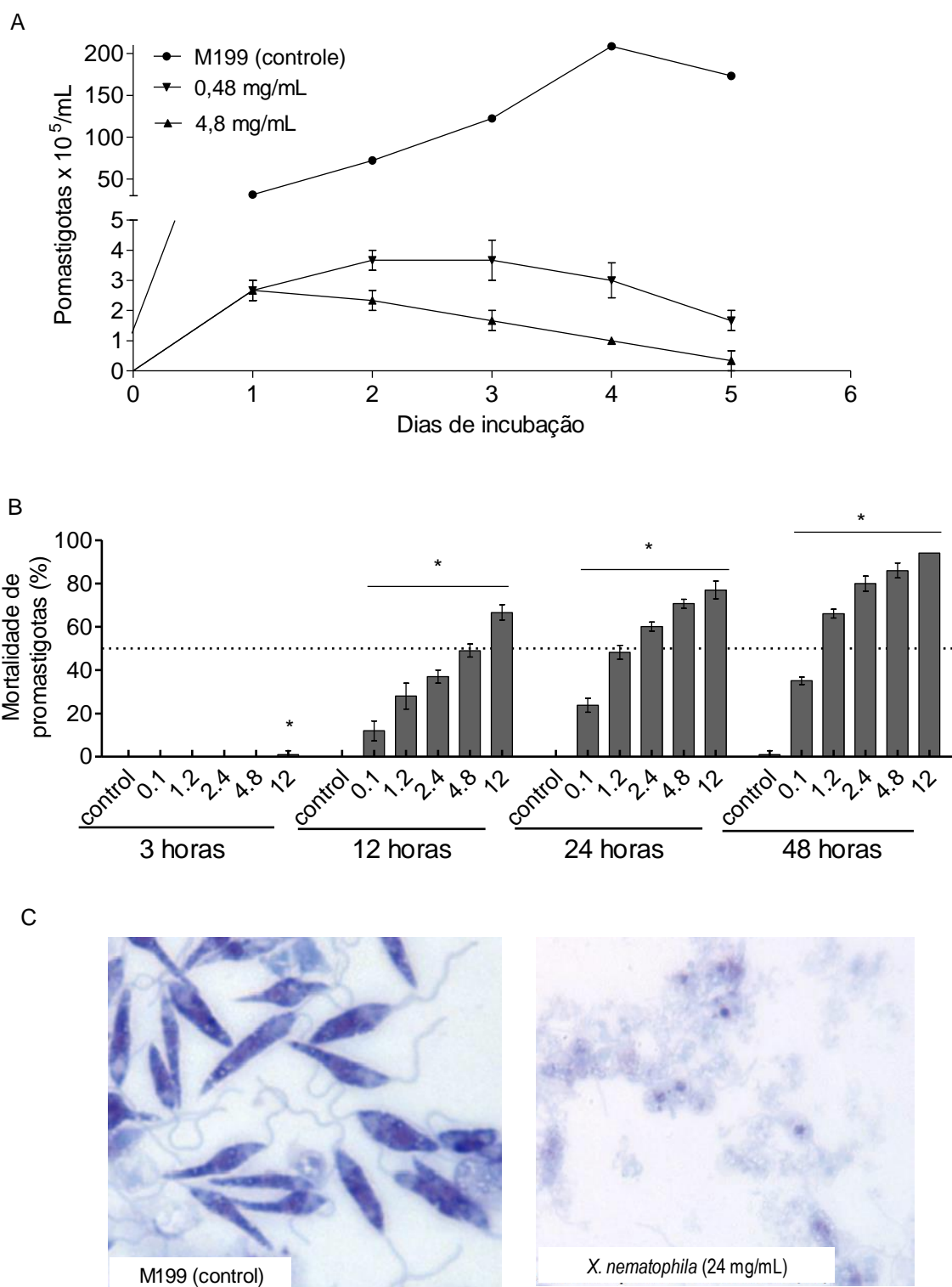


Figura 10 - Efeito tóxico do meio condicionado de *X. nematophila* em promastigotas de *L. amazonensis*.

A) Cinética de crescimento de promastigotas tratadas com meio condicionado. Promastigotas de *L. amazonensis* ($1 \times 10^5/\text{mL}$) foram incubadas em meio M199 (controle) ou meio condicionado de *X.*

nematophila a 0,48 e 4,8 mg/mL à 26°C e o crescimento foi determinado diariamente usando um hemocítmetro. B) Atividade leishmanicida do meio condicionado. Promastigotas de *L. amazonensis* (3×10^6 /poço) foram incubados em meio M199 (controle) ou meio condicionado de *X. nematophila* por até 48 h. Sobrevivência de *Leishmania* foi determinada utilizando um hemocítmetro. Os dados são apresentados como médias \pm SEM (n=4) e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle (M199 médio). C) Efeito do meio condicionado de *X. nematophila* na integridade de promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com meio M199 ou meio condicionado de *X. nematophila* (2,4 mg/mL) por 48 h. A integridade dos promastigotas mantidos em M199 (controle) e com meio condicionado pode ser visualizada nos painéis da esquerda e direita, respectivamente (hematoxilina-eosina – ampliação de 1000 X).

5.3.2.2. A purificação parcial de composto (s) anti-parasitário (s) *X. nematophila*

A purificação parcial dos compostos leishmanicidas secretados por *X. nematophila* no meio de cultura começou a ser realizada na Alemanha, LMU-München, durante o doutorado sanduíche sob a orientação do PD Dr. Ralf Heermann. Os bioensaios eram realizados com promastigotas de *Leishmania tarantolae* (espécie não patogênica a humanos), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Michael Boshart. Os extratos obtidos foram trazidos para o Brasil e os ensaios realizados com *L. tarantolae* foram repetidos no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA, com *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/73/M2269), mostrando resultados semelhantes aos obtidos com *L. tarantolae* (Figura 11).

Antes de iniciar o processo de purificação, o efeito de diferentes condições sobre a estabilidade da molécula bioativa secretada por *X. nematophila* foi avaliado. O efeito da temperatura e a variação de pH na atividade do meio condicionado estão apresentados da figura 11.

A incubação de *X. nematophila* com Amberlite XAD, levou a obtenção de duas frações que foram testadas em promastigotas de *Leishmania* sp. Na figura 11 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** se observa que a fração extraída com metanol foi a que permaneceu com atividade leishmanicida. Esta fração (aqui referenciada como MeOH) foi processada por Stas-Otto e após as 4 etapas consecutivas, a fração ativa foi a aquosa.

