



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

CAMILA BONTEMPO NUNES

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E
IMUNOMODULADORA DE ISOLADOS DE ACTINOBACTERIA DA
RIZOSFERA DE *SOLANUM LYCOCARPUM***

BRASÍLIA

2020

CAMILA BONTEMPO NUNES

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIFÚNGICA E
IMUNOMODULADORA DE ISOLADOS DE ACTINOBACTERIA DA
RIZOSFERA DE *SOLANUM LYCOCARPUM***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Coorientadora: Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meus pais, Humberto e Gisela, pelo apoio e dedicação de uma vida e por todo o esforço e incentivo para que eu chegasse até aqui. Obrigada por me apoiarem tanto a seguir a área que eu gosto. Essa conquista também resulta do esforço de vocês.

À minha segunda mãe e amiga, Maria das Candeias, pela força durante toda a minha vida. Obrigada pelo carinho em todos os momentos e por sempre conversar comigo.

À minha irmã, Luísa, por mesmo de longe me dar apoio para a superação de várias fases na vida. Obrigada por todos os conselhos dados.

À minha prima e à minha madrinha, Luana e Guaciara, por mesmo depois de tanto tempo longe, me darem tanto carinho e um apoio essencial para a conclusão dessa etapa.

Aos meus gatos, por transformarem até os dias muito ruins em dias felizes e pelo amor genuíno dado diariamente.

Ao Gabriel Albuquerque, por toda a parceria nesses anos. Obrigada por me dar suporte, por acreditar tanto em mim e por me ajudar a acreditar também, mesmo nos momentos mais difíceis. Você foi uma parte importante nessa conquista.

A todos os meus amigos da Biotec, principalmente aos que estiveram muito presentes durante essa etapa, Janaína Vieira, Maria Inês Magalhães e Arthur Soares. Obrigada pela força quase que diária que vocês me deram, pelos momentos de descontração e pela ajuda até nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas Mayan Matos, Sara Faria, Hannah Danciger, Gabriela Marques, Lívia Brito e Thaís Pacheco por todo o carinho e suporte, por sempre estarem dispostas a ouvir e ajudar, principalmente durante os últimos dois anos.

Às minhas amigas Luiza Pinheiro e Hisa Dutra, que mesmo com menos contato nos últimos anos, ainda são uma parte muito importante na minha vida.

À minha amiga do coração, Manuela Blanco, que mesmo depois de voltarmos do intercâmbio e mesmo de longe, ainda está presente no meu dia a dia e me dá tanta força em qualquer situação e a qualquer momento. Agradeço muito por ter te conhecido na Alemanha e por termos conseguido manter nossa amizade tão naturalmente, mesmo à distância.

Ao grupo do RGM, Camila Gomes, Kunal Ranjan, Camila Suguiura e Marcus Paulo, mesmo aos que acabei tendo pouco convívio, obrigada por todo o apoio e por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Ao Prof. Márcio Poças, por ter me recebido no

laboratório e me dado a oportunidade de fazer o mestrado. Agradeço por todos os ensinamentos dados, sei que muitos eu levarei para a vida.

Ao grupo do LIA, Thaís Bergmann, Clara Luna, Stephan Oliveira, Lucas Las-Casas e Tatiana Herman, por toda a paciência e por tudo que me ensinaram nesses meses no laboratório. Gostaria de agradecer em especial à Clara Luna, por ter me ensinado toda a parte prática, por ter me acompanhado durante os meus primeiros experimentos e por sempre ter me auxiliado quando eu tive dúvidas. Sem vocês eu não teria conseguido. Agradeço também à Profa. Anamélia Bocca, por ter me acolhido no laboratório como aluna de coorientação. Obrigada por toda a paciência e por todo o apoio, até o último minuto, para que eu concluísse esse trabalho. Tenho muita admiração pela pessoa e pesquisadora que você é.

Ao Prof. Fernando Pacheco, por todas as conversas, paciência e auxílio dado para execução da parte de sequenciamento do trabalho. Também ao Prof. Marcelo Brígido, pelo auxílio e esclarecimentos a respeito da filogenia. Obrigada por serem solícitos e me ajudarem com tanta boa vontade.

Ao PPG BioAni, em especial à Profa. Mônica Garcia, por toda a sua dedicação ao curso e por sempre se dispor a ouvir e auxiliar os alunos no que for possível, seja em questões profissionais ou pessoais.

Aos Professores Aldo Tavares, Vicente Martins e João Paulo Longo por aceitarem fazer parte da banca avaliadora desse trabalho.

Por fim, à CAPES, CNPq e FAP-DF pelo apoio financeiro.

RESUMO

Actinobacteria é um filo de bactérias Gram-positivas de distribuição ubíqua e corresponde a um dos principais componentes do microbioma do solo. Esse filo apresenta potencial de aplicabilidade de seus produtos secretados, principalmente devido aos compostos de seu metabolismo secundário, que são empregados como antifúngicos, antibacterianos, moduladores da resposta imune, entre outros. Até o momento os dados obtidos sobre actinomicetos no solo do Cerrado são relacionados à metagenômica e à busca por enzimas hidrolíticas. Por conseguinte, o solo desse bioma apresenta grande potencial para a bioprospecção de novos compostos derivados deste filo. Nesse trabalho, actinomicetos foram isolados e purificados da rizosfera de *Solanum lycocarpum* e os extratos de oito isolados selecionados, posteriormente identificados como *Streptomyces* spp., foram avaliados para atividades antifúngica contra linhagens de fungos patogênicos humanos e de modulação de macrófagos. A atividade antifúngica foi realizada com linhagens de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. Para a avaliação da ativação de macrófagos, avaliou-se o perfil citotóxico de cada extrato e, posteriormente, BMDMs foram incubados com os extratos e os níveis de TNF- α , IL-6, IL-10 e de óxido nítrico foram analisados no sobrenadante. A capacidade de modulação da atividade microbicida dos macrófagos também foi analisada *in vitro*. Resultados apontam atividade antifúngica para todos os extratos testados. Enquanto *C. albicans* não foi susceptível a nenhum dos extratos, o crescimento de *C. glabrata* foi reduzido por todos eles e *C. parapsilosis* apresentou susceptibilidade variável. Entre as linhagens de *Cryptococcus* spp., H99 e NIH198 tiveram seu crescimento reduzido por cinco extratos e a linhagem resistente a fluconazol, 89-610, teve seu crescimento totalmente inibido por um dos extratos. Os extratos também resultaram em modulação da resposta imune em macrófagos. Observou-se atividade imunoestimulante, pela indução da produção de TNF- α e óxido nítrico, e também imunossupressora, com concomitante inibição da produção de TNF- α e redução da capacidade microbicida de BMDMs infectados pelo fungo patogênico *C. neoformans* H99, além de indução da secreção de IL-10 em macrófagos previamente ativados por LPS. Os resultados obtidos sugerem aplicabilidade dos metabólitos secundários de actinomicetos isolados do solo do Cerrado, tanto para inibição de microrganismos, quanto modulação da resposta imune, e demandam análises mais aprofundadas sobre esses compostos.

Palavras-chave: actinomicetos do solo; Cerrado; bioprospecção; antimicrobianos; imunomodulação.

ABSTRACT

Actinobacteria represents a phylum of Gram-positive bacteria ubiquitously distributed and corresponds to one of the main components of soil microbiome. This phylum presents potential applicability of its secreted products, mainly due to the compounds from its secondary metabolism, which are used as antifungals, antibiotics, modulators of immune response, etc. So far, the research about actinomycetes in the Cerrado soils are related to metagenomics or toward the search for hydrolytic enzymes. Thus, Cerrado soils represents a promising resource for new compounds derived from the phylum. In this work, the actinomycetes were isolated and purified from the rhizosphere of *Solanum lycocarpum* and the extracts of eight selected isolates, later identified as *Streptomyces* sp., were evaluated for antifungal activity against human fungal pathogenic strains and for modulation of macrophages' response. The antifungal assessment was performed with *Cryptococcus* spp. and *Candida* spp. strains. For assessment of macrophages activation, the cytotoxic profile of each extract was assessed and, afterward, BMDMs were incubated with the extracts and TNF- α , IL-6, IL-10 and nitric oxide were quantified in the supernatant. The modulation of macrophages' antimicrobial activity was also evaluated *in vitro*. Results indicate antifungal activity for all extracts tested. Although *C. albicans* was not susceptible to any of the extracts, the growth of *C. glabrata* was inhibited by all of them and *C. parapsilosis* presented variable susceptibility. Among *Cryptococcus* spp. strains, the growth of H99 and NIH198 was impaired by five extracts and the fluconazole resistant strain, 86-610, was completely inhibited by one of the extracts. The extracts also caused modulation in the macrophages' immune response. Immunostimulant activity was observed, by induction of TNF- α and nitric oxide production, and also immunosuppressive activity, by concomitant inhibition of TNF- α production and reduction of the antimicrobial capacity of BMDMs infected by the pathogenic yeast *C. neoformans* H99, besides the induction of IL-10 secretion by previously LPS-activated macrophages. The results obtained suggest the applicability of the secondary metabolites of actinomycetes isolated from the Cerrado soils, as for microorganisms' inhibition, as for immune response modulation, and demand further analysis of these compounds.

Keywords: soil actinomycetes; Cerrado; bioprospection; antimicrobials; immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Nova representação das classes contidas no filo Actinobacteria.	15
Figura 2	Nova representação das ordens contidas na classe Actinobacteria.	16
Figura 3	Esquema de secção de raiz, demonstrando a estrutura da rizosfera.	17
Figura 4	Representação esquemática do ciclo de vida de actinomicetos esporulantes.	20
Figura 5	Quantidade de isolados obtidos da rizosfera de lobeira ou pequiizeiro.	39
Figura 6	Quantidade de isolados obtidos referente à localidade de coleta de solo.	39
Figura 7	Produção de pigmento solúvel preto por LAP3 em placa compartilhada em fase inicial de purificação, após 38 dias de incubação a 28°C.	42
Figura 8	Isolados para os quais foram obtidas culturas puras.	44
Figura 9	Culturas puras dos isolados de Acinobacteria em meio sólido e líquido.	45
Figura 10	Microscopia óptica de isolados de Actinobacteria.	46
Figura 11	Árvore filogenética dos isolados de Actinobacteria baseada em sequências de rDNA 16S.	50
Figura 12	Extratos liofilizados e ressuspensos de isolados puros aplicados aos testes de atividade biológica.	51
Figura 13	Inibição de crescimento de linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp. por extratos de actinomicetos em concentração igual a 10% do volume final, em ensaio de 72 h de incubação a 37 °C.	52
Figura 14	Inibição de crescimento de espécies de <i>Candida</i> spp. por extratos de actinomicetos em concentração igual a 10% do volume final, em ensaio de 72 h em incubação a 37 °C.	54
Figura 15	Ensaio de citotoxicidade em BMDMs murinos, sob interação por 24 h com extratos de actinomicetos nas concentrações finais 5%, 7% e 10%.	55

Figura 16	Repetição de ensaio de citotoxicidade de extratos de actinomicetos a BMDMs, sob concentrações inicialmente definidas para experimentos, em ensaio de interação por 24 h.	57
Figura 17	Quantificação de TNF- α no sobrenadante de BMDMs expostos a extratos de actinomicetos por 24 h.	58
Figura 18	Quantificação de óxido nítrico no sobrenadante de BMDMs expostos a extratos de actinomicetos por 24 h.	60
Figura 19	Contagem de UFC após 2 h e 24 h para macrófagos tratados com os extratos LAP2, LAP8, LDB2 e LDB11.	62
Figura 20	Quantificação de IL-6 no sobrenadante de macrófagos sem infecção com fungos, após interação com extratos por 24 h.	64
Figura 21	Quantificação de IL-10 no sobrenadante de macrófagos, após interação com extratos por 24 h.	65
Figura 22	Quantificação de (A) IL-6 e (B) TNF- α no sobrenadante de macrófagos infectados por H99 e tratados com os extratos, após 24 h de incubação.	66
Figura 23	Quantificação de IL-10 no sobrenadante de macrófagos infectados por H99 e tratados com os extratos, após 24 h de incubação.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequências de iniciadores usados para amplificação do gene de rRNA 16S, apresentados na ordem <i>forward</i> e <i>reverse</i> para cada par.	30
Tabela 2	Composição da reação em cadeia de polimerase para amplificação do gene de rRNA 16S com par de iniciadores universais e de iniciadores Actinobacteria-específicos.	30
Tabela 3	Parâmetros de ciclo da reação em cadeia de polimerase para amplificação do gene de rRNA 16S, com par de iniciadores universais.	31
Tabela 4	Parâmetros de ciclo da reação em cadeia de polimerase para amplificação do gene de rRNA 16S, com par de iniciadores Actinobacteria-específicos.	31
Tabela 5	Concentrações adotadas em ensaio de inibição de leveduras.	34
Tabela 6	Isolados obtidos em diferentes coletas em Goiás e no Distrito Federal.	38
Tabela 7	Morfologia macroscópica preliminar dos isolados, referente à pigmentação, em meio AGA.	40
Tabela 8	Isolados selecionados para purificação.	43
Tabela 9	Identificação dos isolados de Actinobacteria pela comparação do fragmento de rDNA 16S.	49
Tabela 10	Esquematização de inibição de linhagens de leveduras patogênicas por extratos dos isolados de Actinobacteria.	55
Tabela 11	Relação de modulação da produção do TNF- α e de óxido nítrico provocada pelos extratos.	61
Tabela 12	Resumo do perfil modulador da resposta de macrófagos murinos provocados pelos extratos de Actinobacteria.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
A	Adenina
AGA	Asparagina Glicerol Agar
AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana
ANOVA	Análise de variância
BLASTN	<i>Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide</i>
BMDM	Macrófagos derivados da medula óssea
C	Citosina
CIM	Concentração inibitória mínima
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CTAB	Brometo de cetrimônio
Da	Dalton
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	Dextran sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de ligação imunoenzimático
flu	Fluconazol
g	Força centrífuga relativa
G	Guanina
GM-CSF	Fator estimulante de macrófagos e granulócitos
GO	Goiás
h	Horas
HDAC	Histona deacetilase
HDACi	Inibidor de histona deacetilase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio
kb	Quilobase
km ²	Quilômetro quadrado
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Metro
M	Molar
mbIL-6R	Receptor de IL-6 ligado à membrana
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NaBut	Butirato de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NFAT	Fator nuclear de linfócitos T ativados
ng	Nanograma
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanômetro
n°	Número
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
NSIT	Netaji Subhas Institute of Technology
<i>p</i>	Significância estatística
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
pb	Par de bases

PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomolar
qsp	Quantidade suficiente para
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Intermediário reativo de nitrogênio
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
s	Segundo
SCN	<i>Starch Casein Nitrate Broth</i>
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
sIL-6R	Receptor solúvel de IL-6
SNC	Sistema nervosa central
sp.	Espécie
T	Timina
TE	Tris-EDTA
TGF	Fator de transformação do crescimento
Th	Linfócito T auxiliar
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Célula T regulatória
UFC	Unidade formadora de colônia
UnB	Universidade de Brasília
v/v	Percentual volume/volume
wt	<i>Wild type</i>
x	Vezes

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1.	FILO ACTINOBACTERIA	14
1.1.1.	Actinomicetos no solo	16
1.1.2.	Morfologia	18
1.2.	GÊNERO <i>STREPTOMYCES</i>	18
1.2.1.	Ciclo de vida.....	19
1.3.	METABOLISMO SECUNDÁRIO E SÍNTESE DE ENZIMAS.....	20
1.3.1.	Antibióticos.....	21
1.3.2.	Moduladores do sistema imune	22
1.4.	BIOMA CERRADO	25
2.	OBJETIVOS	26
2.1.	OBJETIVOS GERAIS.....	26
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3.	METODOLOGIA.....	27
3.1.	COLETA DE AMOSTRAS E PRÉ-TRATAMENTO.....	27
3.2.	ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS	27
3.3.	PURIFICAÇÃO DAS CULTURAS.....	28
3.3.1.	Protocolo I – Coleta de micélio de substrato	28
3.3.2.	Protocolo II – Coleta preferencial de esporos.....	28
3.3.3.	Tratamento com antibiótico	28
3.4.	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS.....	28
3.4.1.	Caracterização macroscópica.....	28
3.4.2.	Caracterização microscópica	29
3.5.	AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE DE rRNA 16S	29
3.5.1.	Classificação taxonômica e árvore filogenética.....	31
3.6.	OBTENÇÃO DE EXTRATOS	32
3.6.1.	Extrato bruto	32
3.6.2.	Liofilização	33
3.7.	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	33
3.7.1.	Organismos teste.....	33
3.7.2.	Ensaio para avaliação de inibição do crescimento de leveduras	33
3.8.	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE IMUNOMODULADORA.....	34
3.8.1.	Animais.....	34
3.8.2.	Cultura de células murinas.....	34
3.8.3.	Avaliação de citotoxicidade de extratos	35
3.8.4.	Ensaio de ativação de BMDM in vitro.....	35
3.8.5.	Ensaio de interação de BMDMs e <i>C. neoformans</i> H99.....	36

3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4.	RESULTADOS	38
4.1.	ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS	38
4.2.	CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DE ISOLADOS NÃO-PUROS	39
4.3.	PURIFICAÇÃO.....	42
4.3.1.	Caracterização de isolados puros	43
4.4.	SEQUENCIAMENTO DO GENE DE rRNA 16S.....	47
4.5.	FERMENTAÇÃO E PREPARO DE EXTRATOS.....	50
4.6.	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	51
4.7.	ATIVIDADE DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS	55
4.7.1.	Citotoxicidade de extratos a células murinas.....	55
4.7.2.	Produção de TNF- α	57
4.7.3.	Quantificação de óxido nítrico.....	58
4.7.4.	Capacidade microbicida.....	61
4.7.5.	Quantificação de citocinas nos ensaios de infecção	63
5.	DISCUSSÃO	69
6.	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. FILO ACTINOBACTERIA

O filo Actinobacteria é constituído por bactérias Gram-positivas, de alto conteúdo guanina-mais-citosina (G+C) em seu DNA, que pode abranger de 51% em espécies de *Corynebacterium*, a mais de 70% do DNA, como nos gêneros *Streptomyces* e *Frankia* (Ventura et al, 2007). Actinobacteria representa uma das maiores unidades taxonômicas do domínio Bacteria, e apresenta distribuição ubíqua (Barka et al, 2016). Ao decorrer da evolução, esses organismos desenvolveram diferentes modos de vida, sendo a maioria de vida livre, em ecossistemas terrestres ou mesmo aquáticos, incluído o ambiente marinho (Macagnan et al, 2006). Também pertencem ao filo microrganismos patogênicos de animais (espécies de *Tropheryma*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* e *Mycobacterium*), patógenos de vegetais (*Rhodococcus* sp. e *Clavibacter* sp.), comensais gastrointestinais (*Bifidobacterium* sp.) e comensais de plantas (*Frankia* sp. e *Leifsonia* sp.) (Ventura et al, 2007; Barka et al, 2016).

No início de sua descrição, actinomicetos eram considerados uma forma de transição entre bactérias e fungos. Isso pode ser justificado, primeiramente, pela formação de micélio em muitas espécies de Actinobacteria, similar a fungos filamentosos. Além disso, muitos dos actinomicetos formadores de micélio passam por diferenciação das hifas, o que leva à formação de esporos e que consiste também em uma forma de reprodução. Contudo, a comparação a fungos é inexata. Actinomicetos apresentam células delgadas, com material genético contido em um nucleóide procariótico e parede celular composta por peptidoglicano, além de serem suscetíveis a agentes antibacterianos (Barka et al, 2016).

O filo incluiu, previamente, 5 subclasses, 6 ordens e 14 subordens (Ludwig et al, 2012). Essa taxonomia foi baseada na relação filogenética a partir do sequenciamento do rDNA 16S dos organismos. Contudo, aumentou progressivamente o debate científico acerca da definição da filogenia e, conseqüentemente, da taxonomia de todo um filo serem baseadas em um único marcador molecular. Esse debate foi reforçado pela observação contínua de que o sequenciamento de rDNA 16S não era capaz de diferir espécies ou mesmo gêneros muito próximos, sendo necessários meios adicionais de classificação. Dessa forma, surgem novos marcadores genéticos para tal diferenciação, como por exemplo, os genes *rpoB* e *ssgB* (Girard et al, 2013).

Ludwig et al (2015) discutem que a análise comparativa de genes múltiplos ainda não pode ser empregada na filogenia, devido à falta de um conjunto de dados detalhado para outros marcadores moleculares. Por outro lado, a disponibilidade de cada vez mais genomas totais

sequenciados de organismos do filo consiste em um aumento significativo de informação genética, que possibilita a identificação de genes específicos a organismos, em âmbito de gênero e família, uma vez que representam regiões conservadas dos genomas procarióticos (Ludwig & Schleifer, 2005; Kirby, 2011).

Em 2015, Ludwig et al propuseram uma taxonomia atualizada do filo, embasados em análises comparativas de seqüências de genes conservados dentro de espécies. Tais análises corroboraram a visão da evolução procariótica derivada da pequena subunidade de RNA ribossomal e, dessa forma, bancos de dados atualizados e corrigidos do gene de rRNA 16S foram a base para a nova taxonomia. Subclasses e subordens foram eliminadas, elevadas a classes e ordens, respectivamente. Dessa forma, o filo passa a apresentar 6 classes: Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitrospirae, Rubrobacteriia e Thermoleophilia (Figura 1). Além disso, a classe Actinobacteria passa a abranger também as ordens classificadas como subordens, previamente inclusas na ordem Actinomycetales, o que totaliza 18 ordens, sendo essas Acidothermaceae, Actinomycetales - Micrococcales, Actinopolysporales, Bifidobacteriales, Catenulesporales, Corynebacteriales, Cryptosporangiaceae, Frankiaceae, Geodermatophilaceae, Glycomycetales - Micromonosporales, Jiangellales, Kineosporiales, Nakamurellaceae, Propionibacteriales, Pseudonocardiales, Sporichthyaceae, Streptomycetales e Streptosporangiales (Figura 2). Por conseguinte, 43 famílias do filo pertencem à classe Actinobacteria, enquanto as 10 famílias remanescentes distribuem-se entre as demais 5 classes do filo (Ludwig et al, 2015).

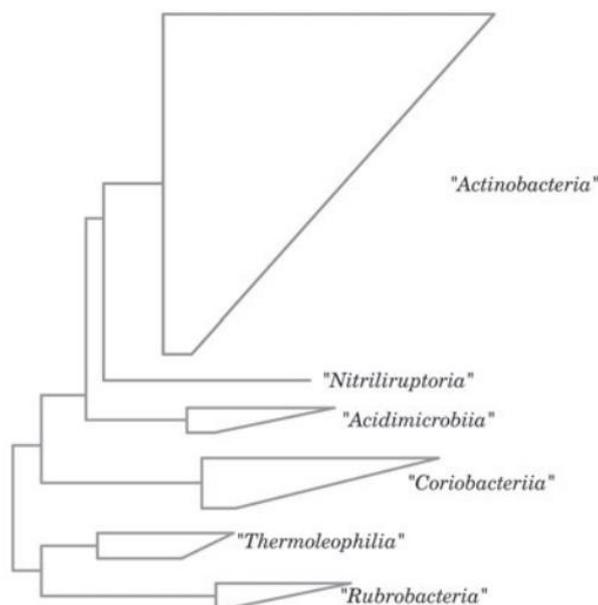


Figura 1. Nova representação das classes contidas no filo Actinobacteria. Fonte: Ludwig et al (2015).

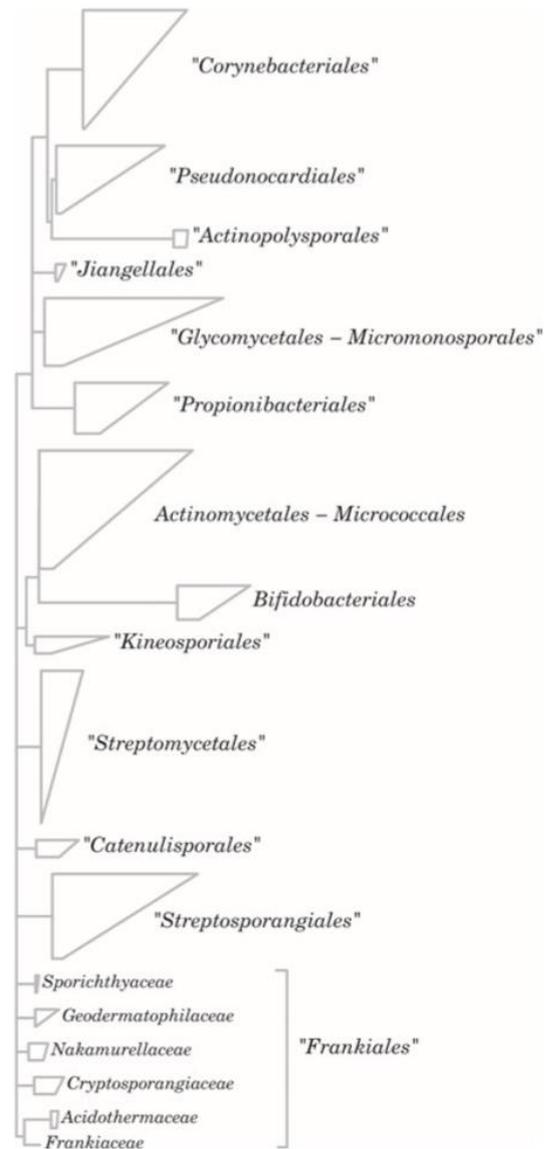


Figura 2. Nova representação das ordens contidas na classe Actinobacteria. Fonte: Ludwig et al (2015).

1.1.1. Actinomicetos no solo

Actinomicetos se adaptaram aos mais diversos ambientes e podem ser encontrados no solo, na água doce ou salgada e no ar, embora sejam mais abundantes no solo. Nesse ambiente, correspondem a parte essencial e a um dos filos mais abundantes da população microbiana (Barka et al, 2016), podendo ser encontrados tanto na superfície, como a mais de 2 metros de profundidade (Goodfellow & Williams, 1983).

O filo apresenta, majoritariamente, organismos saprófitos, habitantes de solo, cuja maior parte do ciclo de vida corresponde ao estado de esporo semidormente, principalmente devido à carência de nutrientes no meio (Mayfield et al, 1972). Nesse habitat, esporos de *Streptomyces* resistentes à dessecação são geralmente abundantes (Chater et al, 2010). Sabe-se

que fatores como pH, temperatura e umidade do solo também influenciam o crescimento de actinomicetos (Barka et al, 2016).

Enquanto muitas bactérias apresentam-se dispersas, aderidas às partículas de solo, certas bactérias interagem diretamente com as raízes vegetais (Glick, 1995). Como designado primeiramente por Hiltner (1904), “rizosfera” representava a interação entre bactérias e raízes de leguminosas. Atualmente, o termo ainda é adotado, porém com maior adequação. Rizosfera descreve a região do solo de ação e influência de uma raiz, logo, é a parte do solo onde raízes vegetais, solo e a biota interagem (Lynch & Leij, 2012).

Efetivamente, a concentração de bactérias na rizosfera – por grama de solo – é, de forma geral, muito superior a concentração de bactérias no restante do solo (Glick, 1995). Além disso, foi amplamente demonstrado que Actinobacteria constitui a rizosfera de diversas espécies vegetais (Miller et al, 1989; Crawford et al, 1993; Siciliano et al, 1998; Coombs & Franco, 2003; Khamna et al, 2009), sendo actinomicetos saprofíticos comuns entre as bactérias componentes do rizoplano e da rizosfera (Solans et al, 2009) (Figura 3).

