

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E  
ANTI-INFLAMATÓRIA DE PRODUTOS NATURAIS DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS COM ÊNFASE NO GÊNERO *Sordaria***

**SANDERSON DIAS CALIXTO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2018**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E  
ANTI-INFLAMATÓRIA DE PRODUTOS NATURAIS DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS COM ÊNFASE NO GÊNERO *Sordaria***

**SANDERSON DIAS CALIXTO**

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Elena Lassounskaia

**Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ**

**FEVEREIRO - 2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

729 / 2018

Calixto, Sanderson Dias

Estudo da atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória de produtos naturais de fungos endofíticos com ênfase no gênero *Sordaria* / Sanderson Dias Calixto. -- Campos dos Goytacazes, 2018.

xviii, 97 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e Biotecnologia. Laboratório de Biologia do Reconhecer.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Lassounskaia, Elena

Bibliografia: f. 86-95

1. Tuberculose pulmonar    2. Inflamação    3. Tratamento adjuvante  
4. Produtos naturais    5. Lasiodiplodina    I. Universidade Estadual do  
Norte Fluminense Darcy Ribeiro    II. Título

616.079

C154e

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do  
Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia, da  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob a  
orientação da Dr<sup>a</sup> Elena Lassounskaia e co-orientação  
da Dr<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano.**

**Apoio:**

- UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**“O insucesso é apenas uma oportunidade para  
recomeçar com mais inteligência.”**

**Henry Ford**

Com os olhos marejados e com uma imensa saudade, dedico esta Dissertação à minha avó Maria (*in memoriam*).

Obrigado por todo carinho e amor que me destinou, sei que está torcendo por mim onde esteja.  
TE AMO!

## Agradecimentos

Mais um ciclo chega ao fim em minha vida e mais um sonho se realiza. Não tenho palavras que possam expressar o quanto me sinto grato neste momento. Gostaria de agradecer a cada um que, de alguma forma, contribuiu para que eu chegasse até aqui. Sei que fatalmente vou esquecer alguém e desde já, peço minhas sinceras desculpas.

Agradeço a Deus, por me dar coragem para enfrentar os desafios do dia-a-dia e por ser fonte de conforto durante os momentos de alegria e tristeza.

A UENF, por me acolher durante todos esses anos, por me proporcionar grandes experiências e me transformar como pessoa.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Elena Lassounskaia, por me aceitar em seu grupo de pesquisa desde o primeiro período da graduação. Pela orientação durante o mestrado, por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento, por todo o conhecimento transmitido e por permitir que eu tivesse liberdade ao conduzir meu projeto.

A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Michelle Muzitano, pela colaboração, sugestões, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa quando eu ainda era um estudante do ensino médio, por todo o incentivo, por encorajar-me e credibilidade em mim e no meu trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Thatiana Ventura, por todo o ensinamento, conselhos, incentivo, colaboração e revisão da Dissertação. Além de uma grande parceira profissional, uma amiga e conselheira. Obrigado por suas palavras de encorajamento e pelo tempo a mim dedicado e por muitas vezes, fazer além do que estava ao seu alcance. Você foi fundamental para o meu processo de formação, além de ser fonte de inspiração. MUITO OBRIGADO!

Aos professores Dr<sup>o</sup> Willian Andrioli, Dr<sup>o</sup> Milton Kanashiro e Dr<sup>a</sup> Alba Rangel por terem aceitado participar da minha banca de defesa de Dissertação de mestrado.

Aos Professores Denise e Willian, por colaborar neste trabalho disponibilizando as amostras de fungos endofíticos e por todo o auxílio.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Eulógio de Carvalho do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA) e toda a sua equipe, pelo auxílio no processamento do material histológico.

Aos técnicos: Fernando César, Juliana Azevedo, Núbia Alencar, Rita Escocard e Verônica Lanes (Vevê) por todo o auxílio e ensinamento durante esses anos.

Ao Vinícius Mussi, por toda a ajuda, incentivo, parceria e pelas risadas que me proporciona, além de compartilhar os árduos dias de experimento. Com certeza um grande amigo que ganhei durante o mestrado.

Aos “Elenetes”: Anderson Cardozo, Andreza Resende, Efranci Ribeiro, Fabrício Almeida, Giliane de Souza (Gigi), Gislane Almeida, Igor Santiago e Letícia Rabello, por todos os momentos de alegria, aprendizado, paciência e pelas risadas. Obrigado pessoal!

Aos meus amigos de LBR: David Gitirana, Laura Maciel, Layla Hissa, Marina Silva e Paula Macêdo pelas risadas e pelos momentos vividos.

Aos meus amigos do grupo da UFRJ: Isabela Borges, Marlon Heggdorne, Maíra Marine e Maria Sandra Queiroz, pelos bons momentos vividos e pelo incentivo de sempre.

Aos meus amigos de graduação, aos quais não citarei nomes para não esquecer ninguém. Todos os momentos que passamos juntos estão guardados para sempre em minha memória e em meu coração. C.Bio2011 para sempre!

Aos meus amigos: Érica Oliveira, Thiára Chagas, Pedro Mozzer, Marta Sette, Nadiyah Pinter, Teresa Pontes, Yrexam Ribeiro e Artur Gebara, obrigado por cada momento compartilhado, por cada conselho, incentivo e força para continuar essa caminhada.

Ao Rodrigo Gebara, um grande amigo que se tornou essencial durante esses dois últimos anos. Obrigado por todo incentivo, companheirismo, conselhos e credibilidade.

A minha mãe, Adriana, por encorajar-me a seguir meus sonhos, por toda a credibilidade, amor e sacrifício feito para que eu pudesse chegar até aqui, essa vitória também é sua!

Ao meu irmão, Carlos Júnio, por ser uma criança tão especial e amorosa. Amo você!

Aos meus Tios, Juliana e Fábio, por todo o incentivo, conselhos e amor.

Ao meu padrinho, Charles, por suas palavras de conforto, incentivo e confiança.

A minha família, pela credibilidade, incentivo, apoio, amor e por entender minha ausência em festas de família, pois sempre havia um experimento para ser feito.

Ao projeto Jovens Talentos para as Ciências, por me dar a oportunidade de iniciar na área científica e fazer com que eu descobrisse que era possível chegar até aqui.

A FAPERJ, pela bolsa de mestrado concedida.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>SUMÁRIO DE TABELA</b> .....	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xv</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1. O gênero mycobacterium .....	19
1.2. Tuberculose.....	21
1.3. Resposta imune e imunopatologia da tuberculose .....	23
1.4. Tratamento da tuberculose.....	27
1.5. Tratamento adjuvante direcionado a inflamação.....	29
1.6. Produtos naturais como fonte de novos fármacos .....	30
1.7. Fungos endofíticos .....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
3.1. Objetivo geral .....	36
3.2. Objetivos específicos .....	36
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1. Obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas de fungos endofíticos .....	37
4.2. Cultivo celular e tratamento com amostras de fungos endofíticos .....	40
4.2.1. Quantificação da produção de NO .....	40
4.2.2. Avaliação da toxicidade celular em cultura de macrófagos tratada .....	41
4.2.3. Bioensaio indireto para quantificação da produção de TNF- $\alpha$ .....	42
4.2.4. Quantificação da produção de PGE <sub>2</sub> e IL-1 $\beta$ .....	42
4.2.5. Avaliação da atividade antioxidante .....	43
4.2.6. Avaliação da expressão enzimática da iNOS e COX-2.....	44
4.3. Cultivo micobacteriano .....	45
4.3.1 Ajuste da concentração micobacteriana.....	46
4.3.2. Avaliação da atividade antimicobacteriana.....	46
4.3.3. Infecção de cultura de macrófagos e quantificação do crescimento micobacteriano intracelular.....	47
4.4. Infecção experimental dos camundongos e tratamento com a lasiodiplodina .....	47
4.4.1. Tratamentos e grupos experimentais .....	49
4.4.2. Obtenção de células pulmonares e dos bacilos .....	49
4.4.3. Análise macroscópica e histopatológica do pulmão .....	50

4.4.4. Método de coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E).....	51
4.4.5. Método de Ziehl-Neelsen .....	51
4.4.6. Análise morfométrica do tecido pulmonar .....	52
4.5. Análise estatística .....	52
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1. Avaliação do extrato, frações e da substância isolada de fungos endofíticos, quanto à capacidade de inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ , citotoxicidade e inibição do crescimento de Mbv BCG e Mtb H37Rv.....	53
5.2. Avaliação das amostras mais ativas quanto à inibição do crescimento do isolado clínico <i>M. tuberculosis</i> M299.....	58
5.3. Avaliação de Tb1, Tb1A e lasiodiplodina obtidos do fungo <i>Sordaria</i> sp. na inibição do crescimento de cepas <i>M. kansasii</i> .....	59
5.4. Avaliação das amostras mais ativas quanto à inibição do crescimento micobacteriano intracelular em cultura de macrófagos RAW 2647 infectados por Mbv BCG, Mtb H37Rv e M299. ....	61
5.5. Avaliação das amostras mais ativas quanto a inibição da produção dos mediadores inflamatórios IL-1 $\beta$ e PGE <sub>2</sub> em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS .....	63
5.6. Avaliação da atividade antioxidante do extrato Tb1, da fração Tb1A e da substância isolada através do método do SNP .....	66
5.7. Avaliação das amostras selecionadas na modulação da expressão enzimática da iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS .....	67
5.8. Avaliação do efeito terapêutico da lasiodiplodina no modelo murino C57BL/6 infectado por cepa hipervirulenta <i>M. tuberculosis</i> M299 .....	69
5.8.1. Efeito da lasiodiplodina na patologia dos pulmões de camundongos infectados .....	70
5.8.2. Análise fenotípica das células inflamatórias nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com lasiodiplodina.....	73
5.8.3. Análise do perfil de citocinas produzidas <i>ex vivo</i> pelas células dos pulmões de animais tratados com lasiodiplodina.....	73
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>97</b>

## SUMÁRIO DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana.....	20
<b>Figura 2:</b> Taxa de incidência de TB no mundo em 2016 .....	21
<b>Figura 3:</b> Sequência de eventos da infecção por <i>M. tuberculosis</i> e a progressão da doença.....	24
<b>Figura 4:</b> Resumo da resposta imune inata e adaptativa na tuberculose.....	25
<b>Figura 5:</b> Estrutura do granuloma na TB. ....	26
<b>Figura 6:</b> Estrutura química dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento convencional da tuberculose.....	27
<b>Figura 7:</b> Estrutura química dos fármacos de segunda e terceira linha utilizados no tratamento da tuberculose.....	28
<b>Figura 8:</b> Novas substâncias avaliadas pela OMS para o tratamento da MDR-TB.....	29
<b>Figura 9:</b> Estrutura química de substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos .....	33
<b>Figura 10:</b> Estrutura química da lasiodiplodina.....	38
<b>Figura 11:</b> Estrutura química do inibidor padrão de iNOS (L-NMMA).....	41
<b>Figura 12:</b> Estrutura química da indometacina. ....	43
<b>Figura 13:</b> Estrutura química do nitroprussiato de sódio e do flavonoide rutina ...	44
<b>Figura 14:</b> Efeito das amostras de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais <i>A. tomentosa</i> , <i>O. notata</i> e <i>T. bullata</i> no crescimento do isolado clínico Mtb M299.. ..	58
<b>Figura 15:</b> Avaliação da capacidade inibitória do extrato TB1, da fração TB1A e lasiodiplodina do fungo <i>Sordaria</i> sp. no crescimento das cepas de <i>M. kansasii</i> . ..	61
<b>Figura 16:</b> Efeito do extrato, fração em acetato de etila e lasiodiplodina obtidos do fungo <i>Sordaria</i> sp. isolado de <i>T. bullata</i> em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados por diferentes cepas de <i>Mycobacterium</i> . ....	63
<b>Figura 17:</b> Efeito do extrato, fração e lasiodiplodina oriundos do fungo endofítico <i>Sordaria</i> sp. na produção dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 $\beta$ e PGE <sub>2</sub> por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. ....	65
<b>Figura 18:</b> Efeito do extrato, fração Tb1A e lasiodiplodina obtido do fungo endofítico <i>Sordaria</i> sp. isolado da espécie vegetal <i>T. bullata</i> no sequestro do radical livre NO. ....	67
<b>Figura 19:</b> Efeito do extrato Tb1, fração Tb1A e lasiodiplodina obtidos do fungo endofítico <i>Sordaria</i> sp. isolado das espécies vegetal <i>T. bullata</i> sobre a expressão enzimática da iNOS e COX-2 de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS..	69
<b>Figura 20:</b> Efeito do tratamento com a lasiodiplodina no crescimento micobacteriano nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados por cepa Mtb hipervirulenta.....	70
<b>Figura 21:</b> Efeito do tratamento com a lasiodiplodina na macropatologia pulmonar induzida nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa <i>Mtb</i> hipervirulenta.....	71

<b>Figura 22:</b> Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados com cepa Mtb hipervirulenta e tratados com a lasiodiplodina.....	72
<b>Figura 23:</b> Análise morfométrica da área de pneumonia nos pulmões dos animais infectados sobre efeito do tratamento com a lasiodiplodina.....	73
<b>Figura 24:</b> Dot plots representativos da imunofenotipagem da amostra de células mieloides obtidas do pulmão do animal infectado através da citometria de fluxo.	74
<b>Figura 25:</b> Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar dos animais infectados pela cepa Mtb hipervirulenta sob efeito de tratamento com lasiodiplodina. ....	75
<b>Figura 26:</b> Produção de citocinas pelas células pulmonares dos animais infectados com cepa Mtb hipervirulenta e tratados com a lasiodiplodina. ....	76