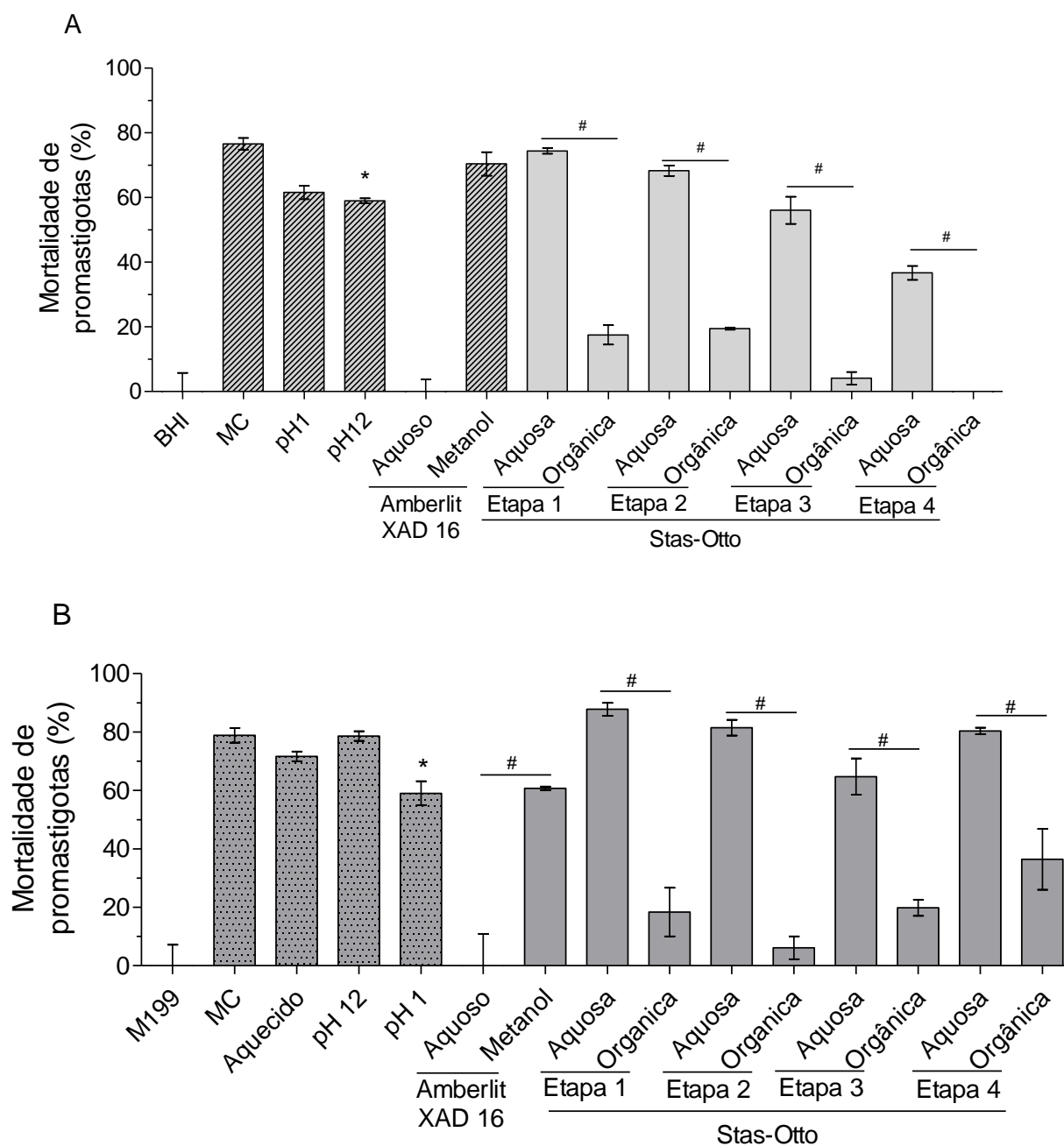


Figura 11 - Efeito de diferentes tratamentos na atividade leishmanicida do meio condicionado de *Xenorhabdus nematophila* e viabilidade de promastigotas em cada etapa do método de Stas-Otto.

Leishmania tarantolae (A) ou *Leishmania amazonensis* (B) (3×10^6 promastigotas/poço) foram incubados por 24 h com M199/BHI (controle), meio condicionado de *X. nematophila* não tratado, meio condicionado aquecido, submetidos à alcalinização ou acidificação ou incubadas com resina Amberlit XAD 16 (10 % (v/v), equivalente a 4,8 mg/mL do meio condicionado original). O extrato metanólico manteve-se ativo contra *Leishmania* e foi submetido à purificação do Stas-Otto. Após 24h de incubação, a mortalidade de promastigotas foi determinada utilizando um hemocitômetro. Os dados são apresentados como médias \pm SEM (n=4) e são representativos de três experimentos independentes.

* $p < 0,05$ em comparação com o meio condicionado não tratado (MC); # $p < 0,05$ em comparação com as respectivas frações aquosas.

5.3.2.3. *X. nematophila* induz a despolarização do potencial transmembrana mitocondrial de *Leishmania*

O potencial de membrana mitocondrial foi quantificado de acordo com FERLINI e SCAMBIA (2007) usando o corante fluorescente rodamina123 (Rh 123, R8004, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), que, passivamente, se difunde através da membrana plasmática e se acumula em mitocôndrias metabolicamente ativas. O meio condicionado parcialmente purificado foi incubado com promastigotas de *L. amazonensis* por 6 e 12 horas, como brevemente descrito anteriormente (ver Materiais e Métodos no artigo 1)

O tratamento das promastigotas com o meio condicionado de *X. nematophila* levou a uma diminuição significativa na fluorescência Rh123 após 12 h de incubação (figura 12A e B) devido a despolarização do $\Delta\Psi_m$ (IV = - de 0,18). Como esperado, a incubação dos parasitos com H_2O_2 a 2mm causou despolarização potente do $\Delta\Psi_m$ (IV = - 0,43).