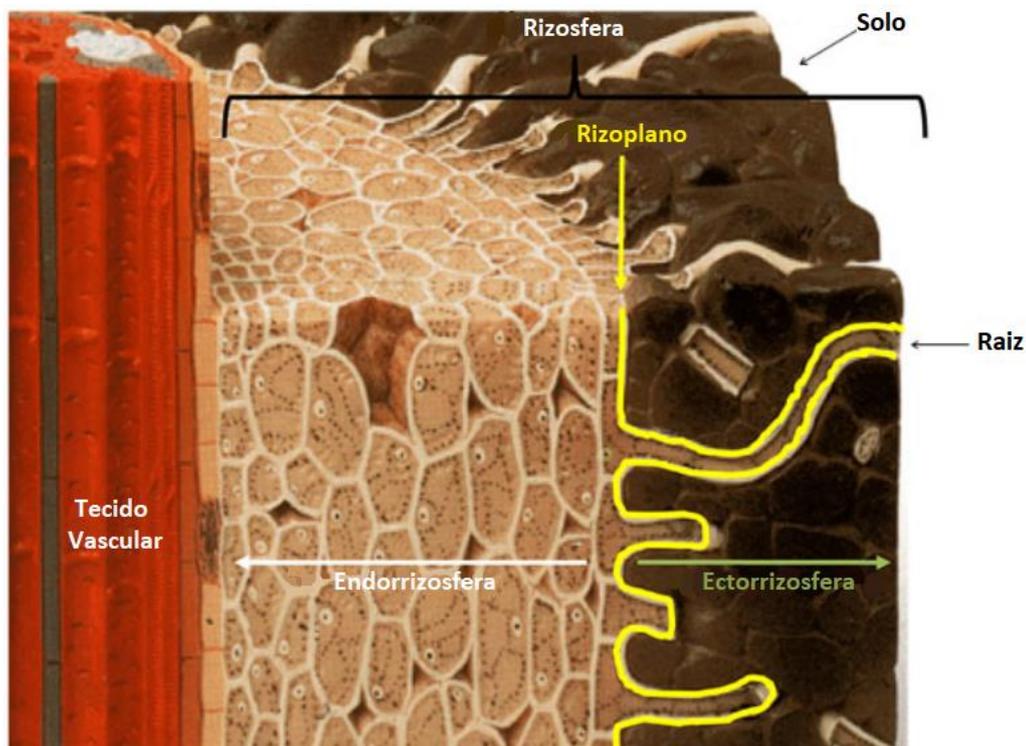


Figura 3. Esquema de secção de raiz, demonstrando a estrutura da rizosfera. Fonte: adaptada de McNear Jr. (2013).

Actinomicetos são capazes de influenciar o crescimento de plantas simbiotes de duas maneiras, direta ou indiretamente. Podem promover o crescimento de forma indireta ao prevenir

os efeitos deletérios de outros microrganismos do ambiente, seja pelo controle biológico ou pela ação antagonista a possíveis patógenos vegetais. Nesse caso, destacam-se a colonização e a síntese de metabólitos secundários, que previnem a proliferação dos patógenos (Fenton et al, 1992). De maneira direta, actinomicetos promovem o crescimento quando a planta obtém suprimento a partir de um composto produzido pelo microrganismo, ou quando actinomicetos facilitam à planta, de alguma forma, a obtenção de nutrientes provenientes do solo. Exemplos de promoção direta do crescimento vegetal são a síntese de fitormônios e a fixação de nitrogênio no solo (Glick, 1995).

Em síntese, a relação simbiótica entre actinomicetos e plantas se origina pelo estímulo promovido pelos exsudatos da raiz para o crescimento de actinomicetos na rizosfera. Por sua vez, esses microrganismos apresentam atividade antagonista a patógenos vegetais e/ou proveem o crescimento vegetal, enquanto se beneficiam dos exsudatos para crescimento e síntese de compostos (Tokala et al, 2002).

1.1.2. Morfologia

Uma evidência de diversificação referente a actinomicetos diz respeito à morfologia desses microrganismos. Actinobacteria abrange gêneros das mais variadas morfologias. Há organismos cocóides, como *Micrococcus*, ou cocobacilares, como *Arthrobacter*, que, assim como membros do gênero *Corynebacterium*, podem se reproduzir por fissão binária. Outros, como espécies de *Nocardia* e *Mycobacterium*, apresentam crescimento filamentosos com posterior fragmentação. Há também organismos, como *Actinoplanes* e *Streptomyces*, que apresentam crescimento filamentosos com a formação de micélio ramificado permanente e altamente diferenciado (Chater & Hopwood, 1993). Características incomuns referentes ao desenvolvimento também estão presentes em muitos gêneros do filo. Observa-se, por exemplo, a formação de micélio aéreo esporulante em espécies de *Streptomyces*, cuja função é também reprodutiva (Barka, et al, 2015), ou o estado não-replicativo persistente observado para alguns microrganismos de *Mycobacterium* (Ventura et al, 2007).

1.2. GÊNERO *STREPTOMYCES*

Devido a algumas de suas características, o gênero *Streptomyces* se tornou proeminente nos estudos genéticos de Actinobacteria. Entre tais características estão a facilidade no isolamento do microrganismo e em seu cultivo *in vitro* e a sua complexa e interessante morfologia (Chater & Hopwood, 1993). Além disso, streptomicetos são abundantes e apresentam grande importância no solo. Essas bactérias expressam enzimas capazes de quebrar

diversos polissacarídeos, como celulose, quitina, xilana, ágar e outras macromoléculas, devido a produção de variadas exoenzimas hidrolíticas. Por fim, destaca-se a sua importância para a medicina e indústria, uma vez descoberta a sua variedade em produção de metabólitos secundários (Barka et al, 2016).

Streptomyces representa o gênero dominante de populações habitantes do solo e consiste em mais de 95% dos isolados de *Actinomycetales*, a partir do solo (Barka et al, 2016). Desde a publicação da sequência genômica da espécie modelo *Streptomyces coelicolor*, há quase duas décadas (Bentley et al, 2002), o genoma de diversas outras espécies do gênero já foi sequenciado e cientificamente disponibilizado.

Atualmente, *Streptomyces* é melhor representado em coleções de cultura que a maioria dos demais gêneros. No entanto, estudos metagenômicos sugerem que muitos outros gêneros do filo apresentam diversidade comparável a *Streptomyces*, somente não há técnicas e ferramentas para seu isolamento, até o momento (Ludwig et al, 2015).

1.2.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Streptomyces* se inicia pela germinação de um esporo, quando o ambiente apresenta condições favoráveis (Figura 4). A partir do esporo, crescem hifas vegetativas, que, pelo seu extenso crescimento e ramificação, formam o micélio vegetativo ramificado intrincado característico do gênero (Chater, 1972). Em divergência ao crescimento comumente observado em bactérias unicelulares, *Streptomyces* cresce por extensão da extremidade das hifas. Enquanto, de forma geral, as células bacterianas crescem por inclusão de novos componentes na parede celular lateral, streptomicetos se alongam pela combinação de extensão e ramificação das pontas das hifas. Além disso, a divisão celular não leva à fissão de células, mas à formação de septos irregularmente espaçados ao longo das hifas (Wildermuth & Hopwood, 1970). Dessa forma, *Streptomyces* apresenta micélio multicelular, com compartimentos interligados contendo inúmeras cópias do material genético (Claessen et al, 2014).

Durante seu crescimento e sob determinadas condições, o micélio vegetativo de *Streptomyces* passa por diferenciação celular, dando origem a novas hifas com estrutura e morfologia diferentes. Essas hifas diferenciadas se formam após um processo como o de morte celular programada, no qual os componentes das hifas vegetativas que sofreram lise podem ser usados para a formação das novas hifas. Essas últimas correspondem ao micélio aéreo, estrutura capaz de se diferenciar e formar cadeias de esporos, responsáveis pela superfície aveludada característica em culturas do gênero em meio sólido (Barka et al, 2016). Após dispersão, esses

esporos são capazes de iniciar o crescimento do micélio multicelular e dar origem a um novo ciclo (Claessen et al, 2014).

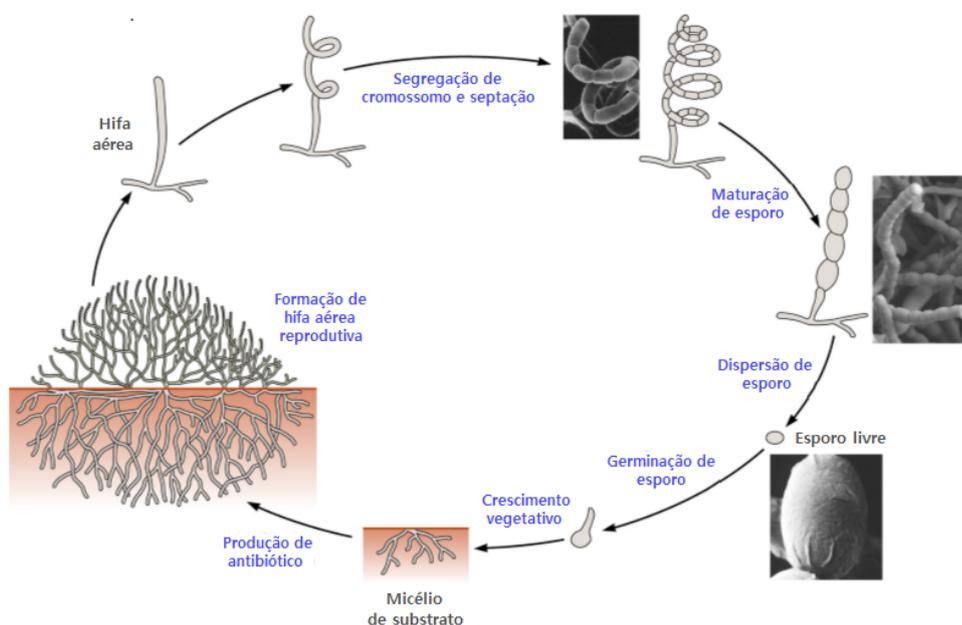


Figura 4. Representação esquemática do ciclo de vida de actinomicetos esporulantes. Fonte: adaptada de Barka et al (2015).

Uma vez que ocorre aumento significativo de nutrientes disponíveis no meio, gerado pelo mecanismo como de morte celular programada de parte do micélio vegetativo, processo esse necessário para o desenvolvimento das novas hifas aéreas esporulantes, acredita-se que a produção e liberação de antibióticos concomitantemente a esse mecanismo garantiu a sobrevivência de actinomicetos durante seu ciclo de vida e diferenciação, contra microrganismos competidores que seriam atraídos pelos nutrientes no ambiente (Chater & Hopwood, 1993). Dessa forma, nota-se geralmente a extensa produção de metabólitos secundários em *Streptomyces* durante o fim da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária, momento que corresponde à diferenciação celular e formação do micélio aéreo formador de esporos (Bibb, 2005).

1.3. METABOLISMO SECUNDÁRIO E SÍNTESE DE ENZIMAS

A relevância biotecnológica e médica desse microrganismo é, em grande parte, responsável pelo interesse no filo Actinobacteria. Esses microrganismos são capazes de sintetizar enzimas extracelulares hidrolíticas variadas, como proteases (Takana & Omura, 1990; Balachandran et al, 2012), quitinases (Blaak et al, 1993; Gupta et al, 1995; Mahadevan &

Crawford, 1997), glucanases (Damude et al, 1993; Harchand & Singh, 1997; Trejo-Estrada et al, 1998), peroxidases (Ramachandra et al, 1988; Casciello et al, 2017), entre outras. Entre essas, estão enzimas que permitem a obtenção de nutrientes a partir de matéria orgânica insolúvel (Chater et al, 2010) e representa a importância dessas bactérias em habitats terrestres, pela decomposição inicial desses resíduos recalcitrantes (Schrempf, 2007).

Além da extensa produção de exoenzimas, se tornou de interesse substancial a investigação de pequenas moléculas secretadas por actinomicetos. Moléculas do metabolismo secundário – geralmente entre 100 e 3000 Da –, principalmente de *Streptomyces*, que são biologicamente ativas (Chater et al, 2010). Entre os agentes derivados de metabólitos secundários de Actinobacteria estão, por exemplo, antifúngicos, antibacterianos, anti-helmínticos, antitumorais e moduladores da resposta imune (Van Wezel & McDowall, 2011).

1.3.1. Antibióticos

Desde a obtenção da actinomicina, o primeiro composto com ação antibiótica isolado de uma espécie de Actinobacteria (Waksman & Woodruff, 1940), foi crescente o interesse a respeito dos metabólitos secundários desses microrganismos e uma variedade de antibióticos produzidos naturalmente pelo filo foram descobertos. Compostos de estrutura química variada, que agem em diferentes processos celulares e levam à inibição de outros organismos. Ainda na mesma década, Waksman & Woodruff (1942a; 1942b) isolaram a streptotricina de *Streptomyces lavendulae*, mas foi somente a streptomomicina, isolada de *Streptomyces griseus* (Schatz et al, 1944; Schatz & Waksman, 1944), o primeiro antibiótico obtido a partir do gênero *Streptomyces* a ser aplicado ao uso terapêutico (Chater et al, 2010).

O filo Actinobacteria produz aproximadamente 70% dos antibióticos atualmente conhecidos, sendo somente o gênero *Streptomyces* responsável por metade dos compostos clínicos utilizados (Avalos et al, 2019). A capacidade de produção entre as espécies é, por outro lado, variável. Isto é, enquanto algumas espécies de *Streptomyces* produzem apenas um antibiótico, outras são capazes de produzir, individualmente, uma série de compostos de diferentes classes (Barka et al, 2016).

Estudos recentes evidenciam, ainda mais, a surpreendente capacidade do metabolismo secundário de *Streptomyces* sp. Avalos et al (2019) discutem a produção de compostos voláteis por streptomycetos, que se dispersam pelo ambiente e interferem no crescimento de outros microrganismos à distância. Na natureza, tais compostos voláteis podem ser promotores ou inibidores de crescimento ou, ainda, moduladores de resistência a drogas ou de *quorum sensing*, e, dessa forma, influenciam o fenótipo e comportamento de microrganismos ao redor (Audrain

et al, 2015). No caso de streptomicetos habitantes do solo e de superfícies, compostos voláteis são sintetizados com baixo valor energético investido e secretados, e têm capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas a longas distâncias. Essas correspondem a moléculas de amônia de alta pressão de vapor e baixo peso molecular que facilmente se difundem pelo ar, água ou solo. Além de sua ação em isolado, Avalos et al (2015) sugerem que os compostos voláteis liberados por *Streptomyces* auxiliam na solubilidade e difusão de outros metabólitos secundários mais complexos – com ação antimicrobiana – produzidos pelo organismo, que dependem de maior investimento de energia. Dessa forma, as pequenas moléculas de amônia de ação antibiótica poderiam representar um mecanismo de sensibilização de possíveis bactérias competidoras, previamente à síntese de antibióticos complexos, como por exemplo, os policetídeos.

Actinomicetos representam, de forma ampla, um recurso valioso para a investigação científica contra a emergência de microrganismos multirresistentes às drogas convencionais (Hopwood, 2008; Bérdy, 2012). Ademais, como ressaltado por Barka et al (2015), a aplicabilidade dos metabólitos secundários de Actinobacteria não se limita apenas à ação antimicrobiana.

1.3.2. Moduladores do sistema imune

Até o momento, alguns metabólitos moduladores do sistema imune foram isolados de culturas de Actinobacteria. Dentre estes metabólitos podemos citar a rubratina, obtida de *Nocardia rubra* (de Reijke et al, 1997), a bestatina, de *Streptomyces olivoreticuli* (Blomgren et al, 1980), e FR-900494, de *Kitasatospora kifunense* (Iwami et al, 1987), capazes de aumentar o perfil inflamatório em camundongos e seres humanos. Por outro lado, a brasilicardina, isolada de *Nocardia brasiliensis* (Komaki et al, 1999), a pentalenolactona, de *Streptomyces filipinensis*, a higromicina A, de *Streptomyces hygroscopicus*, agente antibacteriano conhecido que apresenta atividade imunomoduladora (Uyeda et al, 2001), a rapamicina, de *Streptomyces hygroscopicus*, FK506, de *Streptomyces tsukubaensis*, e FK520, de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* (Andexer et al, 2011), apresentam a capacidade de induzir uma resposta imunossupressora.

A imunomodulação se refere, de forma ampla, à regulação do sistema imunológico, seja a regulação natural, isto é, para a manutenção da homeostase, seja induzida, como intervenção terapêutica que vise à modificação da resposta imune. Quanto à imunomodulação induzida, duas finalidades são possíveis, a ação imunoestimulatória e a ação imunossupressora. Por um lado, a adequação da resposta imune é almejada para combater infecções estabelecidas, para

prevenir infecções em casos de imunodeficiência e para combater o câncer. Por outro, alergias, autoimunidade e transplantes são condições em que a supressão da resposta imune seria desejada (Saroj et al, 2012).

Há formas de se modular o sistema imune previamente ao estabelecimento de uma infecção, como é o caso da vacinação. Contudo, uma vez que a infecção já se estabeleceu, o estímulo da resposta imune pode auxiliar o combate a patógenos. A terapia imunomodulatória empregada nesse caso é, todavia, complexa, uma vez que se obtém diferentes respostas imunológicas para o combate a um mesmo patógeno e, além disso, que ainda são abstrusas as causas do balanço e mudança entre os tipos de resposta (Gea-Banacloche, 2006).

Por imunodeficiência tem-se a situação na qual a função imunológica de um indivíduo está patologicamente reduzida. A imunodeficiência pode ser adquirida, consequência de desnutrição, câncer – ou do tratamento desse – e de infecções, ou pode ser primária, quando transtornos hereditários levam a defeitos no desenvolvimento ou função do sistema imune (McCusker & Warrington, 2011). A ocorrência de imunodeficiências adquiridas é elevada e pode-se dizer que o caso mais comum é a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O agente causador da AIDS, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecta e destrói os linfócitos T auxiliares CD4+ (do inglês, T helper ou Th), comprometendo a resposta imune do hospedeiro, o que favorece progressivamente o desenvolvimento de infecções e de determinados tipos de câncer (Monaco et al, 2016). Por outro lado, transtornos de imunodeficiência primária são considerados raros, com exceção da deficiência de imunoglobulina-A (IgA), exemplo de condição primária mais frequente (McCusker & Warrington, 2011).

No combate ao câncer, técnicas como a administração sistêmica de citocinas, o estímulo, ativação e proliferação *in vitro* de células imunes do próprio paciente para posterior administração, o provimento de anticorpos para bloqueio de moléculas que desencadeiam a inibição da resposta imune inflamatória – ao prevenir que essas se liguem a seus receptores nas células imunes –, ou mesmo a administração de anticorpos que se ligam diretamente às células tumorais foram algumas das abordagens já propostas para modulação do sistema imune, de forma a melhorar a resposta do paciente ao tratamento. No entanto, essas estratégias apresentam objeções, uma vez que podem provocar autoimunidade, alta toxicidade ao organismo, ou mesmo serem inespecíficas, não levando ao resultado desejado, além dos efeitos adversos causados. Propõem-se, então, a combinação da imunomodulação a quimioterápicos, de modo a se obter relação sinérgica entre as terapias (Gea-Banacloche, 2006).

Em oposição à necessidade de ação imunoestimulatória, têm-se condições como a hipersensibilidade, para a qual a imunossupressão é necessária. Há diferentes tipos de hipersensibilidade, classificadas de acordo com o mecanismo de ativação e duração da reação. A classe mais comum de hipersensibilidade é a de tipo I, relacionado às alergias. Nessa classe, a resposta é classificada como imediata e é mediada pela imunoglobulina E (IgE), produzida pela sensibilização a diversos antígenos extrínsecos (Gea-Banacloche, 2006). A IgE se liga a receptores de basófilos e mastócitos e, uma vez detectado o antígeno correspondente, a degranulação é desencadeada, levando à liberação de diversos mediadores, como a histamina e os cisteinil-leucotrienos (Reber et al, 2017). Como efeito, há sintomas como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e produção de muco, ou, em casos severos de anafilaxia, diminuição da pressão arterial, broncoespasmos severos e colapso cardiovascular, quadros altamente letais (Sampson, 2003).

Outra condição que representa ativação indevida da resposta inflamatória é a autoimunidade. Comumente classificada também como reação de hipersensibilidade, a autoimunidade apresenta, contudo, diferença crucial na classificação, uma vez que o antígeno desencadeante da reação é intrínseco (Gea-Banacloche, 2006). O transtorno de autoimunidade pode ser entendido como uma falha no sistema imune de reconhecimento e diferenciação do que é próprio e do que é estranho ao organismo. O princípio da autotolerância é ineficaz nessa condição. Consequentemente, ocorre a ativação da resposta inflamatória contra antígenos do próprio organismo, causando danos às suas próprias células e tecidos (Saroj et al, 2012).

Além da autoimunidade e de reações de hipersensibilidade, o transplante de órgãos ou de células também requer, em associação, a supressão da resposta imune. De outro modo, os tecidos transplantados seriam reconhecidos como estranhos pelo sistema imune do indivíduo receptor e o sensibilizariam. Em consequência, haveria resposta inflamatória contra o órgão ou células transplantadas e provocaria a rejeição pelo organismo. Dessa forma, a administração de imunossupressores permite o controle da inflamação, o que aumenta a probabilidade de aceitação do transplante (Gea-Banacloche, 2006).

A aplicação de imunomoduladores se mostra benéfica ou mesmo imprescindível em diferentes casos clínicos. As drogas geralmente administradas, no entanto, acarretam efeitos adversos graves no organismo, como a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade (Uyeda et al, 2001). Por conseguinte, em busca de melhora na terapia imune clínica e da diminuição de efeitos colaterais, propõe-se a bioprospecção para a descoberta de novas drogas imunomoduladoras.

1.4. BIOMA CERRADO

O Cerrado é uma formação vegetal do tipo savana (Sano et al, 2010), que ocupa área aproximada de 24% em relação à área territorial do Brasil, o que se estima equivaler a uma área total de 2.036.488 km². Esse é o segundo maior bioma brasileiro e abrange, além do Distrito Federal, dez estados: Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins (Ministério do Meio Ambiente, 2011). Devido à sua extensão e heterogeneidade de ecossistemas, o Cerrado abriga enorme biodiversidade (Ministério do Meio Ambiente, 2006) e representa uma área oportuna para a bioprospecção.

O Cerrado possui mais de 4800 espécies de plantas e vertebrados encontrados apenas nesse bioma e, por isso, é considerado um *hotspot* de biodiversidade mundial (Strassburg et al, 2017). Entre as variadas espécies vegetais, o pequi (*Caryocar brasiliense*) e a lobeira (*Solanum lycocarpum*) são organismos símbolo do Cerrado e espécies nativas que se destacam popularmente pelas suas aplicações. O pequi apresenta, além de sua importância econômica e alimentar, relevância medicinal, uma vez que suas folhas são usadas na medicina popular como anti-inflamatório (Jorge et al, 2019) e para tratamento de doenças respiratórias (Pinto et al, 2016). Em corroboração, estudos que investigaram a aplicação do pequi mostraram propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do óleo extraído da polpa (Roesler et al, 2008; Torres et al, 2016). Além do pequi, o fruto da lobeira também é empregado na medicina popular, mas para o tratamento de diabetes e obesidade, além da redução dos níveis de colesterol (Andrade et al, 2016).

Tendo em vista a representatividade dessas duas espécies vegetais no Cerrado, além da inexistência de pesquisas que investiguem a aplicação biotecnológica de actinomicetos da rizosfera de plantas desse bioma, o pequi e a lobeira foram selecionados como espécies vegetais cuja amostra de solo da rizosfera seria coletada nesse projeto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Considerando a importância da bioprospecção dos produtos secretados por bactérias, o objetivo deste trabalho foi investigar possíveis aplicações dos compostos derivados do metabolismo secundário de espécies de Actinobacteria isoladas da rizosfera de *Solanum lycocarpum* e *Caryocar brasiliense*, para a inibição de crescimento de fungos e a modulação de macrófagos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e purificar actinomicetos de amostras de solo da rizosfera de *Solanum lycocarpum* e *Caryocar brasiliense*;
- Obter compostos de metabolismo secundário de actinomicetos em cultura pura;
- Avaliar a influência dos extratos de actinomicetos no crescimento de fungos patogênicos humanos *in vitro*;
- Analisar a toxicidade dos extratos a células de mamíferos;
- Avaliar a influência dos extratos na resposta imune de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (BMDMs);
- Avaliar a influência dos extratos na resposta imune de BMDMs, quando em condição de infecção *in vitro*, pela análise de capacidade microbicida e quantificação de citocinas dessas células.

3. METODOLOGIA

3.1. COLETA DE AMOSTRAS E PRÉ-TRATAMENTO

As coletas de amostra de solo ocorreram durante o mês de julho de 2018, em diferentes localidades no estado de Goiás e no Distrito Federal (DF), todas feitas a cerca de 10 cm de profundidade, em um total de 10 amostras de solo. No Parque Ecológico Ermida Dom Bosco (DF), na Fazenda Sucupira (DF) e no município Alto Paraíso de Goiás (GO), as amostras foram coletadas da rizosfera de lobeiras (*Solanum lycocarpum*). No Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, as coletas foram feitas da rizosfera de pequizeiros (*Caryocar brasiliense*). Por fim, na Reserva Ecológica do IBGE, as amostras foram obtidas da rizosfera de pequizeiros e lobeiras.

O protocolo utilizado foi uma adaptação do descrito por Agadagba (2014). Um grama de cada amostra de solo foi armazenado em estufa a 30 °C por 24 horas para secagem. Esse pré-tratamento reduz o número de células vegetativas bacterianas, enquanto os esporos de muitos actinomicetos persistem (Williams & Cross, 1971). Para as amostras de solo da Reserva Ecológica do IBGE, primeiramente tentou-se o pré-tratamento com fenol, no qual cada amostra seca foi suspensa em 9 mL de solução salina estéril (0,9%) e 1 mL de solução fenólica 15% e misturada no vortex por 2 min. Após incubação de 40 minutos, cinco diluições seriadas 1:10 foram feitas para cada suspensão e 200 µL das diluições 10^{-4} e 10^{-5} foram semeados em placas grandes de meio Asparagina Glicerol Agar (AGA) (1% glicerol, 0,1% L-asparagina, 0,1% fosfato de potássio dibásico, 0,01% solução de sais traço para actinomiceto, 1,5% ágar), também identificado como meio n° 5 do International *Streptomyces* Project (ISP 5) (Shirling & Gottlieb, 1966), meio empregado na literatura para isolamento e purificação de actinomicetos a partir de amostras de solo. As placas foram incubadas a 28 °C por duas semanas e observadas diariamente.

Devido à ausência de microrganismos nas placas de cultura, mesmo após duas semanas de incubação, e após repetição do procedimento, secou-se novamente um grama de solo das mesmas amostras e um grama de solo das demais amostras, sob mesmas condições. Cada amostra seca foi suspensa em 10 mL de solução salina (0,9%) estéril e misturada no vortex por 2 minutos. O procedimento se seguiu da forma já descrita, sem o tratamento com fenol.

3.2. ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS

Após duas semanas de incubação, colônias com aspecto similar a actinomicetos foram estriadas separadamente em novas placas de meio AGA. A seleção foi feita quanto: I) ao

aspecto mais seco da colônia, comum a muitos actinomicetos, II) à aderência da colônia ao ágar, devido à formação de micélio de substrato, III) ao crescimento mais lento da colônia dessas bactérias (Yaminisudha, 2015). Para a purificação, fez-se a seleção dos isolados por ocorrência de pigmentação da hifa ou produção de pigmento solúvel.