## SUMÁRIO DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Identificação das amostras de fungos endofíticos avaliados.....	39
<b>Tabela 2</b> - Efeito inibitório das amostras de fungos endofíticos na produção de NO e TNF- $\alpha$ em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, no crescimento de <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv em cultura e avaliação da citotoxicidade celular pelo método de MTT.....	57
<b>Tabela 3</b> - Concentração inibitória mínima (50% e 90%) apresentada pelas amostras de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais <i>A. tomentosa</i> , <i>O. notata</i> e <i>T. bullata</i> na inibição do crescimento micobacteriano de Mtb M299.....	59
<b>Tabela 4</b> - Concentração inibitória mínima (50% e 90%) apresentada pelo extrato Tb1, fração Tb1A e lasiodiplodina obtidos do fungo endofítico <i>Sordaria</i> sp. isolado de <i>T. bullata</i> na inibição do crescimento micobacteriano de cepas de <i>M. kansasii</i> . .....	60
<b>Tabela 5</b> - Concentração inibitória mínima (50%) apresentada pelo extrato, fração e Lasiodiplodina do fungo endofítico isolado da <i>Tocoyena bullata</i> na inibição do crescimento micobacteriano em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados por <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e M299. ....	63
<b>Tabela 6</b> - Concentração inibitória mínima (50%) apresentada pelo extrato, fração e Lasiodiplodina do fungo endofítico isolado da <i>Tocoyena bullata</i> na inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 $\beta$ e PGE <sub>2</sub> ) em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. ....	65
<b>Tabela 7</b> - Concentração inibitória mínima (50%) apresentada pelo extrato, fração Tb1A e lasiodiplodina fungo endofítico isolado da espécie vegetal <i>T. bullata</i> no sequestro dos radicais livres avaliados pelo método do SNP. ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADC** – Albumina, dextrose, catalase
- **AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- **AINE** - Anti-inflamatório não esteroide
- **APC** – Células apresentadoras de antígeno
- **AT** - *Anemia tomentosa*
- **ATCC** – American Type Culture Collection
- **BAAR** – Bacilo álcool-ácido resistente
- **BCG** – Bacille Calmette-Guérin
- **BDA** - batata dextrose Agar
- **BSA** - Albumina sérica bovina
- **CBA** - Cytometric Bead Array
- **CFU** – Unidade formadora de colônia
- **COX-2** – Ciclooxygenase-2
- **CTL** – Controle
- **D.O.** – Densidade óptica
- **DAB** - Diaminobenzidina
- **DMEM-F12** – Meio Eagle em modificação do Dulbecco com suplemento F12  
*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DMF** – Dimetilformamida
- **DMSO** - Dimetilsulfóxido
- **ELISA** - Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
- **H&E** - hematoxilina-eosina
- **HCL** - ácido clorídrico
- **HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- **i.p.** - Intraperitoneal
- **i.t.** - Intratraqueal
- **IC50** – Concentração inibitória necessária para metade da atividade máxima.
- **IFN- $\gamma$**  – Interferon-gama
- **Ig** - Imunoglobulina
- **IL** – Interleucina
- **INF- $\gamma$**  - Interferon gama
- **INH** – Isoniazida
- **iNOS** – Óxido nítrico sintase induzida
- **kDa** - Quilodalton
- **L-MMA** - N<sup>G</sup>-acetato de monometil-L-arginina
- **Lox** - Lipo-oxigenase
- **LPS** – Lipopolissacarídeo
- **Mbv** – *Mycobacterium bovis*
- **MDR-TB** - Tuberculose multidroga-resistente
- **MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade
- **MIC** - Concentração mínima inibitória
- **Mkan** - *Mycobacterium kansasii*
- **MNT** - Micobactérias não tuberculosas
- **MØ** – Macrófagos
- **MOI** - Multiplicidade da infecção
- **Mtb** - *Mycobacterium tuberculosis*
- **MTBC** - complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- **MTT** – 3-(4, 5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol – sal de tetrazol
- **NAD** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- **NF- $\kappa$ B** - Fator nuclear kappa B

- **NK** – Células *natural killer*
- **NO** – Óxido nítrico
- **OADC** - Ácido oléico, albumina, dextrose, catalase
- **OMS** – Organização Mundial de Saúde
- **ON** - *Ocotea notata*
- **PAS** – Ácido *para*-aminosalicílico
- **PBS** - Salina tamponada fosfatada
- **PBST** - Salina fosfatada tamponada acrescida de Tween 20
- **PDB** - Salina fosfatada tamponada
- **PGE<sub>2</sub>** - Prostaglandina E<sub>2</sub>
- **PGL** – Peptidoglicano
- **PZA** – Pirazinamida
- **RIF** – Rifampicina
- **RLN** - Radicais livres de nitrogênio
- **RLO** – Radicais livres de oxigênio
- **ROS** – Espécies reativas de oxigênio
- **RPMI** – Meio Roswell Park Memorial Institute
- **SDS** – Dodecilsulfato de sódio
- **SFB** – Soro fetal bovino
- **SNP** – Nitroprussiato de sódio
- **spp** – Espécies
- **SS** - *Stachytarpheta schottiana*
- **Tb** – *Tocoyena bullata*
- **TB** – Tuberculose
- **TDM** - Trealose dimicolato
- **T<sub>H</sub>** – Células T Helper
- **TLR** – Receptor Toll-like
- **TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa
- **XDR-Tb** – Tuberculose extensivamente resistente
- **ZN** - Ziehl-Neelsen

## RESUMO

A tuberculose (TB) permanece como uma grave ameaça para saúde pública em todo o mundo. A longa duração do tratamento e o aparecimento de cepas resistentes aos medicamentos incentivam a busca por novos fármacos anti-TB. Nos casos clínicos severos da doença associados à inflamação exacerbada, a terapia adjuvante pode proporcionar a prevenção dos danos teciduais e aumento da capacidade do organismo na eliminação ou contenção do bacilo. Neste contexto, novas substâncias que possuam propriedades *dual*, antimicobacterianas e anti-inflamatórias, representam uma potencial ferramenta terapêutica. Os produtos naturais são uma importante fonte para obtenção de novos compostos, dentre eles os fungos endofíticos são reconhecidos como produtores de metabólitos secundários com importantes atividades biológicas. Neste estudo, 51 amostras de fungos endofíticos obtidas de quatro espécies vegetais (*A. tomentosa*, *O. notata*, *S. schottiana* e *T. bullata*) foram avaliados quanto a ação anti-inflamatória e citotoxicidade em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e quanto a capacidade de inibir o crescimento das cepas *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv e M299. O extrato bruto (Tb1), a fração em acetato de etila (Tb1A) e a substância isolada desta fração (lasiodiplodina), oriundas do fungo endofítico *Sordaria* sp, obtido de *Tocoyena bullata*, foram selecionados para testes mais aprofundados. Estas amostras foram capazes de inibir a produção de NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , destacando-se a lasiodiplodina na inibição da produção de TNF- $\alpha$ . Também foi observado que estas amostras foram capazes de inibir o crescimento de micobactérias tuberculosas e não tuberculosas *in vitro*, e de inibir o crescimento intracelular em cultura de macrófagos infectados por Mtb. A lasiodiplodina mostrou efeito terapêutico no tratamento da TB pulmonar severa, induzida em camundongos C57Bl/6 por cepa Mtb hipervirulenta, apresentando redução da patologia pulmonar, do influxo de leucócitos e da produção de citocinas pró-inflamatórias. As amostras Tb1, Tb1A e a lasiodiplodina apresentaram atividade *dual* e são promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da TB pulmonar severa.

**Palavra-chave:** tuberculose pulmonar, Inflamação, tratamento adjuvante e lasiodiplodina.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a serious threat to public health worldwide. The long duration of therapy and emergence of *M. tuberculosis* (Mtb) strains resistant to multiple drugs encourages the search for new anti-TB drugs. Severe TB cases associated with exacerbated inflammation require additional anti-inflammatory adjuvant therapy to prevent tissue damage and increase the ability of organism to eliminate or contain the Mtb. In this context, new substances that combine dual properties, antimycobacterial and anti-inflammatory, represent a potential therapeutic tool. Natural products are an important source for obtaining new drugs, among them the endophytic fungi are recognized as producers of bioactive secondary metabolites. In this study, 51 samples of endophytic fungi obtained from four plant species (*A. tomentosa*, *O. notata*, *S. schottiana* and *T. bullata*) were evaluated for anti-inflammatory activity and cytotoxicity in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages culture as well as ability to inhibit the growth of *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* (H37Rv and M299). Crude extract (Tb1), fraction in ethyl acetate (Tb1A) and the isolated substance of this fraction, lasiodiplodin, from endophytic fungus *Sordaria* spp culture isolated from *T. bullata* were selected for additional tests. These samples inhibited the NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production, highlighting lasiodiplodine in the inhibition of TNF- $\alpha$  production. It was also observed that these samples were able to inhibit the growth of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria *in vitro* and intracellular growth in infected macrophages. Lasiodiplodine showed therapeutic effect in C57BL/6 mice infected with hypervirulent Mtb strain. The treatment with lasiodiplodine led to reduction of pulmonary pathology, leukocyte influx and proinflammatory cytokine production. Tb1, Tb1A and lasiodiplodine showed dual activity and are promising for the development of new drugs for the treatment of severe pulmonary TB.

**Key words:** pulmonary tuberculosis, inflammation, adjuvant treatment and lasiodiplodin.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O gênero *Mycobacterium*

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, que compreende mais de 160 espécies/subespécies de bactérias, contendo espécies patogênicas ao homem e animais, potencialmente patogênicas (*M. kansasii*, *M. abscessus* e *M. avium*) ou raramente patogênicas (*M. smegmatis* e *M. goodii*). Algumas espécies se destacam por serem patógenos de importância clínica, grupo onde se inclui *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. ulcerans*, os quais são agentes causadores da tuberculose humana, hanseníase e úlceras de Buruli, respectivamente (TORTOLI, 2006; ORGEUR e BROSCH, 2017).

O gênero *Mycobacterium* é constituído por micobactérias tuberculosas, pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (MTBC) e por micobactérias não tuberculosas (MNT) (JOHNSON e ODELL, 2014).

MTBC compreende as micobactérias causadoras da tuberculose, sendo elas: *M. tuberculosis* (Mtb), *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canetti*, *M. orygis* e *M. pinnipedii*. Estas espécies possuem diferentes padrões de tropismo por hospedeiro, virulência, patogenicidade e resistência a fármacos, (COSMA *et al.*, 2003, TORTOLI, 2006).

O principal agente etiológico da tuberculose (TB) humana é o *M. tuberculosis*, um bacilo intracelular facultativo, em forma de bastonete, não encapsulado, imóvel, sem flagelos e esporos.

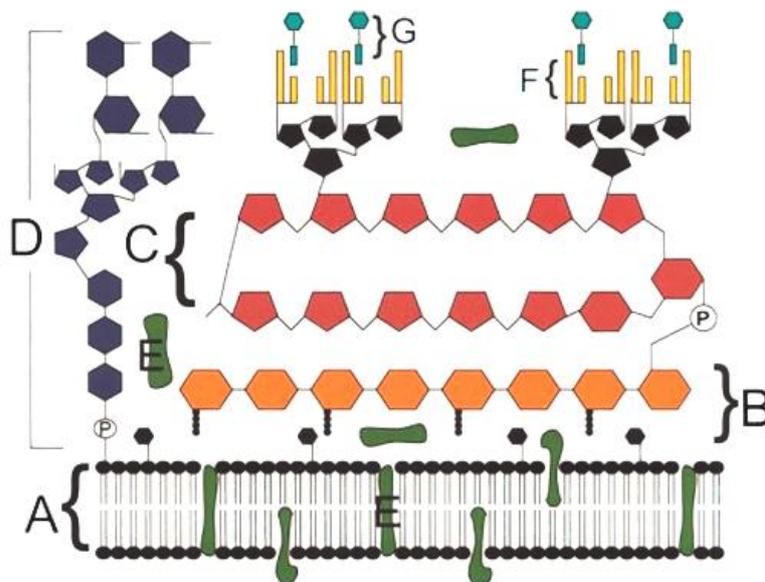
Outras espécies de micobactérias podem induzir um quadro clínico semelhante a TB, como *M. kansasii* (Mkan), a segunda MNT mais comum e potencialmente patogênica, e responsável por grande parte das infecções por MNT na população humana (JOHNSON e ODELL, 2014).

Em geral, as micobactérias apresentam tamanho entre 1 a 10 micrômetros de comprimento e 0,2 a 0,6 micrômetros de largura. É um patógeno aeróbico obrigatório dividindo-se a cada 12 e 16 horas, o que explica o fator do desenvolvimento da doença crônica (MURRAY *et al.*, 2010; ORME, 2014).

A estrutura da parede celular (**Figura 1**) consiste de uma membrana interna recoberta por uma camada espessa de peptidoglicanos (PGL) covalentemente ligado a moléculas de ácidos micólicos, que por sua vez estão

associados à arabinogalactanos, recoberto por lipídios livres, glicolipídios, polipeptídeos e lipoproteínas (MURRAY *et al.*, 2010). Os ácidos micólicos são os principais lipídios presentes na parede celular micobacteriana e encontrados em diferentes espécies de micobactérias. A proporção e o tipo de ácidos micólicos afetam a patogenicidade e a virulência, sendo alvo de vários fármacos (GROENEWALD *et al.*, 2013). O glicolípido micobacteriano trealose-dimicolato (TDM) é um importante fator de virulência fundamental na patogênese e na persistência de lesões crônicas e granulomatosas, e, portanto, o representante mais estudado desta classe (KARAKOUSIS *et al.*, 2004).

A composição da parede celular confere características importantes ao gênero, como: hidrofobicidade, antigenicidade, crescimento lento, resistência a, detergentes e antibióticos utilizados na terapia. Em virtude da complexa composição lipídica (50% do peso seco), os bacilos são resistentes à descoloração com solução álcool-ácida após coloração com fucsina fenicada, por isso a denominação de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (MURRAY *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012).

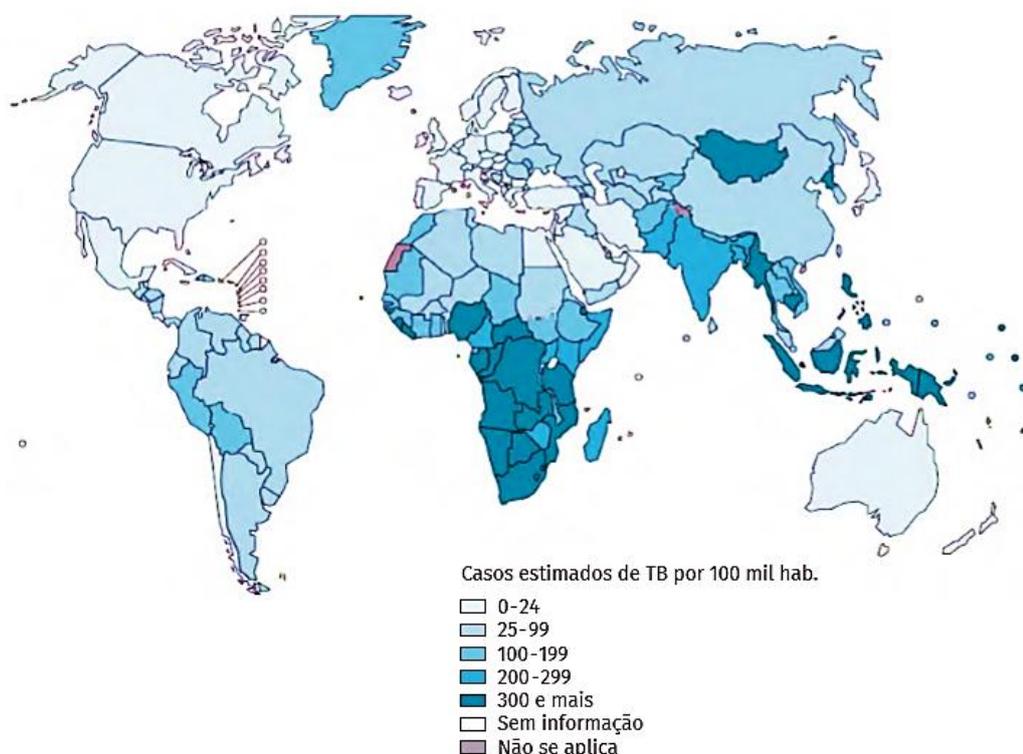


**Figura 1-** Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana. As letras representam (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicanos, (C) arabinogalactanos, (D) lipoarabinomananas manosiladas, (E) proteínas associadas à membrana plasmática e a parede celular, (F) ácidos micólicos e (G) moléculas de glicolipídios associados aos ácidos micólicos (Adaptado de KARAKOUSIS *et al.*, 2004).