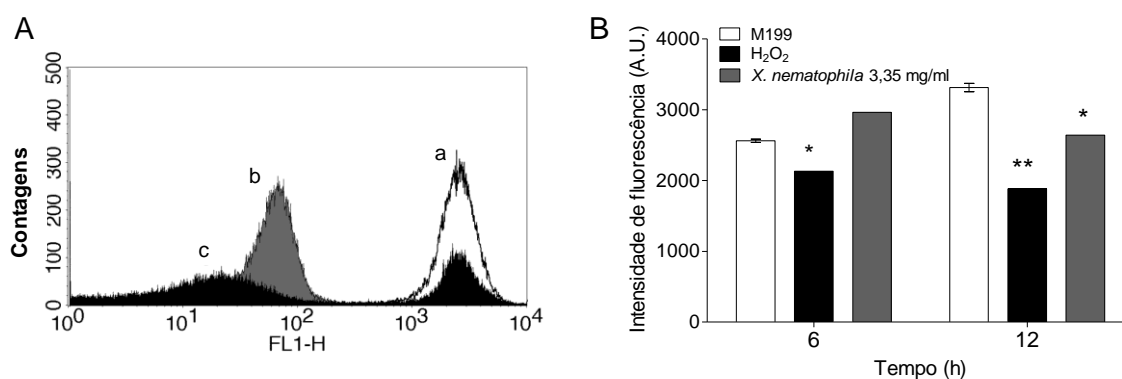


Figura 12 - Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de promastigotas.

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (1×10^6) foram tratados com $2 \mu M$ de H_2O_2 , 3,35 mg/mL de *Xenorhabdus nematophila* por 6h e 12h a $26^\circ C$. $\Delta\Psi_m$ foi determinada por citometria de fluxo, utilizando-se o reagente Rhodamin 123. A) Histograma do controle não tratado (a – branco) e de promastigotas tratados com de H_2O_2 (b - cinza) e *X. nematophila* 3.35 mg/ml (c - preto). B) Representação gráfica da intensidade média de fluorescência em unidades arbitrárias (R. U.) dos diferentes grupos de tratamento. Dados representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs M199; ** $p < 0,001$ vs M199.

5.3.2.4. Metabólitos de *X. nematophila* causam elevação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio em *Leishmania amazonensis*.

A geração de ROS foi quantificada utilizando o corante permanente diacetato 2',7' diclorofluoresceína (DCF-DA; D6883, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que se torna fluorescente após a oxidação a dichlorofluorescein (DCF). O meio condicionado parcialmente purificado foi incubado com promastigotas de *L. amazonensis* por 1, 6 e 12 horas, como brevemente descrito anteriormente (ver materiais e métodos no artigo 1).

A medição dos níveis intracelulares de ROS por citometria de fluxo mostrou que os níveis de ROS foram significativamente aumentados pelo tratamento de *L. amazonensis* com H_2O_2 e *X. nematophila* de uma a 12 horas de incubação (Figura 13).

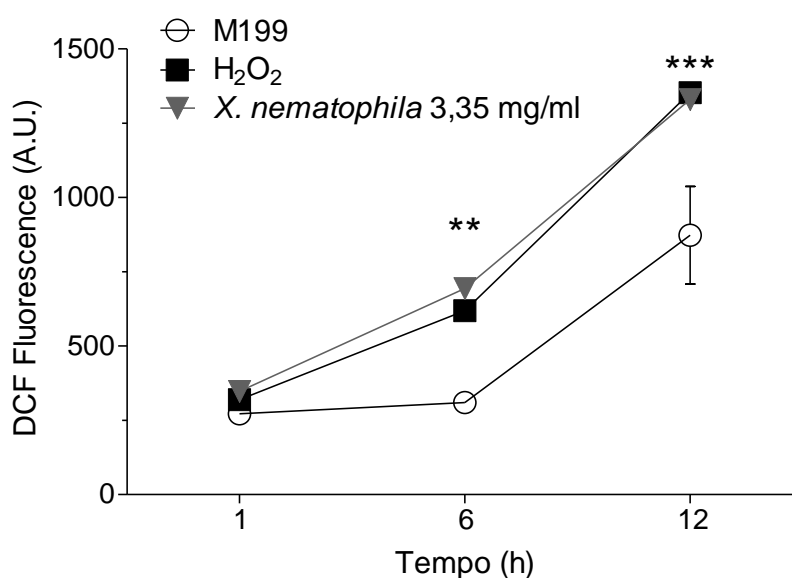


Figura 13 - Níveis intracelulares de ROS de promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados com 2 μ M de H_2O_2 ou 3,35 mg/mL de *X. nematophila* para 1, 6 e 12 horas a 26°C. Os níveis de ROS foram determinados por citometria de fluxo utilizando diclorofluoresceína (DCF) e os dados estão representados como média da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (U.A.). * $p < 0,05$ vs M199; ** $p < 0,001$.

5.3.2.5. Baixa citotoxicidade do meio condicionado de *Xenorhabdus nematophila* em macrófagos e eritrócitos.

Para avaliar o efeito citotóxico do meio condicionado de *X. nematophila*, testamos sua toxicidade em macrófagos, bem como seu efeito hemolítico. Conforme representado na figura 14A, o meio condicionado de *X. nematophila* apresentou baixa citotoxicidade em macrófagos. Somente as maiores concentrações levaram a mortalidade de macrófagos. A concentração de *X. nematophila* que leva a 50% de mortalidade em macrófagos foi estimada em 6.55 mg/mL (Tabela 2). Além disso, o meio condicionado de *X. nematophila* não apresentou citotoxicidade significativa contra eritrócitos humanos (Figura 14B).

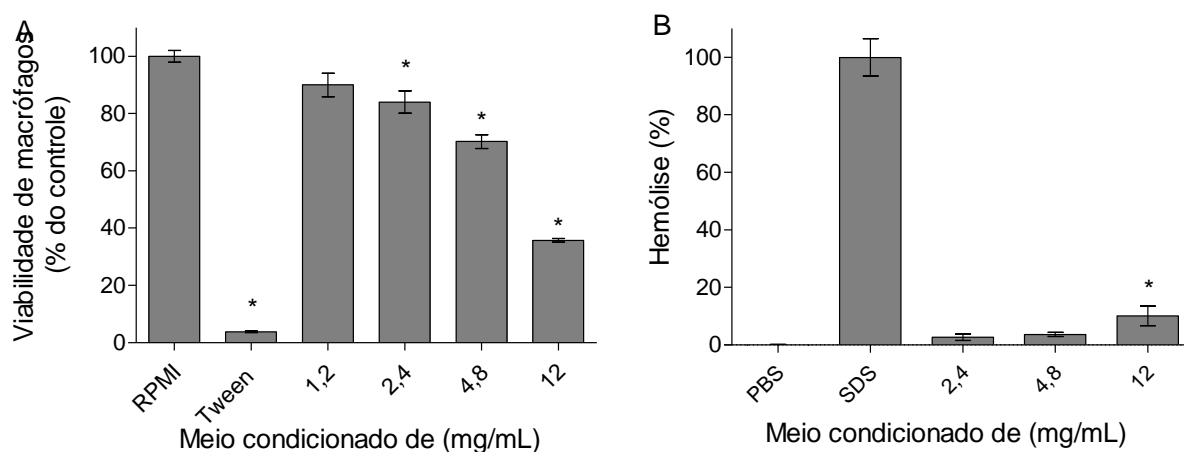


Figura 14 - Citotoxicidade do meio condicionado de *X. nematophila* em macrófagos e efeito hemolítico.