3.3. PURIFICAÇÃO DAS CULTURAS

3.3.1. Protocolo I – Coleta de micélio de substrato

Nesse protocolo, uma porção de colônia isolada contendo ágar foi coletada com alça de platina, macerada em nova placa e estriada por esgotamento. Os isolados foram reestriados sucessivamente em meio AGA.

3.3.2. Protocolo II – Coleta preferencial de esporos

Os isolados passaram por sucessivos estriamentos em meio alternativo AGA, sem adição de glicerol, a fonte de carbono do meio, identificado como meio AA (0,1% L-asparagina, 0,1% fosfato de potássio dibásico, 0,01% solução de sais traço para actinomiceto, 1,5% ágar). Nesse protocolo, culturas sólidas foram incubadas até o aparecimento de aspecto aveludado das colônias. O inóculo foi obtido pela raspagem leve da superfície das colônias, com alça de platina estéril, com mínimo dano ao micélio de substrato da colônia, para coleta preferencial de esporos.

3.3.3. Tratamento com antibiótico

Para conclusão da purificação, os isolados foram sucessivamente estriados em meio AA, acrescido de ácido nalidíxico ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Hayakawa & Nonomura, 1989) e incubados a 28 °C. A purificação foi confirmada por microscopia óptica, após incubação em meio não-seletivo, NDB (0,3% extrato de carne, 0,5% peptona, 1% dextrose), por 5 dias, sob agitação de 150 rpm e a 28 °C. Para estoque, os isolados foram congelados em glicerol 35% a -80 °C.

3.4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

3.4.1. Caracterização macroscópica

As características morfológicas dos isolados obtidos foram observadas após inóculo em meio AGA sólido. Esses foram estriados separadamente e incubados a 28 °C por 7 dias.

Características como o aspecto e pigmentação da colônia, produção de pigmento solúvel e aparente formação de esporos foram observadas.

3.4.2. Caracterização microscópica

Características referentes à morfologia do micélio foram analisadas, principalmente referente à espessura, e presença de ramificação das hifas.

3.5. AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE DE rRNA 16S

Inóculo de esporos dos isolados puros foi feito em 3 mL de meio líquido NDB e incubados a 150 rpm, a 28 °C por 2 dias. O DNA total dos isolados foi extraído como descrito em protocolo de extração de DNA de actinomicetos, cordialmente fornecido pelo Netaji Subhas Institute of Technology (NSIT). O micélio das culturas foi coletado com ponteiros estéreis cortadas e lavado três vezes com tampão Tris-EDTA (TE) (1 M Tris-Cl, 0,5 M EDTA, pH 8,0). As hifas foram maceradas e as células lisadas em vortex, após adição de TE, CTAB-NaCl (2%), NaCl (1,3 M), lisozima (0,2 mg/mL), proteinase K (0,2 mg/mL) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (0,35%). Após incubações a 37 °C por 1 h e a 65 °C por 15 min, a solução Fenol : Clorofórmio : Álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionada em duas rodadas, seguido de adição da solução Clorofórmio : Isopropanol (24:1). Ao sobrenadante das amostras foi adicionada RNase A (10 mg/mL), seguido de incubação por 45 min a 37 °C. Para precipitação do DNA, foram usados acetato de sódio (0,3 M) e isopropanol (0,6 v/v). O pellet de DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% resfriado e foi ressuspensão em água MilliQ estéril. As amostras foram mantidas a -20 °C para armazenamento.

O DNA total foi usado como molde para a amplificação do rDNA 16S por reação em cadeia de polimerase (PCR). Para as reações, foram utilizados os iniciadores universais de rDNA 16S, 27f e 1492r (Coombs & Franco, 2003) e iniciadores Actinobacteria-específicos, SC-Act-235aS20 – SC-Act-878aA19 (Schäfer et al, 2010), cujas sequências foram apresentadas na Tabela 1.

As reações foram feitas com a enzima *Taq* DNA recombinante (500 U) (Invitrogen) em volume final igual a 25 µL (Tabela 2). Os parâmetros de reação para o par de iniciadores universais e para os pares Actinobacteria-específicos são apresentados na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente. O resultado da amplificação foi confirmado por eletroforese em gel 0,8% de agarose corado com brometo de etídeo, pela comparação ao marcador molecular 1kb (Kasvi).

Para o par de iniciadores universais, foi necessária a purificação da banda do tamanho desejado, após separação no gel de agarose. Esse procedimento foi feito com o kit Wizard SV

Gel and PCR Clean-Up System da Promega, conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Para os isolados que não obtiveram qualidade no sequenciamento da banda purificada, foi necessária tentativa de aprimoramento dos componentes de reação, visando ao aumento de especificidade. Dessa forma, reações foram feitas com o acréscimo de formamida (1,25, 2,5 e 5%), sendo a concentração 2,5% (v/v) adotada, uma vez que apresentou produto amplificado, com maior especificidade. Além disso, tentou-se aprimorar a reação pela diminuição da concentração de primer, de dNTP mix e de MgCl₂ (Alkami, 1999).

Tabela 1. Sequências de iniciadores usados para amplificação do gene de rRNA 16S, apresentados na ordem *forward* e *reverse* para cada par.

Iniciadores	Sequência	Fragmento amplificado (pb)
27f	5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG	~1500
1492r	5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT	
SC-Act-235aS20	5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	~640
SC-Act-878aA19	5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG	

Tabela 2. Composição da reação em cadeia de polimerase para amplificação do gene de rRNA 16S com par de iniciadores universais e de iniciadores Actinobacteria-específicos.

Tampão <i>Taq</i>	1 x
dNTP mix	800 µM
MgCl ₂	2 mM
Iniciador <i>forward</i>	0,4 µM
Iniciador <i>reverse</i>	0,4 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase	1,25 U
DNA molde	1 µL
Água Milli-Q	qsp 25 µL

Os produtos de PCR foram purificados em reação com as enzimas SAP (0,18 U/µL) e EXOI (0,2 U/µL) em termociclador na seguinte reação: 37 °C por 1h30, seguido de 80 °C por 20 min e 4 °C por 20 min. As amostras foram encaminhadas para sequenciamento em volume final igual a 7 µL, sendo 3 µL de primer, e em concentração final entre 5-20 ng de DNA.

Tabela 3. Parâmetros de ciclo da reação em cadeia de polimerase para amplificação do gene de rRNA 16S, com par de iniciadores universais.

Temperatura	Duração	
95 °C	3 min	
94 °C	30 s	25 ciclos
52 °C	30 s	
72 °C	1,5 min	
72 °C	10 min	

Tabela 4. Parâmetros de ciclo da reação em cadeia de polimerase para amplificação do gene de rRNA 16S, com par de iniciadores Actinobacteria-específicos.

Temperatura	Duração	
95 °C	3 min	
94 °C	30 s	35 ciclos
72 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	15 min	

3.5.1. Classificação taxonômica e árvore filogenética

A qualidade das sequências obtidas no sequenciamento foi analisada com a ferramenta PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) (Togawa & Brígido, 2003), considerando-se o valor de corte de ≥ 20 . O cromatograma das sequências com qualidade acima do valor de corte foi analisado na ferramenta Chromas (Technelysium Pty Ltd) para determinar a qualidade das regiões. As extremidades das sequências com picos não bem-definidos devido à perda de sinal foram retiradas com a ferramenta de edição de sequência no programa BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999).

No BioEdit, as sequências antissenso foram convertidas em senso pela ferramenta *Reverse Complement* e gerou-se uma fita consenso pelo alinhamento com a fita senso. Uma vez que a região do gene amplificada pelos iniciadores se sobrepunha em um fragmento da sequência, se fez a comparação de alinhamento entre a fita consenso amplificada pelos iniciadores específicos e as sequências obtidas dos iniciadores universais. A fita de iniciadores universais que gerou melhor alinhamento foi usada para combinar as duas sequências de iniciadores. Inconsistências no alinhamento foram resolvidas no Chromas pela análise da

qualidade do par de bases no cromatograma. Uma sequência consenso foi gerada combinando-se a amplificação dos dois pares de iniciadores. As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados GenBank (NCBI) por meio de BLASTN, acessado em novembro de 2020.

O alinhamento das sequências dos isolados e das sequências de referências obtidas no BLASTN foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE e a curadoria do alinhamento foi feita com a ferramenta Gblocks, com auxílio do site *Méthodes et Algorithmes pour la Bio-informatique* (Dereeper et al, 2008). No programa MEGA X 10.2.2, fez-se a análise evolutiva pelo método de máxima verossimilhança, com o modelo de *General Time Reversible* (GTR) e análise estatística *bootstrap* com 1000 réplicas (Kumar et al, 2018). A inferência da árvore foi feita pelo método de distância entre vizinhos e a linhagem de *Bacillus subtilis* IAM 12118 foi usada como grupo externo.

3.6. OBTENÇÃO DE EXTRATOS

3.6.1. Extrato bruto

Entre os isolados purificados, foram selecionados para fermentação e avaliação de bioatividade aqueles que apresentavam pigmentação solúvel em cultivo em meio AGA sólido (Tabela 8). Tal característica foi previamente associada à ocorrência de atividade biológica em actinomicetos (Abraham & Chauhan, 2018).

O protocolo adotado para a fermentação foi uma adaptação do exposto por Cheepurupalli et al (2017). A partir do estoque, culturas dos isolados foram crescidas em meio sólido AGA para esporulação por 7 dias. Esporos dos isolados foram inoculados em meio *seed* para actinomicetos (1% amido, 0,5% glicose, 0,5% extrato de levedura, 0,5% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e incubados a 28 °C por 3 dias a 150 rpm. Essas culturas foram usadas para inóculo de 15% (v/v) em 100 mL de meio de fermentação para actinomiceto, SCN (1% amido, 0,03% caseína, 0,2% nitrato de potássio, 0,2% cloreto de sódio, 0,2% fosfato de potássio dibásico, 0,005% sulfato de magnésio, 0,002% carbonato de cálcio, 0,001% sulfato ferroso hepta-hidratado), e foram incubadas a 28 °C por 11 dias, totalizando 14 dias de incubação. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 17000 g por 10 min para retirada da biomassa, e o sobrenadante recolhido e armazenado a 4 °C.

3.6.2. Liofilização

Os extratos brutos foram congelados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde foram mantidos por 24 horas. Posteriormente, foram submetidos a liofilização e, em seguida, os produtos liofilizados foram ressuspensos em água Milli-Q estéril, em 10% do volume inicialmente submetido à liofilização. Os extratos liofilizados foram esterilizados em filtros descartáveis $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Kasvi) e armazenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até os experimentos.

3.7. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.7.1. Organismos teste

Como organismos indicadores de atividade antimicrobiana foram usadas as leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* H99, *Cryptococcus neoformans* 89-610, *Cryptococcus gattii* NIH198.

3.7.2. Ensaio para avaliação de inibição do crescimento de leveduras

Baseado em protocolo CLSI M27-A3 (Wayne, 2008), os organismos-teste foram inoculados em 3 mL de meio Sabouraud Dextrose (SDB) (1% peptona, 2% glicose), e incubados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 horas. As devidas diluições foram feitas para que os inóculos finais correspondessem a concentração entre $1 - 2 \times 10^4$ UFC/mL. Os experimentos foram realizados em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (0,165 mol/L) e suplementado com 0,2% glicose, em microplacas de 96 poços, com volume total de 200 μL por poço, e foram incubadas sem agitação por 72 h. Após incubação, a leitura de absorbância foi feita por espectrofotometria, sob o comprimento de onda igual a 530 nm. Uma leitura inicial foi feita, posteriormente ao inóculo do ensaio, para dedução nos valores de absorbância finais, de forma a excluir vieses, como por exemplo, a pigmentação e sua intensidade para cada extrato.

Como drogas controle, foram usados butirato de sódio (NaBut) em concentração elevada (200 mM) e fluconazol, em concentração inibitória mínima (CIM) referente às linhagens de *Cryptococcus* spp. (Perfect et al, 1996; Miller et al, 2004; Nascimento et al, 2017) e concentração maior que o CIM para as espécies de *Candida* spp. (Azevedo et al, 2010) (Tabela 5). O controle positivo de crescimento foi incubado com solução tampão fosfato-salino (PBS), mesmo estoque utilizado para a diluição dos extratos. Um controle sem inóculo de microrganismo também foi feito, no qual apenas RPMI-1640 e PBS foram adicionados. A concentração final do extrato aplicada ao experimento foi igual a 10% do volume final por poço.

Tabela 5. Concentrações adotadas em ensaio de inibição de leveduras.

	Fluconazol ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Butirato de sódio (mM)
<i>C. neoformans</i> H99	4	200
<i>C. neoformans</i> 89-610	16	200
<i>C. gattii</i> NIH198	8	200
<i>C. albicans</i>	2	200
<i>C. glabrata</i>	16	200
<i>C. parapsilosis</i>	4	200

3.8. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

3.8.1. Animais

Os animais utilizados para o estudo foram camundongos de linhagem isogênica de C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade. Todos os camundongos foram criados no biotério do Instituto de Biologia – UnB, sendo mantidos em padrão sanitário, recebendo água e alimentação “*ad libitum*”. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA-UnB), sob projeto intitulado: “Papel de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) na Infecção Murina por Patógenos Fúngicos” (UnBDoC nº 55924/2016) e conduzidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA).

3.8.2. Cultura de células murinas

Os macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) foram obtidos pela diferenciação das células tronco hematopoiéticas murinas conforme protocolo recomendado por Lutz et al (1999) e padronizada pelo nosso grupo. O fêmur e a tíbia de animais eutanasiados foram retirados e, as células, obtidas pela lavagem da medula óssea. Após a lavagem, as hemácias foram lisadas com solução de lise (8,3 g/L cloreto de amônio; 0,01 M tampão Tris-HCl) e as células tronco hematopoiéticas foram contadas em câmara de Neubauer. Em cada placa, 2×10^6 células foram incubadas em meio RPMI-1640 com gentamicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 20 ng/mL de fator estimulante de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (ImmunoTools) e 50 μM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em incubadora a 37 °C sob atmosfera de 5% CO_2 . Após 3 dias de incubação, adicionou-se mais RPMI-1640 e, após 6 dias do procedimento inicial, trocou-se o meio de cultivo das células. Após 8 dias de incubação, as células dendríticas foram retiradas

junto ao sobrenadante de cultivo e os macrófagos, aderidos às placas, foram desaderidos em incubação com solução TrypLE por 30 min.

Uma vez que, mesmo ao se utilizar GM-CSF, a polarização completa para macrófagos M1 na diferenciação não é garantida e, além disso, que tratamentos adicionais e análises de marcadores principais para M1 não foram feitos nesse projeto, foi considerado que os macrófagos apresentam perfil semelhante ao M1, ou seja, M1-like.

3.8.3. Avaliação de citotoxicidade de extratos

O efeito citotóxico dos extratos foi avaliado com o kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay G1782 da Promega, conforme protocolo do fabricante. Uma vez que a concentração de amostra usualmente testada pelo grupo em experimentos imunológicos é de 10% do volume final, essa foi a concentração máxima inicialmente estipulada para a avaliação citotóxica dos extratos aos macrófagos. Testaram-se também concentrações finais mais baixas, de 5% e 7% de extrato. Após o experimento, a concentração final 1% de extrato foi avaliada para aqueles com alta citotoxicidade nas concentrações anteriores. As concentrações finais estão identificadas nos gráficos.

3.8.4. Ensaios de ativação de BMDM *in vitro*

Os BMDMs foram separados como recomendado por Lutz et al (1999) e a densidade de células de 1×10^5 células por poço foi usada em todos os experimentos. As células foram incubadas em exposição aos diferentes extratos por 24 h, nos seguintes grupos: I) células + extrato; II) células + extrato + lipopolissacarídeos (LPS); III) células + extrato + LPS + interferon- γ (IFN- γ). As concentrações finais de LPS e IFN- γ aplicadas ao experimento foram, respectivamente, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 20 ng/mL . Para cada grupo, fez-se o grupo controle, no qual PBS foi adicionado aos poços. Para extratos que apresentaram citotoxicidade, mesmo em concentração final igual a 5%, a concentração aplicada aos experimentos foi de 1% ou 0,5%. A concentração final igual a 5% foi selecionada para os extratos que apresentaram viabilidade celular aproximada ou igual a 70%, sob tal concentração. Após incubação, o sobrenadante das células foi coletado e armazenado a -20°C até os experimentos.

3.8.4.1. Produção de citocinas

Os níveis de fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) foram quantificados pelo método de ELISA, do tipo sanduíche. Nesse ensaio, os poços são previamente revestidos com o anticorpo de captura específico à citocina. Após incubação

com as amostras de sobrenadante ou citocina *standard*, para ligação ao primeiro anticorpo, o anticorpo de detecção é adicionado. Esse se liga a outro epítipo da citocina, formando o complexo “sanduíche” característico do método. Em seguida, a enzima estreptoavidina-HRP é adicionada e se acopla ao complexo. Por fim, adiciona-se a solução substrato, que reage com a enzima acoplada, e há geração de cor. Após interrupção da reação, esse sinal é mensurado pela absorbância da amostra sob comprimento de onda igual a 450 nm. A intensidade do sinal gerado é diretamente proporcional à concentração da citocina alvo presente na amostra. A concentração da citocina nas amostras é aferida pela curva padrão produzida com a citocina *standard*.

A quantificação da citocina no sobrenadante das células foi feita com os kits TNF alpha Mouse Uncoated ELISA Kit, IL-6 Mouse Uncoated ELISA kit e Mouse IL-10 Uncoated ELISA, da Invitrogen, conforme as instruções do protocolo do fabricante. A quantificação de citocinas foi feita em sobrenadante de BMDMs tratados com os extratos e, posteriormente, de BMDMs infectados com o fungo patogênico H99 e tratados com os extratos.

3.8.4.2. Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos foi avaliada de forma indireta, pela quantificação de nitrito (NO₂), pela reação de Griess. Nesse método, o reagente Griess é preparado com 50% (v/v) de solução sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 5%, e 50% (v/v) de solução NEED a 0,1%. O princípio do método se baseia na geração de N₂O₃ pela acidificação do nitrito, ou auto-oxidação de óxido nítrico, que reage com a sulfanilamida e produz derivados de diazônio. Esses intermediários reativos interagem com o NEED, o que produz um cromóforo que absorve fortemente a 540 nm (Bryan & Grisham, 2007). Os sobrenadantes dos diferentes grupos foram incubados por 15 min no escuro junto à solução de Griess e, após interrupção da reação, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro para o comprimento de onda igual a 540 nm. Uma curva padrão de nitrito foi usada para comparação e quantificação de óxido nítrico nas amostras.

3.8.5. Ensaio de interação de BMDMs e *C. neoformans* H99

BMDMs foram obtidos como previamente descrito, inoculados em placas de 96 poços em densidade de 1×10^5 células por poço, para as quais definiram-se os grupos com e sem ativação por LPS (0,5 µg/mL), e foram incubados por 3 horas em estufa a 37°C e sob atmosfera de 5% CO₂. As leveduras foram opsonizadas com o anticorpo monoclonal 18B7 (39 µg/mL), cedido pelo Prof. Dr. Arturo Casadevall, durante 30 minutos antes da infecção. Foram adicionadas à cultura em multiplicidade de infecção (do inglês, MOI) igual a 5 e incubou-se

por 2 horas. Posteriormente, os poços foram lavados com meio RPMI-1640 a 37 °C, de forma a remover células leveduriformes não internalizadas. Fez-se a reposição do meio às células, com reestímulo de LPS para o devido grupo e adição dos extratos nas concentrações utilizadas. Como controle de internalização, fez-se o grupo de 2 horas de infecção, ao qual apenas PBS estéril foi adicionado, que foi lisado e plaqueado logo após primeira lavagem.

Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C e as células foram lavadas novamente com PBS, para retirada de células leveduriformes livres.

3.8.5.1. Quantificação de unidades formadoras de colônias

Após ensaio de interação, os macrófagos dos grupos 2 e 24 horas foram lisados com solução SDS (0,05%). 100 µL da solução foram adicionados por poço da triplicata e, após ressuspensão, diluiu-se na proporção de 1:10. 50 uL da suspensão foram plaqueados em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (1% peptona, 2% glicose, 1,2% ágar) e incubados em estufa a 28 °C. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas após 3 dias de incubação.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de dados foi feita no software GraphPad Prism 8.0, sendo os testes estatísticos aplicados para cálculo de diferenças significativas: one-way ANOVA com múltiplas comparações, quando na comparação dentro de grupos, ou teste t. A diferença estatística foi demonstrada com * e # para $p < 0.05$; ** e ## para $p < 0.01$; *** e ### para $p < 0.001$; **** e #### para $p < 0.0001$, para análise dentro dos grupos, de uma amostra ao seu controle. Para diferença significativa em análises entre grupos, consideraram-se os mesmos valores de p , e essa foi indicada com o símbolo “#” acompanhado por uma barra.

4. RESULTADOS

4.1. ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS

Um total de 74 possíveis actinomicetos foi isolado a partir das amostras de solo coletadas. A relação entre número de actinomicetos isolados e o local de coleta de solo é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Isolados obtidos em diferentes coletas em Goiás e no Distrito Federal.

Local	Data de coleta	Número de isolados	
		Lobeira	Pequizeiro
Reserva IBGE	02/07/2018	0	14
Ermida Dom Bosco	19/07/2018	39	–
Alto Paraíso	18/07/2018	13	–
Chapada dos Veadeiros	16/07/2018	–	4
Fazenda Sucupira	23/07/2018	4	–
		56	18
Total		74 isolados	

(–): não houve coleta de amostra de solo no local.

Pelos dados obtidos, observa-se que o número de actinomicetos na amostra foi mais elevado na rizosfera da lobeira do que na rizosfera do pequizeiro, ao menos para actinomicetos possíveis de cultivo *in vitro*, sob as condições adotadas (Figura 5). Visto que cerca de 75% dos isolados correspondem à rizosfera de lobeira, essa mostra-se um alvo potencial para a investigação científica de espécies de actinomicetos no Cerrado.

Referente à localidade de coleta do solo, obtiveram-se mais isolados com aspecto semelhante ao geral observado para actinomicetos na amostra da Ermida Dom Bosco, proveniente da rizosfera de lobeira, que corresponde a mais da metade dos isolados obtidos (Figura 6). Em seguida, tem-se um número bem próximo de isolados provenientes da Reserva IBGE e de Alto Paraíso. Por fim, as amostras de solo coletadas na Chapada dos Veadeiros e próximo à Fazenda Sucupira foram as que menos apresentaram isolados de morfologia semelhante a actinomicetos, uma vez que cada uma forneceu apenas 5% dos isolados do projeto.

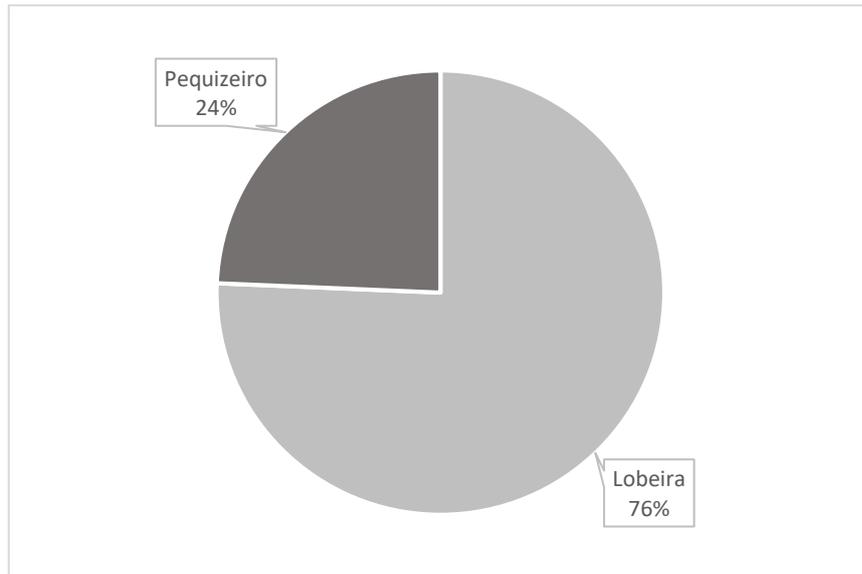


Figura 5. Quantidade de isolados obtidos da rizosfera de lobeira ou pequizeiro.

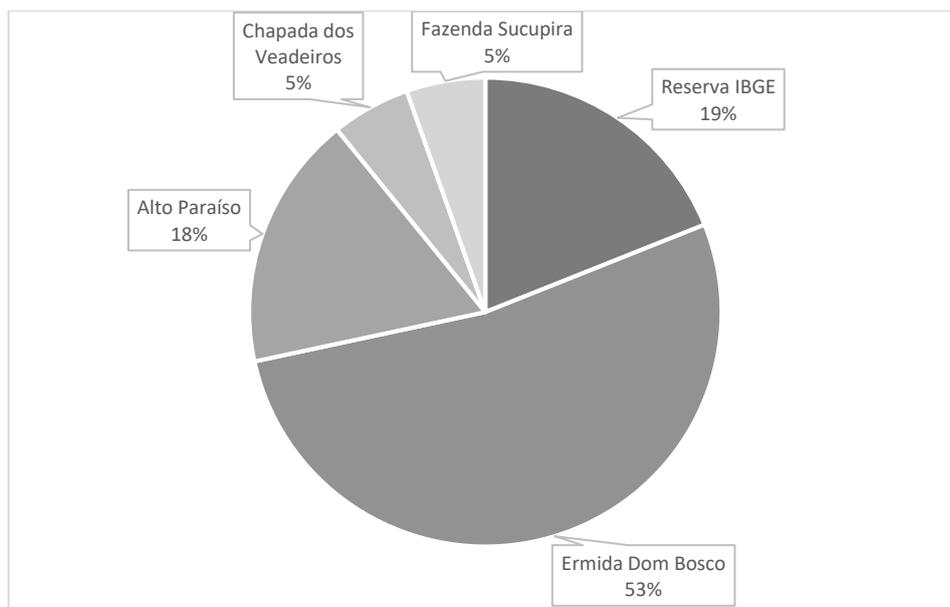


Figura 6. Quantidade de isolados obtidos referente à localidade de coleta de solo.

4.2. CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DE ISOLADOS NÃO-PUROS

As características previamente citadas foram observadas, em cultivo em meio AGA, para cada isolado obtido, enquanto as culturas em questão ainda eram mistas (Tabela 7).

Tabela 7. Morfologia macroscópica preliminar dos isolados, referente à pigmentação, em meio AGA.

(Continua)

Amostra	Isolado	Pigmentação		
		Hifa de substrato	Hifa aérea/esporos	Solúvel
Lobeira - Alto Paraíso	LAP1	Marrom claro	Amarelo	Alaranjado
	LAP2	Marrom	Marrom claro	Alaranjado
	LAP3	Marrom claro	Marrom claro	Preto
	LAP4	–	–	–
	LAP5	Marrom claro	Amarelo	–
	LAP6	–	Cinza	–
	LAP7	Marrom	Cinza	–
	LAP8	Rosa claro	Rosa/cinza	Alaranjado
	LAP9	–	–	–
	LAP10	Rosa claro	Rosa	–
	LAP11	Marrom claro	Cinza claro	Vinho
	LAP12	Amarelo claro	Cinza	–
	LAP13	–	Amarelo	–
Lobeira - Ermida Dom Bosco	LDB1	–	–	–
	LDB2	Marrom	Amarelo	Marrom
	LDB3	–	Bege	–
	LDB4	–	–	–
	LDB5	–	–	–
	LDB6	Amarelo claro	–	–
	LDB7	Marrom claro	Bege	–
	LDB8	–	Cinza claro	–
	LDB9	–	Cinza claro	–
	LDB10	–	–	–
	LDB11	Marrom	Cinza claro	Alaranjado
	LDB12	Marrom claro	Cinza	–
	LDB13	Marrom claro	Bege	–
	LDB14	–	Cinza claro	–
	LDB15	–	–	–
	LDB16	Marrom claro	Cinza claro	–
	LDB17	–	–	Amarelo
	LDB18	–	Cinza escuro	–
	LDB19	–	Cinza escuro	–
	LDB20	–	Amarelo	–
	LDB21	–	Amarelo claro	–
	LDB22	–	Cinza claro	–
	LDB23	–	Bege	–
	LDB24	–	Amarelo claro	–
	LDB25	Marrom claro	Cinza claro	–
	LDB26	Rosa claro	–	–
	LDB27	–	–	–
	LDB28	Marrom claro	–	–
	LDB29	–	–	–
	LDB30	Marrom claro	Marrom claro	–
	LDB31	–	–	–
	LDB32	Azul escuro	Azul claro/cinza	–

Tabela 7. Morfologia macroscópica preliminar dos isolados, referente à pigmentação, em meio AGA.