## 1.2. Tuberculose

A tuberculose é uma das doenças mais antigas da história afetando a população desde a Antiguidade. Ainda em registros arqueológicos já foi demonstrada a presença da doença entre diversos povos (CAMPOS e PIANTA *et al.*, 2001). Os sinais clínicos da TB, responsáveis por alterações ósseas características, como deformidades tuberculosas, lesões erosivas e colapso das vértebras (doença de Pott) foram primariamente identificadas em múmias egípcias (CHAN *et al.*, 2013).

Existe um consenso de que o fluxo migratório europeu em virtude das expedições marítimas de colonização possibilitou a disseminação da doença no continente americano e a transmissão da TB levou a morte de milhares de indígenas. No Brasil, a disseminação da TB tem sido atribuída à vinda dos colonizadores jesuítas, que ao migrarem portando a doença, transmitiam-na aos índios através do convívio com os nativos (CAMPOS e PIANTA *et al.*, 2001).



**Figura 2** - Taxa de incidência de TB no mundo em 2016. Casos estimados de TB por 100 mil habitantes (Adaptado de WHO, 2017).

A TB é uma das doenças infecciosas com maior taxa de mortalidade no mundo (**Figura 2**). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada por *Mtb*. Ao longo da vida somente 10% destes indivíduos desenvolvem a doença, enquanto a contenção da infecção em estágio latente com lenta progressão ocorre em 90% das pessoas infectadas o que representa um amplo reservatório para novos casos de TB ativa (OTTENHOFF e KAUFMANN, 2012).

Em 2016, foram notificados 10,4 milhões de casos de TB, sendo destes, 1,1 milhão de indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2017). A maioria dos casos de co-infecção entre TB e HIV se concentra nos países africanos. Estima-se que em 2016, cerca de 1,4 milhão de mortes por TB ocorreram entre indivíduos HIV-negativo e 0,4 milhão de mortes em pacientes HIV-positivo, totalizando aproximadamente 1,8 milhão de óbitos (WHO, 2017).

No Brasil, foram notificados 84 mil novos casos da doença em 2015 e 7,7 mil óbitos em decorrência da mesma (WHO, 2017). O Estado do Rio de Janeiro (RJ) possui a maior taxa de incidência de TB dentre os Estados da Região Sudeste, o que pode ser explicado, em parte, pela elevada proporção da população residindo em áreas urbanas (mais de 96%, segundo o Censo IBGE de 2010) e alta densidade demográfica (368 habitantes/Km<sup>2</sup>) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Vários fatores influenciam o aumento do número de casos de TB, destacando-se o aparecimento de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento e o aumento dos casos de co-infecção com o HIV. Acrescentam-se a estes, a desnutrição, o tabagismo, o consumo excessivo de álcool, diabetes, poluição do ar, flutuação populacional e a baixa condição socioeconômica (KUMAR *et al.*, 2011; KOUL *et al.*, 2011).

A ausência ou tratamento inadequado associado a uma diminuta supervisão durante o período de terapia conduz ao aumento na prevalência de cepas *Mtb* resistentes a múltiplos fármacos (MDR-TB) ou extensivamente resistentes a estes (XDR-TB). O tratamento dos casos de TB resistente possui baixa taxa de sucesso, além de elevarem a duração do tratamento e apresentarem inúmeros efeitos adversos (WHO, 2017).

Em adição ao aumento do número de casos de TB, também foi observado crescente prevalência de doenças pulmonares causadas por MNT em várias partes do mundo (PREVOTS *et al.*, 2010). Nos países em desenvolvimento, os casos de infecções provocadas por MNT são subestimados, devido à baixa

realização da rotina de cultivo das espécies a partir de amostras suspeitas e a dificuldade de obtenção do diagnóstico diferencial da TB. No Estado do Rio de Janeiro, cerca de 60% dos pacientes identificados com infecção pulmonar por MNT foram inicialmente diagnosticados e tratados de forma empírica para TB (MELLO *et al.*, 2013).

A OMS destaca a importância da terapia adequada e de qualidade para a TB sensível ao tratamento padrão pré-estabelecido, além de ferramentas de diagnóstico ideais, como a melhor forma de prevenção contra o surgimento e propagação de cepas resistentes de *Mycobacterium*. Ademais, a busca por novos fármacos mais efetivos e de menor toxicidade têm sido amplamente incentivado.

### **1.3. Resposta imune e imunopatologia da tuberculose**

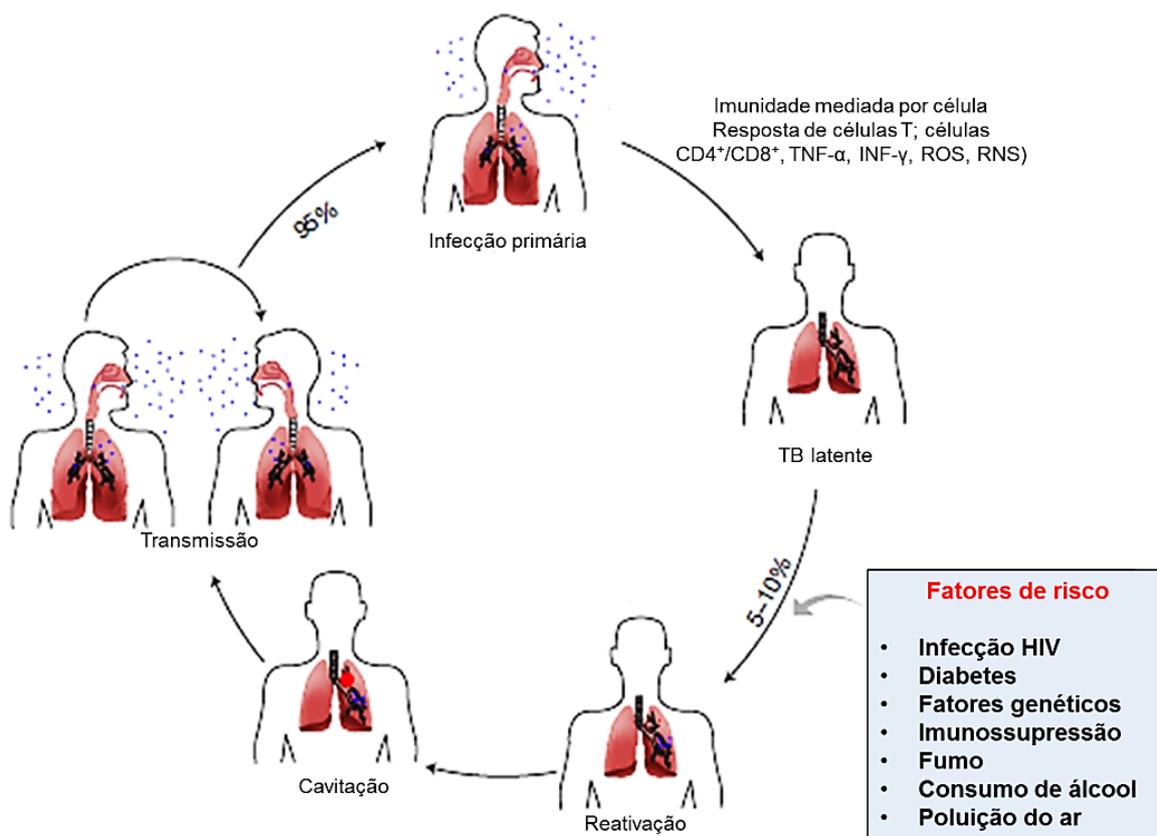
*M. tuberculosis* é transmitido através da liberação de aerossol contendo partículas infecciosas, proveniente da tosse de indivíduos acometidos pela doença pulmonar ativa e posterior inalação das gotículas de aerossol contendo o bacilo por indivíduos saudáveis (ARRANZ-TRULLÉN *et al.*, 2017). O desenvolvimento da doença está associado ao tempo de duração e intensidade da exposição (ORME, 2011).

Os indivíduos expostos ao Mtb podem manifestar diferentes características da doença, podendo ocorrer um espectro de manifestações clínicas com diferença no tipo, extensão da patologia desenvolvida no pulmão e intensidade da progressão da doença (LOPEZ *et al.*, 2003).

Diferentemente da TB, a via de transmissão da MNT, Mkan, não é bem definida, contudo pode ser ingerida ou inalada e a transmissão entre humanos é incomum (RICKETTS *et al.*, 2014). Após a infecção pulmonar por Mkan, o desenvolvimento da doença é lento e pode desencadear sinais clínicos semelhantes aos da TB, incluindo febre, dor no peito, tosse, suores noturnos e perda de peso, nos estágios mais avançados e severos da doença (MATVEYCHUK *et al.*, 2012).

Após inalação, *M. tuberculosis* pode ser eliminado pelas células imunes; entrar em fase de latência havendo controle do crescimento bacilar pelas células inflamatórias recrutadas através da formação do granuloma ou pode ocorrer a multiplicação bacilar evoluindo para uma doença ativa, o que está relacionado à

virulência da cepa infectante, fatores genéticos do hospedeiro entre outros (Figura 3) (SUBBIAN *et al.*, 2011; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2017).



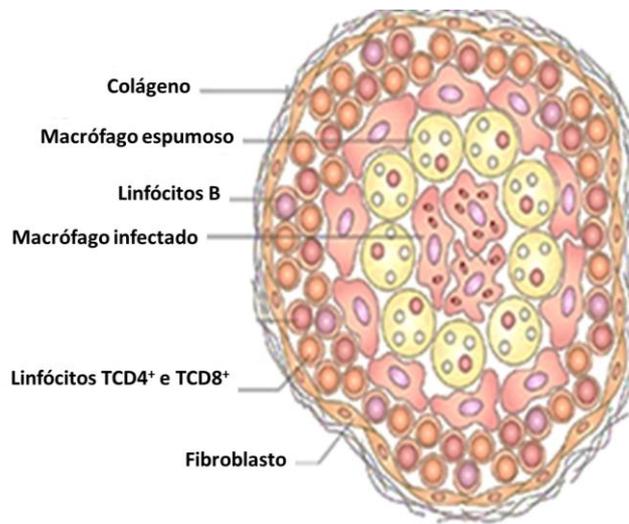
**Figura 3-** Sequência de eventos da infecção por *M. tuberculosis* e a progressão da doença (Adaptado de KUMAR *et al.*, 2011).

A resposta imunológica inata se inicia com os macrófagos alveolares e do parênquima pulmonar fagocitando as micobactérias inaladas, o que ocasiona o recrutamento adicional de outras células inflamatórias, tais como monócitos, células dendríticas, neutrófilos, que se tornam células permissíveis para propagação bacilar. Entretanto, *Mtb* possui mecanismo de evasão à maturação e fusão fagolisossomal (BEHAR *et al.*, 2011).

A ativação celular induz a produção de diversas citocinas (TNF-α, IL-12, IL-1), quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico - NO) (THAISS e KAUFMANN, 2010).

As células dendríticas são responsáveis pela apresentação dos antígenos micobacterianos às células T *naive* do linfonodo torácico e sua ativação celular tornando estas células efetoras (KRUTZIK e MODLIN, 2004).





**Figura 5-** Estrutura do granuloma na TB. O recrutamento de macrófagos ativados, outros leucócitos e células T e B para o pulmão, conduz a formação do granuloma. Eventualmente, a progressão da doença pode ocorrer e possibilitar a liberação do bacilo a partir do centro necrótico para espaços aéreos intactos possibilitando a transmissão (Adaptado de KAUFMANN *et al.*, 2010).

Em geral, a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como o  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{NO}$ , pelos macrófagos infectados é essencial para a proteção contra micobactérias. No entanto, durante o curso da doença pulmonar ativa em casos clínicos severos da TB, a produção excessiva dos fatores pró-inflamatórios desempenham uma função deletéria, contribuindo para o agravamento da patologia (GARLANDA *et al.*, 2007).

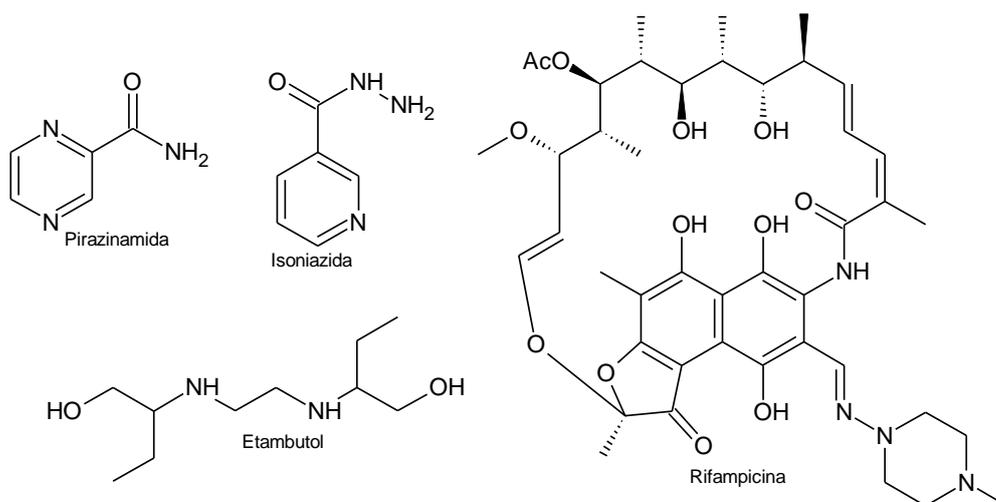
Cepas micobacterianas virulentas induzem morte por necrose dos macrófagos infectados permitindo a disseminação da bactéria e infecção de novas células permissíveis. A necrose amplia as áreas de lesão pulmonar e a destruição de brônquios e vasos (GARLANDA *et al.*, 2007; LYADOVA *et al.*, 2010). Além disso, o acúmulo de neutrófilos no foco inflamatório decorrente da morte necrótica das células infectadas favorece a disseminação bacteriana, uma vez que são células permissíveis e de vida curta, além de liberarem uma gama de produtos microbicidas e citotóxicos que contribuem para a patologia pulmonar, desenvolvimento de áreas de necrose e formação de cavernas conduzindo a danos permanentes no pulmão e incapacidade funcional em longo prazo (GROMMES e SOEHNLEIN, 2011).

Neste contexto, têm sido proposto a utilização de um tratamento anti-inflamatório adjuvante associado à terapia anti-TB padrão para reduzir o quadro

inflamatório deletério desenvolvido em indivíduos hiper-reativos (ZUMLA *et al.*, 2015) .