A) Macrófagos foram tratadas com meio RPMI (controle de citotoxicidade negativo), Tween (controle de citotoxicidade positivo) ou meio condicionado bacteriano, e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT após 48 h de incubação. B) A atividade hemolítica. Eritrócitos foram incubados com meio PBS (controle de hemólise negativo), SDS 0,01% (controle positivo) ou meio condicionado de *X. nematophila* por 60 min. A hemólise foi estimada pela medição da absorbância do sobrenadante das células em 540 nm. Dados são expressos como médias \pm SEM de quatro repetições e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado-se com meio RPMI (painel A) ou PBS (painel B).

5.3.2.6. O meio condicionado de *X. nematophila* estimula a atividade leishmanicida de macrófagos por mecanismos independente de NO

Considerando que *Leishmania* spp. sobrevive e multiplica-se como amastigotas dentro das células de hospedeiros vertebrados, testamos a toxicidade do meio condicionado de *X. nematophila* contra as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp., conforme descrito anteriormente anteriormente (ROMAO *et al.*, 1999) (ver materiais e métodos no artigo 1).

Com base nos valores de IC₅₀ encontrados para promastigotas (Tabela 2), a atividade leishmanicida do meio condicionado em amastigotas intracelulares foram testados de 0,1 a 4,8 mg/mL. Verificou-se que, em todas as concentrações testadas, os fluidos bacterianos estimularam a atividade leishmanicida de macrófagos, reduzindo a viabilidade dos amastigotas de *L. amazonensis* numa ordem de 13 para 97,7% (figura 15A). Ao contrário do efeito leishmanicida induzido pela estimulação de macrófagos infectados com LPS mais IFN- γ (85,2% de mortalidade, por um mecanismo dependente de óxido nítrico), o meio condicionado de *X. nematophila* não estimulou a produção de NO em macrófagos estimulados (figura 6B).

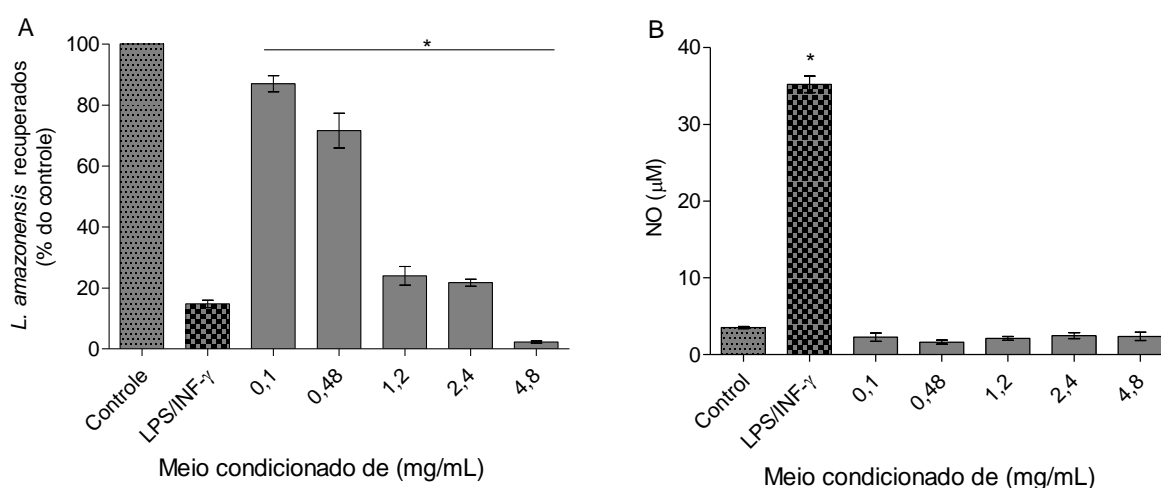


Figura 15 - Efeito do meio condicionado de *Xenorhabdus nematophila* em amastigotas de *Leishmania amazonensis* e produção de óxido nítrico por macrófagos, *in vitro*.

Macrófagos infectados com amastigotas foram incubados com M199 (controle), meio condicionado ou LPS (10 ng/mL) e IFN- γ (10 ng/mL). Após 48 h, as células foram lisadas para determinação da viabilidade dos parasitos como descrito nos materiais e métodos (A) e o sobrenadante foi armazenado para determinação da concentração de NO (B) produzido pelos macrófagos, pela reação de Griess.

Dados são expressos como médias \pm SEM de quatro repetições e são representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

6. DISCUSSÃO GERAL

Phthorhaddus luminescens e *Xenorhaddus nematophila* são bactérias conhecidas por secretarem uma diversidade de produtos extracelulares como lipases, fosfolipases, proteases e um amplo espectro de antibióticos (HERBERT e GOODRICH-BLAIR, 2007; WATERFIELD *et al.*, 2009; INMAN e HOLMES, 2012), além de uma infinidade de metabólitos secundários (BODE, 2009), o que faz desta bactérias promissoras fontes para novos compostos terapêuticos. As atividades entomopatogênica e antibiótica dessas bactérias já são bem elucidada, no entanto, sua atividade antiparasitária ainda é negligenciada (FFRENCH-CONSTANT *et al.*, 2007; HEERMANN e FUCHS, 2008; MUNCH *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2013; GRUNDMANN *et al.*, 2014). Juntos, os resultados obtidos neste estudo demonstram que ambas as espécies de bactérias, *P. luminescens* e *X. nematophila*, secretam metabólitos com significativa atividade leishmanicida e tripanocida.

Os metabolitos anti-*Leishmania* secretados por *P. luminescens* são peptídeos termolábeis, uma vez que o aquecimento praticamente eliminou a atividade leishmanicida do meio condicionado por *P. luminescens*. A natureza peptídica do metabólico foi confirmada pela inativação do efeito tóxico pela incubação com proteinase-K. *Xenorhaddus nematophila* também secretou metabolitos com atividade leishmanicida na cultura, no entanto, os resultados mostraram que se trata de um produto termo-estável de natureza não peptídica, uma vez que não teve sua atividade eliminada pela proteinase-K.