(Continuação)

Amostra	Isolado	Pigmentação		
		Hifa de substrato	Hifa aérea/esporos	Solúvel
Lobeira - Ermida Dom Bosco	LDB33	–	Amarelo claro	–
	LDB34	Rosa	Rosa claro	–
	LDB35	–	–	–
	LDB36	–	Marrom	–
	LDB37	Amarelo claro	Amarelo	–
	LDB38	–	–	–
	LDB39	–	–	–
Pequi 1 - IBGE	P1A	–	Cinza	–
	P1B	Rosa	Cinza	–
	P1C	–	Cinza	–
	P1D	–	–	–
	P1E	–	–	–
	P1F	–	–	–
	P1G	–	–	–
	P1H	Preto	Cinza	Roxo
	P1I	Laranja	Laranja	–
Pequi 2 - IBGE	P2A	Marrom claro	Cinza	Marrom
	P2B	Marrom claro	Cinza	Marrom
	P2C	–	–	–
	P2D	Cinza claro	Laranja/preto	–
	P2E	–	Laranja	–
Pequi 1 - Parque Nacional	PPN1A	Marrom claro	Cinza claro	Marrom
	PPN1B	–	–	–
Pequi 2 - Parque Nacional	PPN2A	Amarelo claro	Amarelo claro	–
	PPN2B	–	–	–
Lobeira - Fazenda Sucupira	LS1	Marrom claro	–	Alaranjado
	LS2	Amarelo claro	–	Alaranjado
	LS3	–	–	Amarelo
	LS4	Laranja	Amarelo claro	–

(–) indica ausência de pigmento.

O tempo para secreção de pigmento solúvel em meio AGA mostrou-se variável entre os isolados. Alguns liberavam pigmento no meio após poucos dias de incubação, enquanto outros o faziam somente após incubação por período superior a duas semanas. Como no caso do isolado LAP3, quando incubado em estufa a 28 °C, em placa dividida com outros isolados e na fase inicial da purificação, após 38 dias o isolado havia secretado pigmento solúvel preto no meio de cultura (Figura 7). É relevante ressaltar que o meio AGA é incolor, portanto, a pigmentação percebida nas culturas é proveniente do metabolismo do microrganismo cultivado.

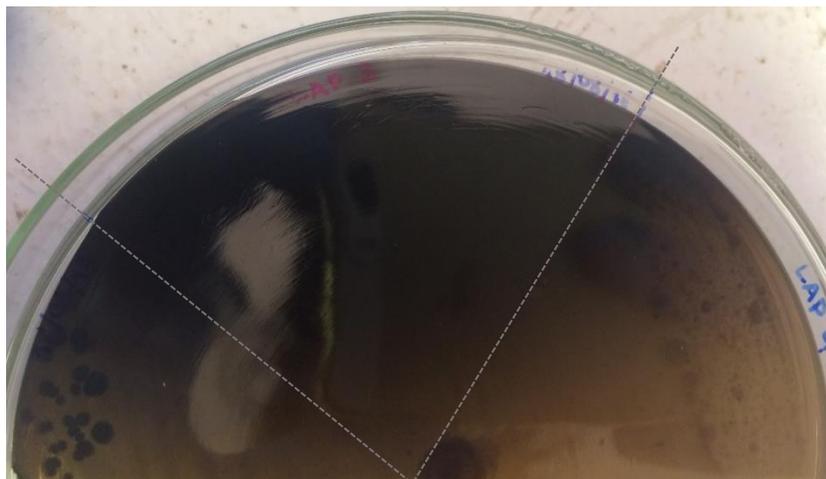


Figura 7. Produção de pigmento solúvel preto por LAP3 em placa compartilhada em fase inicial de purificação, após 38 dias de incubação a 28°C. Linhas tracejadas delimitam área onde o isolado foi estriado.

4.3. PURIFICAÇÃO

Actinomicetos são capazes de produzir variados pigmentos, como produtos intra ou extracelulares (Abraham & Chauhan, 2018), e a produção de pigmentos em culturas desses microrganismos pode estar associada à bioatividade. Como demonstrado em estudos prévios, melaninas produzidas por bactérias apresentam, além de ação protetiva, como a antioxidante (Kiran et al, 2014), ação antimicrobiana (Vasanthabharathi et al, 2011), antitumoral (El-Naggar & El-Ewasy, 2017) e anti-inflamatória (Kurian et al, 2015). Dessa forma, e como demonstrado por Abraham & Chauhan (2018), a ocorrência de pigmentação na cultura pode representar uma abordagem eficiente para a investigação de actinomicetos com atividade biológica.

A partir dos 74 prováveis actinomicetos isolados, foram selecionados 13 organismos isolados da rizosfera de lobeiras, como apresentado na Tabela 8. A seleção foi baseada na caracterização em meio AGA (Tabela 7) e o critério utilizado para a seleção foi, primeiramente, a produção de pigmento solúvel. Foram selecionados também os isolados com pigmentação diferenciada do micélio, de cor rosa e azul. Após essa seleção, o trabalho se restringiu a isolados da rizosfera de lobeira.

Pode-se observar melhora significativa no processo de purificação das culturas pela mudança de protocolo adotada. O segundo protocolo apresentou diminuição rápida no número de bactérias mistas e na eliminação dessas das culturas. Além da coleta preferencial de esporos, a ausência de suplementação do meio com fonte de carbono provavelmente dificultou o crescimento das demais bactérias, enquanto os actinomicetos eram capazes de crescer e se desenvolver. Essa característica incomum de capacidade de crescimento talvez possa ser

explicada por uma possível habilidade em usar o ágar presente do meio de cultura sólido como fonte de carbono alternativa, possibilitando assim o seu crescimento e desenvolvimento em meio sem adição do glicerol como fonte tradicional de carbono, tema discutido por Prosser & Palleroni (1978) para espécies de *Streptomyces*.

Tabela 8. Isolados selecionados para purificação.

Identificação	Isolado	Pigmento		
		Micélio		Solúvel
		Substrato	Aéreo/esporos	
LAP	1	Marrom claro	Amarelo	Alaranjado
	2	Marrom	Marrom claro	Alaranjado
	3	Marrom claro	Marrom claro	Preto
	8	Rosa claro	Rosa/cinza	Alaranjado
	11	Marrom claro	Cinza claro	Vinho
LDB	2	Marrom	Amarelo	Marrom
	11	Marrom	Cinza claro	Alaranjado
	17	–	–	Amarelo
	32	Azul escuro	Azul claro/cinza	–
	34	Rosa	Rosa claro	–
LS	1	Marrom claro	–	Alaranjado
	2	Amarelo claro	–	Alaranjado
	3	–	–	Amarelo

(–): ausência de pigmento.

Quando cultivadas em meio alternativo AA, a morfologia das colônias era completamente alterada se comparada à de cultivo em meio AGA. Observou-se modificação na pigmentação dos isolados, que apresentavam colônias acinzentadas para a maioria. Além disso, observava-se também diferença no desenvolvimento dos actinomicetos. Esses adquiriam superfície aveludada mais rapidamente e essa, quando coletada e observada ao microscópio óptico, era similar às estruturas descritas para os esporos de actinomicetos filamentosos. Isso pode refletir resposta ao estresse imposto pela escassez de carbono e consequente necessidade de consumo de fonte alternativa, levando à formação de esporos mais rapidamente, forma mais resistente a condições adversas, como o déficit de nutrientes no meio, e cuja estrutura é adaptada à dispersão (Bobek et al, 2017).

4.3.1. Caracterização de isolados puros

Uma vez confirmada a purificação das culturas por análise ao microscópio óptico de culturas líquidas crescidas por 5 dias em meio rico não-seletivo, os isolados foram estriados em

meio AGA e incubados por 7 dias a 28 °C. Sob lupa de aumento, foram fotografados sobre fundo branco ou preto, a depender da possibilidade de visualização da morfologia das colônias sobre cada fundo (Figura 8).

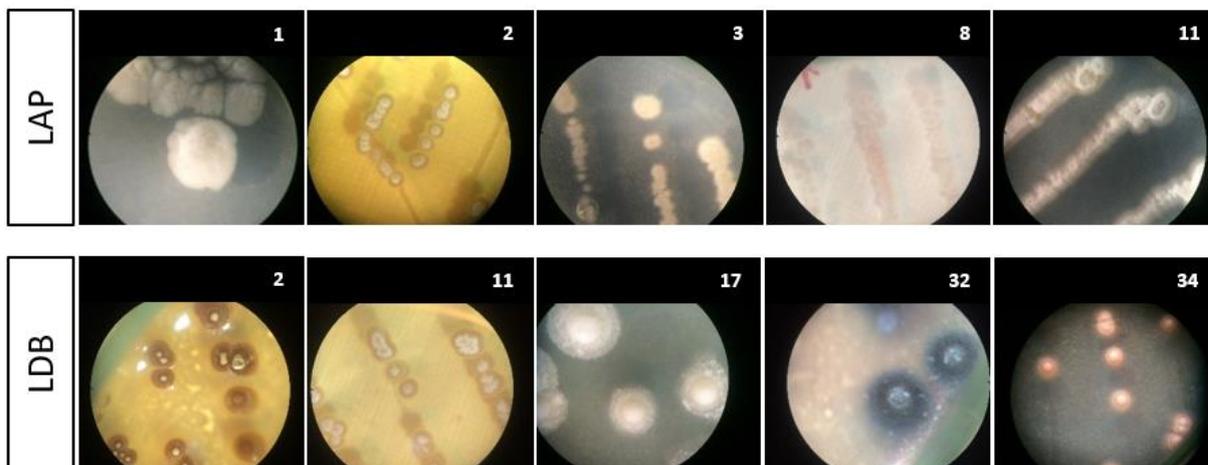


Figura 8. Isolados para os quais foram obtidas culturas puras. Da esquerda para a direita, tem-se LAP1, LAP2, LAP3, LAP8 e LAP11 (linha superior) e LDB2, LDB11, LDB17, LDB32 e LDB34 (linha inferior), fotografados sob lupa de aumento.

A Figura 8 evidencia o aspecto seco das colônias dos isolados de Actinobacteria, característica comum ao filo. Além disso, foi possível observar a textura aveludada na superfície das colônias, a qual é removida sob raspagem. Essa textura geralmente corresponde às hifas aéreas e/ou esporos. A imagem também permite observar, para alguns isolados, a aderência do microrganismo ao meio de cultura, pelo crescimento de micélio abaixo da superfície do meio, característica bem evidente à observação direta das placas.

Com exceção dos isolados LDB32 e LDB34, que não secretam pigmento solúvel em meio AGA mesmo após incubação a 28 °C por longo período, os isolados LAP1, LAP3, LAP8, LAP11 e LDB17 não apresentavam pigmentação do meio até o momento de registro.

A Figura 9A, tirada de outro cultivo após 10 dias de incubação, evidencia melhor os pigmentos produzidos pelos isolados. Nessa imagem, já é possível observar início de secreção de pigmento amarelo pelo isolado LDB17 (linha inferior, 3ª placa), que possui micélio completamente branco. Apesar de aparente secreção de pigmento azul e rosa por LDB32 e LDB34, respectivamente, a coloração se deve à expansão do crescimento de hifas finas no interior do meio de cultura e não a produto solúvel se dispersando pelo meio, visível por finos filamentos sob observação direta. O mesmo ocorre com a placa de LAP11. Na Figura 9D, se observa a liberação de pigmento pelo isolado LAP11 após incubação longa de 6 semanas.

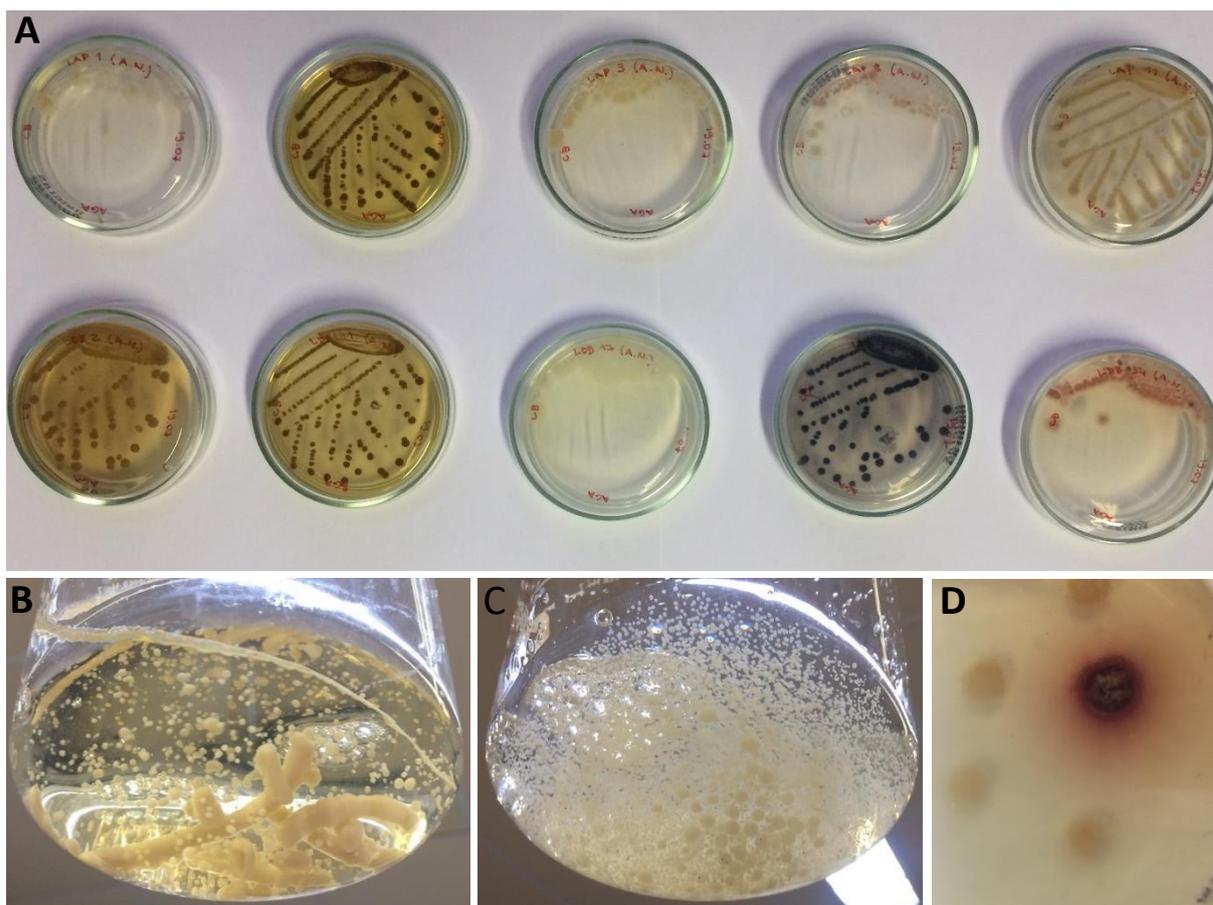


Figura 9. Culturas puras dos isolados de Actinobacteria em meio sólido e líquido. **(A)** Verso de placas de cultura após 10 dias de incubação a 28 °C em meio AGA. Linha superior: LAP1, LAP2, LAP3, LAP8, LAP11. Linha inferior: LDB2, LDB11, LDB17, LDB32, LDB34. **(B)** Cultura de LDB2 após 2 dias de incubação a 28 °C e 150 rpm em meio SCN. **(C)** Cultura de LDB17 após 2 dias de incubação a 28 °C e 150 rpm em meio SCN. **(D)** Cultura de LAP11 após 6 semanas de incubação a 28 °C em meio AGA. Secreção de pigmento vinho observada.

As Figuras Figura 9B e Figura 9C mostram o aspecto de crescimento floculado observado com frequência para o filo. Diferentemente de outras bactérias, actinomicetos, em especial *Streptomyces* spp., geralmente não se dispersam no meio em cultura líquida, logo não geram homogeneidade de suspensão. Esse padrão se deve à forma de crescimento do microrganismo, pela germinação de esporos que se desenvolvem em hifas, formando um micélio emaranhado que dá origem a partículas floculares na cultura, comumente referidos, em inglês, como *pellets* (Barka et al, 2016; Zacchetti et al, 2018).

Além disso, como pode ser observado nas imagens, o crescimento de Actinobacteria também não gera a turbidez do meio comumente observada para a progressão de culturas de bactérias. Em meio líquido, actinomicetos se desenvolvem em *pellets* e mantêm o meio límpido. Além da investigação microscópica da pureza da amostra, essencial para a sua confirmação, a limpidez do meio pode também ser tomada como indicação de pureza da cultura de

actinomiceto. Isso porque a presença de bactérias não-filamentosas, que são isoladas junto na amostra de suspensão de solo, provocam turbidez concomitante ao desenvolvimento dos flocos de Actinobacteria.

Para a obtenção de maior quantidade de biomassa em cultura líquida, observou-se ser ideal o inóculo a partir dos esporos de culturas sólidas. Quando o inóculo era feito pela raspagem de colônias de aspecto pouco aveludado, pouca biomassa se desenvolvia em meio líquido. O mesmo acontecia para o inóculo em cultura líquida a partir de micélio em líquido; de forma geral, o crescimento de novas células se restringia ao crescimento do floco já existente. Apenas quando o meio de cultivo era favorável à germinação de esporos ainda presentes nas culturas em forma dormente, como foi o caso das culturas em meio SCN durante a fermentação, se observou o desenvolvimento de diversos pequenos flocos, advindos provavelmente de novas germinações.

Além do aspecto macroscópico, observou-se microscopicamente para todos os isolados a formação de hifas ramificadas, tanto em meio sólido, quanto em cultura líquida. Em análise de cultura líquida em meio NDB, posterior à purificação, percebeu-se diferença na conformação do micélio entre os isolados. O micélio dos isolados LAP1, LAP3 e LAP8 possuía formação mais densa, com hifas muito entrelaçadas até as extremidades dos *pellets*, como representado nas Figura 10A e 10B. Os demais isolados, o LAP2, LAP11, LDB2, LDB11, LDB17, LDB32 e LDB34, possuíam micélio de formação menos intrincada, mais denso apenas no centro do *pellet* e com maior espaçamento entre as hifas nas extremidades, como representado na Figura 10C.

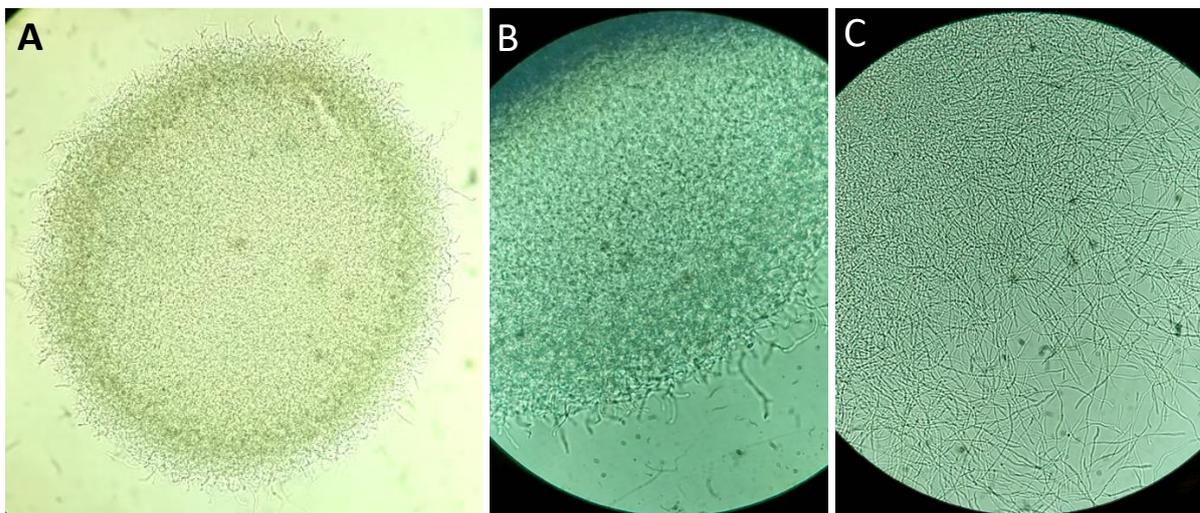


Figura 10. Microscopia óptica de isolados de Actinobacteria. (A) *Pellet* do isolado LAP8, sob objetiva de 40x. (B) Isolado LAP8, sob objetiva de 100x. (C) Isolado LAP11, sob objetiva de 100x.

4.4. SEQUENCIAMENTO DO GENE DE rRNA 16S

A amplificação e sequenciamento do gene de rDNA 16S dos dez isolados com o par de iniciadores Actinobacteria-específicos não gerou entraves, de modo que se otimizou apenas as temperaturas e duração dos ciclos na PCR (Tabela 4), gerando apenas uma banda específica de forte intensidade, cujas sequências apresentaram qualidade correspondente ao parâmetro máximo da ferramenta PHRED.

Por outro lado, houve necessidade de diversas adaptações na reação com o par de iniciadores universais usado, visando à otimização da reação, primeiramente feitas na temperatura e duração dos ciclos, definidos na Tabela 3, e posteriormente nos componentes da reação. Para os isolados LAP1, LAP2, LAP3, LAP8, LDB2, LDB11 e LDB17, apenas a purificação, a partir do gel de agarose, do produto de PCR obtido na reação com parâmetros apresentados nas Tabela 2 e Tabela 3 gerou sequência senso de qualidade e bom alinhamento com a sequência consenso dos iniciadores específicos. Os isolados LAP11, LDB32 e LDB34 tiveram o fragmento do gene amplificado sob as seguintes alterações: I) diminuição da concentração do primer para 0,2, 0,25 e 0,3 μM ; II) diminuição da concentração de MgCl_2 para 1,5 mM; III) acréscimo de formamida em concentração 2,5% (v/v), diminuição de MgCl_2 para 1,8 mM, redução de dNTP para 400 μM , redução de primer para 0,2 μM , concomitantemente. Essas alterações foram baseadas no protocolo de Alkami (1999).

A reação que gerou melhor amplificação para o isolado LDB32 foi a com redução da concentração do primer para 0,2 μM e, para os demais isolados, as alterações expostas no item III acima. Com exceção de LDB32, cuja melhor reação apresentava banda de fraca intensidade, a fita consenso obtida no sequenciamento das demais amostras teve qualidade com valor ≥ 20 no PHRED e bom alinhamento com a fita consenso dos iniciadores específicos. Sendo assim, apenas LDB32 teve a análise comparativa no BLASTN restrita ao fragmento de menor tamanho ampliado pelos iniciadores específicos. Observou-se também que, para todos os isolados, a amplificação com os iniciadores universais gerou fragmentos com qualidade curtos, bem inferiores aos 1500 pb alvos da amplificação, o que mostra que a reação não foi completa.

Pela comparação das sequências de rDNA 16S amplificadas, foi possível identificar espécies correspondentes de maior similaridade no banco de dados BLASTN. Como apresentado na Tabela 9, todos os isolados desse trabalho foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A comparação ao banco de dados identificou uma espécie mais similar apenas para dois isolados. LAP3 mostrou maior similaridade à espécie

Streptomyces luteogriseulus e LAP11 à espécie *Streptomyces roseogriseus*. Os demais isolados apresentaram percentual de identidade correspondente a duas ou mais espécies do gênero.

Pela análise filogenética estatística feita no programa MEGA, alinhando-se as sequências dos isolados e das espécies identificadas no BLASTN, foi possível identificar a relação evolutiva mais próxima dentro do gênero *Streptomyces*. Como mostra a Figura 11, o LAP1 foi identificado como mais relacionado à espécie *Streptomyces roseolus*, o LAP2 a *Streptomyces gancidicus*, o LAP8 a *Streptomyces graminearus*, o LDB2 a *Streptomyces cellulosa*, o LDB17 a *Streptomyces tubercidicus*, enquanto o isolado LDB11 apresentou maior proximidade evolutiva ao isolado LDB2. No entanto, não foi possível aproximar a relação entre o LDB32 e o LDB34 e as respectivas espécies similares, visto que os galhos e nós referentes a ancestrais comuns que os aproximavam das espécies apresentaram suporte estatístico inferior a 50%.

Tabela 9. Identificação dos isolados de Actinobacteria pela comparação do fragmento de rDNA 16S.

Isolado	Query Cover (%)	Identidade (%)	Tamanho do fragmento (pb)	BLASTN (Espécies mais relacionadas)
LAP1	98	99,87	793	<i>Streptomyces roseolus*</i> <i>Streptomyces filamentosus</i>
LAP2	100	100	790	<i>Streptomyces gancidicus*</i> <i>Streptomyces cellulosa</i>
LAP3	100	99,62	782	<i>Streptomyces luteogriseus</i>
LAP8	87	98,22	764	<i>Streptomyces graminearus*</i> <i>Streptomyces coelicoflavus</i> <i>Streptomyces thermocarboxydus</i>
LAP11	99	99,34	763	<i>Streptomyces roseogriseus</i>
LDB2	98	99,05	744	<i>Streptomyces cellulosa*</i> <i>Streptomyces gancidicus</i> <i>Streptomyces thermocarboxydus</i> <i>Streptomyces lusitanus</i>
LDB11	99	100	736	<i>Streptomyces gancidicus</i> <i>Streptomyces cellulosa</i> <i>Streptomyces thermocarboxydus</i> <i>Streptomyces lusitanus</i>
LDB17	89	99,21	710	<i>Streptomyces tubercidicus*</i> <i>Streptomyces caniferus</i> <i>Streptomyces lydicus</i> <i>Streptomyces hygrosopicus</i> <i>Streptomyces nigrescens</i> <i>Streptomyces platensis</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i> <i>Streptomyces libani</i> <i>Streptomyces angustmyceticus</i> <i>Streptomyces griseocarneus</i>
LDB32	95	100	608	<i>Streptomyces hydrogenans</i> <i>Streptomyces albidoflavus</i> <i>Streptomyces violascens</i> <i>Streptomyces diastaticus</i> <i>Streptomyces koyangensis</i> <i>Streptomyces sampsonii</i> <i>Streptomyces alboflavus</i> <i>Streptomyces ambofaciens</i> <i>Streptomyces rutgersensis</i> <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>
LDB34	100	99,74	766	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> <i>Streptomyces graminearus</i> <i>Streptomyces thermocarboxydus</i>

(*) indica espécie mais relacionada evolutivamente, inferida pela análise filogenética.