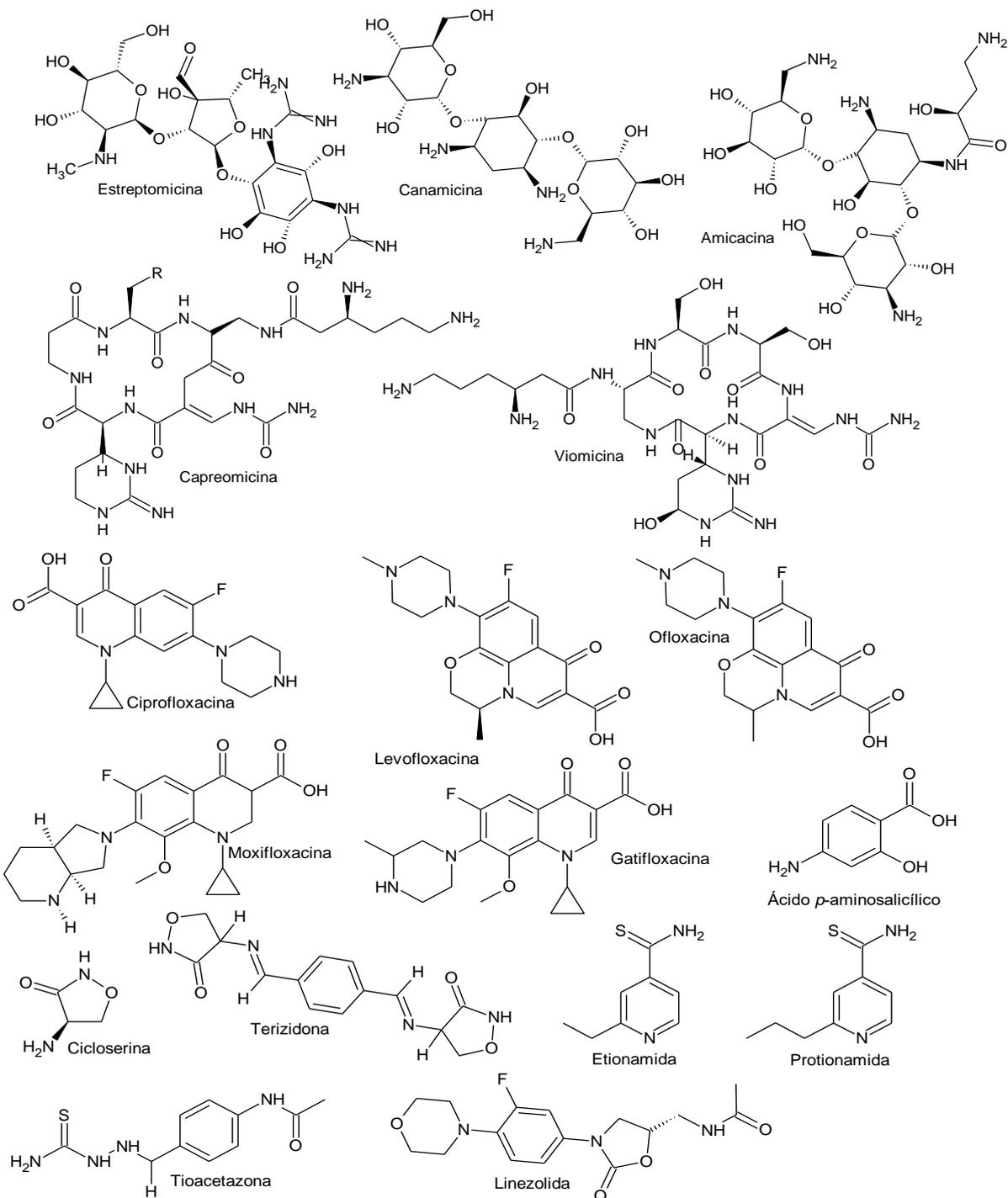
#### 1.4. Tratamento da tuberculose

O tratamento da TB foi estabelecido pela OMS e baseia-se na utilização dos fármacos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (**Figura 6**) por 2 meses, seguidos por mais 4 meses de tratamento com isoniazida e rifampicina, tendo uma taxa de cura de 83% dos pacientes (ALMATAR *et al.*, 2017).



**Figura 6** - Estrutura química dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento convencional da tuberculose.

Nos casos de MDR-TB, resistência a isoniazida e a rifampicina, e XDR-TB (resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e pelo menos um medicamento injetável de segunda linha), a taxa de cura é muito baixa, e exige a utilização de fármacos de segunda e terceira linha, tais como: Canamicina, Amicacina, Ciprofloxacina e Levofloxacina (**Figura 7**), que são geralmente injetáveis, mais caros e com maiores efeitos adversos (WHO, 2017).



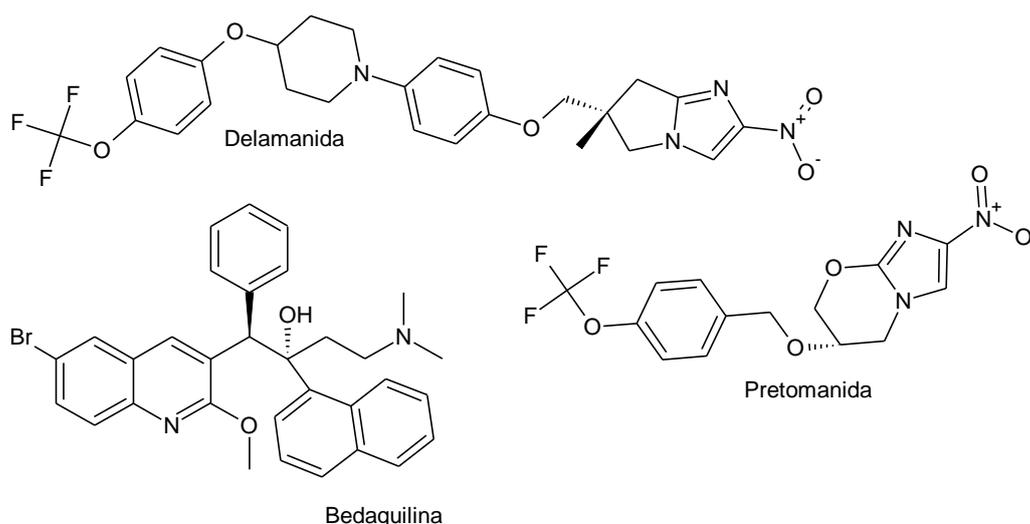
**Figura 7** - Estrutura química dos fármacos de segunda e terceira linha utilizados no tratamento da tuberculose.

É de suma importância se buscar novos fármacos anti-TB mais potentes para evitar o surgimento de novos casos de TB e de cepas resistentes à terapia padrão. Deve-se considerar, no entanto, a avaliação da eficácia da substância nos diferentes estados fisiológicos e de replicação de *M. tuberculosis*, substâncias mais eficazes que possibilitem a diminuição do período de tratamento

favorecendo a conclusão da terapia, redução dos efeitos adversos, do risco de resistência e o custo (ORME, 2011).

Nos últimos 10 anos, diversas organizações de saúde e científicas têm incentivado o estudo e desenvolvimento de fármacos promissores para o tratamento da TB resistente. Em 2014, a OMS implementou o uso da bedaquilina e delamanida (**Figura 8**) como parte do tratamento para MDR-TB quando as demais alternativas não forem eficazes e disponíveis. Atualmente, a pretomanida (**Figura 8**) encontra-se em desenvolvimento clínico de Fase III e outros fármacos já utilizados na clínica terapêutica têm sido reavaliados quanto a novas doses de utilização e novas combinações de tratamento (WHO, 2017).

A busca por novas substâncias com propriedades *dual*, anti-inflamatória e antimicobacteriana, constitui uma nova estratégia terapêutica para os casos severos da TB pulmonar relacionados a resposta inflamatória deletéria (VENTURA *et al.*, 2015b).



**Figura 8** - Novas substâncias avaliadas pela OMS para o tratamento da MDR-TB.

### 1.5. Tratamento adjuvante direcionado a inflamação

A terapia adjuvante consiste na utilização de imunomoduladores, de forma complementar ao tratamento anti-TB com antibióticos, com objetivo de atuar na redução da resposta inflamatória excessiva, reparação ou prevenção dos danos teciduais necróticos e aumento da capacidade do organismo na eliminação ou contenção do Mtb hiper-reativos. Diferentes abordagens de terapia adjuvante ao

tratamento da TB resistente têm sido incentivados, destacando-se principalmente o uso de anti-inflamatórios (HAWN *et al.*, 2013; ZUMLA *et al.*, 2015).

O tratamento anti-inflamatório adjuvante direcionado a casos severos de TB extrapulmonar já tem sido explorado na clínica terapêutica, com a utilização de glicocorticoides, tais como: dexametasona e prednisolona, em associação a terapia anti-TB padrão nos casos de meningite e pericardite tuberculosa (BUONSENSO *et al.*, 2010 e PRASAD e SINGH, 2008). Contudo, a utilização desta abordagem necessita de estudos adicionais para os casos de TB pulmonar (ZUMLA *et al.*, 2014).

Além dos glicocorticoides, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm sido avaliados no tratamento adjuvante anti-TB em modelos murinos, uma vez que os efeitos adversos dos glicocorticoides limitem severamente seu uso embora os AINEs também os apresentem.

Novas substâncias que possuam a combinação de propriedades antimicobacteriana e anti-inflamatória podem proporcionar uma vantagem importante no seu uso contra a TB pulmonar severa.

## **1.6. Produtos naturais como fonte de novos fármacos**

Os primeiros relatos sobre o uso de produtos naturais com finalidade terapêutica datam aproximadamente 2600 a.C, com a utilização de plantas para o tratamento de enfermidades. Nos dias atuais, cerca de 80% da população de países em desenvolvimento utiliza de plantas medicinais na atenção primária à saúde (SOFOWORA *et al.*, 2013) e os estudos químicos, farmacológicos e clínicos dos medicamentos populares são derivados principalmente de plantas, formando uma ampla base de medicamentos desta origem (CHAPLA *et al.*, 2012).

No Brasil, entre os anos de 2013 e 2015, foi registrado um aumento de 161% na busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A partir do Plano Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, o Ministério da Saúde têm investido desde 2012, mais de R\$ 30 milhões em 78 projetos com plantas medicinais e fitoterápicos no âmbito do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os produtos naturais desempenham um papel fundamental na busca de novas substâncias e no desenvolvimento desta área interdisciplinar, sendo as

substâncias de origem natural responsáveis por 34,4% dos medicamentos aprovados para tratamento de infecções (NEWMAN e GRAGG, 2016).

Na última década, a pesquisa científica tem voltado à atenção para outras fontes de produtos naturais além das plantas, avançando os estudos para fontes até então pouco investigadas, como micro-organismos marinhos e endofíticos, representando um grande avanço na área dos antibióticos, imunossupressores e medicamentos antineoplásicos (RAJAMANIKYAM *et al.*, 2017).

Os micro-organismos desempenham um papel importante como fonte de moléculas bioativas que podem ser utilizadas na clínica terapêutica, e destes, os micro-organismos endofíticos apresentam uma enorme diversidade e adaptação especializada tornando-se uma área excitante de estudo na busca de novos medicamentos e substâncias (PADHI *et al.*, 2013).

### **1.7. Fungos endofíticos**

Os fungos endofíticos são micro-organismos em forma de micélio, que residem nos tecidos vegetais de plantas, com associação simbiótica, sob as camadas de células da epiderme sem causar sintomas ou danos aparentes para o hospedeiro. Esta definição inclui praticamente todo o espectro de interações simbióticas que ocorrem entre os fungos e as plantas: comensalismo, mutualismo e raramente parasitismo (DHANYA e PADMAVATHY, 2014).

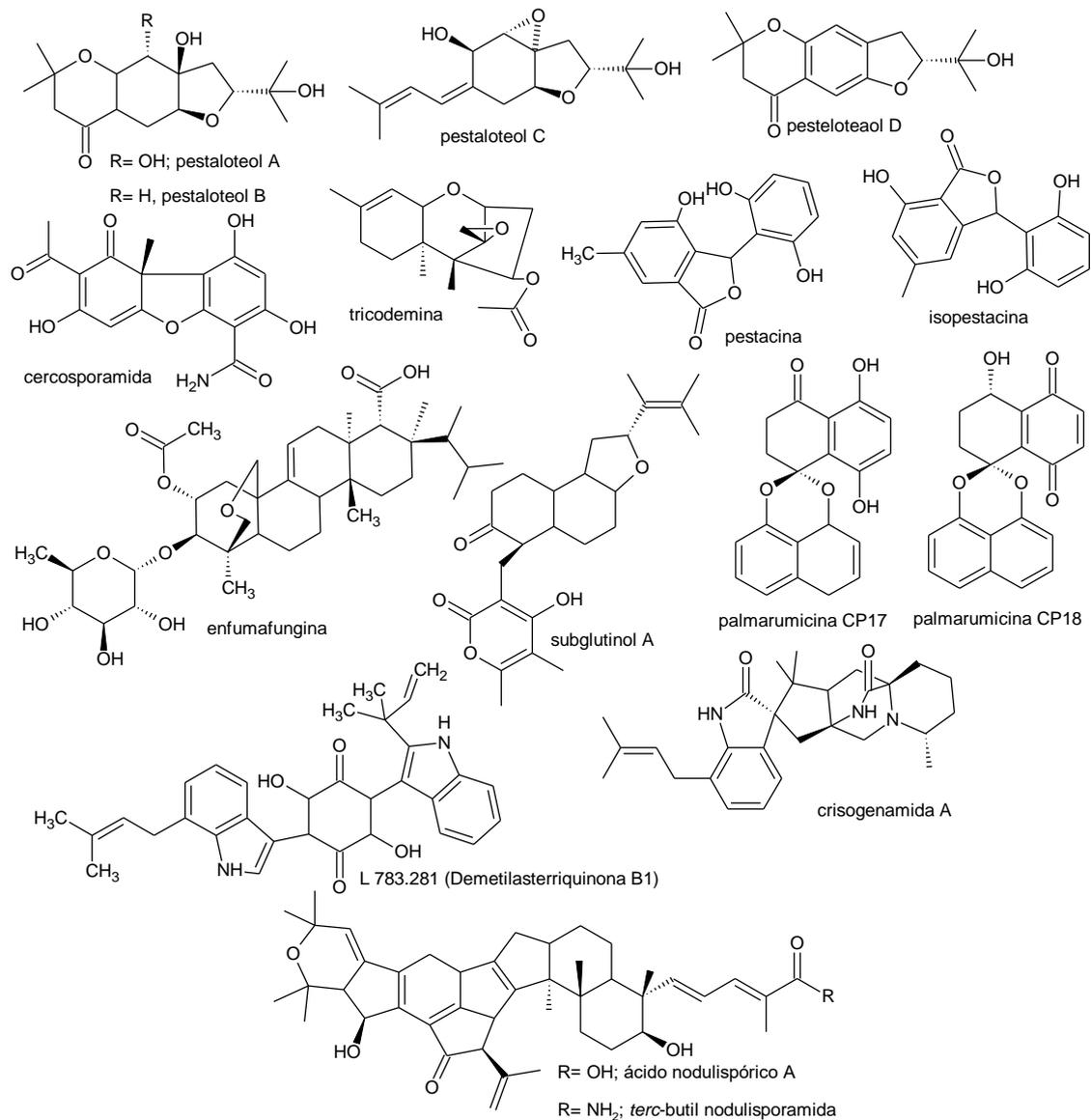
As populações de fungos endofíticos são amplamente afetadas pelas condições climáticas e capazes de aumentar a capacidade da planta de tolerar vários tipos de estresses abióticos e bióticos e a resistência do vegetal a insetos e pragas. Eles produzem fitohormônios e outras substâncias bioativas úteis para plantas, favorecendo seu desenvolvimento, sobrevivência e sustentabilidade (WANG *et al.*, 2012; DHANYA e PADMAVATHY, 2014 e NISA *et al.*, 2015).

A população de fungos endofíticos em uma espécie de planta é altamente diversa e depende de características como: espécie hospedeira, estágio de desenvolvimento do hospedeiro e condição ambiental. O fungo endofítico permanece todo ou parte de seu ciclo de vida colonizando tecidos vegetais saudáveis de forma inter e/ou intracelular. Estes micro-organismos têm sido isolados a partir de muitos tipos de plantas; árvores, ervas, algas e plantas herbáceas (NISA *et al.*, 2015; GOUDA *et al.*, 2016).