Devido à natureza química distinta dos compostos de cada bactéria, seguiu-se caminhos diferentes para a purificação do meio condicionado de cada uma. A natureza peptídica *P. luminescens* levou a purificação parcial por ultracentrifugação e cromatografia em gel, revelando um peptídeo leishmanicida menor que 3 kDa, relativamente estável à variação de pH (1,0 – 12,0). A molécula secretada por *X. nematophila* mostrou-se estável à variação de pH, mantendo o efeito parasiticida mesmo após extrema variação para pH 1,0 e pH 12,0. Esta estabilidade permitiu a utilização do método de Stas-Otto para a purificação parcial

do meio condicionado de *X. nematophila*. A incubação do meio condicionado de *X. nematophila* com Amberlite XAD-16 indicou que o composto leishmanicida ficou adsorvido na resina, uma vez que a fração extraída com metanol foi a que permaneceu ativa enquanto a fase aquosa, extraída por filtração, teve seu efeito anulado.

A fim de melhor compreender as vias pelas quais os metabólitos secretados levam à morte parasitária, alguns mecanismos de ação foram investigados. Para isso, foram utilizados os meios condicionados parcialmente purificados de *P. luminescens* (porção menor que 3 kDa, chamado daqui por diante de PLT- sigla para *Photorhabdus*-derived Leishmanicidal Toxin) e de *X. nematophila* (porção aquosa final do método Stas-Otto). O efeito do PLT e da porção aquosa do Stas-Otto foi investigado sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de promastigotas de *L. amazonensis* utilizando Rhodamin123 (Rh123). A Rh123 é um marcador catiônico usado para detectar alterações do potencial da membrana mitocondrial. Este se acumula na matriz mitocondrial, agentes que impedem sua absorção levam à diminuição do potencial de membrana, alterando a intensidade da fluorescência. Um aumento na permeabilidade do sistema mitocondrial resulta na perda de $\Delta\Psi$ mitocondrial e ruptura da membrana mitocondrial externa (CHEN, 1988; HUANG *et al.*, 2007; TSUJIMOTO e SHIMIZU, 2007). O tratamento de promastigotas com compostos de ambas bactérias causou despolarização do potencial da membrana mitocondrial. A diminuição da fluorescência sugere um aumento na permeabilidade do próton através da membrana mitocondrial interna, o que pode levar à morte do parasito devido à diminuição da síntese de ATP (RODRIGUES *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2017).

Considerando que ao infectar o hospedeiro mamífero as formas promastigotas de *Leishmania* se diferenciam em amastigotas no interior do fagolisossoma (SACKS e KAMHAWI, 2001; CHAPPUIS *et al.*, 2007), a citotoxicidade em macrófagos também foi avaliada. Os metabólitos secretados por *P. luminescens* e *X. nematophila* apresentam baixa citotoxicidade a macrófagos bem como praticamente não causa nenhum efeito hemolítico, revelando a seletividade dos compostos ao parasito.

Também foi avaliado se os metabólitos influenciariam a atividade dos

macrófagos infectados sobre amastigotas. As espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO), produzidos por macrófagos ativados, possuem importante papel no controle da infecção por *Leishmania* (FONSECA *et al.*, 2003; DEGROSSOLI *et al.*, 2011; NOVAIS *et al.*, 2014). Contudo, os resultados mostraram que o sobrenadante de ambas culturas bacterianas estimula a atividade leishmanicida dos macrófagos infectados por um mecanismo independente de NO. Além de NO, macrófagos ativados produzem enzimas proteolíticas no fagolisossomo a fim de destruir microrganismos (HOUGHTON *et al.*, 2009; ABBAS *et al.*, 2012; WEISS e SCHAIBLE, 2015) e também convertem oxigênio molecular em ROS, que são agentes altamente oxidantes capazes de destruir diferentes classes de microrganismos (ABBAS *et al.*, 2012; PAIVA e BOZZA, 2014) incluído *Leishmania* spp. (FONSECA-SILVA *et al.*, 2016).

Também foi observado que o índice de seletividade (SI) foi maior para amastigota do que para promastigota - *P. luminescens* (9,66 e 3,92, respectivamente) e *X. nematophila* (10,39 e 19,85, respectivamente) - indicando maior seletividade às formas amastigotas. De fato, este é o alvo de preferência na elaboração de novos quimioterápicos contra leishmaniose. Juntos, esses resultados evidenciam que ambas as entomobacterias, *P. luminescens* e *X. nematophila*, têm grande potencial para serem usadas como fonte para quimioterapia, uma vez que células do hospedeiro foram significativamente menos sensíveis aos metabólitos secretados do que os agentes parasitários.

Da mesma forma que ocorreu para *L. amazonensis*, os meios condicionados de ambas as bactérias mostraram-se efetivos contra *T. cruzi* e apresentaram alto índice de seletividade ao protozoário. No entanto, ao se avaliar as características do meio condicionado de cada bactéria (aquecimento, alteração de pH e incubação com proteinase-K) observaram-se as primeiras diferenças na atividade do meio condicionado de *P. luminescens* sobre *L. amazonensis* e *T. cruzi*. A incubação do meio de *P. luminescens* com proteinase K não alterou sua atividade tripanocida, ao contrário do que ocorreu com *L. amazonensis*, indicando a natureza não peptídica de seu metabólito tripanocida.

Quanto ao meio de *X. nematophila*, este também manteve sua atividade tripanocida após aquecimento. Porém, após incubação com a resina Amberlit

XAD16, a atividade permaneceu na fração aquosa (não adsorvida pela resina) ao contrário da fração leishmanicida, que permaneceu adsorvida na resina.