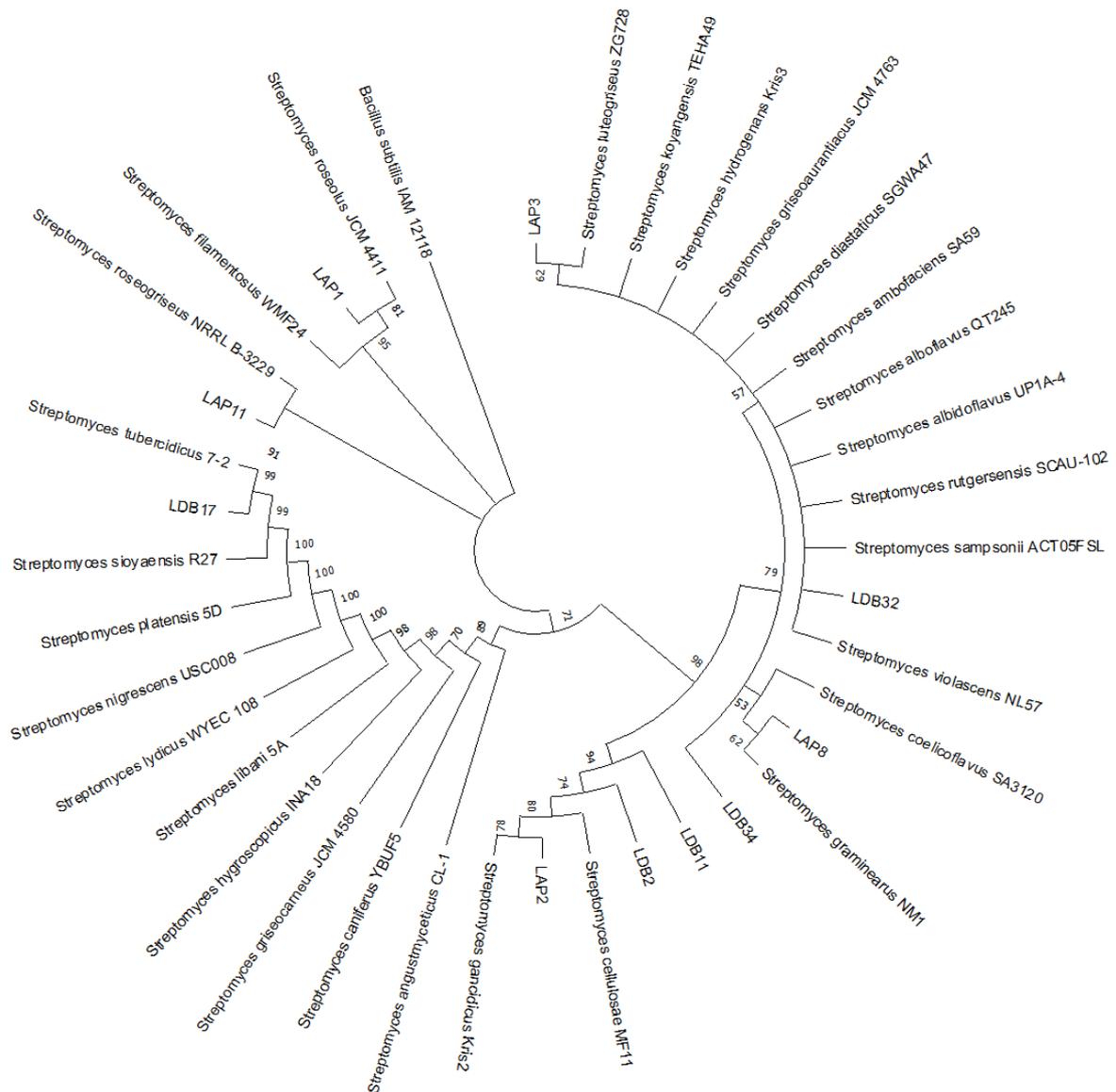


Figura 11. Árvore filogenética dos isolados de Actinobacteria baseada em sequências de rDNA 16S. A relação evolutiva foi feita pelo método de máxima verossimilhança e resulta de análise estatística *bootstrap*. Os valores próximos aos nós indicam o suporte *bootstrap* (%) baseado na análise de 1000 réplicas. Os galhos referentes a valores de suporte inferiores a 50% foram condensados.

4.5. FERMENTAÇÃO E PREPARO DE EXTRATOS

O extrato dos oito actinomicetos selecionados foi coletado após 14 dias de fermentação em meio SCN. Nesse meio, houve alteração na pigmentação secretada (Figura 12). Enquanto alguns desses apresentaram mudanças sutis, por exemplo, apenas na intensidade do pigmento entre as condições de cultivo, LAP3, que apresentou pigmentação preta quando em meio sólido AGA, produziu extrato de tom amarronzado, além de LAP11, que secretou pigmento amarelo na fermentação, enquanto pigmentava o meio sólido AGA com coloração vinho.

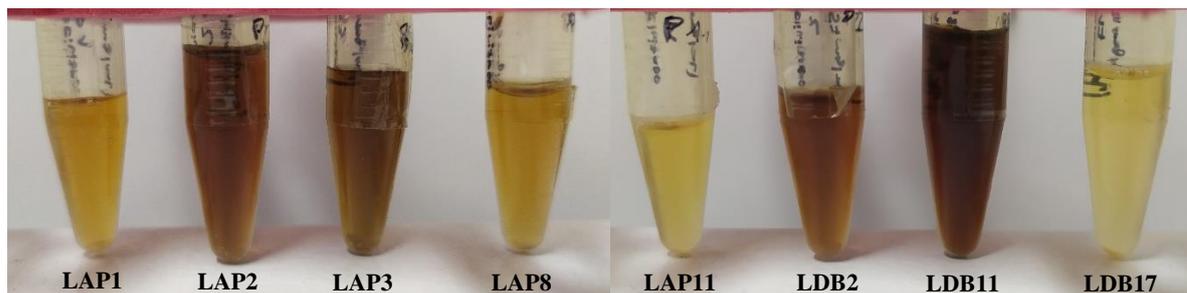


Figura 12. Extratos liofilizados e ressuspensos de isolados puros aplicados aos testes de atividade biológica.

Após liofilização e ressuspensão dos extratos, esses foram empregados nos ensaios de atividades antimicrobiana e de modulação do sistema imune.

4.6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Um experimento para avaliar possível efeito de inibição de crescimento de leveduras foi feito para as linhagens *C. neoformans* H99, *C. neoformans* 89-610 e *C. gattii* NIH0198 e para as espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

As drogas controle adotadas foram fluconazol e butirato de sódio. O fluconazol é um triazol de 1ª geração comumente empregado no tratamento contra infecções fúngicas (Davis et al, 2019), e resulta na inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase, componente da via de síntese do ergosterol (Pristov & Ghannoum, 2019). O ergosterol é uma molécula análoga ao colesterol de células animais, e é componente da membrana celular fúngica (Spampinato & Leonardi, 2013). A interrupção de sua biossíntese provoca, além de perturbação da estrutura da membrana celular (Pristov & Ghannoum, 2019), acúmulo de intermediários tóxicos para a célula fúngica (Sagatova et al, 2015). O NaBut é uma droga epigenética que inibe as enzimas histonas deacetilases (HDACs) (Davie, 2003). HDACs estão envolvidas na remodelação da estrutura conformacional da cromatina e sua inibição provoca alterações na expressão gênica do organismo (Marks et al, 2004). É crescente a investigação de inibidores de HDACs (HDACi) para o tratamento de doenças e, como demonstrado por Brandão et al (2015), HDACi como o NaBut interferem no crescimento e nos principais fatores de virulência de *C. neoformans*. Em 2011, Nguyen et al haviam mostrado que NaBut apresenta atividade antifúngica contra patógenos oportunistas, por afetar o crescimento e fatores de virulência de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*.

Após 72 h de incubação a 37 °C, observou-se sensibilidade de todas as linhagens de *Cryptococcus* a mais de um dos extratos testados. Sob a temperatura testada, a linhagem

C. neoformans H99 mostrou-se sensível aos extratos LAP3, LAP11, LDB2, LDB11 e LDB17, apresentando crescimento significativamente reduzido, quando incubado junto aos extratos (Figura 13A). Para todos os extratos com atividade, a inibição de crescimento foi de ao menos 50%.

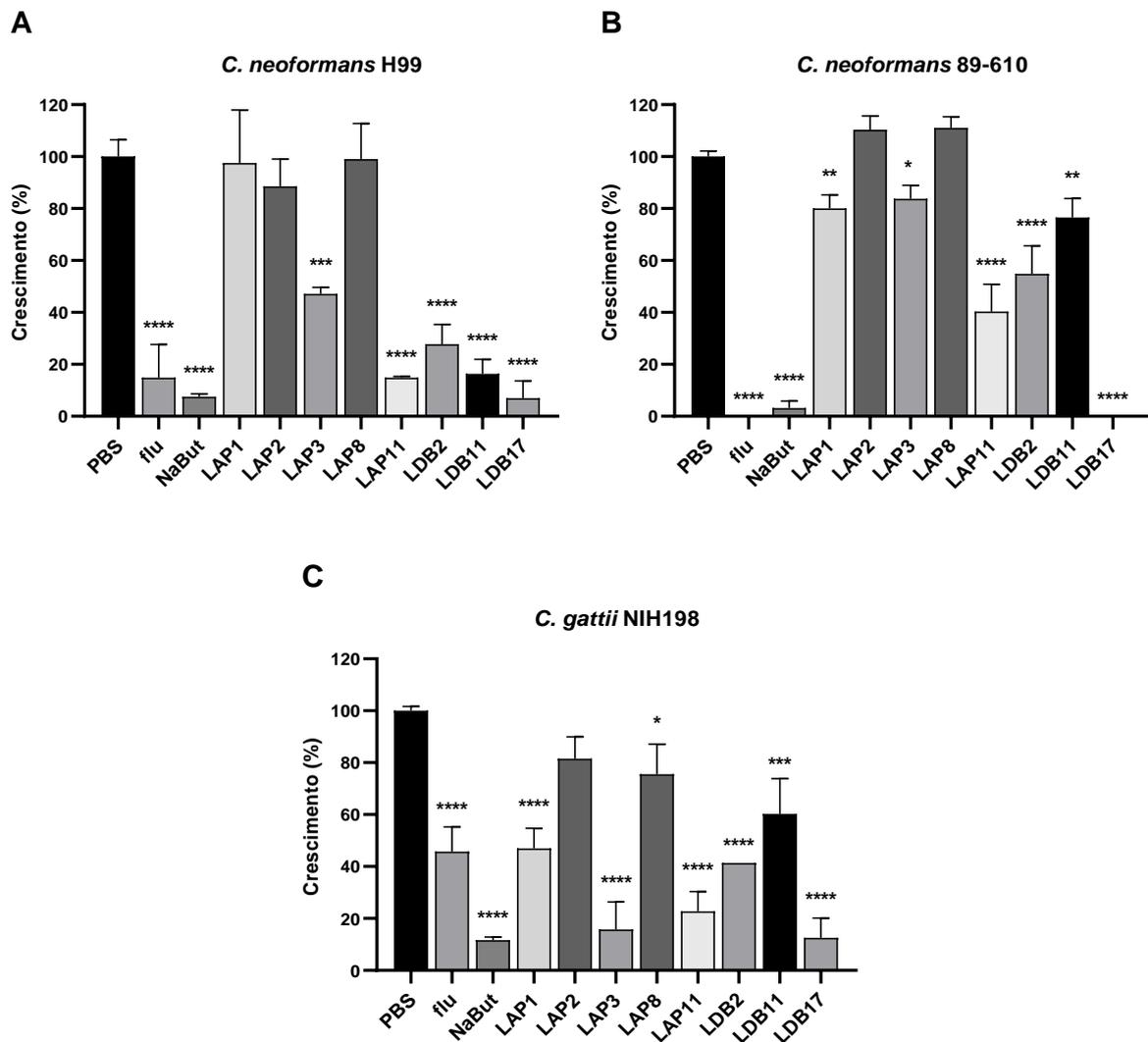


Figura 13. Inibição de crescimento de linhagens de *Cryptococcus* spp. por extratos de actinomicetos em concentração igual a 10% do volume final, em ensaio de 72 h de incubação a 37 °C. PBS corresponde ao controle positivo de crescimento. flu e NaBut foram as drogas controle usadas, fluconazol e butirato de sódio, respectivamente. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA em múltiplas comparações dos grupos testes ao controle (PBS), sendo a diferença significativa indicada relativa ao grupo controle.

Como apresentado na Figura 13B, a linhagem *C. neoformans* 89-610 foi sensível ao total de seis extratos, entre esses, os cinco capazes de inibir o crescimento da linhagem H99. É interessante ressaltar que 89-610 é uma linhagem resistente a fluconazol. O CIM dessa

linhagem corresponde a $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de fluconazol, concentração quatro vezes maior que o CIM da linhagem H99, e duas vezes maior que o CIM de outra linhagem resistente, *C. neoformans* T1 (Perfect et al, 1996). Por sua elevada resistência a fluconazol, 89-610 foi selecionada como microrganismo indicador de atividade antimicrobiana nesse projeto. A sensibilidade a seis dos extratos testados é um resultado de grande relevância. Ressalta-se ainda que, enquanto os extratos LAP1, LAP3 e LDB11 inibiram o crescimento da linhagem em aproximadamente 20%, e os extratos LAP11 e LDB2 entre 50-60%, o extrato LDB17 foi capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo a 37°C , temperatura equivalente à do hospedeiro em infecções.

A linhagem de *C. gattii* NIH198 também teve seu crescimento significativamente reduzido pelos extratos, sendo que apenas o extrato LAP2 não afetou o crescimento da espécie (Figura 13C). Dessa forma, sete dos oito extratos testados apresentaram atividade inibitória para o crescimento de NIH198. Além dos capazes também de inibir o crescimento de 89-610, LAP8 também afetou o crescimento, mesmo que de forma reduzida.

A sensibilidade das espécies de *Candida* mostrou-se variável. *C. albicans* não teve seu crescimento inibido pela concentração elevada de NaBut ou por nenhum dos extratos testados e teve seu crescimento estimulado pelo extrato LAP1 (Figura 14A).

C. glabrata apresentou redução significativa de crescimento para todos os extratos em teste (Figura 14B). Pode-se perceber também que, no ensaio de inibição de crescimento de *C. glabrata*, a concentração de $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de fluconazol, superior ao valor de CIM exposto por Azevedo et al (2011) para a espécie, não foi suficiente para inibição completa do crescimento do microrganismo, como era esperado. Contudo, com exceção do extrato LDB17, todos os demais extratos apresentaram diferença significativa de crescimento, quando comparados ao controle tratado com fluconazol pelo teste estatístico one-way ANOVA (dados não apresentados), o que mostra maior sensibilidade de *C. glabrata* ao tratamento com sete dos extratos testados, que ao tratamento de fluconazol em concentração para a qual era esperada inibição. Além disso, a concentração elevada de NaBut inibiu parcialmente o crescimento da espécie, e para a droga, observou-se atividade significativamente menor que a dos setes extratos citados (dados não apresentados).

A espécie *C. parapsilosis* teve seu crescimento inibido por cinco extratos: LAP2, LAP3, LDB2, LDB11 e LDB17 (Figura 14C). Entretanto, a atividade desses extratos sobre essa espécie parece ser mais sutil que a observada em *C. glabrata*, com exceção de LDB17, que inibiu o crescimento de *C. parapsilosis* em aproximadamente 50%, enquanto inibiu *C. glabrata*

em 40%. Para o extrato LDB17, percebe-se maior susceptibilidade das linhagens de *Cryptococcus* que das espécies de *Candida* testadas.

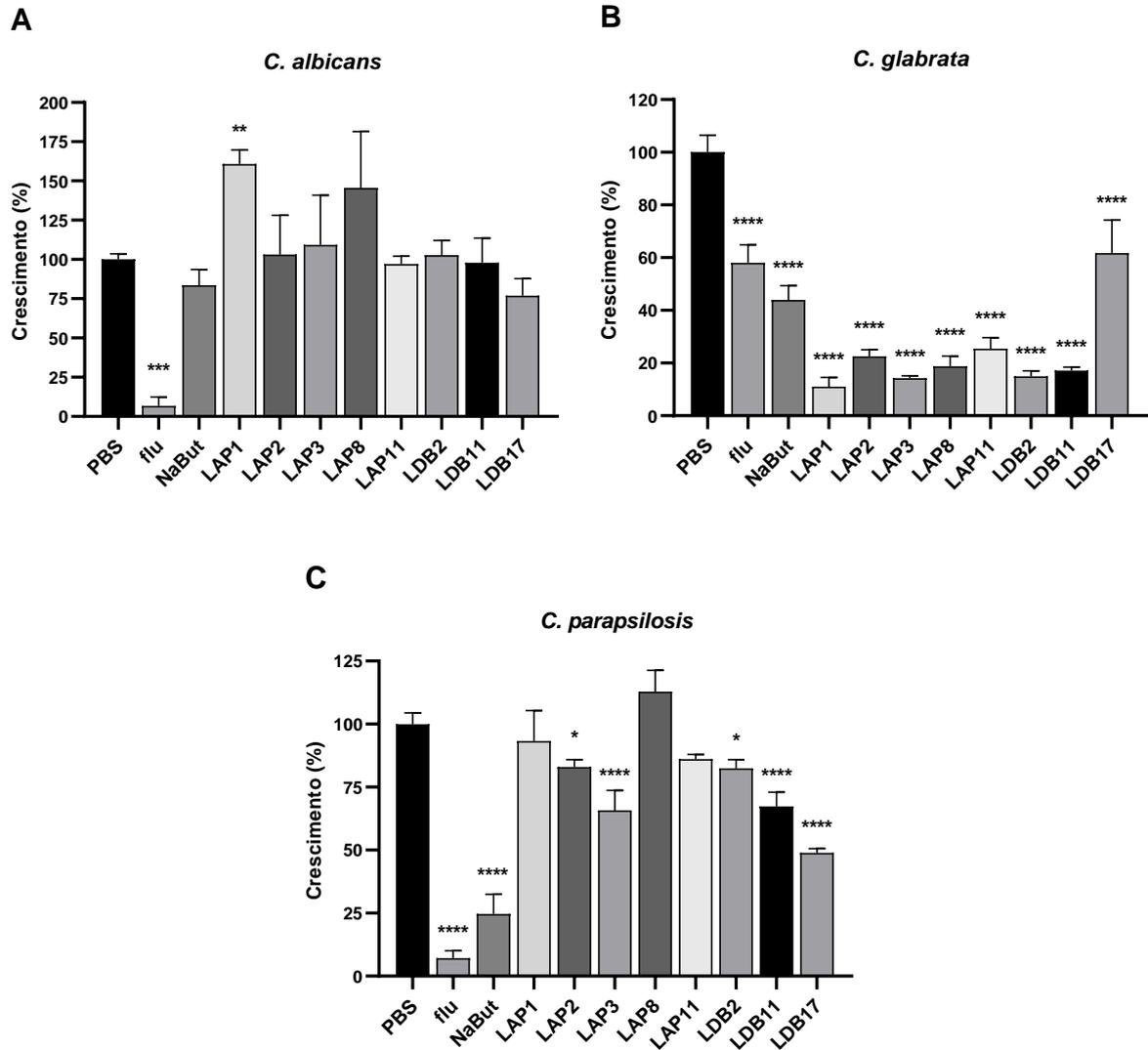


Figura 14. Inibição de crescimento de espécies de *Candida* spp. por extratos de actinomicetos em concentração igual a 10% do volume final, em ensaio de 72 h em incubação a 37 °C. PBS corresponde ao controle positivo de crescimento. flu e NaBut representam as drogas controle usadas, fluconazol e butirato de sódio, respectivamente. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA em múltiplas comparações dos grupos testes ao controle (PBS), sendo a diferença significativa indicada relativa ao grupo controle.

Visto que todos os extratos testados apresentaram atividade antifúngica sobre ao menos dois dos microrganismos indicadores (Tabela 10), esses mostram-se promissores para a prospecção de novos compostos antimicrobianos.

Tabela 10. Esquematização de inibição de linhagens de leveduras patogênicas por extratos dos isolados de Actinobacteria.

	Extratos							
	LAP1	LAP2	LAP3	LAP8	LAP11	LDB2	LDB11	LDB17
<i>C. neoformans</i> H99	-	-	++	-	+++	++	+++	+++
<i>C. neoformans</i> 89-610	+	-	+	-	++	++	+	+++
<i>C. gattii</i> NIH198	++	-	+++	+	+++	++	++	+++
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	+	-	-	+	+	++

(-) indica que não houve inibição de crescimento da linhagem. +, ++ e +++ indicam inibição de crescimento leve, moderada e forte, respectivamente.

4.7. ATIVIDADE DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

4.7.1. Citotoxicidade de extratos a células murinas

Antes de iniciar qualquer ensaio de ativação dos macrófagos, os extratos foram analisados quanto a sua citotoxicidade. Este ensaio foi feito com BMDMs e, inicialmente, foram testadas três concentrações diferentes de extrato: 5%, 7% e 10% do volume final (Figura 15). Observou-se alta citotoxicidade para todos os extratos em concentração final igual a 10%, sendo a maior taxa de viabilidade celular de aproximadamente 50% na interação com o extrato LAP2, e a menor taxa quando em interação com LDB17, de aproximadamente 5%.

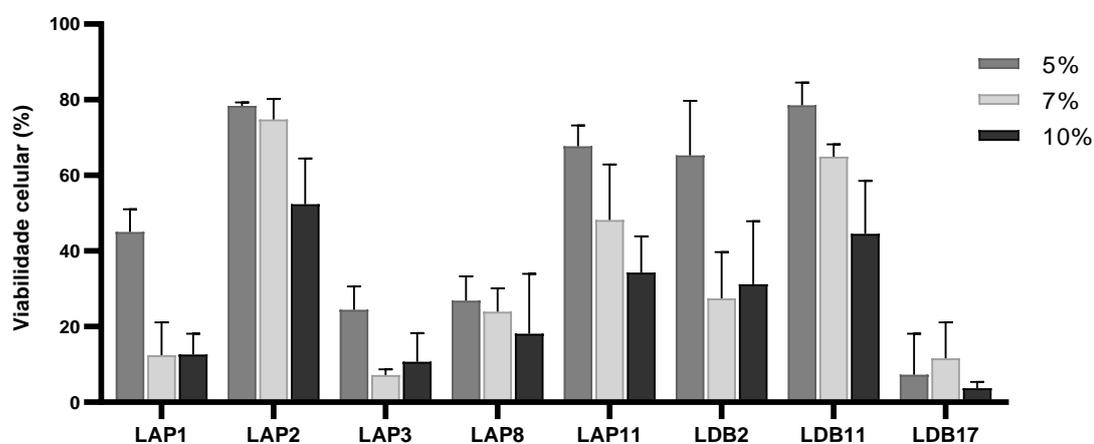


Figura 15. Ensaio de citotoxicidade em BMDMs murinos, sob interação por 24 h com extratos de actinomicetos nas concentrações finais 5%, 7% e 10%.

A concentração final de 7% também apresentou elevada citotoxicidade aos macrófagos, uma vez que apenas os extratos LAP2, LAP11 e LDB11 apresentaram valores acima de 50% de viabilidade celular. Para essa concentração, é possível inferir considerável biocompatibilidade do extrato LAP2, cuja interação resultou em aproximadamente 70% de viabilidade celular. Por outro lado, os extratos LAP1, LAP3 e LDB17 ainda foram muito tóxicos para as células, com taxas de viabilidade similares à concentração de 10%.

Analisando a concentração de 5% de extrato, apenas quatro dos extratos testados resultaram em mais de 60% de viabilidade celular. Enquanto a interação com LAP2 e LDB11 proporcionou aproximadamente 78% de células viáveis, e a interação com LAP11 e LDB2 de aproximadamente 70% e 65%, respectivamente, os demais extratos resultaram em menos de 50% de viabilidade. O menor valor obtido foi para LDB17, correspondendo a aproximadamente 8% de células viáveis.

Com base nesse resultado e considerando-se a viabilidade celular mínima de 70% para a aplicação aos ensaios, as concentrações finais de extrato adotadas para os experimentos, em primeiro momento, foram de 1% para LAP1, LAP3, LAP8, LDB2 e LDB17, e igual a 5% para os extratos LAP2, LAP11, LDB11.

Após novo ensaio de interação entre macrófagos e extratos por 24 horas, a análise de citotoxicidade foi repetida para as concentrações previamente escolhidas (Figura 16). Para o ensaio, fez-se um controle ao qual apenas PBS foi adicionado, distintamente do experimento anterior, no qual não houve grupo controle sem tratamento. Na nova análise, o grupo controle com PBS foi usado como valor correspondente a 100% de viabilidade celular, de forma que apenas a influência dos extratos sobre a sobrevivência dos macrófagos fosse avaliada. Com base nessa proporção, a viabilidade celular dos grupos tratados foi calculada.

Para as novas concentrações testadas, com exceção dos extratos LAP3 e LDB17, não houve diferença significativa entre a viabilidade celular observada entre o controle e as células tratadas com os extratos. Uma vez que essas concentrações não induziriam reações nas células imunes referentes à citotoxicidade, foram estabelecidas para todos os experimentos seguintes. Devido à permanente citotoxicidade observada para os extratos LAP3 e LDB17, que resultaram em uma viabilidade celular de aproximadamente 22% e 34%, respectivamente, foi definida a concentração de 0,5% para os experimentos seguintes.

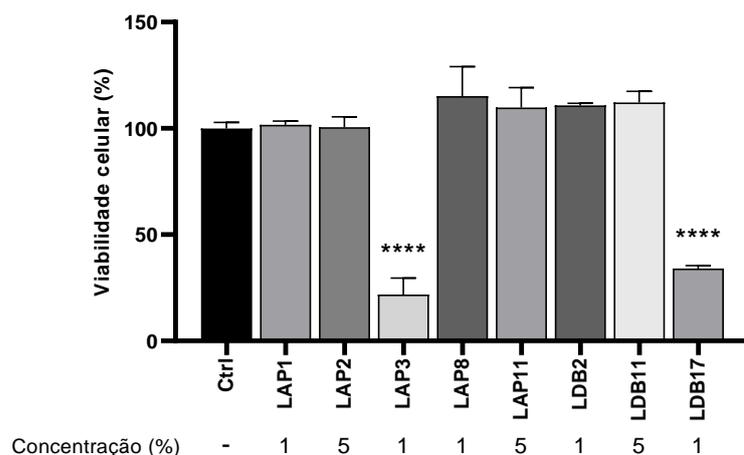


Figura 16. Repetição de ensaio de citotoxicidade de extratos de actinomicetos a BMDMs, sob concentrações inicialmente definidas para experimentos, em ensaio de interação por 24 h. Grupo controle sem tratamento foi usado como correspondente a 100% de viabilidade celular. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA em múltiplas comparações dos grupos testes ao controle (PBS), sendo a diferença significativa indicada relativa ao grupo controle.

4.7.2. Produção de TNF- α

Para avaliação do perfil de ativação dos BMDMs quando incubados com os extratos de Actinobacteria, os macrófagos foram incubados por 24 h com os extratos e quantificou-se o TNF- α do sobrenadante dessas células.

Para analisar qual o papel destes extratos na modulação dos macrófagos, incubou-se os BMDMs com os extratos, na presença ou ausência do controle positivo, LPS, para a indução desta citocina. No ensaio, pode-se observar alteração significativa da citocina pela exposição a quatro dos extratos, quando em associação ao LPS (Figura 17).

Os extratos não induziram a produção de TNF- α , com exceção do LAP1 e LAP11. Esses extratos também apresentaram um aumento na produção desta citocina quando os macrófagos foram estimulados concomitantemente com LPS. Sendo assim, LAP1 e LAP11 são compostos indutores de resposta por TNF- α , sendo o extrato LAP11 um forte indutor da produção de TNF- α . O extrato LDB17 também apresentou este comportamento, apesar de não ter apresentado diferença estatística no grupo não estimulado com LPS. Esses três extratos apresentaram aumento na produção de TNF- α quando as células foram estimuladas também com LPS.