Supõe-se que em cada planta coexista uma comunidade de dezenas de espécies de organismos endofíticos, muitos dos quais ainda são táxons não identificados podendo ultrapassar mais de 300.000 espécies de plantas já conhecidas (WANG *et al.*, 2012). Diversos autores divergem quanto à quantidade de espécies de fungos presentes no planeta Terra. Blackwell (2010) reportou que estimativas recentes sugerem que existam mais de 5,1 milhões de representantes de fungos. Isto demonstra o potencial químico e biológico envolvendo o estudo de metabólitos secundários produzidos por fungos.

Substâncias naturais provenientes de fungos endofíticos ainda é um recurso da nossa biodiversidade muito pouco estudado, embora sejam uma fonte rica e confiável de compostos naturais apresentando uma diversidade de atividades biológicas (NICOLETTI *et al.*, 2013).

A investigação química de membros do gênero dos fungos endofíticos resultou na descoberta de vários metabólitos secundários bioativos incluindo: alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenos, policetonas e fenóis, assim como algumas substâncias cloradas com diversas características estruturais. Até 2003, cerca de 4.000 metabólitos secundários bioativos obtidos a partir de fungos já haviam sido descritos. A maioria destes metabólitos (**Figura 9**) é produzida por fungos chamados "criativos", que incluem espécies dos gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (WANG *et al.*, 2012 e PADHI *et al.*, 2013).



**Figura 9** – Estrutura química de substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos (CHAPLA *et al.*, 2012).

Estudos recentes mostraram que produtos naturais produzidos por diferentes fungos endofíticos possuem potencial antioxidante (PADHI *et al.*, 2013), atividade antibacteriana, antitumoral (BASHYAL *et al.*, 2005), antifúngica, antiviral (WANG *et al.*, 2002), antiparasitária, neuroprotetiva, antidiabética, anticolinesterásica e citotóxica (CHAPLA *et al.*, 2012).

A ampla possibilidade neste campo de pesquisa pode ser observada no fato de que extratos brutos a partir de diferentes caldos de cultura mostraram atividade antimicrobiana contra fungos patogênicos, leveduras e bactérias (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

O potencial anti-inflamatório ou antimicobacteriano de produtos naturais de fungos endofíticos possui poucas descrições na literatura. Foi mostrado que extratos metanólicos dos fungos endofíticos *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium* sp. apresentaram atividade antioxidante, anti-inflamatória ao inibir a produção de 15-LOX e COX-2; além de inibirem o crescimento bacteriano de *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. flexneri* (RUMA *et al.*, 2013).

O extrato metanólico obtido a partir de meio de arroz do fungo endofítico *Nigrospora sphaerica* e o extrato em acetato de etila obtido a partir do sobrenadante do meio PDB (*Potato Dextrose Broth*) deste mesmo fungo exibiram atividade antibacteriana frente a diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas, com potencial destacado frente cultura de *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 2015).

O extrato etanólico do sobrenadante da cultura de *Fusarium* sp. e o ácido fusárico isolado do mesmo demonstrou atividade antimicobacteriana para a cepa atenuada *M. bovis* BCG e para a cepa de baixa virulência *M. tuberculosis* H37Rv (PAN *et al.*, 2011).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado diversos produtos bioativos sobre o enfoque da atividade *dual* para o tratamento adjuvante da TB pulmonar severa. Foi demonstrado efeito *dual* para a classe das chalconas sintéticas em testes *in vitro* e no modelo murino de TB pulmonar severa (VENTURA, 2015a) e para o extrato hidroalcolólico de *Passiflora mucronata* e suas frações hexânica e diclorometânica (HEGGDORNE-ARAÚJO *et al.*, 2017). Entretanto, substâncias naturais provenientes de fungos endofíticos apresentando atividade *dual* não têm sido identificadas.

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba localizado na região Norte do Estado do Rio de Janeiro (Brasil), envolve as planícies fluviais e marinhas do litoral dos municípios de Macaé, Quissamã e Carapebus (FUNDAÇÃO DOM CINTRA, 2005). Possui uma vegetação característica por combinar fatores químicos e físicos, como elevada temperatura, salinidade, deposição de salsugem e exposição solar (COGLIATTI-CARVALHO *et al.*, 2001). Todas estas características favorecem a produção de metabólitos secundários, portanto, o direcionamento dos estudos sobre esta perspectiva são de grande interesse, focando no isolamento e no estudo farmacológico de substâncias provenientes de espécies vegetais desta região.

## 2. JUSTIFICATIVA

O aumento no número de casos de TB está intimamente associado a crescente prevalência de cepas *Mtb* multi e extensivamente resistentes aos fármacos utilizados na terapia anti-TB padrão representando uma ameaça à capacidade de controle da TB. Casos clínicos severos de TB pulmonar, comum em indivíduos com MDR-TB, estão frequentemente associados a uma resposta inflamatória deletéria e alta taxa de transmissibilidade do bacilo.

Neste contexto, a utilização de uma abordagem terapêutica adjuvante direcionada a redução da resposta inflamatória do paciente e dos danos teciduais associados, em combinação com fármacos anti-micobacterianos, pode melhorar os resultados do tratamento e preservar a função pulmonar.

Existe uma necessidade urgente de obtenção de novas substâncias mais eficazes e menos tóxicas contra cepas *Mtb* resistentes. Em adição, a abordagem estratégica de terapia adjuvante para os casos severos de TB estimula a busca por novos fármacos com atividade *dual*, anti-inflamatória e antimicobacteriana, onde várias substâncias naturais de diferentes origens têm sido investigadas e representam uma ferramenta potencial.

Os fungos endofíticos apresentam uma área importante de estudo e inúmeros trabalhos demonstraram que substâncias obtidas de fungos endofíticos possuem potencial farmacológico incluindo efeito anti-inflamatório e antimicobacteriano.

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba possui vasta bioflora contendo diversas espécies que são descritas por suas propriedades farmacológicas, contudo, espécies de fungos endofíticos provenientes destas ainda não foram estudadas quanto ao potencial *dual*, antimicobacteriano e anti-inflamatório, incentivando estudos acerca deste âmbito.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Estudar o potencial dos extratos, frações e substância isolada oriundos de fungos endofíticos obtidos das espécies vegetais: *Stachytarpheta schottiana*, *Ocotea notata*, *Anemia tomentosa* e *Tocoyena bullata*, quanto à capacidade antimicobacteriana e anti-inflamatória visando aplicação terapêutica para tratamento da TB pulmonar severa.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os extratos, frações e substância isolada dos fungos endofíticos quanto à inibição da produção de NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub> em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS;
- Avaliar a citotoxicidade celular das amostras através da análise da atividade mitocondrial da cultura de macrófagos RAW 264.7 tratada utilizando o método de MTT Realizar o *screening* dos extratos, frações e substância isolada dos fungos endofíticos quanto à capacidade de inibir o crescimento da cultura bacteriana de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* (H37Rv e M299); Investigar o potencial antioxidante das amostras mais ativas através do sequestro do radical NO
- Verificar o efeito das amostras mais ativas na expressão enzimática da iNOS e COX-2;
- Avaliar a capacidade das amostras mais ativas em inibir o crescimento de cepas *M. kansasii* em cultura bacteriana;
- Verificar o potencial das amostras em inibir o crescimento micobacteriano em cultura de macrófagos infectados;
- Avaliar os efeitos terapêuticos da substância isolada lasiodiplodina em modelo murino de TB pulmonar severa induzida em camundongos C57Bl/6 por cepa hipervirulenta.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas de fungos endofíticos

As amostras de fungos endofíticos foram obtidas através de uma parceria entre o Laboratório de Biologia do Reconhecer- LBR/UENF e o Laboratório de Produtos Bioativos (LaProdBio)/ UFRJ *Campus* Macaé, em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Guimarães e o Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Willian Jonis Andrioli.

A coleta das espécies vegetais, o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos para obtenção dos extratos, frações e substância isolada foram realizados pelos colaboradores da UFRJ *Campus* Macaé e descritas brevemente abaixo.

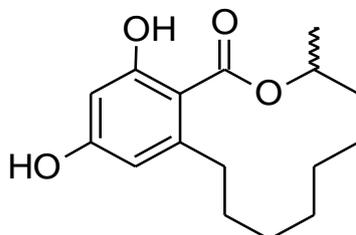
O material vegetal das espécies *Stachytarpheta schottiana* (Verbenaceae), *Ocotea notata* (Lauraceae), *Anemia tomentosa* (Anemiaceae), *Tocoyena bullata* (Rubiaceae), foi lavado em água corrente e esterilizado superficialmente em banhos de imersão em álcool etílico, solução de hipoclorito de sódio e em água destilada estéril de acordo com tempos e concentrações pré-estabelecidas para preservação da espécie endofítica. Em seguida, pequenos fragmentos do material vegetal foram inoculados em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) indicado para crescimento fúngico. Vinte quatro horas após a inoculação do material vegetal iniciou-se o isolamento dos fungos (GUIMARÃES, 2006).

A coleta e purificação das diferentes linhagens de fungos foram feitas pelo repique em tubos de ensaio *slant*, contendo meio BDA e o estoque das linhagens para preservação foi realizado em água estéril (CASTELLANI, 1939) e óleo mineral.

Para o cultivo de cada fungo, a fim de isolar possíveis substâncias bioativas, estes foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA. Após este período, o micélio crescido foi transferido para meio sólido de arroz ou líquido PDB para fermentação. Posteriormente foram realizados procedimentos de extração com solventes orgânicos para obtenção dos extratos brutos.

Posteriormente, o extrato bruto proveniente do meio de cultivo de arroz do fungo *Sordarium* sp, isolado de *T. bullata*, foi fracionado em diferentes solventes

orgânicos (hexano, acetato de etila, butanol e etanol) e também a fração aquosa. A partir da fração em acetato de etila de TB1 foi isolado a lasiodiplodina (**Figura 10**).



**Figura 10-** Estrutura química da lasiodiplodina.

As frações em acetato de etila e hexânica dos fungos endofíticos obtidos das espécies vegetais *A. tomentosa*, *O. notata* e *S. schottiana* foram submetidas aos ensaios antimicobacterianos, bem como a substância lasiodiplodina. A lista das amostras avaliadas está apresentada na **Tabela 1**.

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 20 mg/mL e esterilizados por filtração em membrana de nylon 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Após serem filtradas, as amostras foram aliquotadas e conservadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 1-** Identificação das amostras de fungos endofíticos avaliados.

PLANTA	AMOSTRAS	SIGLA	LOCAL DE ISOLAMENTO	IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA
<i>Anemia tomentosa</i>	A (Fr. em acetato de etila) H (Fr. Hexânica)	AT1 A	Folha	XX
		AT1 H		
		AT2 A	Folha	XX
		AT2 H		
		AT3 A	Folha	XX
		AT3 H		
		AT4 A	Folha	XX
		AT4 H		
		AT5 A	Esporo	XX
		AT5 H		
		AT6 A	Esporo	<i>Fusarium oxysporum</i>
		AT6 H		
		AT7 A	Esporo	XX
		AT7 H		
		AT8 A	Raiz	XX
AT8 H				
AT9 A	Raiz	XX		
AT9 H				
<i>Ocotea notata</i>	A (Fr. em acetato de etila) H (Fr. Hexânica)	ON1 A	Caule	XX
		ON1 H		
		ON2 A	Caule	XX
		ON2 H		
		ON3 A	Caule	<i>Penicillium clarisporta</i>
		ON3 H		
		ON4 A	Folha	<i>Annulohypoxyylon stygium</i>
		ON4 H		
		ON5 A	Folha	XX
		ON5 H		
		ON6 A	Folha	<i>Penicillium citrinum</i>
		ON6 H		
ON7 A	Folha	XX		
ON7 H				
<i>Stachytarpheta schottiana</i>	A (Fr. em acetato de etila) H (Fr. Hexânica)	SS1 A	Caule	XX
		SS1 H		
		SS2 A	Folha	XX
		SS2 H		
		SS3 A	Folha	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>
		SS3 H		
		SS4 A	Folha	XX
		SS4 H		
		SS5 A	Raiz	XX
		SS5 H		
SS6 A	Raiz	XX		
SS6 H				
<i>Tocoyena bullata</i>	Extrato Bruto	Tb1	Folha	<i>Sordaria spp</i>
	Acetato de etila Arroz	Tb1 A		
	Acetato de etila PDB	Tb1 Ap		
	Etanólica	Tb1 E		
	Butanólica	Tb1 B		
	Aquosa	Tb1 Aq		
	Substância isolada	Lasio		

XX – Microorganismo fúngico não identificado.

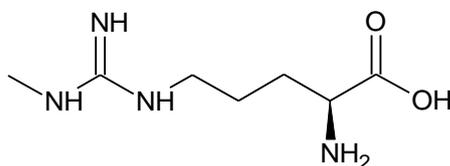
## 4.2. Cultivo celular e tratamento com amostras de fungos endofíticos

As linhagens murinas de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929 foram obtidos da ATCC (VA, USA) e cultivados em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Gibco/ Invitrogen, NY, USA), sendo mantidos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando em experimentação, os macrófagos RAW 264.7 ( $5 \times 10^5$  células/mL) foram plaqueados com meio DMEM-F12 suplementado com 2% SFB, na presença ou ausência das amostras dos fungos endofíticos (4, 20, 100 e 500 µg/mL) e/ou LPS (1 µg/mL, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA) . A placa foi mantida em estufa e após 24 h, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação dos parâmetros inflamatórios. Os fibroblastos murinos L929 foram plaqueados ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) com DMEM-F12 suplementado com 10% SFB, 24 h antes da coleta de sobrenadante proveniente da cultura de macrófagos tratada. Quando em experimentação, o sobrenadante da cultura das células L929 foi retirado e 50 µL/poço de DMEM-F12 suplementado com 10% SFB e actinomicina D (2 µg/mL) foram adicionados. Posteriormente, 50 µL/poço do sobrenadante coletado da placa de RAW 264.7 estimulada com LPS e tratada por 24h foram transferidas para a mesma.

### 4.2.1. Quantificação da produção de NO

A produção de NO pelos macrófagos foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito. Cinquenta microlitros de cada sobrenadante (obtido conforme item 4.2) foram acrescentados a 50 µL de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Aldrich). Após 10 min, a absorbância foi mensurada a 570 nm em espectrofotômetro de placa (Dinatech MR5000). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em µM utilizando como referência uma curva de nitrito de sódio decrescida do valor obtido com os aditivos sem células (GRIESS, 1939). O fármaco padrão, L-MMMA (Acetato de N<sup>G</sup>- metil-L-arginina) (**Figura 11**) conhecido pela inibição da iNOS, foi utilizado, na concentração de 20 µg/mL ( $40,86 \pm 1,06\%$ , IC<sub>50</sub>  $78,3 \pm 6,5$  µg/mL) para comparação da atividade inibitória com as apresentadas pelos extratos dos fungos endofíticos em estudo. Em concentrações maiores, o fármaco apresentou citotoxicidade elevada e em

concentrações menores não foi capaz de manter sua atividade inibitória (VENTURA, 2015b). As quantidades obtidas em  $\mu\text{M}$  de NO no sobrenadante de cada amostra foram comparadas ao controle negativo de produção de NO, cultura de macrófagos sem estímulo e tratamento, e ao controle positivo de produção de NO, macrófagos estimulados com LPS e não tratados e.