Outras espécies de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* são produtoras de compostos bioativos, como estilbenes (KRONENWERTH *et al.*, 2014) e GameXPptides (CHALLINOR e BODE, 2015), szentiamida, um depsipeptideo isolado de *X. szentirmaii*, chaiaphumina e xenoamicina A, que são compostos com atividade contra uma gama de parasitos, incluindo *Trypanosoma* e *Leishmania* (ZHOU *et al.*, 2013; GRUNDMANN *et al.*, 2014). *Xenorhabdus nematophila* sintetiza tanto compostos termolábeis como termoestáveis que são efetivas contra diferentes espécies de bactérias (INMAN e HOLMES, 2012). Estes antimicrobianos podem ser secretados no meio de cultura como proteínas solúveis ou grandes complexos associados à membrana (KHANDELWAL e BANERJEE-BHATNAGAR, 2003). Estas proteínas tiveram sua atividade inseticida completamente inativadas quando aquecidas a 80° C por 15 minutos. Considerando que muitas toxinas proteicas produzidas por bactérias podem ser completamente inativadas por aquecimento, pode-se assumir que tais metabólitos anti-*Leishmania* secretados por *X. nematophila* seja uma molécula de natureza não proteica. Já a cultura de *P. luminescens* teve sua atividade praticamente extinta ao ser aquecida e tratada com proteinase K, revelando a natureza peptídica do composto leishmanicida presente no meio.

Os resultados demonstraram que os compostos secretados por ambas as bactérias são efetivos contra *L. amazonensis*, e possuem promissor potencial terapêutico contra leishmaniose.

7. CONCLUSÃO

Os metabólitos secretados por *P. luminescens* e *X. nematophila*, muito estudados como larvicidas, inseticidas, fungicidas e bacteriocidas, apresentam também atividade leishmanicida e tripanocida contra formas flageladas e amastigotas de *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

A morte de promastigotas de *L. amazonensis* parece estar relacionada a danos mitocondriais e a atividade anti-amastigota no macrófago infectado foi

independente da produção de óxido nítrico.

O composto com atividade leishmanicida parece ser um peptídeo menor que três kDa, o qual foi isolado de *P. luminescens*.

A ação contra *T. cruzi* não se deve a uma molécula proteica, uma vez que sua atividade não foi afetada pela proteinase K.

Quanto ao meio de *X. nematophila*, a fração leishmanicida permaneceu ligada à resina, enquanto que a fração com atividade contra *T. cruzi* foi encontrada na porção aquosa.

Em suma, a seletividade pelo parasito aliada a baixa citotoxicidade tornam estas bactérias promissoras fontes de compostos com potencial terapêutico que poderão ser aplicados contra a leishmaniose ou doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012. ISBN 9781437715286 1437715281 9780808924258 0808924257.

ABDELADHIM, M. et al. 2016. Molecular diversity between salivary proteins from New World and Old World sand flies with emphasis on *Bichromomyia olmeca*, the sand fly vector of *Leishmania mexicana* in Mesoamerica. PLoS neglected tropical diseases, v. 10, n. 7, p. e0004771, ISSN 1935-2735.

ALARCÓN DE NOYA, B. et al. 2016. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. Parasite Epidemiology and Control, v. 1, n. 2, p. 188-198, 6// ISSN 2405-6731.

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

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. 2007. Cutaneous leishmaniasis. Clinics in Dermatology, v. 25, n. 2, p. 203-211, 3// ISSN 0738-081X.

BASANO, S. D. A.; CAMARGO, L. M. A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 7, p. 328-337, ISSN 1415-790X.

BASU, M. K.; RAY, M. 2005. Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. Critical reviews in microbiology, v. 31, n. 3, p. 145-54, ISSN 1040-841X

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. Journal of Applied Microbiology v. 93, n. 3, p. 512-9, ISSN 1364-5072.

BLACKBURN, M. et al. 1998. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. Applied and environmental microbiology, v. 64, n. 8, p. 3036-41, Aug ISSN 1098-5336 (Electronic) 0099-2240 (Linking).

BLACKBURN, M. B. et al. 2005. The broadly insecticidal *Photorhabdus luminescens* toxin complex a (Tca): activity against the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. Journal of insect science, v. 5, p. 32, ISSN 1536-2442 (Electronic) 1536-2442 (Linking).

BODE, H. B. 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. Current opinion in chemical biology, v. 13, n. 2, p. 224-230, 4// ISSN 1367-5931.

BOEMARE, N.; AKHURST, R. The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S., *et al.* **The prokaryotes**: Springer New York, 2006. cap. 16, p.451-494. ISBN 978-0-387-25496-8.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. 2015. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease: Looking Back, Looking Ahead. *The American Journal of Pathology*, v. 185, n. 6, p. 1537-1547, 12/23/accepted ISSN 0002-9440 1525-2191.

BOWMAN, D. D. **Parasitologia Veterinaria de georgis**. 8. Brasil: Manole LTDA, 2006.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07 ISSN 0003-2697.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana. In. **Doenças Infecciosas e Parasitárias - Guia de Bolso**. 8. Brasília-DF: Brasil Ministério da Saúde, 2010a. (Série B. Textos Básicos de Saúde). ISBN 978-85-334-1657-4.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010b. Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf>.

BRASIL. 2016. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana-Situação Epidemiológica/Dados. Portal da Saúde. Brasil: Ministério da Saúde

BRASIL. 2017. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral - Situação Epidemiológica. Portal da Saúde. Brasil: Ministério da Saúde

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CALDAS, S. **Avaliação comparativa do tratamento com derivados nitroimidazólicos e triazólicos na evolução da infecção de camundongos pelo Trypanosoma cruzi** 2011. 121 (PhD). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto Ouro Preto.

CASTELLUCCI, L. C. *et al.* 2014. Host genetic factors in American cutaneous leishmaniasis: a critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, p. 279-288, ISSN 0074-0276.

CEBALLOS, L. A. *et al.* 2006. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta tropica*, v. 98, n. 3, p. 286-296, 07/12 ISSN 0001-706X.

CHALLINOR, V. L.; BODE, H. B. 2015. Bioactive natural products from novel microbial sources. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1354, n. 1, p. 82-97, ISSN 1749-6632.

CHAPPUIS, F. et al. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 873-82, Nov ISSN 1740-1526.

CHEN, L. B. 1988. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annual review of cell biology*, v. 4, p. 155-81, ISSN 0743-4634 (Print) 0743-4634.

CHIRAC, P.; TORREELE, E. 2006. Global framework on essential health R&D. *Lancet*, v. 367, n. 9522, p. 1560-1, May 13 ISSN 0140-6736.

COURA, J. R. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 113-122, ISSN 0074-0276.

DA SILVA, J. L. et al. 2017. Larvicidal and growth-inhibitory activity of entomopathogenic bacteria culture fluids against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology* Jan 06 ISSN 0022-0493.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, p. 151-156, ISSN 0036-4665.