Observou-se também inibição da secreção do TNF- α induzida por LPS. Como apresentado na Figura 17, o extrato LDB11 apresentou forte atividade anti-inflamatória pela

redução de TNF- α , em grupo de células ativadas. Esse extrato foi capaz de reduzir em mais de 70% a produção dessa citocina, quando em comparação ao grupo controle estimulado com LPS.

Tendo em vista os resultados observados, a aplicação de extratos de actinomicetos isolados do solo do Cerrado mostrou-se promissora para a modulação da atividade dos macrófagos, tanto para prospecção de compostos imunoestimulantes, quanto para compostos imunossupressores, uma vez que se obteve tanto estímulo da via de TNF- α , quanto a repressão da sua produção na presença de fatores indutores desta citocina, em macrófagos murinos.

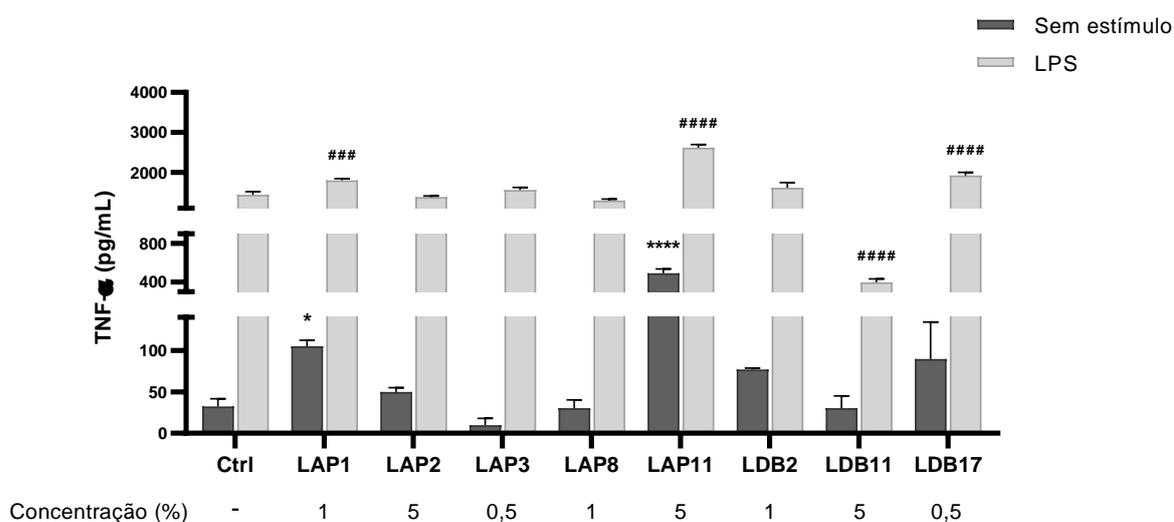


Figura 17. Quantificação de TNF- α no sobrenadante de BMDMs expostos a extratos de actinomicetos por 24 h. Quantificação feita pelo método de ELISA. Análise estatística feita por one-way ANOVA, para a qual (*) indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, dentro do grupo “Sem estímulo”, e (#) indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, dentro do grupo “LPS”. A diferença estatística foi demonstrada com * e # para $p < 0.05$; ** e ## para $p < 0.01$; *** e ### para $p < 0.001$; **** e #### para $p < 0.0001$.

4.7.3. Quantificação de óxido nítrico

Posteriormente à análise de TNF- α , investigou-se a liberação de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da cultura de BMDMs incubados com os extratos.

O óxido nítrico (NO), além de mediador de processos fisiológicos no organismo, como a regulação da pressão sanguínea, é uma molécula que executa diversas funções no sistema imune. Primeiramente identificado apenas como um produto de macrófagos ativados por citocinas e/ou antígenos microbianos, atualmente se sabe que diversas células imunes, além de macrófagos, produzem e respondem a NO (Tripathi et al, 2007). Além disso, NO é reconhecido como uma das moléculas de papel mais versátil no sistema imune, atuando na imunidade inata, como agente tóxico a agentes infecciosos, inibindo a sua replicação, ou mesmo na imunidade

adquirida, como regulador tanto de crescimento e atividade, quanto de morte de diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, neutrófilos, mastócitos e células *natural killer* (NK), entre outros efeitos provocados por esse mediador (Bogdan, 2001).

Para avaliação de NO no sobrenadante dos macrófagos, fez-se um grupo sem estímulo, tratado apenas com PBS ou extrato, de modo a avaliar possível efeito indutor de NO nas células pelos extratos. Fez-se também um grupo estimulado, além dos extratos, com LPS e IFN- γ , os dois sinais necessários para a ativação da produção de NO. Esse último grupo possibilitaria a investigação de efeito supressor provocado pelos extratos de actinomicetos. A comparação dos grupos teste foi feita em relação ao controle PBS dentro do grupo referente ao estímulo adotado.

Analisando a capacidade dos extratos de induzirem a liberação de NO, observou-se que o LAP2, LAP3, LAP8, LAP11 e LDB2 aumentaram os níveis deste mediador, quando comparados com o grupo controle sem qualquer estímulo. Os extratos LAP3, LAP8 e LDB2 foram capazes de induzir a produção de níveis elevados de NO, com concentrações acima de 50 μ M (Figura 18).

Quando os BMDMs foram incubados com estímulos positivos para a produção de NO, estimulados com LPS e IFN- γ , apenas um extrato testado, o LDB17, apresentou efeito supressor da produção desse mediador. Para esse grupo, o LDB17 reduziu em mais de 50% a liberação de NO pelas células, quando comparado ao grupo controle. Dentre os extratos que apresentaram aumento significativo para a produção de NO em células estimuladas, temos o LAP1, LAP2, LAP3, LAP8, LDB2 e LDB11. Sob essa condição, enquanto LAP1 parece aumentar NO de forma pouco relevante, LAP2, LDB2 e LDB11 apresentaram perfil semelhante, correspondendo a um aumento de 70-90% na quantidade de NO produzida pelo controle do grupo. Entre os extratos avaliados, o LAP3 e LAP8 foram os que mais aumentaram NO liberado pelas células estimuladas, para os quais houve aumento de mais de 4x e mais de 5x, respectivamente, em relação ao controle do grupo. O extrato LAP1 interferiu na produção de NO apenas quando estimulado com o controle positivo. Dessa forma, esse extrato não foi considerado um indutor da via de NO.

Quando os grupos estimulados com os extratos foram comparados entre si, na presença de LPS e IFN- γ ou não, observamos que alguns provocaram aumento significativo, como o LAP2, LDB2 e o LDB11. Os extratos que apresentaram uma alta produção deste mediador na ausência do controle positivo, como o LAP3 e LAP8, não tiveram um aumento expressivo na presença do LPS e IFN- γ , provavelmente por ter atingido o máximo da capacidade de produção deste mediador pelos BMDMs, não apresentando qualquer tipo de efeito.

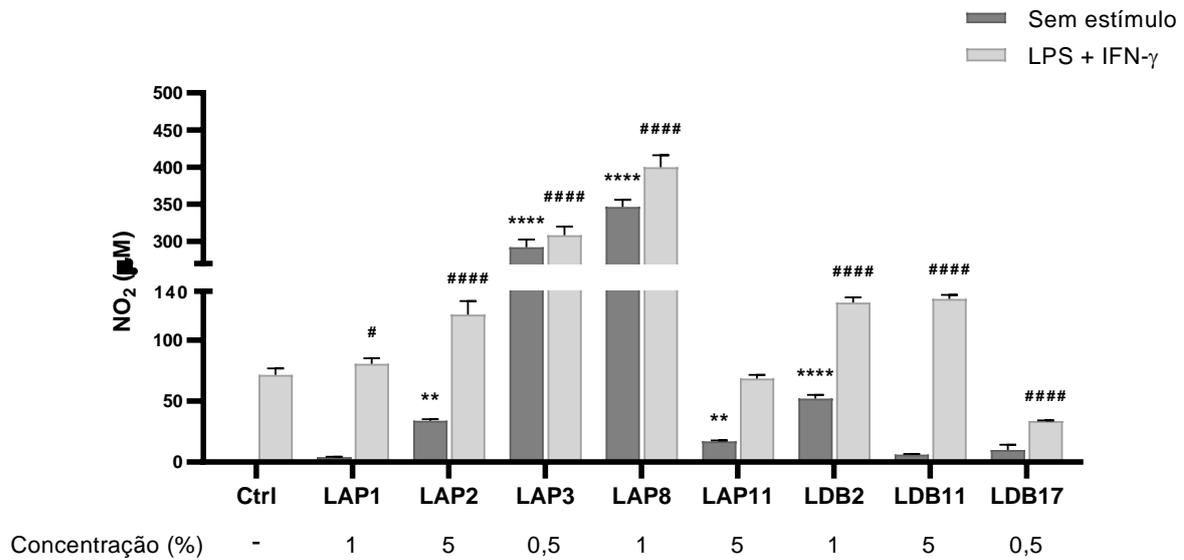


Figura 18. Quantificação de óxido nítrico no sobrenadante de BMDMs expostos a extratos de actinomicetos por 24 h. Quantificação feita pelo método de Griess. Análise estatística feita por one-way ANOVA, para a qual (*) indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, dentro do grupo “Sem estímulo”, e (#) indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, dentro do grupo “LPS + IFN- γ ”. A diferença estatística foi demonstrada com * e # para $p < 0.05$; ** e ## para $p < 0.01$; *** e ### para $p < 0.001$; **** e #### para $p < 0.0001$.

Analisando os dados de secreção de TNF- α e NO pelos BMDMs estimulados com os extratos, considerando o efeito indutor ou supressor, não se observou um efeito similar entre a produção dos parâmetros aqui analisados. A produção de TNF- α e NO, na ausência de estímulos positivos, apenas ocorreu com o extrato LAP11, no entanto não responderam da mesma forma na presença do estímulo positivo (Tabela 11). O extrato LDB11, apesar de não ser um indutor de TNF- α e NO, apresentou um efeito oposto quando estimulado com os controles positivos, com modulação negativa e positiva na secreção de TNF- α e NO, respectivamente. O extrato LAP2 não modulou a produção de TNF- α quando comparado aos controles, mas apresentou um pequeno efeito estimulatório para a produção de NO. Os extratos LAP3, LAP8 e LDB2 também não modularam positivamente a produção de TNF- α , mas induziram uma forte produção de NO. Entre esses, enquanto LDB2 induziu NO de forma leve, LAP3 e LAP8 mostraram-se forte indutores. Assim como o LDB11, o LDB17 não induziu a produção espontânea de TNF- α e NO, mas, ao contrário de LDB11, apresentou a capacidade de modular positivamente e negativamente a secreção de TNF- α e NO, respectivamente.

Devido às limitações enfrentadas no ano de 2020, fase de conclusão desse trabalho, referentes ao acesso aos laboratórios da universidade, possibilidade de execução de

experimentos e disponibilidade de materiais para os ensaios, foram escolhidos apenas quatro extratos para os quais a influência na resposta imune seria feita em análise mais aprofundada. Tendo em vista a análise inicial da resposta imune em macrófagos murinos sob exposição aos extratos de actinomicetos e direcionando a investigação à correlação de atividades antifúngica e imunomoduladora, os extratos que induziram a via de TNF- α nos macrófagos, mesmo na ausência de estímulos, ou seja, que induziriam por si só uma resposta pró-inflamatória nos macrófagos não foram mais avaliados, e, além desses, os extratos que produziram alto efeito citotóxico mesmo em concentração reduzida. Dessa forma, os extratos LAP1 e LAP11 (indutores de TNF- α) e LAP3 e LDB17 (elevada citotoxicidade) não foram incluídos na análise experimental seguinte, que abrangeu apenas os extratos LAP2, LAP8, LDB2 e LDB11. Esses foram utilizados para os ensaios de atividade microbica dos macrófagos *in vitro*. Os demais extratos serão avaliados em análises futuras.

Tabela 11. Relação de modulação da produção do TNF- α e de óxido nítrico provocada pelos extratos.

	TNF- α		Óxido nítrico	
	-	LPS	-	LPS + IFN- γ
LAP1	↑	↑	0	↑
LAP2	0	0	↑	↑
LAP3	0	0	↑↑↑	↑↑↑
LAP8	0	0	↑↑↑	↑↑↑
LAP11	↑↑	↑	↑	0
LDB2	0	0	↑↑	↑
LDB11	0	↓↓↓	0	↑
LDB17	0	↑	0	↓↓

(-) indica ausência de estímulo positivo. 0 indica ausência de modulação. ↑, ↑↑ e ↑↑↑ indicam indução leve, moderada e forte, respectivamente. ↓↓ e ↓↓↓ indicam inibição moderada e forte, respectivamente.

4.7.4. Capacidade microbica

Para avaliar se os extratos poderiam modular a atividade microbica dos macrófagos, estes foram incubados com o fungo patogênico humano *C. neoformans* isolado H99, na presença ou não dos extratos.

Os BMDMs foram infectados por H99 e, após 2 h, as células foram lavadas para a retirada de leveduras não internalizadas. O meio de cultura foi repostado nas mesmas condições do início do experimento e as células foram estimuladas com os extratos LAP2, LAP8, LDB2

e LDB11. Após 24 h de incubação, as células foram novamente lavadas e foram lisadas para análise da carga fúngica no citoplasma dos BMDMs. As amostras foram diluídas e plaqueadas para contagem de UFC. A carga fúngica no tempo de 2 h sem tratamento e sem ativação foi realizada para análise de internalização.

Como mostrado na Figura 19, os extratos LAP8 e LDB2 não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, estimulados ou não com LPS. Pode-se dizer que o perfil de resposta sob tratamento com ambos reproduz o perfil do grupo controle. Não houve interferência desses extratos nem no processo de proliferação do fungo dentro do macrófago, nem na capacidade dos macrófagos de matar as células internalizadas após ativação com LPS. Apesar do LAP8 e do LDB2 serem sozinhos bons indutores da produção de NO, o aumento deste mediador microbicida não foi capaz de aumentar a atividade microbicida dos BMDMs.

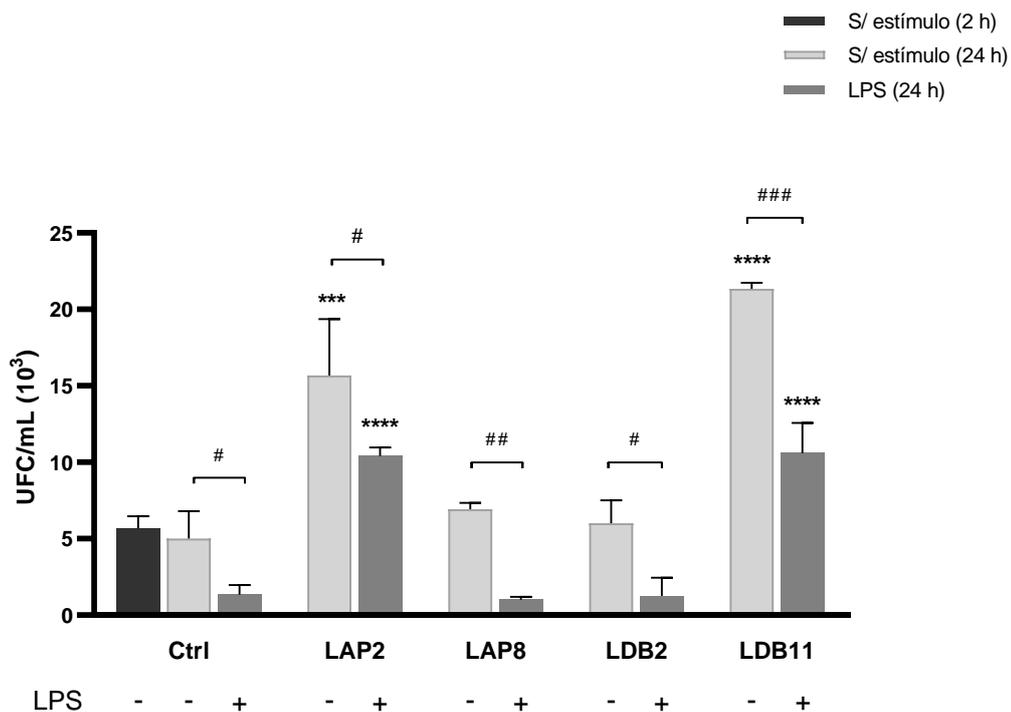


Figura 19. Contagem de UFC após 2 h e 24 h para macrófagos tratados com os extratos LAP2, LAP8, LDB2 e LDB11. Fez-se o grupo com e sem ativação por LPS. Grupo 2 h sem tratamento e sem LPS feito para análise de internalização do fungo. Análise estatística feita por one-way ANOVA, onde (*) indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, dentro do grupo “Sem estímulo (24 h)” ou dentro do grupo “LPS (24 h)”, e (#) acompanhado de barra indica diferença significativa entre os grupos 24 h com e sem estímulo, para um mesmo extrato. A diferença estatística foi demonstrada com * e # para $p < 0.05$; ** e ## para $p < 0.01$; *** e ### para $p < 0.001$; **** e #### para $p < 0.0001$.

Ao analisar o tratamento com os extratos LAP2 e LDB11, percebe-se que ambos provocaram alteração significativa na resposta dos macrófagos aos fungos. Como pode-se observar, os macrófagos estimulados com esses extratos, na presença ou não do LPS, apresentaram uma carga fúngica maior que o grupo controle 24 h. Isso significa que a taxa de proliferação de H99 internalizados foi mais elevada sob tratamento com os extratos que sem tratamento, apesar de ambos produzirem níveis mais elevados de NO quando estimulados também com LPS. Estes dados confirmam a resistência do H99 ao NO, sobrevivendo nas condições onde este mediador está mais elevado que os controles.

4.7.5. Quantificação de citocinas nos ensaios de infecção

Diante destes resultados, avaliou-se a produção TNF- α no sobrenadante dos BMDMs infectados com o fungo e incluiu-se a análise da IL-6 e da IL-10, para melhor avaliar o quadro da ativação da resposta inflamatória induzida pelos extratos. Inicialmente foi analisada a influência dos extratos na produção de IL-6 sem a infecção com os fungos (Figura 20). Como apresentado na Figura 20A, todos os extratos induziram a secreção de IL-6, visto que mesmo na ausência do estímulo positivo (LPS), foram identificadas quantidades significativamente maiores da citocina no sobrenadante das células tratadas com os extratos, quando em comparação ao controle não tratado com o extrato. O extrato que apresentou os maiores níveis de produção de IL-6 foi o LDB11. O estímulo com LPS potencializou a produção dessa citocina e não se observou diferença entre os grupos estimulados com os extratos e o controle.

De forma a complementar os resultados obtidos anteriormente nas análises de todos os extratos, fez-se também a quantificação de IL-6 no sobrenadante de células tratadas com os extratos, sem infecção. Como apresentado na Figura 20B, apenas o LAP11 foi capaz de aumentar a secreção espontânea de IL-6 e, juntamente com o extrato LAP1, apresentou níveis mais elevados quando os BMDMs também foram estimulados com LPS. Dessa forma, além de ser indutor de TNF- α (Figura 17), LAP11 também foi indutor da via de IL-6. Para os demais extratos, LAP3 e LDB17, não se observou influência significativa na resposta por IL-6.

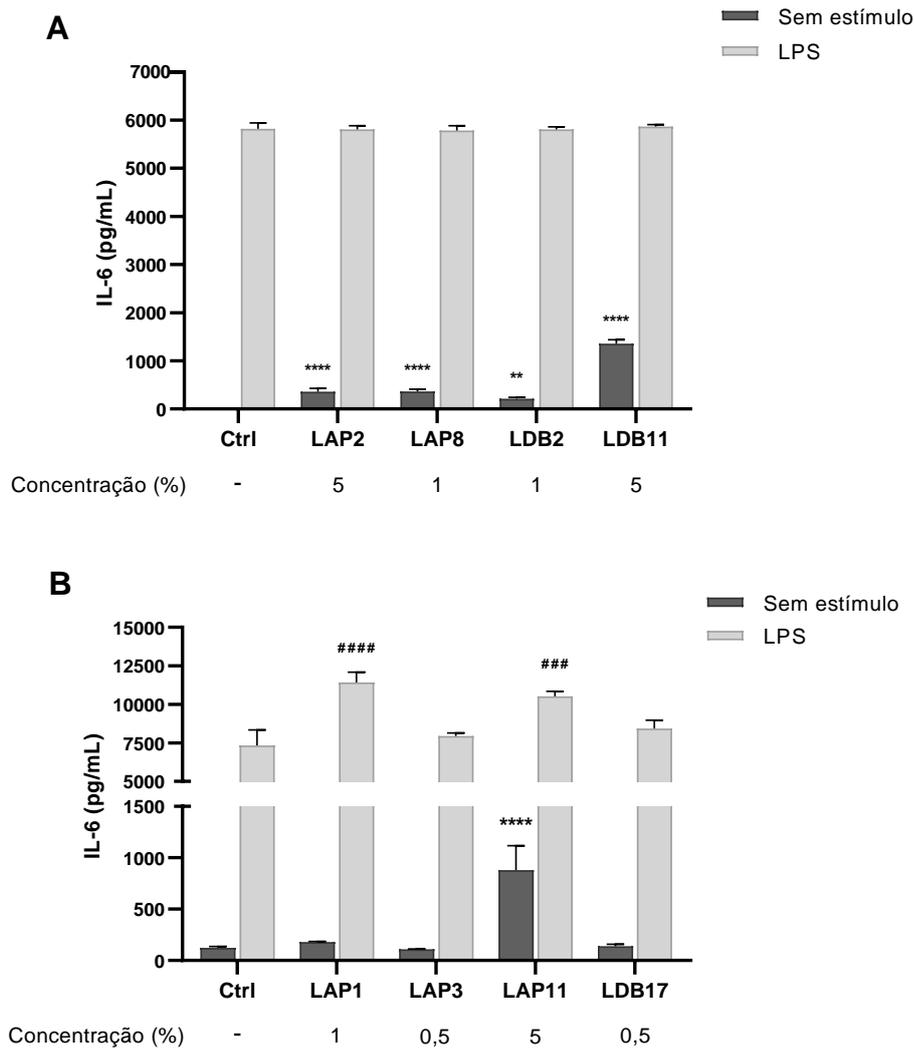


Figura 20. Quantificação de IL-6 no sobrenadante de macrófagos sem infecção com fungos, após interação com extratos por 24 h. **(A)** Grupo de extratos selecionados para análise de capacidade microbicida. **(B)** Grupo de extratos não analisados em experimento de infecção. Quantificação feita pelo método de ELISA. Análise estatística feita por one-way ANOVA, para a qual (*) indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, dentro do grupo “Sem estímulo”, e (#) dentro do grupo “LPS”. A diferença estatística foi demonstrada com * e # para $p < 0.05$; ** e ## para $p < 0.01$; *** e ### para $p < 0.001$; **** e #### para $p < 0.0001$.

Para os extratos com maior modulação positiva ou negativa na produção do TNF- α , ou seja, os extratos LAP11 e LDB11, respectivamente, foi analisada também a produção da IL-10. Como mostrado na Figura 21A, o extrato LDB11 induziu a produção de IL-10 quando os BMDMs foram estimulados com LPS, mesma condição na qual foi observada inibição da produção de TNF- α . O mesmo efeito não foi observado nas células não ativadas por LPS. Na ausência do estímulo por LPS, condição na qual o extrato LAP11 induziu a secreção do TNF- α ,

esse extrato apresentou leve redução na produção da IL-10, quando comparado ao grupo controle (Figura 21B).

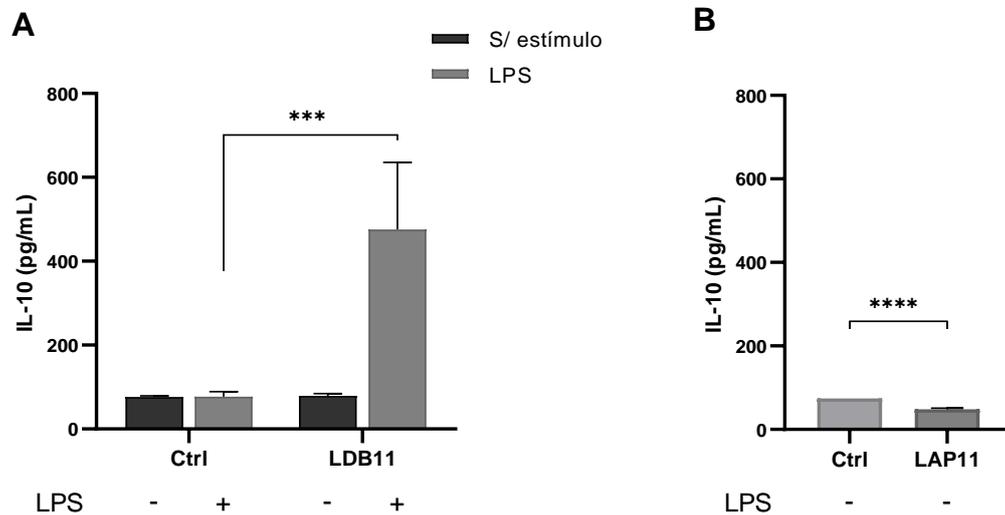


Figura 21. Quantificação de IL-10 no sobrenadante de macrófagos, após interação com extratos por 24 h. **(A)** Análise de IL-10 sob tratamento com o extrato LDB11. **(B)** Análise de IL-10 sob tratamento com o extrato LAP11. Quantificação feita pelo método de ELISA. Análise estatística feita por one-way ANOVA e teste *t*, respectivamente, para a qual (*) e indica diferença significativa. A diferença estatística foi demonstrada com *** para $p < 0.001$ e **** para $p < 0.0001$.

Posteriormente, avaliou-se a produção de IL-6 e TNF- α no sobrenadante dos macrófagos infectados por H99. Como apresentado na Figura 22A, o padrão de modulação da secreção de IL-6 observado para os extratos foi semelhante ao experimento sem infecção (Figura 20A). No entanto, o tratamento com o extrato LAP2 não apresentou diferença significativa na produção de IL-6 por macrófagos infectados na ausência de estímulo positivo, como observado previamente. Já o extrato LDB11 induziu a produção da citocina também em macrófagos não ativados por LPS e infectados com H99.

Como apresentado na Figura 22B, os BMDMs ativados por LPS e infectados com H99 apresentaram aumento na produção de TNF- α quando tratados com os extratos LAP2, LAP8 e LDB2. Já quando os BMDMs foram tratados com o extrato LDB11, houve diminuição na produção dessa citocina. Não houve diferença significativa na produção de TNF- α em macrófagos não estimulados tratados com os extratos.