**Figura 11-** Estrutura química do inibidor padrão de iNOS, L-NMMA (VALLANCE e LEIPER, 2002).

#### 4.2.2. Avaliação da toxicidade celular em cultura de macrófagos

O teste de citotoxicidade celular das amostras de fungos endofíticos foi efetuado através da avaliação do potencial mitocondrial em metabolizar o 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol (MTT) a um cristal de formazan.

Após 24 h a cultura celular ser tratada conforme o item 4.2, foi acrescido 10  $\mu\text{L}$ /poço da solução de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich) e incubado por 2 h a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, o sobrenadante da placa foi removido e os cristais de formazan obtidos foram solubilizados em isopropanol adicionado de ácido clorídrico (HCl) (4mM) (MOSMANN, 1983). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm (Dinatech MR5000). O percentual de viabilidade obtido através do método do MTT foi convertido à percentual de citotoxicidade utilizando como referência os valores obtidos nos controles utilizados, segundo a fórmula:  $100 - ((D.O._{\text{amostra}} - D.O._{\text{C+}}) * 100 / D.O._{\text{C-}} - D.O._{\text{C+}})$ . Como controle positivo de mortalidade foi utilizado a cultura de macrófagos estimulados e não-tratados acrescida de 10  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 a 0,1% e como controle negativo, acultura de macrófagos estimulados e não-tratados. Ressalta-se que o controle do solvente DMSO (Sigma Aldrich) usado na diluição das substâncias também foi empregado neste ensaio.

#### 4.2.3. Bioensaio indireto para quantificação da produção de TNF- $\alpha$

O bioensaio indireto permite avaliar a presença de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7, uma vez que os fibroblastos murinos L929 são sensíveis à presença de TNF- $\alpha$ . Assim, a concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura está associada ao índice de morte celular. A cultura de fibroblastos L929 foi tratada com solução de tripsina 0,025%+ EDTA 0,2% (Vetec, Brasil) para remoção das células aderentes do frasco de cultivo celular. Após a remoção, a solução de tripsina adicionado das células foi acrescido de igual volume de meio DMEM-F12 suplementado para interromper a ação da tripsina. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação (1200 rpm, 4°C por 5 min) e o pellet celular foi ressuspenso em meio de cultura para plaqueamento na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL. Após 24 h em estufa de cultivo celular, os procedimentos seguiram o descrito no item 4.2 e então incubado por 24 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT (descrito no item 4.2.2). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm (MOSMANN, 1983; SHIAU *et al.*, 2001). A concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante foi mensurada em pg/mL usando como referência uma curva padrão de TNF- $\alpha$  murino recombinante. As quantidades obtidas em pg/mL de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cada amostra foram comparadas ao controle negativo de produção de TNF- $\alpha$ , cultura de macrófagos sem estímulo e não tratada, e ao controle positivo de produção de TNF- $\alpha$ , macrófagos estimulados e não tratados.

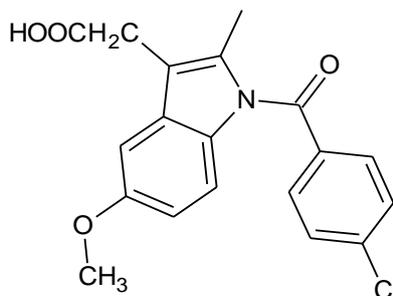
#### 4.2.4. Quantificação da produção de PGE<sub>2</sub> e IL-1 $\beta$

A produção da citocina IL-1 $\beta$  e do mediador inflamatório lipídico PGE<sub>2</sub> no sobrenadante da cultura de macrófagos tratada (conforme descrito no item 4.2) foi quantificado separadamente utilizando kits comerciais de ELISA (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima) tipo sanduíche (IL-1 $\beta$  (BD Biosciences, CA, USA) e PGE<sub>2</sub> (R&D Systems, MN, USA)) e a execução experimental ocorreu segundo o protocolo do fabricante.

No ensaio de quantificação da produção de PGE<sub>2</sub> foi utilizado também como controle positivo, o fármaco indometacina (Sigma Aldrich), AINE inibidor da produção de prostaglandinas (**Figura 12**), nas concentrações de 0,2  $\mu$ g/mL, 0,04

$\mu\text{g/mL}$ ,  $0,004 \mu\text{g/mL}$  e  $0,0004 \mu\text{g/mL}$  padronizadas de acordo com Chang *et al.*, 2006. As amostras mais ativas foram avaliadas nas concentrações de 4, 20 e  $100 \mu\text{g/mL}$ .

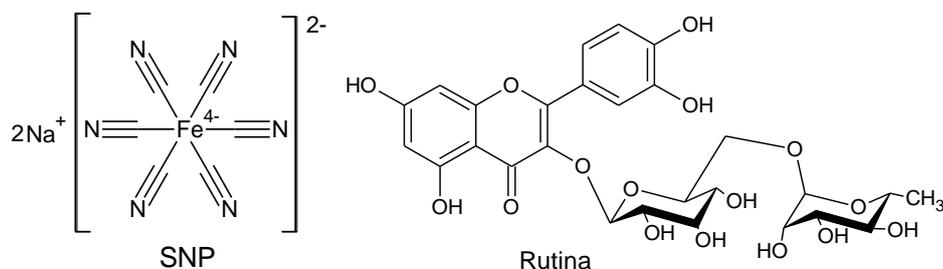
Como controle positivo da produção de ambos mediadores foi utilizado o sobrenadante da cultura de macrófagos estimulada e não tratada e como controle negativo, o sobrenadante da cultura celular não estimulada e não tratada.



**Figura 12.** Estrutura química da indometacina, AINE inibidor da produção de prostaglandinas. (RAO *et al.*, 2008).

#### 4.2.5. Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP) diluído em PBS estéril a  $100 \text{ mM}$ . O método foi previamente padronizado quanto à concentração de SNP a ser utilizada e o tempo de incubação para maior proximidade com o ensaio celular em termos de quantidade em micromolar de NO (CALIXTO, 2016). A solução de SNP ( $5 \mu\text{L}$ ) foi adicionada a  $45 \mu\text{L}$  do meio de cultura DMEM-F12 acrescido das amostras ou do flavonoide rutina (**Figura 13**), conhecido por sua capacidade sequestradora de NO, nas concentrações de 4, 20 e  $100 \mu\text{g/mL}$ . A placa foi incubada a temperatura ambiente por 1,5 h na presença de luz. Após este período, o teste colorimétrico de Griess foi efetuado (como descrito no item 4.2.1) (ZHAI *et al.*, 2009). As quantidades obtidas em  $\mu\text{M}$  de NO no sobrenadante de cada amostra foram comparadas ao controle negativo, somente meio de cultura, e ao controle positivo, meio de cultura acrescido de SNP.



**Figura 13** - Estrutura química do nitroprussiato de sódio e do flavonoide rutina (COUTINHO *et al.*, 2009; ZHAI *et al.*, 2009).

#### 4.2.6. Avaliação da expressão enzimática da iNOS e COX-2

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na concentração de  $2 \times 10^7$  células/mL em placas de Petri e incubados por 24 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, os macrófagos confluentes foram estimulados com LPS (1 µg/mL) e tratados a 100 e 20 µg/mL das amostras mais ativas (devido a não interferência da citotoxicidade e a presença do potencial de inibição da produção dos mediadores inflamatórios NO e PGE<sub>2</sub>) por mais 24 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para confirmação da presença do estímulo celular após 24 h, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação pelo método de Griess. Cada placa de petri foi então lavada com PBS 1X e a monocamada celular foi removida com auxílio do *cell scraper*, sendo transferida para microtubos e centrifugada (1200 rpm, 5') para obtenção do *pellet* celular. Estes foram lisados com tampão de lise (10% SDS, 20% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 2% azul de bromofenol e 1 M Tris HCl, pH 6.8, contendo inibidor de proteases – Sigma Aldrich) e a concentração de proteínas estimada pelo método de Bradford.

Sessenta microgramas do lisado celular foram submetidos ao gel de 10% SDS-poliacrilamida no sistema MiniVE Vertical Electrophoresis System (GE-Healthcare). Após a eletroforese, as proteínas devidamente separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando tampão fosfato (Amersham Hybond- ECL, GE-Healthcare). Posteriormente, a membrana foi bloqueada com 2,5% de albumina sérica bovina (BSA) dissolvida em TBS acrescido de Tween 0,05% (PBST), overnight a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada 3X com PBST 0,05% e incubadas com anticorpo primário anti-iNOS monoclonal (BD Transduction Laboratories), 1:1000, ou com anticorpo monoclonal

anti-COX-2 (BD Transduction Laboratories), 1:500, ambos diluídos em TBST 0,05% acrescido de 1% de leite desnatado, por 1h, a temperatura ambiente.

Em seguida, a membrana foi lavada 3X com PBST 0,05% e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse IgG-peroxidase respectivamente (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology) em TBS por 1 h, a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada extensivamente com TBST 0,05% e revelada com solução de 0,5 mg de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich) em 50 mM de Tris HCl, pH 7,5 e 0,03% de peróxido de hidrogênio.

O peso molecular das bandas foi comparado ao peso molecular padrão (Full Range Rainbow - GE-Healthcare). As bandas protéicas reveladas foram digitalizadas utilizando scanner de alta resolução e a análise densitométrica foi realizada através do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD). O valor para a condição estimulada (células estimuladas com LPS) foi inferido como 1 e as outras condições foram calculadas em correlação com este parâmetro.

#### **4.3. Cultivo micobacteriano**

A cepa de BCG (vacina onco-BCG, linhagem Moreau, Copenhagem SEED# julho de 1978) foi cedida pelo Instituto Butantan/SP enquanto a cepa laboratorial de referência *M. tuberculosis* H37Rv foi obtida da ATCC (27294). A cepa *Beijing*, *M. tuberculosis* M299, proveniente de um isolado clínico de pacientes com TB em Moçambique foi cedida pelo Dr. Philip Suffys (Instituto Oswaldo Cruz/RJ). As cepas foram cultivadas em meio *Middlebrook* 7H9 (DIFCO, Detroit, MI), acrescido de 0,05% Tween 80 suplementado com 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase- Difco Laboratories) durante 7 dias até a fase mid-log, em estufa bacteriológica à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

A cepa padrão de Mkan ATCC 12478 e os isolados clínicos de pacientes (4404 e 8835) foram genotipadas e cedidas pelo Dr. Philip Suffys. As culturas micobacterianas foram crescidas em meio de cultura *Middlebrook* 7H9 acrescido de 0,05% glicerol e de 10% de ADC.

O monitoramento do crescimento micobacteriano foi efetuado através da medida de densidade óptica (D.O 600nm), por espectrofotometria (Biochrom, modelo Libra S6). As alíquotas de 1 mL (10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> bactérias) foram retiradas para estoque e acondicionadas à -70°C.

#### 4.3.1. Ajuste da concentração micobacteriana

Antes da execução dos experimentos, as culturas de Mtb em suspensão por 7 dias e de Mkan em suspensão por 4 dias foram agitadas no vórtex (BIOMATIC) e sonicadas em banho de ultrassom (Ultrasonic Maxi cleaner 800–UNIQUE) por 1 min para dispersão dos grumos. O ajuste da concentração bacteriana utilizada nos experimentos foi realizado através da leitura prévia de 1 mL da suspensão das culturas (7H9) em espectrofotômetro (Hitachi – modelo U-1100) a 600nm, subtraído da D.O do meio de cultura 7H9 somente suplementado. Posteriormente, a diluição das culturas obedeceu ao critério de relação da densidade óptica *versus* número de bacilos (D.O 0,100 - $2 \times 10^7$  bacilos/mL) para as cepas *M. tuberculosis* H37Rv e M299, (D.O 0,100 -  $10^8$  bacilos/mL) para *M. bovis* BCG, (D.O 0,200 -  $5 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$  e  $2 \times 10^7$  bacilos/mL) para *M. Kansasii* 12478/ATCC, 8835 e 4404, respectivamente.

#### 4.3.2. Avaliação da atividade antimicobacteriana

Durante a fase logarítmica de crescimento das cepas de *Mycobacterium*, 50 µL da suspensão de cada cepa foram plaqueados em placa de 96 poços ( $1 \times 10^7$  CFU/mL) e acrescido das amostras de fungos endofíticos (50 µL) em concentração 2X maior do que a concentração final desejada (0,001; 0,01; 1; 2 e 10 µg/mL para *M. bovis* BCG e 4, 20 e 100 µg/mL para ambas as cepas de Mtb e Mkan). A placa foi então incubada a 37°C por 7 dias para *M. bovis* BCG, 5 dias para Mtb e Mkan. Após este período, foram adicionados 10 µL/poço de solução de MTT e 3 h depois, 100 µL de tampão de lise (20% p/v de SDS, 50% v/v de DMF, Sigma Aldrich). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm (CAVIEDES *et al.*, 2002). Como controle positivo de crescimento foi utilizado meio de cultura 7H9 suplementado acrescido de bactérias e não tratado e como controle negativo, somente meio de cultura suplementado.

A atividade das amostras de fungos endofíticos foi comparada a rifampicina, fármaco padrão para tratamento da TB. A rifampicina foi utilizada na concentração de 0,0011 a 0,03 µg/mL para *M. bovis* BCG e nas concentrações de 0,0032 - 1 µg/mL para a cepa H37Rv e 0,008, - 10 µg/mL para a cepa M299. Para os testes realizados com Mkan foi acrescentado como controle o fármaco

isoniazida (0,0032 - 2 µg/mL) além da rifampicina, tendo em vista que Mkan acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com AIDS, e nestes o regime terapêutico tradicional envolvendo rifampicina acelera o metabolismo hepático dos inibidores da protease do HIV, tornando-os ineficazes (GRAYBILL, 2001).

Toda manipulação e cultivo das micobactérias obedeceram às normas de biossegurança de nível III.

#### **4.3.3. Infecção de cultura de macrófagos e quantificação do crescimento micobacteriano intracelular**

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados ( $5 \times 10^5$  células/mL) em placas de 96 poços com meio DMEM-F12 sem antibiótico e suplementado com 10% SFB por 24 h. Antes da infecção, as suspensões micobacterianas de Mbv BCG, Mtb H37Rv e M299 foram agitadas em vórtex e sonicadas conforme item 4.3.1. A densidade óptica foi ajustada para 0,1. A cultura de macrófagos foi infectada na razão MOI (Multiplicidade da infecção) 1:1 (macrófago/bactéria). A fagocitose foi permitida por 3 h, e logo após, as micobactérias extracelulares foram removidas por lavagem com PBS 1X estéril. Posteriormente, a monocamada celular infectada foi tratada por 4 dias com o extrato TB1, a fração em acetato de etila TB1A e a substância isolada lasiodiplodina nas concentrações de 4, 20 100 µg/mL. No quarto dia após infecção, as células foram lisadas com saponina 1% (Sigma Aldrich) para liberar as bactérias intracelulares. As alíquotas do lisado celular foram diluídas em série de 10 vezes em PBS 1X estéril e plaqueadas em triplicata em placas de ágar 7H10 suplementadas. Após 21 dias de incubação a 37°C foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU).