DE SOUZA, A. A. A. et al. 2016. Natural *Leishmania (Viannia)* spp. infections in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon region reveal new putative transmission cycles of American cutaneous leishmaniasis. *Parasite*, v. 23, p. 22, 03/24/received 04/30/accepted ISSN 1252-607X.

DEGROSSOLI, A. et al. 2011. The influence of low oxygen on macrophage response to *Leishmania* infection. *Scandinavian journal of immunology*, v. 74, n. 2, p. 165-75, Aug ISSN 0300-9475.

DUTRA, W. O. et al. 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 208-218, ISSN 0074-0276.

EL-SAYED, N. M. et al. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 409-15, Jul 15 ISSN 0036-8075.

FERLINI, C.; SCAMBIA, G. 2007. Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange. *Nature Protocols* v. 2, n. 12, p. 3111-4, ISSN 1750-2799.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DOWLING, A.; WATERFIELD, N. R. 2007. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon*, v. 49, n. 4, p. 436-51, Mar 15 ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

FILHO, A. A. D. S. et al. 2004. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, n. 9, p. 1195-1199, ISSN 2042-7158.

FISCHER-LE SAUX, M. et al. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, v. 49 Pt 4, p. 1645-56, Oct ISSN 0020-7713.

FONSECA-SILVA, F. et al. 2016. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 2, p. e0004442, 02/10 10/16/received 01/17/accepted ISSN 1935-2727 1935-2735.

FONSECA EDA, S. et al. 2014. Spatial epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in a municipality of west Sao Paulo State, Brazil. *Journal of vector borne diseases*, v. 51, n. 4, p. 271-5, Dec ISSN 0972-9062.

FONSECA, S. G. et al. 2007. Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 may be Associated to the Predominance of CD8+ T cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 66, n. 2-3, p. 362-371, ISSN 1365-3083.

FONSECA, S. G. et al. 2003. TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, v. 33, n. 8, p. 2297-306, Aug ISSN 0014-2980

FORST, S. et al. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual review of microbiology*, v. 51, p. 47-72, ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227 (Linking).

GARCÍA-HERNÁNDEZ, R. et al. 2012. *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 12, p. e1974,

GARCIA, F. P. et al. 2017. A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction.

Apoptosis, v. 22, n. 1, p. 57-71, Jan ISSN 1360-8185.

GASCON, J. et al. 2007. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Revista española de cardiología*, v. 60, n. 3, p. 285-93, Mar ISSN 0300-8932.

GAUTHIER, C. et al. 2009. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 5, p. 2002-2008, 3/1/ ISSN 0968-0896.

GONZALEZ, P. et al. 2006. Diterpenoid alkaloid derivatives as potential chemotherapeutic agents in American trypanosomiasis. *Pharmacology*, v. 76, n. 3, p. 123-8, ISSN 0031-7012 (Print) 0031-7012.

GRUNDMANN, F. et al. 2014. Antiparasitic Chaiyaphumines from Entomopathogenic *Xenorhabdus* sp. PB61.4. *Journal of Natural Products*, v. 77, n. 4, p. 779-783, 2014/04/25 ISSN 0163-3864.

GUEDES, P. M. M. et al. 2012. Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 4, p. e1630,

GÜRTLER, R. E. et al. 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, v. 134, n. Pt 1, p. 69-82, 10/11 ISSN 0031-1820 1469-8161.

HEERMANN, R.; FUCHS, T. M. 2008. Comparative analysis of the *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. *BMC Genomics*, v. 9, p. 40, ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking).

HEINRICH, A. K. et al. 2016. Heterogeneous regulation of bacterial natural product biosynthesis via a novel transcription factor. *Heliyon*, v. 2, n. 11, p. e00197-e00197, 11/29 06/23/received 10/19/revised 11/11/accepted ISSN 2405-8440.

HERBERT, E. E.; GOODRICH-BLAIR, H. 2007. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nature reviews Microbiology*, v. 5, n. 8, p. 634-46, Aug ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking).

HOSTOMSKÁ, J. et al. 2009. Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC genomics*, v. 10, n. 1, p. 282, ISSN 1471-2164.

HOUGHTON, A. M. et al. 2009. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature*, v. 460, n. 7255, p. 637-41, Jul 30 ISSN 0028-0836.

HUANG, M. et al. 2007. Mitochondrial Inner Membrane Electrophysiology Assessed by Rhodamine-123 Transport and Fluorescence. *Annals of biomedical engineering*, v. 35, n. 7, p. 1276-1285, 03/20 ISSN 0090-6964 1521-6047.

INMAN, F. L.; HOLMES, L. 2012. Effect of heat sterilization on the bioactivity of antibacterial metabolites secreted by *Xenorhabdus nematophila*. *Pakistan journal of biological sciences*, v. 15, n. 20, p. 997-1000, Oct 15 ISSN 1028-8880 (Print) 1028-8880.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, v. 38, n. 1, p. 181-206, 1993/01/01 ISSN 0066-4170.

KAYE, P.; SCOTT, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* v. 9, n. 8, p. 604-615, 08//print ISSN 1740-1526.

KHANDELWAL, P.; BANERJEE-BHATNAGAR, N. 2003. Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 4, p. 2032-7, Apr ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking).

KRONENWERTH, M. et al. 2014. Bioactive derivatives of isopropylstilbene from mutasynthesis and chemical synthesis. *Chembiochem*, v. 15, n. 18, p. 2689-91, Dec 15 ISSN 1439-4227.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 811-827, ISSN 0074-0276.

LANG, T.; LECOEUR, H.; PRINA, E. 2009. Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends in Parasitology*, v. 25, n. 10, p. 464-473, 10// ISSN 1471-4922.

MARLOW, M. A. et al. 2013. Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. *PLOS ONE*, v. 8, n. 2, p. e56177,

MATEUS, D. J. S. **Genotypic analysis of the *Leishmania infantum* resistance to conventional drugs and new chemically synthesized compounds**. 2014. (MSc). *Biologia (Microbiologia Aplicada)*, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, Portugal.

MAYA, J. D. et al. 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 146, n. 4,

p. 601-620, 4// ISSN 1095-6433.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunology Review*, v. 201, p. 206-24, Oct ISSN 0105-2896 (Print) 0105-2896.

MORAES, C. B. et al. 2014. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Scientific reports*, v. 4, p. 4703, ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking).

MUNCH, A. et al. 2008. *Photorhabdus luminescens* genes induced upon insect infection. *BMC Genomics*, v. 9, p. 229, ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking).

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. Atheneu, 2005.