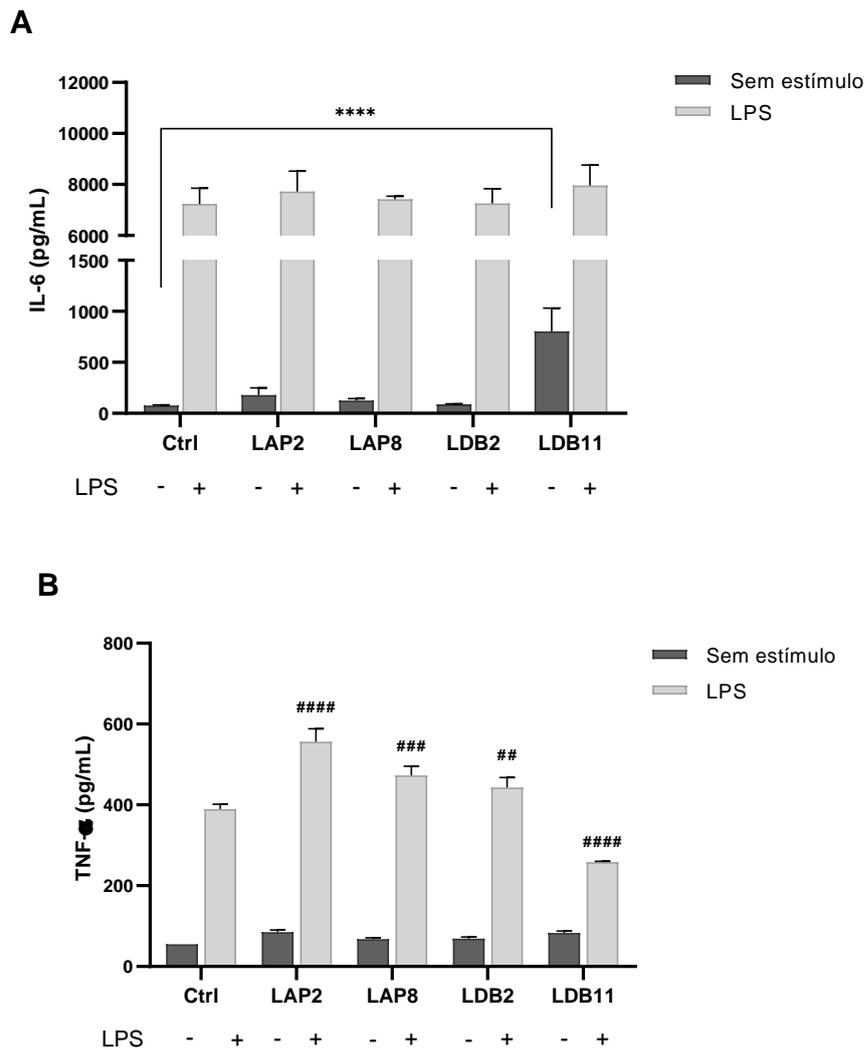


Figura 22. Quantificação de (A) IL-6 e (B) TNF- α no sobrenadante de macrófagos infectados por H99 e tratados com os extratos, após 24 h de incubação. Quantificação feita pelo método de ELISA. Análise estatística feita por one-way ANOVA, para a qual (*) indica diferença significativa em comparação ao grupo controle, dentro do grupo “Sem estímulo”, e (#) dentro do grupo “LPS”. A diferença estatística foi demonstrada com * e # para $p < 0.05$; ** e ## para $p < 0.01$; *** e ### para $p < 0.001$; **** e #### para $p < 0.0001$.

A análise da produção da citocina IL-10 também foi feita no sobrenadante dos BMDMs infectados com H99 e tratados com os extratos LAP2 e LDB11, que reduziram a sua capacidade microbicida, e tratados com o extrato LDB2, que resultou em pouco efeito modulatório nos ensaios. Quando comparados ao controle positivo, percebe-se a indução da produção de IL-10 em células infectadas ativadas com LPS, mas tratadas com os extratos LAP2 e LDB11, o que corrobora a sua propriedade anti-inflamatória (Figura 23). Desses extratos, o LDB11 foi o indutor mais forte, apresentando efeito similar ao observado no ensaio sem infecção com H99

(Figura 21A). Os BMDMs ativados por LPS e tratados com o LDB2 apresentaram pequena diminuição na produção de IL-10. Não foi observada diferença significativa na produção da citocina entre os BMDMs sem o estímulo positivo tratados com os extratos e o controle. A esquematização dos resultados de modulação da resposta dos BMDMs sob tratamento com os extratos foi apresentada na Tabela 12.

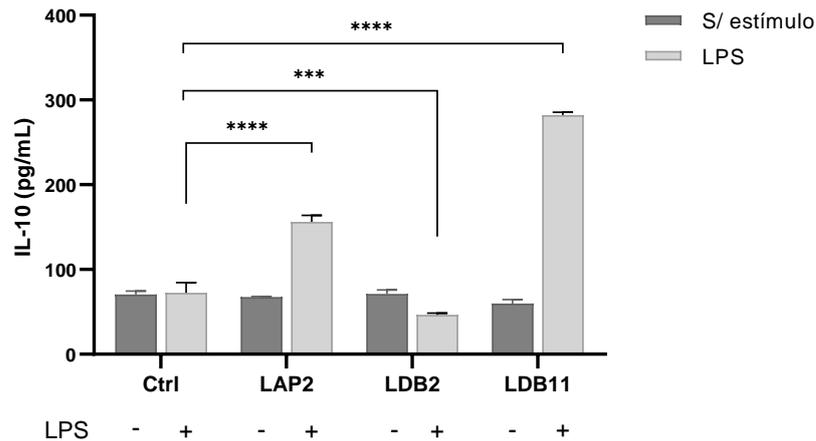


Figura 23. Quantificação de IL-10 no sobrenadante de macrófagos infectados por H99 e tratados com os extratos, após 24 h de incubação. Quantificação feita pelo método de ELISA. Análise estatística feita por one-way ANOVA e teste t, respectivamente, para a qual (*) e indica diferença significativa. A diferença estatística foi demonstrada com *** para $p < 0.001$ e **** para $p < 0.0001$.

Tabela 12. Resumo do perfil modulador da resposta de macrófagos murinos provocados pelos extratos de Actinobacteria.

	BMDMs						BMDMs infectados por H99										
	TNF- α		NO		IL-6		IL-10		Cap. microbicida		TNF- α		IL-6		IL-10		
	-	LPS	-	LPS+IFN γ	-	LPS	-	LPS	H99	H99 + LPS	H99	H99 + LPS	H99	H99 + LPS	H99	H99 + LPS	
LAP1	↑	↑	0	↑	0	↑											
LAP2	0	0	↑	↑	↑	0			↓↓	↓↓↓	0	↑	0	0	0	0	↑↑
LAP3	0	0	↑↑↑	↑↑↑	0	0											
LAP8	0	0	↑↑↑	↑↑↑	↑	0			0	0	0	↑	0	0			
LAP11	↑↑	↑	↑	0	↑↑	↑	↓										
LDB2	0	0	↑↑	↑	↑	0			0	0	0	↑	0	0	0	0	↓
LDB11	0	↓↓↓	0	↑	↑↑	0	0	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	0	↓	↑↑	0	0	0	↑↑↑
LDB17	0	↑	0	↓↓	0	0											

(-) indica ausência de estímulo positivo. 0 indica ausência de modulação. ↑, ↑↑ e ↑↑↑ indicam indução leve, moderada e forte, respectivamente. ↓, ↓↓ e ↓↓↓ indicam inibição leve, moderada e forte, respectivamente. Células em cinza são análises que não foram feitas nesse trabalho.

5. DISCUSSÃO

Actinobacteria abrange bactérias Gram-positivas de alto conteúdo C+G em seu genoma. É um filo diversificado que representa uma das maiores unidades taxonômicas dentro do domínio Bacteria, considerando-se número e variedade de espécies identificadas (Ventura, 2007). Desenvolveu-se, ao longo da evolução, com diferentes modos de vida e em diversos habitats, e a heterogeneidade genômica observada para o filo reflete sua biodiversidade (Barka et al, 2016).

Apesar de apresentar distribuição ubíqua, a maior parte do filo Actinobacteria se apresenta como microrganismos habitantes do solo. A depender de condições derivadas da localização geográfica, como temperatura, pH, conteúdo de matéria orgânica ou umidade, entre outros fatores, a quantidade e variedade de actinomicetos no solo podem ser influenciadas (Arifuzzaman et al, 2010). No solo, em particular, *Streptomyces* é o gênero de Actinobacteria mais comumente identificado (Barka et al, 2016).

Em 2009, Quirino et al compararam a diversidade microbiana componente do solo do Cerrado em condições antrópicas e em área de preservação ecológica. No estudo, mostraram que, enquanto o filo Actinobacteria foi o mais abundante em amostras sob efeito antrópico, o mesmo não aconteceu em área de preservação. Em solo de Cerrado preservado, como colocado pelos pesquisadores, Actinobacteria representou apenas 19,4% dos microrganismos identificados no solo, atrás de α -Proteobacteria (26,4%) e de Acidobacteria (22,2%). Em contrapartida, em solo sob condição antrópica, 34,3% dos microrganismos identificados pertenciam ao filo Actinobacteria, em quantidade consideravelmente mais elevada que os filios seguintes: 20% para Acidobacteria e 11,4% para α -Proteobacteria.

Nesse trabalho, o resultado observado se assemelha ao apresentado por Quirino et al (2009). Apesar de a abordagem desse não ser metagenômica, para ser possível comparação entre filios na composição do solo, obteve-se maior quantidade de colônias de aspecto semelhante a actinomicetos em amostra sob condição antrópica. Mais da metade dos microrganismos isolados no trabalho foram de amostra coletada na Ermida Dom Bosco (Brasília - DF), enquanto na Reserva Ecológica do IBGE, mesmo recinto de coleta de solo de Cerrado preservado do trabalho de Quirino et al (2009), a quantidade de isolados corresponde a menos da metade dos providos pelo solo em condição antrópica (Figura 6). Por outro lado, as demais amostras coletadas apresentaram menos colônias de possíveis actinomicetos que o observado para a Reserva IBGE, sendo duas delas de condição antrópica.

Estudos que comparam a população microbiana no solo no Cerrado, mais especificamente, da rizosfera de vegetais do Cerrado sob efeito antrópico ou de preservação

não foram realizados até o presente momento. Dessa forma, não são possíveis comparações específicas à rizosfera no Cerrado quanto aos resultados obtidos no trabalho. Uma vez que o solo é parte componente da rizosfera vegetal e que as propriedades e composição do solo circundante interferem diretamente na rizosfera das plantas (McNear Jr., 2013), tomaram-se também os estudos do solo do Cerrado como comparações para esse trabalho.

Em 2013, Silva et al investigaram a composição do solo e a diversidade dentro do filo Actinobacteria em amostras do Cerrado nativo de diferentes localidades, além de condições diversas do ambiente. Nesse estudo, o gênero *Streptomyces* foi abundante em todas as amostras, independente da estação do ano ou composição do solo. Além disso, identificaram elevada acidez para o solo de todas as amostras coletadas.

No presente trabalho, as características buscadas para a seleção de Actinobacteria entre as colônias cultivadas a partir da suspensão de solo direcionaram ao isolamento de actinomicetos filamentosos. De toda forma, e além de Actinobacteria apresentar variados gêneros formadores de hifa (Barka et al, 2016), é relevante enfatizar que entre os 10 isolados purificados, todos compõem o gênero *Streptomyces*. Essa observação corrobora a abundância do gênero no solo do Cerrado constatada por Silva et al (2013), além de reforçar a afirmação de Poomthongdee et al (2015) de que, em ambientes ácidos, os actinomicetos geralmente encontrados pertencem ao gênero *Streptomyces*, ampliando-se também a constatação de elevada acidez geral do solo do Cerrado analisada por Silva et al (2013), observada também por Quirino et al (2009).

Nesse trabalho, fez-se a classificação taxonômica dos isolados purificados apenas com base na análise de rDNA 16S. Como revisado por Maughan & Van der Auwera (2011), para espécies estreitamente relacionadas, a aplicação da análise de rDNA 16S em isolado para classificação taxonômica se mostra limitada. Apesar disso, além de definir-se o gênero em que estão contidos, foi possível a identificação das espécies geneticamente mais próximas dos actinomicetos isolados e aplicados aos ensaios.

Actinobacteria é amplamente conhecido pelo seu potencial de produção de metabólitos secundários com bioatividades relevantes. Mais especificamente, o filo *Streptomyces* apresenta capacidade biossintética abundante (Zacchetti et al, 2018). Além das consideráveis enzimas hidrolíticas exploradas industrialmente, o metabolismo secundário de *Streptomyces* forneceu, nas últimas décadas, os mais variados agentes bioativos (Barka et al, 2016). A espécie *S. roseolus*, identificada como mais relacionada ao isolado LAP1, foi previamente descrita pela sua capacidade de produção de quitinases e de quitosanases (Jiang et al, 2012a; Jiang et al, 2012b). Foi descrita também como inibidora do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus*,

além de provocar alterações morfológicas na espécie em co-cultura (Caceres et al, 2018). A espécie mais relacionada ao isolado LAP2, *S. gancidicus*, foi descrita pela produção de amilases (Krishnan & Sampath Kumar, 2015), celulasas (Jeffrey & Azrizal, 2007) e pela sua capacidade antimicrobiana contra *A. fumigatus*, *A. aerogenes*, *S. epidermis* e *S. flexneri* (Nayaka et al, 2018). *S. luteogriseus*, mais relacionada ao isolado LAP3, foi descrita pela capacidade de produção de fitases (Aly et al, 2015), pela atividade de inibição de hidrolases (Zhong et al, 2001) e pela sua atividade biodegradante das micotoxinas aflatoxina-B1 e zearalenona (Harkai et al, 2016). Em 1997, foi descrita a produção de um inibidor de catepsina-B por essa espécie (Han et al, 1997), porém as técnicas de classificação do microrganismo foram restritas à morfologia e novos estudos sobre o tema não foram encontrados. A espécie *S. graminearus*, mais próxima evolutivamente ao LAP8, tem como principal descrição um produto de seu metabolismo secundário, a gougerotina, antibiótico inibidor da síntese proteica, que também apresenta atividade antitumoral, antiviral, entre outras (Jiang et al, 2013). A espécie mais similar ao LAP11, *S. roseogriseus*, foi descrita como primeiro microrganismo do qual isolaram a pentalenolactona (Koe et al, 1957), porém estudos posteriores com linhagens da espécie não conseguiriam a produção do antibiótico em cultivo em diversos meios (Cane et al, 1979) e novos estudos relacionando esse antibiótico à espécie não foram encontrados, apenas para outras espécies do gênero. A espécie *S. cellulosa*, relacionada ao LDB2, teve descrita sua atividade antioxidante (Rani et al, 2018), a produção de lipase (Boran, 2018) e sua atividade antimicrobiana (Zothanpuia et al, 2018), sendo a primeira espécie de *Streptomyces* da qual se isolou a fungicromina, de ação antibiótica, apesar de sua elevada citotoxicidade (Noguchi et al, 1988). A espécie mais relacionada ao isolado LDB17, *S. tubercidicus*, foi descrita pelo isolamento da endonuclease sítio-específica *StuI* (Shimotsu et al, 1980) e pela produção da tubercidina, análoga de adenosina, de potente ação antimicrobiana e antitumoral (Liu et al, 2018). Além dessa molécula, descreveu-se também a produção de FK520, primeiramente identificado no metabolismo secundário de *S. hygrosopicus*, mas posteriormente descrita por Kónya et al (2008) também como um produto da fermentação de *S. tubercidicus*. FK520, posteriormente denominado ascomicina, é um inibidor da proteína serina/treonina fosfatase cálcio-dependente, ou calcineurina (CaN / proteína fosfatase 2B), inicialmente descrito como antifúngico (Arai et al, 1962) e posteriormente descrito com propriedades imunossupressoras (Dumont et al, 1992).

O isolado LDB11, apesar de a análise filogenética não indicar maior proximidade evolutiva a outra espécie já definida que não ao isolado LDB2, os resultados desse trabalho reforçam a distinção dos dois isolados. Os dois divergem não apenas pela morfologia, mas

também pela atividade biológica observada nos ensaios. O que corrobora que o metabolismo secundário dos isolados em mesma condição de cultivo é diferente, resultado de microrganismos diferentes. Para o LDB11 e também para os isolados LDB32 e LDB34, será necessário aprofundamento nas análises moleculares, analisando-se o gene de rRNA 16S completo, ou mesmo outros genes, para que seja possível identificar a qual espécie de *Streptomyces* esses isolados são mais relacionados. Entre as espécies identificadas nesse trabalho, apenas *S. roseogriseus* foi identificada por Silva et al (2013) no solo do Cerrado, encontrada em uma das localidades de coleta, tanto em estação seca, quanto chuvosa.

O filo Actinobacteria, em especial o gênero *Streptomyces*, foi descrito como componente abundante do solo e da rizosfera vegetal e seu metabolismo secundário representa uma das principais fontes de composto bioativos (Quirino et al, 2009; Barka et al, 2016). Até o momento, mais de 10000 compostos com bioatividade foram obtidos de Actinobacteria, muitos com ação antimicrobiana (Lee et al, 2018). Correspondendo à relevância metabólica do filo, observou-se atividade antifúngica para os oito extratos avaliados nesse trabalho.

Entre as linhagens de leveduras avaliadas para inibição de crescimento pelos extratos, foram incluídas duas espécies do fungo patogênico do gênero *Cryptococcus*: *C. neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* geralmente afeta indivíduos imunocomprometidos, apesar de já terem sido descritos casos de acometimento de pacientes imunocompetentes (Hoang et al, 2004), enquanto *C. gattii* infecta também indivíduos imunocompetentes (Hoang et al, 2014; Idnurm et al, 2005). As duas espécies são responsáveis por infecções com acometimento do sistema nervoso central (SNC), pulmões, ou mesmo infecções sistêmicas (Carrasco-Zuber et al, 2016). Entre as linhagens de *C. neoformans*, avaliou-se a inibição de uma linhagem resistente a fluconazol. Avaliou-se também a inibição do crescimento de espécies de *Candida*, o gênero mais comum em infecções fúngicas em humanos. As espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* correspondem a três das cinco espécies de *Candida* que são responsáveis por 90% das infecções causadas por fungos em humanos, sendo *C. albicans* a mais comum (Turner & Butler, 2014). Como mostra a Tabela 10, os extratos de *Streptomyces* sp. isolados do Cerrado tiveram ação antifúngica abrangente, afetando o crescimento de ao menos duas das linhagens testadas. É relevante ressaltar que muitos dos extratos do trabalho apresentaram inibição moderada ou forte para várias das linhagens patogênicas, sendo dois deles capazes de inibir moderadamente a linhagem de *C. neoformans* resistente a fluconazol, 89-610, e um extrato, o LDB17, capazes de inibir completamente o crescimento desse microrganismo.

A demanda progressiva atual de novas drogas antimicrobianas, essas que, além de serem limitadas, apresentam elevada toxicidade ao hospedeiro infectado, é agravada ainda pelo

número crescente de microrganismos resistentes às drogas tradicionalmente empregadas. Uma vez que o processo de resistência de microrganismos evolui ao longo do tempo, é necessária uma investigação rigorosa e contínua de novos compostos (Perfect, 2017). A abrangente atuação dos extratos de Actinobacteria isolados da rizosfera de lobeiras para a inibição de fungos patogênicos reflete o potencial do filo e a importância da exploração nesse bioma para sua aplicação biotecnológica. É necessária ainda a ampliação da análise antimicrobiana a outros fungos patogênicos humanos e também a bactérias. Além disso, é preciso avaliar a aplicação dos extratos em concentrações não-tóxicas a células de mamíferos.

Um importante aspecto a ser identificado na bioprospecção de novos componentes com ação microbicida é também avaliar a capacidade de modulação do sistema imunológico, para auxiliar na eliminação do patógeno. Além disso, a bioprospecção de novas drogas imunomoduladoras pode promover melhora na terapia imune clínica e a diminuição de efeitos colaterais observados para muitas drogas convencionais. Assim, foram analisados alguns mediadores que estão diretamente ligados ao processo inflamatório do indivíduo.

O TNF- α é considerado uma citocina pró-inflamatória e é mediador tanto de imunidade inata quanto adaptativa (Khan, 2008). É uma citocina produzida por diversas células imunes, sendo o principal tipo celular o macrófago, mas também por linfócitos *natural killer* (NK), mastócitos, linfócitos B e linfócitos Th1. Entre seus variados efeitos, TNF- α aumenta a expressão de moléculas de adesão, promove a ativação de macrófagos, além de aumentar a sua atividade fagocitária. Esse mediador aumenta a atividade de apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, ativa linfócitos T, promovendo e regulando a resposta de tipo Th1 pelo estímulo à produção de citocinas como IFN- γ , podendo também agir sinergicamente com IFN- γ para a ativação de macrófagos. A combinação desses dois mediadores leva à formação e maturação de fagolisossomos e estimula também a produção de intermediários reativos de nitrogênio (RNI), aumentando de maneira geral a atividade microbicida de macrófagos (Wang & He, 2018). Estudos anteriores relacionaram a modulação de TNF- α a compostos isolados de Actinobacteria. De Reijke et al (1997), mostraram o aumento de TNF- α , entre outras citocinas pela administração *in vivo* do imunoestimulante rubratina, de *Nocardia ruber*. Já Lee et al (2016) descreveram a diminuição da produção dessa citocina em macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS e tratados com a griseusrazina A, isolada de *Streptomyces griseus*. Em análise inicial da modulação da resposta de macrófagos, obteve-se ação imunoestimulante e imunossupressora (Figura 17). Os extratos LAP1 e LAP11 induziram a ativação da via de TNF- α , enquanto LDB11 suprimiu a ativação por LPS, sendo LAP11 o indutor mais forte e LDB11 um forte repressor. O extrato LDB11 reduziu a produção dessa

citocina mesmo em BMDMs estimulados por LPS e infectados por H99 (Figura 22B). Dessa forma, LAP1 e LAP11 tiveram ação pró-inflamatória e LDB11 anti-inflamatória. Corroborando o perfil pró-inflamatório do LAP11, observou-se também a produção de IL-6 em BMDMs não-estimulados (Figura 20B) e influência na produção de NO pelos macrófagos, mas de forma pouco significativa (Figura 18).

O óxido nítrico é um mensageiro intercelular de papel versátil no sistema imune. Sabe-se que padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são reconhecidos por células do sistema imune inato e as ativam. Uma vez ativadas, macrófagos liberam diferentes moléculas efetoras para inibir a replicação do agente infeccioso, entre elas o óxido nítrico. Além de defesa tóxica a patógenos, NO também regula o crescimento, atividade e morte de diversos tipos celulares do sistema imunes. Por ser produzido em níveis elevados em certas reações inflamatórias, NO foi tido como agente pró-inflamatório (Tripathi et al, 2007).

A óxido nítrico sintase induzível (NOS2), uma das isoformas da enzima responsável pela catálise de L-arginina para produção de óxido nítrico, em macrófagos, é ativada por TNF- α , interleucina-1 (IL-1), IFN- γ , endotoxinas ou LPS. Ao contrário das demais isoformas conhecidas, que produzem a molécula em níveis pico-nanomolares, NOS2 gera altos níveis de NO, em concentrações micromolares, por períodos prolongados (Wang et al, 2018). A elevada expressão de NOS2 e produção de NO após inflamação ou infecção já foi bem caracterizada (Tripathi et al, 2007). Nesse trabalho, observou-se maior indução da produção de NO por três extratos: LDB2 (leve), LAP3 e LAP8 (fortes); de aproximadamente 50 μ M, 290 μ M e 350 μ M, respectivamente (Figura 18). Curiosamente, nenhum desses extratos teve ação sobre a via de TNF- α (Figura 17), o que mostra que o mecanismo de ação dos extratos em cada via não se relacionou à outra. Além de efeito indutor, obteve-se também efeito supressor de NO pelo extrato LDB17 em BMDMs ativados por LPS + IFN- γ . Além desses extratos, LAP2 e LAP11 também modularam a produção de NO, estimulando BMDMs não ativados pelos estímulos positivos, mas de forma leve. Com isso, pode-se afirmar que os extratos LAP2, LAP3, LAP8, LAP11, LDB2 e LDB17 modulam a atividade da enzima NOS2 ou a sua expressão em macrófagos murinos. É importante destacar que os extratos LAP3 e LAP8 induziram a produção de NO em mais de 4x em relação ao controle positivo estimulado com LPS + IFN- γ . Como ressaltado por Wang et al (2018), a molécula de NO é uma das principais no estresse oxidativo, e o estresse oxidativo excessivo pode colaborar para a formação de um microambiente tumoral e favorecer a carcinogênese. Sendo assim, deve ser considerado o efeito excessivo desses extratos em análises futuras. Esses resultados se correlacionam a descrições anteriores de modulação de óxido nítrico por compostos derivados de *Streptomyces* sp. Lee et al (2016), por

exemplo, mostraram a supressão da produção de NO e diminuição na expressão da enzima NOS2 em macrófagos imortalizados tratados com a griseusrazina A, de *S. griseus*. De forma a ampliar os resultados obtidos, análises futuras poderão ser feitas sobre a expressão da enzima NOS2 em BMDMs sob tratamento com os extratos LAP3, LAP8, LDB2 e em BMDMs estimulados com os sinais positivos e tratados com o extrato LDB17.

A citocina IL-6, geralmente tida como pró-inflamatória, é um fator de estímulo para células B, levando à produção de IgG. Essa citocina tem papel essencial na resposta imune contra patógenos, em processos inflamatórios e na modulação do crescimento celular. Além disso, IL-6 modula a resistência de linfócitos T à apoptose, induz a ativação de linfócitos T auxiliares e controla o equilíbrio entre linfócitos Th17 e linfócitos T regulatórios (Treg) (Zhang et al, 2014). Com exceção do extrato LAP1, todos os demais extratos de ação estimulante, ou seja, os extratos LAP8 e LDB2 (indutores de NO) e o extrato LAP11 (indutor de TNF- α) induziram a produção de IL-6 (Figura 20). No entanto, a ação observada para LAP8 e LDB2 foi menor. O extrato LAP11 também apresentou inibição leve da produção de IL-10, corroborando seu perfil pró-inflamatório (Figura 21B). Curiosamente, o extrato LDB11, que apresentou forte inibição da via de TNF- α ativada por LPS (Figura 17), concomitantemente é indutor moderado da via de IL-6.

Células fagocitárias, como os macrófagos, integram a resposta inata do organismo contra agentes patogênicos, possuindo variados efetores antimicrobianos. Além disso, macrófagos representam componente de transição importante para a resposta imune adaptativa, pela sua função, por exemplo, de apresentação de antígenos às células linfóides. Essas células possuem papel crítico na iniciação, manutenção e resolução da inflamação. Suas principais funções, além de apresentação de antígenos, são a fagocitose, para eliminação de *debris* e patógenos invasores, e a imunomodulação, pela liberação de citocinas e fatores de crescimento (Fujiwara & Kobayashi, 2005). Em análise da influência dos extratos de Actinobacteria na capacidade microbicida das células imunes *in vitro*, LAP2 e LDB11 prejudicaram a ação dos macrófagos contra o agente infeccioso H99 (Figura 19). O efeito observado deve-se à diminuição da capacidade dos macrófagos de matar o patógeno fagocitado, que pode se replicar no interior das células. Entre as condições microbicidas no interior do macrófago, os microrganismos fagocitados são expostos a baixa disponibilidade de nutrientes, espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS), atividade hidrolítica e pH ácido (Austermeier et al, 2020). Pode-se dizer que LAP2 e LDB11 afetaram de alguma maneira as vias responsáveis por tais condições e provocam perfil anti-inflamatório em macrófagos murinos. Esse resultado para LDB11 corrobora a observação anterior de forte supressão da produção de TNF- α induzida

por LPS. Curiosamente, esse extrato induziu a produção de IL-6 em BMDMs infectados ou não com o fungo patogênico H99 (Figura 20A e Figura 22).