#### **4.4 Infecção experimental dos camundongos e tratamento com a lasiodiplodina**

Camundongos da linhagem C57Bl/6, livres de germes, machos, com idade entre 6 e 8 semanas, foram fornecidos pelo biotério central do Centro de Bociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Os animais foram infectados e mantidos em micro-

isoladores, distribuídos organizadamente em estantes ventiladas no biotério de Biossegurança nível III do Laboratório de Biologia do Reconhecer (CBB/ UENF) sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elena Lassounskaia. O modelo de infecção dos camundongos foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança da UENF (C-CIBio-18/03, 2017) e pela Comissão de Ética em Uso Animal, CEUA, da UENF (protocolo nº 350-2017). Antes do procedimento de infecção experimental foi efetuada a preparação do inóculo. A cepa *Beijing* M299 foi previamente cultivada e a densidade óptica mensurada de acordo com o item 4.3.1 Esta cepa foi escolhida para infecção por desenvolver no animal infectado severa patologia pulmonar, com alta carga bacteriana e extensivo dano tecidual (AMARAL *et al.*, 2014). A dose de infecção de 100 bacilos (baixa dose) num volume de 60 µL foi realizada para cada animal e confirmada por contagem de CFU em placas de ágar 7H10 plaqueadas com o mesmo volume de inóculo instilado na traqueia do animal. No procedimento de infecção experimental, os animais foram inicialmente anestesiados por via intraperitoneal (i.p.), pela aplicação de uma alíquota de 90-120 µL da mistura de Anazedan (xilazina, 15 mg/kg, Vetbrands) e Dopalen (ketamina, 110 mg/kg, Vetbrands) diluídos em PBS estéril. Para certificação da eficácia da analgesia nos animais, estes foram submetidos a testes de padrão de reflexo de acordo com as normas de bioética de experimentação animal.

O procedimento cirúrgico foi iniciado com uma incisão transversal de 0,5 cm na pele da região do pescoço do animal para exposição da traqueia, onde foi injetado o volume de 60 µL (~10<sup>2</sup> bacilos) entre os anéis cartilagosos mais proeminentes, com auxílio de uma seringa hipodérmica 0,3 mL (Terumo, SP, Brasil). Os animais controle receberam 60 µL de PBS 1X estéril. Logo após a infecção intratraqueal (i.t.), a incisão foi suturada. Os animais infectados foram separados em dois grupos com quatro animais cada e supervisionados diariamente quanto aos sinais vitais e eutanasiados (inalação de CO<sub>2</sub>), se requerido, seguindo o protocolo de bioética animal, quando observado perda de peso, ausência de mobilidade e dificuldade de respiração a fim de minimizar o sofrimento.

#### 4.4.1. Tratamentos e grupos experimentais

Priorizando o estabelecimento da infecção pelo bacilo e desenvolvimento da resposta imune, o tratamento dos animais foi iniciado após 15 dias do procedimento de infecção, por via intraperitoneal (20 µL/animal), alternando o lado de aplicação no abdômen, diariamente durante 15 dias de tratamento. Os animais infectados foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos de 2 animais cada. Um grupo experimental de animal não infectado foi inserido (3 animais), de acordo com o protocolo a que foram submetidos:

**Grupo 1-** Animais não infectados.

**Grupo 2-** Animais somente infectados por Mtb e não tratados.

**Grupo 3-** Animais infectados por Mtb que receberam aplicação intraperitoneal diária de lasiodiplodina (20 mg/Kg).

Após o período de tratamento de 15 dias (30 dias de infecção) os animais foram sacrificados por exposição em câmara de CO<sub>2</sub> e os seguintes parâmetros averiguados: carga bacilar (CFU) no pulmão, alterações teciduais e celulares no pulmão (macropatologia e histopatologia/ morfometria), relação entre o peso dos pulmões e o número de células contabilizados, produção de citocinas *ex vivo* a partir das células pulmonares, e análise fenotípica do infiltrado celular nos pulmões por citometria de fluxo.

#### 4.4.2. Obtenção de células pulmonares e dos bacilos

Para a obtenção das células pulmonares foi coletado o lóbulo inferior esquerdo e os lóbulos superior, médio e inferior direito dos pulmões dos camundongos infectados ou não, os quais foram pesados e adicionados à placa de petri (JProlab, 21 cm<sup>2</sup>) com 3 mL de meio de cultura RPMI (Gibco/Invitrogen, NY, USA). Com o auxílio de pinças curvas, o órgão foi fragmentado e mantido acondicionado no gelo. A seguir foram adicionado 1 mL de solução de digestão tecidual (1 µg/mL de liberase Blendzyme 2) e 0,1 µg/mL de DNase de pâncreas bovino (Sigma Aldrich) foram acrescidas e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 40 minutos sob agitação. Após este período, os órgãos imersos na solução de digestão foram dissociados utilizando seringas de 10 mL por 10 ciclos de

homogeneização e os homogenatos obtidos filtrados em *cell strainer* com poro de 40 µm (BD Bioscience, CA, USA).

O homogenato isento de matriz tecidual foi destinado à quantificação micobacteriana através da diluição decimal seriada e plaqueamento em placa de ágar 7H10 suplementada. As placas foram lacradas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 21 dias e o CFU quantificado.

O restante do homogenato foi processado para obtenção de células. As hemácias foram removidas através de tratamento com tampão de lise ACK (0,144 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,0169 M Tris base, pH 7.4) e as suspensões celulares foram lavadas e ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 0,05 mg/mL de gentamicina sendo mantidas no gelo. Uma alíquota desta suspensão foi adicionada de azul de Trypan 0,2% solubilizado em paraformaldeído 4% por 2 minutos para contagem celular. Após a quantificação e ajuste da concentração celular ( $5 \times 10^5$  células/mL), as células foram plaqueadas e cultivadas *ex vivo* por 48 h para quantificação da produção espontânea de mediadores inflamatórios.

Os sobrenadantes da cultura celular *ex vivo* foram coletados, filtrados para remoção de micobactérias e estocados em freezer -70°C. Quando da execução do Cytometric Bead Array (CBA), estes foram descongelados e uma alíquota de 50 µL de cada amostra foi tratada com beads conjugadas a anticorpos de captura de alta afinidade IL-6, IFN-γ, TNF-α e IL-17A. As marcações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante e a leitura foi efetuada em citômetro de fluxo, onde cada bead possui uma fluorescência única, permitindo a detecção proteica simultaneamente numa mesma amostra.

#### **4.4.3. Análise macroscópica e histopatológica do pulmão**

A avaliação da macro e micropatologia foram realizadas para o pulmão, nos 30 dias após a infecção. O lóbulo superior esquerdo do pulmão de cada animal foi selecionado para a análise histológica e, portanto fixados por no mínimo 96 h em formol 10% tamponado. A macropatologia foi avaliada através da pesagem dos pulmões dos animais, comparando o peso dos órgãos entre os animais somente infectados e os animais infectados e distintamente tratados e após a fixação, o lóbulo direito do pulmão de cada animal foi fotografado com escala em centímetros para a avaliação macroscópica das mudanças

morfológicas do órgão. A massa relativa foi calculada pela razão entre o peso do pulmão de cada animal infectado (tratado ou não) e a média do peso do pulmão dos animais controle. Os estudos histopatológicos para avaliar a micropatologia foram realizados nos cortes dos tecidos a partir da coloração com hematoxilina-eosina (H&E) para a visualização das alterações teciduais e pelo método de Ziehl-Neelsen para detecção da presença de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR).

#### **4.4.4. Método de coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E)**

O lóbulo superior do pulmão direito dos camundongos infectados ou não foi retirado para análises histopatológicas 30 dias após a infecção. Após a fixação, os lóbulos foram lavados com água destilada por 30 minutos, seguido de banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%) por 1 h em cada concentração e, então, submetidos a dois banhos contendo xilol por 1 h cada, estando estes, preparados para a inclusão na parafina, por 30 minutos. Após o procedimento do Histotec (fixação e clarificação), as peças foram emblocadas em parafina e levadas ao gelo. Os blocos rígidos foram seccionados no micrótomo (Leica) com espessura de 4-5  $\mu\text{m}$ , colocado em banho-maria e posicionados em lâmina. As lâminas contendo os cortes foram embebidas em duas baterias de xilol por 3 minutos cada, logo banhadas em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 minuto em cada concentração para então serem corados com hematoxilina por 3 minutos e eosina por 50 segundos. Novamente, foram repetidos os banhos em álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 minuto em cada concentração e em xilol por 3 minutos. Os cortes então sofreram fixação permanente com Permount.

#### **4.4.5. Método de Ziehl-Neelsen**

Os órgãos foram fixados, clivados e emblocados como descrito no item 4.4.4. A lâmina contendo o corte do tecido foi imersa em solução aquecida de carboxifuccina por 30 minutos. Logo após, a mesma foi lavada em água corrente e tratada com álcool-ácido 1% até atingir a tonalidade rósea. Os tecidos foram lavados novamente em água corrente por 8 minutos, com posterior imersão em 10 mL da solução de azul de metileno (4 mM de azul de metileno em álcool etílico 95%) acrescido de 90 mL de água destilada. Os cortes foram submetidos à

fixação permanente com Permount e analisados por microscopia óptica (microscópio Zeiss-Axiplan). As técnicas de coloração foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Patologista Clínico do Laboratório de Sanidade Animal, do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

#### **4.4.6. Análise morfométrica do tecido pulmonar**

Os cortes corados com H&E foram analisados por microscopia óptica (microscópio Axioplan 2, Carl Zeiss, Inc.) e as imagens dos cortes capturadas através do dispositivo AxioCam MCR-5 (Zeiss). Para a análise morfométrica, as imagens foram obtidas numa ampliação de 100X e avaliadas pelo programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD) em relação à área de inflamação (área de pneumonia) presente em cada imagem. As imagens coloridas foram convertidas em escala de preto e branco para permitir a identificação de áreas aeradas, como os alvéolos (em preto) e áreas de tecido inflamado e não inflamado, em branco. Para quantificar a porcentagem de área não aerada (área branca), a média das porcentagens de área de 10 fotos da secção pulmonar dos camundongos foi calculada e para quantificar a porcentagem de área inflamada (área de pneumonia), a média do percentual da área de tecido do pulmão controle foi subtraída do percentual da área de tecido pulmonar de cada grupo infectado.

#### **4.5. Análise estatística**

Os dados foram relatados como média  $\pm$  erro padrão e avaliado por análise de variância One-Way ANOVA seguido por Teste de Tukey, sendo considerado significativo  $p < 0.05$ . Para calcular o  $IC_{50}$ ,  $MIC_{50}$  e  $MIC_{90}$  das amostras testadas foram utilizados os resultados das curvas de concentração-resposta para cada atividade por regressão não-linear e as estatísticas calculadas para estes valores foram avaliadas por análise de variância One-Way ANOVA seguido por Teste de Tukey, sendo considerado significativo  $p < 0,05$ . Softwres utilizados: Microsoft Office Excel e GraphPad Prism 4.

## 5. RESULTADOS

Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos têm atraído cada vez mais atenção devido à exibição de inúmeras atividades farmacológicas, incluindo anti-inflamatória, antimicrobiana e efeitos antimicobacterianos (PRETSCH *et al.*, 2014).

Neste trabalho foram avaliados os extratos, frações e substância isolada de fungos endofíticos obtidos de diferentes espécies vegetais, sendo dezoito frações obtidas de *Anemia tomentosa*, doze frações de *Stachytarpheta schottiana*, cartoze frações de *Ocotea notata* e um extrato, cinco frações e uma substância isolada de *Tocoyena bullata*.

As amostras foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a produção dos mediadores químicos NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, envolvidos no processo inflamatório e a citotoxicidade celular; utilizando o modelo de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Além disso, o potencial de inibição das amostras de fungos endofíticos frente ao crescimento de cepas micobacterianas foi avaliado em cultura bacteriana e macrófagos infectados por Mtb. Tendo em vista que a atuação em ambas atividades biológicas têm sido incentivada nos casos severos de tuberculose pulmonar associados a inflamação excessiva, as amostras mais ativas foram selecionadas de acordo com o perfil *dual* de atividade em ambos os aspectos.

O processo de identificação dos fungos endofíticos ainda está em andamento e a **Tabela 1** (p.39) contém a codificação e identificação dos microorganismos já identificados.

### **5.1. Avaliação do extrato, frações e da substância isolada de fungos endofíticos, quanto à capacidade de inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ , citotoxicidade e inibição do crescimento de Mbv BCG e Mtb H37Rv**

O estudo do potencial anti-inflamatório e antimicobacteriano das 51 amostras de fungos endofíticos iniciou-se pela investigação destas quanto a capacidade de inibir a produção de NO e TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Além disso, as amostras foram avaliadas quanto à citotoxicidade celular para permitir a seleção daquelas exibindo baixa ou nenhuma

interferência da citotoxicidade. Este critério foi estabelecido de modo que pudessem ser selecionadas amostras capazes de inibir a produção de NO e TNF- $\alpha$  sem aparente interferência deste potencial pelo índice de morte celular. Para cada amostra foi obtida uma curva de concentração-resposta e desta foi calculada a concentração necessária para inibir 50% da atividade estudada, IC<sub>50</sub>, como exibido na **Tabela 2**.

O radical livre NO e a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  exercem importantes funções no sistema imunológico para o controle de doenças infecciosas, contudo, quando em altas concentrações, estão associados ao agravamento dos processos inflamatórios e degenerativos exibindo efeitos deletérios (BOGDAN, 2001; BALKWILL *et al.*, 2001 e ORME *et al.*, 2015).

Com atenção aos valores de IC<sub>50</sub> obtidos no ensaio anti-inflamatório (**Tabela 2**), foi observado que em geral as amostras estudadas foram mais potentes em inibir a produção de NO do que TNF- $\alpha$ , tendo em vista que apenas cinco amostras foram capazes de inibir a produção de TNF- $\alpha$ . As frações dos fungos endofíticos de *O. notata* (ON1A, ON1H, ON2A, ON6A) foram moderadamente ativas na inibição da produção desta citocina (IC<sub>50</sub> < 260  $\mu$ g/mL). Destaca-se o potencial da lasiodiplodina, substância isolada da fração acetato de etila do fungo endofítico isolado de *T. bullata* que apresentou maior potencial de atividade ( $p < 0,001$ ) com IC<sub>50</sub> de  $17,3 \pm 0,7$   $\mu$ g/mL. Estas amostras demonstraram atividade inibitória de forma seletiva com baixa ou nenhuma interferência da citotóxica como pode ser observado pelos valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios de avaliação de toxicidade celular pelo método de MTT.

Ao avaliar exclusivamente o potencial das amostras testadas em inibir a produção de NO, observou-se que 25 amostras apresentaram capacidade de inibição com baixa ou nenhuma toxicidade celular. Dentre estas, com IC<sub>50</sub> < 52  $\mu$ g/mL podem ser citadas 3 frações dos fungos endofíticos isolados de *A. tomentosa* (AT2A, AT5A, AT6H), todas as frações de fungos endofíticos provenientes de *O. notata*, 2 frações oriundas de fungos endofíticos de *S. schottiana* (SS2A e SS4H) e 3 amostras de fungos Sordaria sp. Isolados de *T. bullata* (extrato TB1 e as frações TB1A e TB1Ap). Foram moderadamente ativas as frações TB1E, TB1B e a substância isolada lasiodiplodina (**Tabela 2**).