NIELSEN-LEROUX, C. et al. 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current opinion in microbiology*, v. 15, n. 3, p. 220-31, Jun ISSN 1879-0364.

NOLLMANN, F. I. et al. 2012. Synthesis of szentiamide, a depsipeptide from entomopathogenic *Xenorhabdus szentirmaii* with activity against *Plasmodium falciparum*. *Beilstein journal of organic chemistry*, v. 8, p. 528-33, ISSN 1860-5397 (Electronic).

NOVAIS, F. O. et al. 2014. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *The Journal of infectious diseases*, v. 209, n. 8, p. 1288-96, Apr 15 ISSN 0022-1899.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical microbiology reviews*, v. 18, n. 2, p. 293-305, Apr ISSN 0893-8512.

OWUAMA, C. I. 2001. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. *World Journal of microbiology and biotechnology*, v. 17, n. 5, p. 505-515, 2001/07/01 ISSN 0959-3993.

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. 2014. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? *Antioxidants & redox signaling*, v. 20, n. 6, p. 1000-1037, 05/26/received 08/05/revised 09/01/accepted ISSN 1523-0864 1557-7716.

PASSOS, S. R. et al. 2014. Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with

furazolidone and domperidone. International journal of antimicrobial agents, v. 44, n. 5, p. 463-465, ISSN 0924-8579.

PATHAICHINDACHOTE, W. et al. 2013. Isoleucine at position 150 of Cyt2Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* plays an important role during membrane binding and oligomerization. BMB Reports, v. 46, n. 3, p. 175-180, 05/04/received 06/26/revised 09/03/accepted ISSN 1976-6696 1976-670X.

PAVETO, C. et al. 2004. Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Catechins. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 48, n. 1, p. 69-74, January 1, 2004

RANGEL, M. et al. 2011. Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. Toxicon, v. 57, n. 7–8, p. 1081-1092, 6// ISSN 0041-0101.

RASSI, A.; MARIN, J. A.; RASSI, A. 2017. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 112, n. 3, p. 224-235, 02/16 07/24/received 11/22/accepted ISSN 0074-0276 1678-8060.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. 2009. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 152-158, ISSN 0074-0276.

RODRIGUES, J. H. D. S. et al. 2014. A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. PloS ONE, v. 9, n. 1, p. e85706,

ROMAO, P. R. et al. 1999. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. Parasitology, v. 118, n. 6, p. 559-66, Jun ISSN 0031-1820.

ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. 2005. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected balb/c mice. Journal of Parasitology, v. 91, n. 5, p. 1113-1115, 2005/10/01 ISSN 0022-3395.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annual review of microbiology, v. 55, p. 453-83, ISSN 0066-4227.

SANCHEZ-CANETE, M. P. et al. 2009. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug.

Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 53, n. 4, p. 1305-13, Apr ISSN 0066-4804.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 9, p. 581-592, 09//print ISSN 1474-1733.

SHEETS, J. J. et al. 2011. Insecticidal toxin complex proteins from *Xenorhabdus nematophilus*: structure and pore formation. *The journal of biological chemistry*, v. 286, n. 26, p. 22742-9, Jul 1 ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking).

SHI, H. et al. 2012. An insecticidal protein from *Xenorhabdus ehlersii* triggers prophenoloxidase activation and hemocyte decrease in *Galleria mellonella*. *Current microbiology*, v. 64, n. 6, p. 604-10, Jun ISSN 1432-0991 (Electronic) 0343-8651 (Linking).

SHRESTHA, Y. K.; LEE, K. Y. 2012. Oral toxicity of *Photorhabdus* culture media on gene expression of the adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Journal of invertebrate pathology*, v. 109, n. 1, p. 91-6, Jan ISSN 1096-0805

SILVA, D. A. D. **Aspectos ecológicos da fauna flebotomínea (Diptera, Psychodidae) e suas implicações na Epidemiologia da Leishmanioses em Cotia, Estado de São Paulo, Brasil.** 2005. 77 Tese. Departamento de Epidemiologia, Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública., São Paulo.

SILVA, O. et al. 2013. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, p. 1-6, 2013/06/01 ISSN 0932-0113.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Seminars in immunopathology*, v. 34, n. 6, p. 735-51, Nov ISSN 1863-2297.

SUNDAR, S. 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health* v. 6, n. 11, p. 849-54, Nov ISSN 1360-2276.

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

TOLEZANO, J. E.; SHAW, J. J. **Ecoepidemiologia da Leishmaniose tegumentar americana (LTA): perpetuação da LTA no Estado de São Paulo, região endêmica de colonização antiga.** 2000.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. 2007. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*, v. 12, n. 5, p. 835-840, 2007// ISSN 1573-675X.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. International journal for parasitology, v. 31, n. 5-6, p. 472-81, May 01 ISSN 0020-7519 (Print) 0020-7519.

URBINA, J. A. 2001. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. Current opinion in infectious diseases, v. 14, n. 6, p. 733-41, Dec ISSN 0951-7375 (Print) 0951-7375.

VIOTTI, R. et al. 2014. Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 58, n. 2, p. 635-639, ISSN 0066-4804 1098-6596.

WATERFIELD, N. R.; CICHE, T.; CLARKE, D. 2009. *Photorhabdus* and a host of hosts. Annual review of microbiology, v. 63, p. 557-74, ISSN 1545-3251.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. Immunological reviews, v. 264, n. 1, p. 182-203, 02/20 ISSN 0105-2896.

WHO. 2010. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. World Health Organization Geneva, Switzerland, p.202

WHO. World Health Organization. Chagas disease. In: HOLMES, P. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases**. Geneva, Switzerland: WHO, 2015. cap. 4.2, ISBN 978 92 4 156486 1.

WHO. 2016. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. WHO. Switzerland, p. 285–296

WHO. 2017. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet 340, Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >. Acesso em: 29/01/2018.

WINGFIELD, P. 2001. Protein precipitation using ammonium sulfate. Current protocols in protein science, v. Appendix 3, p. Appendix 3F, May ISSN 1934-3655.

WU, D.; YOTNDA, P. 2011. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. Journal of visualized experiments, v. 57, n. 57, p. e3357, Nov 21 ISSN 1940-087x.

YOSHIDA, N. 2009. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 101-107, ISSN 0074-0276.

ZHOU, Q. et al. 2013. Structure and biosynthesis of xenoamicins from entomopathogenic *Xenorhabdus*. Chemistry, v. 19, n. 49, p. 16772-9, Dec 2 ISSN 0947-6539.