Apesar de ser comumente considerada uma citocina pró-inflamatória, também foram observadas propriedades alternativas para IL-6, que não direcionadas à inflamação (Scheller et al, 2011). Em 1996, Trautwein et al sugeriram a importância de IL-6 na regeneração do fígado devido aos altos níveis da citocina secretada após hepatectomia parcial. No mesmo ano, estudo com camundongos IL-6^{-/-} mostrou regeneração prejudicada do fígado após hepatectomia de 2/3 (Cressman et al, 1996). Além disso, trabalhos já demonstraram que apenas a combinação de IL-6 e do receptor solúvel de IL-6 (sIL-6R) leva a proliferação hepatocelular eficiente, destacando a importância da trans-sinalização de IL-6 na regulação da regeneração hepática (Peters et al, 1997; Schirmacher et al, 1998). Efeito regenerativo de IL-6 também foi observado para as células epiteliais intestinais de camundongos tratados com dextran sulfato de sódio (DSS) para indução de colite (Grivennikov et al, 2009, Chalaris et al, 2010), de forma que Grivennikov et al (2009) mostraram níveis inflamatórios mais elevados em camundongos IL-6^{-/-} tratados com DSS que em camundongos selvagens (*wt*). Além de ação regenerativa provocada por IL-6, esses estudos mostram a piora no quadro inflamatório na ausência de IL-6. Estudos em camundongos demonstram ainda que a atividade anti-inflamatória observada para IL-6 é mediada pela via de sinalização clássica, referente à ativação por receptores de IL-6 ligados à membrana (mbIL-6R) (Scheller et al, 2011). Tendo em vista o apresentado, há a possibilidade de o aumento de IL-6 observado sob tratamento com os extratos que reduziram a produção de TNF- α e/ou a atividade microbicida de macrófagos infectados, ou seja, o LAP2 e o LDB11, componha de fato a indução de um perfil anti-inflamatório. Corroborando essa hipótese, observou-se a indução da produção de IL-10 nos BMDMs ativados por LPS, infectados por H99 e tratados com os extratos LDB2 e LDB11 (Figura 23) e, ainda a aumento dessa citocina nos BMDMs estimulados e tratados com o LDB11 (Figura 21A). A IL-10 é uma citocina com fortes propriedades anti-inflamatórias, inibindo a produção de mediadores inflamatórios, reduzindo a fagocitose e a apresentação de antígenos e, concomitantemente, inibindo o desenvolvimento de variadas células inflamatórias pelo estímulo à produção de mediadores anti-inflamatórios (Iyer & Cheng, 2012).

Entre estudos anteriores que isolaram moléculas imunomoduladoras do produto de fermentação de *Streptomyces* sp. podemos citar os agentes imunossupressores FK506, FK520 e a rapamicina, isolados de *S. tsukubaensis*, *S. hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* e *S. hygroscopicus*, respectivamente. Esses compostos apresentam estruturas similares e atuam prevenindo a proliferação de linfócitos T pela ligação inicial à imunofilina FKBP12. O seu

mecanismo de ação, no entanto, é diferente. FK506 e FK520 se ligam a FKBP12, formando um complexo inibidor de calcineurina e conseqüentemente, impedem a defosforilação do fator nuclear de linfócitos T ativadas (NFAT) e sua translocação para o núcleo, bloqueando o estímulo à liberação de citocinas como a IL-2. O complexo rapamicina-FKBP12 inibe a função quinase da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), levando à inibição do início da tradução de mRNA e de seu progresso, entre outros efeitos (Andexer et al, 2011). Alta toxicidade *in vivo* é observada para a rapamicina e para FK506, que envolvem vasculite e necrose miocárdica, e neuro e nefrotoxicidade, respectivamente, o que impõe grandes limitações à aplicação terapêutica desses imunossuppressores. O mecanismo dos efeitos tóxico e imunossupressor já foram descritos como relacionados (Dumont 2000). O análogo de FK506, o FK520, apresenta menor toxicidade e teve sua atividade imunossupressora descrita por Dumont et al (1992), quando o grupo buscava por análogos cuja ação imunossupressora não estivesse correlacionada aos efeitos tóxicos. Como citado anteriormente, Kónya et al (2008) descreveram a produção de FK520 por *S. tubercidicus*, espécie mais relacionada ao isolado LDB17. Embora o extrato desse isolado tenha apresentado elevada toxicidade na forma de um composto, esse aspecto levanta a possibilidade de investigação desse isolado para a inibição dos linfócitos T, enfatizando-se a elevada ação antifúngica observada para seu composto, que remete à atividade antifúngica também descrita para FK520. Ressalta-se ainda a possibilidade de efeito imunossupressor para o LDB17 em linfócitos T, mesmo não tendo sido observada inibição considerável em macrófagos pelo seu extrato. Como descrito por Escolano et al (2014), o análogo FK506 não foi capaz de modular perfil anti-inflamatório em macrófagos, apesar de seu forte efeito inibidor de linfócitos T.

Novos produtos moduladores da resposta imune foram identificados em *Streptomyces* spp., no entanto, os seus mecanismos e aplicações clínicas ainda precisam ser determinados (Bolourian & Mojtahedi, 2018). Vale ressaltar ainda que muitos dos imunomoduladores já descritos apresentam alta toxicidade concomitantemente aos seus efeitos (Uyeda, 2001). Nesse trabalho, a modulação da resposta de macrófagos murinos foi analisada em concentrações não tóxicas a essas células, reforçando o potencial de aplicação dos extratos com ação imunoestimulante e imunossupressora das espécies de *Streptomyces* isolados da rizosfera de *Solanum lycocarpum*.

O sistema imune é uma rede interligada complexa e altamente regulada formada pelas mais variadas células, órgãos linfoides, fatores humorais e citocinas (Parkin & Cohen, 2001). Devido ao efeito muitas vezes pleiotrópico das moléculas efetoras do sistema imune (Khan, 2008), cujo quadro se desdobra em inúmeras possibilidades a depender do panorama completo,

é necessário um estudo mais abrangente das vias do sistema imune influenciadas pelos extratos moduladores da resposta de macrófagos. Apenas sob análise mais completa seria possível formular o perfil exato de ação de cada composto, envolvendo outras moléculas mediadoras e outros tipos celulares do sistema imune. Ainda assim, esse trabalho fornece as diretrizes a serem exploradas.

Uma possibilidade futura para o trabalho é o fracionamento cromatográfico dos extratos de Actinobacteria e a purificação de seus componentes, como feito em outros trabalhos de caráter semelhante (Rajan & Kannabiran, 2014; Hassan et al, 2017; Ramachandran et al, 2019). Dessa forma, identificam-se os reais agentes bioativos entre os metabólitos secundários de cada composto, sendo possível sua caracterização estrutural e identificação molecular. Tal abordagem, além de elucidar cada produto bioativo da amostra, permite sua avaliação específica. Tendo como exemplo, um composto com atividade antifúngica relevante, mas de elevada citotoxicidade a mamíferos, como foi observado para LDB17, não necessariamente apresenta os dois efeitos derivados de um mesmo agente. Ademais, a separação possibilitaria ainda a avaliação de bioagentes em maiores concentrações, aumentando seu potencial de ação, visto que moléculas prejudiciais ao organismo hospedeiro presentes no composto estariam ausentes.

Como apresentado, o presente trabalho obteve resultados positivos de imunomodulação, mesmo dentro das limitações encontradas, como, por exemplo, a concentração máxima de extrato aplicada ser de 5% (v/v). Em perspectivas futuras, a decomposição dos extratos ampliaria as possibilidades de aplicação, visto que, caso o agente citotóxico for outro que não o imunomodulador, a ação imunomodulatória é encoberta no composto, aplicado em baixas concentrações, a fim de amenizar o efeito do agente tóxico às células.

Ademais, esse trabalho foi o primeiro a isolar Actinobacteria de amostras de rizosfera do Cerrado e avaliar sua ação antifúngica e moduladora da resposta imune. Os resultados apresentados sugerem inibição do crescimento de leveduras e mostram também um *screening* inicial de sua ação *in vitro* sobre macrófagos murinos, havendo indicação de supressão e estímulo da resposta imune. Esse trabalho abre inúmeras possibilidades de pesquisa visando à aplicação dos extratos obtidos. No tratamento contra infecções fúngicas, pode ser aprofundada a abordagem antimicrobiana, ou ainda a indução da resposta imune contra infecções no caso de hospedeiros com deficiência na resposta inflamatória. Pode também ser aprimorado o estudo do efeito imunossupressor observado, visando à aplicação no tratamento de quadros de hipersensibilidade, intrínseca ou extrínseca, ou em casos de transplantes. Além disso, o trabalho

foi inicial para a investigação e seleção de extratos potenciais para investigação das demais vias do intrincado sistema imune.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que actinomicetos isolados da rizosfera de *Solanum lycocarpum* são potenciais fontes de compostos com ação biológica. Os extratos dos isolados desse trabalho apresentaram atividade antifúngica contra linhagens de fungos patogênicos humanos e apresentaram propriedades moduladoras pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na resposta de macrófagos murinos *in vitro* sob concentrações atóxicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, J. & Chauhan, R. (2018). Profiling of red pigment produced by *Streptomyces* sp. JAR6 and its bioactivity. *3 Biotech*, 8(1): 22.
- Agadagba, S. K. (2014). Isolation of actinomycetes from soil. *Microbios*, 4(3): 136-140.
- Alkami Biosystems, Inc. (1999). *Alkami Quick Guide for PCR*. United States of America: Guanabara Koogan.
- Aly, M. M. et al (2015). Production and characterization of phytase from *Streptomyces luteogriseus* R10 isolated from decaying wood samples. *Int J Agric Biol*, 17(3): 515-522.
- Andexer, J. N. et al (2011). Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520, and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate. *Proc Natl Acad Sci*, 108(12): 4776-4781.
- Andrade, A. F. et al (2016). In vitro cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity assessment of *Solanum lycocarpum* hydroalcoholic extract. *Pharm Biol*, 54(11): 2786-2790.
- Arai T, Kouama Y, Suenaga T, Honda H (1962). Ascomycin, an antifungal antibiotic. *J Antibiot* 15: 231-232.
- Arifuzzaman, M. et al (2010). Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *Afr J Biotechnol*, 9(29): 4615-1619.
- Audrain, B. et al (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev* 39(2): 222-233.
- Austermeier, S. et al (2020). I want to break free – macrophage strategies to recognize and kill *Candida albicans*, and fungal counter-strategies to escape. *Curr Opin Microbiol*, 58: 15-23.
- Azevedo, A. et al (2011). In vitro susceptibility of a large collection of *Candida* strains against fluconazole and voriconazole by using the CLSI disk diffusion assay. *Mycopathologia*, 171: 411-416.
- Balachandran, C. et al (2012). Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549). *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(1): S392-S400.
- Barka, E. A. et al (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(1): 1-43.
- Bentley, S. D. et al (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417: 141-147.
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*, 65(8): 385-395.

- Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol*, 8(2): 208-215.
- Blaak, H. et al (1993). Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. *Eur J Biochem*, 214(3): 659-669.
- Blomgren, H. et al (1980). Bestatin treatment and the peripheral lymphocyte population in cancer patients. *Recent Results Cancer Res*, 75: 133-138.
- Bobek, J. et al (2017). A waking review: Old and novel insights into the spore germination in *Streptomyces*. *Front Microbiol*, 8: 2205.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2(10): 907-916.
- Bolourian, A. & Mojtahedi, Z. (2018). Immunosuppressants produced by *Streptomyces*: evolution, hygiene hypothesis, tumour rapalog resistance and probiotics. *Environ Microbiol Rep*, 10(2): 123-126.
- Boran, R. (2018). Detergent compatible extracellular lipase from *Streptomyces cellulosa* AU-10: A green alternative for the detergent industry. *J Surfact Deterg*, 21(4): 565-573.
- Brandão, F. A. et al (2015). Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. *Virulence*, 6(6): 618-630.
- Bryan, N. S. & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 43(5): 645-657.
- Caceres, I. et al (2018). *Streptomyces roseolus*, a promising biocontrol agent against *Aspergillus flavus*, the main aflatoxin B₁ producer. *Toxins (Basel)*, 10(11): 1-13.
- Cane, D. E. et al (1979). The biosynthesis of pentalenolactone. *Tetrahedron Lett*, 20: 3639-3642.
- Carrasco-Zuber, J. E. et al (2016). Cutaneous involvement in the deep mycose: a review. Part II - Systemic mycoses. *Actas Dermosifilogr*, 107(10): 816-822.
- Casciello, C. et al (2017). A valuable peroxidase activity from the novel species *Nonomuraea gerenzanensis* growing on alkali lignin. *Biotechnol Rep*, 13: 49-57.
- Chalaris, A. Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med*, 207: 1617-1624.
- Chater, K. & Hopwood, D. (1993). Streptomyces. In Sonenshein, A; Hoch, J; Losick, R (ed), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*: 83-99. ASM Press, Washington, DC.
- Chater, K. (1972). A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol*, 72(1): 9-28.

- Chater, K. F. et al (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*, 34(2): 171-198.
- Cheepurupalli, L. et al (2017). Bioactive molecule from *Streptomyces* sp. mitigates MDR *Klebsiella pneumoniae* in zebrafish infection model. *Front Microbiol*, 8(614): 1-15.
- Claessen, D. et al (2014). Bacterial solutions to multicellularity: A tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat Rev Microbiol*, 12(2): 115-124.
- Coombs, J. T. & Franco, C. M. M. (2003). Isolation and identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol*, 69(9): 5603-5608.
- Crawford, D. L. et al (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol*, 59: 3899-3905.
- Cressman, D. E. et al (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*, 274: 1379-1383.
- Damude, H. G. et al (1993). Endoglucanase CasA from alkalophilic *Streptomyces* strain KSM-9 is a typical member of family B of beta-1,4-glucanases. *Gene*, 123(1): 105-107.
- Davie, J. R. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, 133(7): 2485S-2493S.
- Davis, M. R. et al (2019). Tolerability of long-term fluconazole therapy. *J Antimicrob Chemother*, 74(3): 768-771.
- De Reijke, T. M. et al (1997). Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell wall skeleton preparation (Rubratin) for superficial bladder cancer immunotherapy: a phase I/II study. *Urol Res*, 25(2): 117-120.
- Dereeper, A. et al (2008). Phylogeny.fr: Robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*, 36.
- Dumont, F. J. (2000). FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem*, 7(7): 731-748.
- Dumont, F. J. et al (1992). The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: Pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin. *J Exp Med*, 176: 751-760.
- El-Naggar, N. E. & El-Ewasy, S. M. (2017). Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Sci Rep*, 7(42129): 1-19.
- Escolano, A. et al (2014). Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP-1 and p38. *EMBO J*, 33(10): 1117-1133.

- Fenton, A. et al (1992). Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl Environ Microbiol* 58(12): 3873-3878.
- Fujiwara, N. & Kobayashi, K (2005). Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(3): 281-286.
- Gea-Banacloche, J. C. (2006). Immunomodulation. *Princip Mol Med*, 92: 893-904.
- Girard, G. et al (2013). A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open Biol*, 3(10): 1-13.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41(2): 109-117.
- Goodfellow, M. & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol*, 37(1): 189-216.
- Grivennikov, S. et al (2009). IL-6 and STAT3 signaling is required for survival of intestinal epithelial cells and colitis associated cancer. *Cancer Cell*, 16: 103-113.
- Gupta, R. et al (1995). Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *J Appl Bacteriol*, 78(4): 378-383.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41:95-98.
- Han, K. H. et al (1997). Selection and identification of a strain KT-10 producing the cathepsin B inhibitor. *J Microbiol Biotechn*, 7(5): 333-340.
- Harchand, R. K. & Singh, S. (1997). Characterization of cellulase complex of *Streptomyces albaduncus*. *J Basic Microbiol*, 37(2): 93-103.
- Harkai, P. et al (2016). Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. collection. *Int Biodeterior Biodegradation*, 108: 48-56.
- Hassan, S. S. et al (2017). Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. *Environ Toxicol Pharmacol*, 49: 34-47.
- Hayakawa, M. & Nonomura, H. (1989). A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil. *Actinomycetol*, 3(2): 95-104.
- Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. *Arb Deut Landw Gesell*, 98: 59-78.
- Hoang, L. M. N. et al (2004). *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): Epidemiology, microbiology and histopathology. *J Med Microbiol*, 53: 935-940.

- Hopwood, D. A. (2008). *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. *J Hist Med Allied Sci*, 63(2): 273-274.
- Idnurm, A. et al (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*, 3: 753-764.
- Iwami, M. et al (1987). A new immunomodulator, FR-900494: taxonomy, fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot*, 40(5): 612-622.
- Iyer, S. S. & Cheng, G. (2012). Role of interleukin-10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*, 32(1): 23-63.
- Jeffrey, L. S. H. & Azrizal, M. R. (2007). Screening for cellulase activities in actinomycetes isolated from different locations of Peninsular Malaysia. *J Trop Agric and Fd Sc*, 35(1): 153-157.
- Jiang, L. et al (2013). Combined gene cluster engineering and precursor feeding to improve gougourotin production in *Streptomyces gramineus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 10469-10477.
- Jiang, X. et al (2012a). Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus*. *Carbohydr Polym*, 87(4): 2409-2415.
- Jiang, X. et al (2012b). Purification, characterization, and action mode of a chitosanase from *Streptomyces roseolus* induced by chitin. *Carbohydr Res*, 355: 40-44.
- Khamna, S. et al (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: Diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 649.
- Khan, M. M. (2008). Role of cytokines. *Immunopharmacology*. Springer, Boston, MA
- Kiran, G. S. et al (2014). Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures. *J Nanobiotechnology*, 12(18): 1-13.
- Kirby, R. (2011). Chromosome diversity and similarity within the *Actinomycetales*. *FEMS Microbiol Lett*, 319(1): 1-10.
- Koe, B. K. et al (1957). PA 132, a new antibiotic. I. Isolation and chemical properties. *Antibiot Annu*: 672-675.
- Komaki, H. et al (1999). Brasilicardin A, a new terpenoid antibiotic from pathogenic *Nocardia brasiliensis*: fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot*, 52(1): 13-19.
- Kónya, A. et al (2008). Production of FK520 by *Streptomyces tubercidicus*. *Microbiol Res*, 163(6): 624-532.

- Krishnan, A. & Sampath Kumar, S. (2015). Optimization of alpha amylase extracted from marine actinomycetes - *Streptomyces gancidicus* ASD-KT852565. *Int Res J Pharm*, 6: 729-735.
- Kumar, S. et al (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*, 35:1547-1549.
- Kurian, N. K. et al (2015). Evaluation of anti-inflammatory property of melanin from marine *Bacillus* sp BTCZ31. *Asian J Pharm Clin Res*, 8(3): 251-255.
- Lee, D. S. et al (2016). Marine-derived secondary metabolite, griseusrazin a, suppresses inflammation through heme oxygenase-1 induction in activated RAW264.7 macrophages. *J Nat Prod*, 79(4): 1105-1111.
- Lee, L. H. et al (2018). Editorial: The search for biological active agent(s) from Actinobacteria. *Front Microbiol*, 9: 824.
- Liu, Y. et al (2018). Discovery and characterization of the tubercidin biosynthetic pathway from *Streptomyces tubercidicus* NBRC 13090. *Microb Cell Fact*, 17(1): 131.
- Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (2005). Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. *Microbial Phylogeny and Evolution, Concepts and Controversies* (edited by Sapp): 70-98. Oxford University Press, New York.
- Ludwig, W. et al (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 5: 1-28. Springer-Verlag, New York, NY.
- Ludwig, W. et al (2015). Road map of the phylum Actinobacteria. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: 1-37. Hoboken, NJ: Wiley.
- Lutz, M. B. et al (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, 223(1): 77-92.
- Lynch, J. M. & Leij, F. (2012). Rhizosphere. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Macagnan, D. et al (2006). Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, 34(2): 122-132.
- Mahadevan, B. & Crawford, D. L. (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme Microb Technol* 20(7): 489-493.
- Marks, P. A. et al (2004). Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res*, 91: 137-168.
- Maughan, H. & Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect Genet Evol*, 11(5): 789-797.
- Mayfield, C. I. et al (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol Biochem*, 4: 79-91.

- McCusker, C. & Warrington, R. (2011). Primary immunodeficiency. *Allergy, Asthma, and Clin Immunol*, 7 (S11).
- McNear Jr., D. H. (2013). The rhizosphere - roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge* 4(3): 1.
- Miller, H. J. et al (1989). Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat and grass cultivars. *Can J Microbiol*, 35: 656-660.
- Miller, J. L. et al (2004). *In vitro* and *in vivo* efficacies of the new triazole albaconazole against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(2): 384-387.
- Ministério do Meio Ambiente (2011). Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: Cerrado. Brasília: MMA. 200 p.
- Monaco, C. L. et al (2016). Altered virome and bacterial microbiome in human immunodeficiency virus-associated acquired immunodeficiency syndrome. *Cell Host Microbe*, 19(3): 311-322.
- Nascimento, E. et al (2017). *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates from both HIV-infected and uninfected patients: antifungal susceptibility and outcome of cryptococcal disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 59: 1-7.
- Nayaka, S. et al (2018). Molecular characterization and antimicrobial efficacy of *Streptomyces gancidicus* strain SN-3 from soil samples. *J Microbiol Res*, 8(4): 97-102.
- Nguyen, L. N. et al (2011). Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. *J Antimicrob Chemother*, 66(11): 2573-2580.
- Noguchi, H. et al (1988). Biosynthesis and full NMR assignment of fungichromin, a polyene antibiotic from *Streptomyces cellulose*. *J Am Chem Soc*, 110(9): 2938-2945.
- Parkin, J. & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270): 1777-1789.
- Perfect, J. R. (2017). The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*, 16(9): 603-616.
- Perfect, J. R. et al (1996). *In vitro* and *in vivo* efficacies of the azole SCH56592 against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(8): 1910-1913.
- Peters, M. et al (1997). Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in IL-6/sIL-6R double transgenic mice. *J Exp Med*, 185: 755-766.
- Pinto, L. C. et al (2016). Traditional knowledge and uses of the *Caryocar brasiliense* Cambess. (Pequi) by "quilombolas" of Minas Gerais, Brazil: Subsidies for sustainable management. *Braz J Biol*, 76(2): 511-519.

- Poomthongdee, N. et al (2015). Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: Diversity and properties beneficial to plants. *J Antibiot*, 68: 106-114.
- Pristov, K. E. & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*, 25(7): 792-798.
- Prosser, B. L. A. T. & Palleroni, N. J. (1978). Nutritional characterization of some selected actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol*, 28(4): 516-522.
- Qi, D. et al (2019). Taxonomy and broad-spectrum antifungal activity of *Streptomyces* sp. SCA3-4 isolated from rhizosphere soil of *Opuntia strictai*. *Front Microbiol*, 10(1390): 1-15.
- Rajan, B. M. & Kannabiran, K. (2014). Extraction and identification of antibacterial secondary metabolites from marine *Streptomyces* sp. VITBRK2. *Int J Cell Med*, 3(3): 130-137.
- Ramachandra, M., D. L. et al (1988). Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl Environ Microbiol*, 54(12): 3057-3063.
- Ramachandran, G. et al (2019). Extraction and partial purification of secondary metabolites from endophytic actinomycetes of marine green algae *Caulerpa racemosa* against multi drug resistant uropathogens. *Biocatal Agric Biotechnol*, 17: 750-757.
- Rani, R. et al (2018). Phenolic compounds as antioxidants and chemopreventive drugs from *Streptomyces cellulosa* strain TES17 isolated from rhizosphere of *Camellia sinensis*. *BMC Complement Altern Med*, 18: 82.
- Reber, L. L. et al (2017). The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clean Immunol*, 140(2): 335-348.
- Roesler, R. et al (2008). Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem*, 110(3): 711-717.
- Sagatova, A. A. et al (2015). Structural insights into binding of the antifungal drug fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 α -demethylase. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8): 4982-4989.
- Sampson, H. A. (2003). Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics*, 111(6): 1601-1608.
- Sano, E. E. et al (2010). Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environ Monit Assess*, 166: 113-124.
- Saroj, P. et al (2012). An overview on immunomodulation. *J Adv Sci Res*, 3(1): 7-12.
- Schäfer, J. et al (2010). Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 311(2): 103-112.

- Schatz, A. & Waksman, S. A. (1944). Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Biol Med*, 57(2): 244-248.
- Schatz, A. et al (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med*, 55(1): 66-69.
- Scheller, J. et al (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813(5): 878-888.
- Schirmacher, P. et al (1998). Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation, and extracellular hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice. *Am J Pathol*, 153: 639-648.
- Schrempf, H. (2007). Biology of *Streptomyces*. *The Prokaryotes, a handbook on the biology of Bacteria*. 3rd ed. Springer Verlag, New York, NY.
- Shimotsu, H. et al (1980). A new site-specific endonuclease *StuI* from *Streptomyces tubercidicus*. *Gene*, 11(3-4): 219-225.
- Shirling, E. B. T & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 16(3): 313-340.
- Siciliano, S. D. et al (1998). Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can J Microbiol*, 44: 844-851.
- Silva, M. S. et al (2013). Brazilian Cerrado soil Actinobacteria ecology. *BioMed Res Int*, 2013: 1-10.
- Solans, M. et al (2009). Saprophytic actinomycetes promote nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high N. *J Plant Growth Regul*, 28(2): 106-114.
- Spampinato, C. & Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int*, 2013.
- Strassburg, B. B. et al (2017). Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nature Ecol Evol*, 1(0099).
- Takana, Y. & Omura, S. (1990). Metabolism and products of actinomycetes - An introduction. *Actinomycetol*, 4(1): 13-14.
- Togawa, R.C. & Brigido, M.M. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi 14th to 16th May 2003. Ribeirão Preto.

- Tokala, R. K. et al (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol*, 68(5): 2161-2171.
- Torres, L. R. et al (2016). Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food Chem Toxicol*, 97: 205-216.
- Trautwein, C. et al (1996). Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterol*, 110: 1854-1862.
- Trejo-Estrada, S. R. et al (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biological control agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J Ind Microbiol Technol*, 21: 81-90.
- Tripathi, P. et al (2007). The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51(2007): 443-452.
- Turner, S. T. & Butler, G. (2014). The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(9): 1-17.
- Uyeda, M. et al (2001). Pentalenolactone I and hygromycin A, immunosuppressants produced by *Streptomyces filipinensis* and *Streptomyces hygroscopicus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65(5): 1252-1254.
- Van Wezel, G. P. & McDowall, K. J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep*, 28(7): 1311-1333.
- Vasanthabharathi, V. et al (2011). Melanin production from marine *Streptomyces*. *Afr J Biotechnol*, 10(54): 11224-11234.
- Ventura, M. et al (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(3): 495-548.
- Waksman, S. A. & Woodruff, H. B. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes. *Proc Soc Exp Biol Med*, 45(2): 609-614.
- Waksman, S. A. & Woodruff, H. B. (1942a). Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against Gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med*, 49(2), 207-210.
- Waksman, S. A. & Woodruff, H. B. (1942b). Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. *J Bacteriol*, 44(3): 373-384.
- Wang, X. et al (2018). Macrophage inducible nitric oxide synthase circulates inflammation and promotes lung carcinogenesis. *Cell Death Discov*, 4(46): 1-12.

- Wayne, P. A. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard – Third edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3*, 28(14).
- Wildermuth, H. & Hopwood, D. (1970). Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol*, 60: 51-59.
- Williams, S. T. & Cross, T. (1971). Actinomycetes (Chapter XI). *Methods Microbiol*, 4: 295-334.
- Yaminisudha, L. S. et al (2015). Isolation, screening, identification, characterization and application green synthesised silver nanoparticle from marine actinomycetes *Streptomyces althoticus*. *W J Pharm Res*, 4: 1592-1611.
- Zacchetti, B. et al (2018). Dynamics of pellet fragmentation and aggregation in liquid-grown cultures of *Streptomyces lividans*. *Front Microbiol*, 9(943): 1-10.
- Zhang, C. et al (2014). Inhibition of the interleukin-6 signaling pathway: A strategy to induce immune tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol*, 47(2): 163-173.
- Zhong, D. et al (2001). Structural revision of isovalertatins M03, M13, and M23 isolated from the culture of *Streptomyces luteogriseus*. *Carbohydr Res*, 331(1): 69-75.
- Zothanpuia, A. K. P. et al (2018). Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. *Microb Cell Fact*, 17(68): 1-14.