De forma geral, as amostras de fungos endofíticos obtidos de ON e Tb foram mais ativos quanto à modulação de ambos os mediadores inflamatórios

avaliados, enquanto as frações de fungos endofíticos de AT e SS demonstraram ter maior citotoxicidade. x

Como controle para a inibição da produção de NO, utilizou-se a substância padrão, L-*MMMA* ( $\text{N}^{\text{G}}$ -acetato de monometil-L-arginina), um inibidor inespecífico da produção de NO com ação na enzima iNOS. Quando comparado o potencial de inibição apresentado pelas amostras de fungos endofíticos ao exibido pelo L-*MMMA* ( $\text{IC}_{50}$   $78,3 \pm 6,5 \mu\text{g/mL}$ ), verificou-se que 22 amostras foram mais ativas que este.

A capacidade de inibir ambos os mediadores inflamatórios foi observado para ON1A, ON1H, ON2A, ON6A e lasiodiplodina.

A busca por extratos, frações e substâncias naturais que sejam capazes de inibir o crescimento micobacteriano é essencial para o tratamento da TB. Os casos severos da doença associados à inflamação excessiva incentivam a busca por substâncias bioativas com propriedade *dual*, por isso, como parte da estratégia de *screening*, as amostras provenientes de fungos endofíticos também foram avaliadas quanto à atividade antimicobacteriana em cultura de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv. A cepa atenuada *M. bovis* BCG e a cepa de baixa virulência *M. tuberculosis* H37Rv foram utilizadas para os experimentos de triagem considerando razões de biossegurança e os respectivos valores da concentração mínima inibitória (MIC) 50% e 90% foram apresentados na **Tabela 2**.

Das amostras de fungos endofíticos testadas, 26 foram capazes de inibir o crescimento de *M. bovis* BCG enquanto 11 mantiveram seu potencial inibitório frente à cepa Mtb H37Rv. Contudo deve-se considerar que a ação de alguns grupos de amostras não foi seletiva ao patógeno, tendo em vista a elevada toxicidade celular em cultura de macrófagos ou não apresentaram potencial inibitório da produção de NO e TNF- $\alpha$ .

Das amostras de fungos endofíticos obtidos de *A. tomentosa*, as frações AT1H e AT6H inibiram o crescimento de *M. bovis* BCG, contudo somente AT6H manteve o potencial inibitório frente à Mtb H37Rv. O mesmo foi observado para as frações SS2A e SS4H dos fungos endofíticos de *S. schottiana*. Todas as amostras de fungos obtidos de *O. notata* foram ativas em inibir o crescimento de *M. bovis* BCG, embora somente as amostras ON1A, ON1H e ON2H tenham inibido o crescimento de Mtb H37Rv (**Tabela 2**).

Estudos com produtos naturais de fungos endofíticos oriundos da *T. bullata* foram iniciados previamente por Calixto (2016), onde cinco extratos foram avaliados quanto a atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana *in vitro*. A partir desse *screening*, o extrato de fungo endofítico de gênero *Sordaria* foi selecionado para testes mais aprofundados (**Anexo 1**).

O extrato do fungo isolado de *T. bullata* (TB1) e a substância isolada lasiodiplodina foram os mais ativos dentre todas as demais amostras testadas em inibir o crescimento de Mbv BCG apresentando MIC<sub>50</sub> < 10 µg/mL. Também foram ativas em inibir o crescimento de Mtb H37Rv MIC<sub>50</sub> < 70 µg/mL, assim como a fração em acetato de etila (TB1A) tendo MIC<sub>50</sub> de 84,8±1,9 µg/mL. Contudo, a fração em etanol, butanol e aquosa não foram ativas.

Em comparação ao fármaco padrão, rifampicina, o potencial de inibição apresentado pelas amostras de fungos endofíticos avaliados foi menor para ambas as cepas (*M. bovis* BCG MIC<sub>50</sub> 0,1 ± 0,03 µg/mL e Mtb H37Rv MIC<sub>50</sub> 0,8 ± 0,1 µg/mL).

Analisando as amostras quanto a propriedade *dual*, anti-inflamatória e antimicobacteriana, e considerando a citotoxicidade celular apresentada, seis amostras puderam ser destacadas: AT6H, ON1A, ON2H, Tb1, Tb1A e lasiodiplodina, sendo capazes de modular a produção de ambos os mediadores inflamatórios e inibir o crescimento de cepas *Mycobacterium*.

**Tabela 2-** Efeito inibitório das amostras de fungos endófitos na produção de NO e TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, no crescimento de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv em cultura e avaliação da citotoxicidade celular pelo método de MTT.

Amostras	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)			MIC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	MIC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)	MIC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	MIC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)
	NO	TNF- $\alpha$	MTT	Mbv BCG		Mtb H37Rv	
AT1 A	20,2 $\pm$ 0,1	>500	71,0 $\pm$ 1,0	97,5 $\pm$ 0,1	>500	157,2 $\pm$ 0,8	>500
AT1 H	49,9 $\pm$ 0,0	>500	130,8 $\pm$ 1,0	62,0 $\pm$ 0,2	>500	104,3 $\pm$ 0,8	>500
AT2 A	34,9 $\pm$ 0,5	>500	140,3 $\pm$ 0,8	171,1 $\pm$ 0,3	>500	>500	>500
AT2 H	59,9 $\pm$ 0,5	>500	170,3 $\pm$ 1,6	329,0 $\pm$ 0,1	>500	305 $\pm$ 1,3	>500
AT3 A	168,4 $\pm$ 1,7	>500	40,3 $\pm$ 1,6	278,0 $\pm$ 0,3	>500	>500	>500
AT3 H	56,4 $\pm$ 0,9	>500	60,1 $\pm$ 3,0	253,1 $\pm$ 0,2	>500	>500	>500
AT4 A	15,4 $\pm$ 0,5	>500	50,6 $\pm$ 1,8	148,8 $\pm$ 0,6	>500	294 $\pm$ 1,0	>500
AT4 H	42,5 $\pm$ 0,9	>500	50,2 $\pm$ 0,2	45,1 $\pm$ 0,5	>500	>500	>500
AT5 A	16,5 $\pm$ 0,4	>500	90,6 $\pm$ 0,9	>500	>500	433,4 $\pm$ 1,0	>500
AT5 H	37,4 $\pm$ 0,6	>500	80,4 $\pm$ 1,0	230,5 $\pm$ 0,2	>500	>500	>500
AT6 A	9,6 $\pm$ 0,3	>500	20,6 $\pm$ 0,8	8,6 $\pm$ 0,6	60,2 $\pm$ 0,6	25,1 $\pm$ 1,0	>500
AT6 H	4,2 $\pm$ 0,2	>500	130,7 $\pm$ 0,3	22,4 $\pm$ 0,7	320,4 $\pm$ 0,7	11,8 $\pm$ 0,2	>500
AT7 A	32,2 $\pm$ 0,5	>500	24,5 $\pm$ 1,1	332 $\pm$ 0,5	>500	>500	>500
AT7 H	80,4 $\pm$ 0,1	>500	110,4 $\pm$ 0,2	245,3 $\pm$ 0,9	>500	>500	>500
AT8 A	41,1 $\pm$ 0,6	>500	100,2 $\pm$ 1,3	120,6 $\pm$ 0,4	>500	>500	>500
AT8 H	116,5 $\pm$ 0,3	>500	150,3 $\pm$ 2,0	371,7 $\pm$ 0,2	>500	>500	>500
AT9 A	12,3 $\pm$ 0,5	>500	10,1 $\pm$ 1,3	47,8 $\pm$ 0,4	>500	199,7 $\pm$ 0,9	>500
AT9 H	28,7 $\pm$ 1,7	>500	20,2 $\pm$ 1,7	91,9 $\pm$ 0,1	>500	169,6 $\pm$ 1,0	>500
ON1 A	10,9 $\pm$ 0,9	235,2 $\pm$ 0,3	437,7 $\pm$ 4,7	54,9 $\pm$ 0,7	>500	64,31 $\pm$ 1,0	>500
ON1 H	16,4 $\pm$ 1,0	263,0 $\pm$ 0,3	398,3 $\pm$ 4,9	150,8 $\pm$ 1,2	>500	82,63 $\pm$ 2,1	>500
ON2 A	11,0 $\pm$ 1,0	212,0 $\pm$ 0,2	479,3 $\pm$ 5,4	62,2 $\pm$ 1,8	>500	>500	>500
ON2 H	7,0 $\pm$ 1,8	314,5 $\pm$ 0,1	162,1 $\pm$ 2,4	75,52 $\pm$ 1,5	>500	64,31 $\pm$ 1,0	>500
ON3 A	5,4 $\pm$ 2,1	192,3 $\pm$ 0,8	201,0 $\pm$ 2,8	88,6 $\pm$ 1,0	>500	>500	>500
ON3 H	6,6 $\pm$ 0,8	301,7 $\pm$ 0,1	102,9 $\pm$ 2,0	120,7 $\pm$ 1,5	>500	>500	>500
ON4 A	12,0 $\pm$ 0,8	358,0 $\pm$ 0,1	326,8 $\pm$ 4,1	59,8 $\pm$ 1,7	>500	>500	>500
ON4 H	6,8 $\pm$ 0,9	375,3 $\pm$ 0,1	447,7 $\pm$ 6,0	67,3 $\pm$ 2,0	>500	323 $\pm$ 3,1	>500
ON5 A	5,4 $\pm$ 1,2	351,3 $\pm$ 0,6	66,2 $\pm$ 2,6	61,6 $\pm$ 1,0	>500	>500	>500
ON5 H	3,9 $\pm$ 1,1	305,0 $\pm$ 0,7	140,0 $\pm$ 3,4	52,9 $\pm$ 1,5	>500	>500	>500
ON6 A	6,6 $\pm$ 1,4	250,8 $\pm$ 0,3	302,3 $\pm$ 4,0	106,2 $\pm$ 1,2	>500	309,3 $\pm$ 1,2	>500
ON6 H	4,4 $\pm$ 1,5	285,3 $\pm$ 0,4	318,2 $\pm$ 4,0	45,1 $\pm$ 0,8	>500	>500	>500
ON7 A	5,3 $\pm$ 1,2	299,9 $\pm$ 1,4	242,6 $\pm$ 3,3	50,8 $\pm$ 0,4	>500	>500	>500
ON7 H	3,3 $\pm$ 1,0	195,0 $\pm$ 0,3	88,8 $\pm$ 4,5	45,12 $\pm$ 0,8	>500	142,9 $\pm$ 0,4	>500
SS1 A	57,0 $\pm$ 0,9	>500	84,2 $\pm$ 1,2	104,6 $\pm$ 1,5	>500	>500	>500
SS1 H	26,8 $\pm$ 0,3	>500	21,4 $\pm$ 1,0	90,0 $\pm$ 1,3	>500	169,6 $\pm$ 0,5	>500
SS2 A	52,0 $\pm$ 1,4	>500	284,0 $\pm$ 0,3	76,5 $\pm$ 0,6	>500	>500	>500
SS2 H	21,3 $\pm$ 2,9	>500	58,3 $\pm$ 2,0	72,9 $\pm$ 0,8	>500	>500	>500
SS3 A	10,3 $\pm$ 4,0	>500	16,3 $\pm$ 2,9	63,0 $\pm$ 1,6	>500	>500	>500
SS3 H	28,7 $\pm$ 0,2	>500	27,7 $\pm$ 3,0	54,7 $\pm$ 1,6	>500	>500	>500
SS4 A	31,8 $\pm$ 0,6	>500	94,8 $\pm$ 0,9	62,0 $\pm$ 0,9	>500	>500	>500
SS4 H	27,2 $\pm$ 0,4	>500	131,8 $\pm$ 2,5	22,2 $\pm$ 0,9	>500	>500	>500
SS5 A	68,8 $\pm$ 1,2	>500	10,8 $\pm$ 2,0	32,6 $\pm$ 1,6	>500	>500	>500
SS5 H	49,4 $\pm$ 1,0	>500	76,2 $\pm$ 2,8	40,8 $\pm$ 2,0	>500	>500	>500
SS6 A	32,0 $\pm$ 0,2	>500	73,9 $\pm$ 2,0	30,6 $\pm$ 1,2	>500	>500	>500
SS6 H	16,9 $\pm$ 1,0	>500	7,6 $\pm$ 1,0	21,6 $\pm$ 1,6	>500	>500	>500
Tb1	30,1 $\pm$ 1,7	291,7 $\pm$ 2,4	228,8 $\pm$ 1,5	1,5 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,5	66,8 $\pm$ 0,1	374,0 $\pm$ 0,33
Tb1 A	33,8 $\pm$ 0,2	>500	>500	196,1 $\pm$ 0,9	>500	84,8 $\pm$ 1,9	472,0 $\pm$ 1,9
Tb1 Ap	38,8 $\pm$ 0,3	>500	>500	198,8 $\pm$ 0,1	>500	94,8 $\pm$ 0,1	>500
Tb1 E	102,6 $\pm$ 0,3	>500	>500	449,3 $\pm$ 0,2	>500	>500	>500
Tb1 B	121,3 $\pm$ 2,3	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Tb1 Aq	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Lasio	157,3 $\pm$ 2,3	17,3 $\pm$ 0,7	242,6 $\pm$ 1,2	6,7 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 1,3	60,4 $\pm$ 0,1	374,2 $\pm$ 3,4
L-NMMA <sup>1</sup>	78,3 $\pm$ 6,5	68,5 $\pm$ 3,3	>500	XX	XX	XX	XX
Rifampicina <sup>2</sup>	XX	XX	XX	0,1 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1

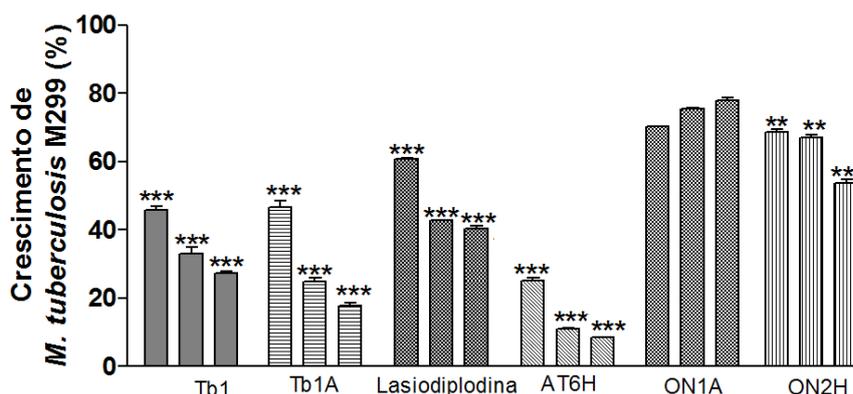
<sup>1</sup> Inibidor padrão de NO; <sup>2</sup> fármaco anti-TB padrão; Valores de média  $\pm$  DP; n=3; XX- não definido. (n=3).

## 5.2. Avaliação das amostras mais ativas quanto à inibição do crescimento do isolado clínico *M. tuberculosis* M299

Após o *screening* inicial onde as amostras de fungos endofíticos foram avaliados quanto à sua atividade antimicobacteriana em cultura de Mbv BCG e Mtb H37Rv, como também quanto à capacidade de inibir a produção de mediadores inflamatórios com baixa ou nenhuma citotoxicidade, as amostras mais promissoras (AT6H, ON1A, ON2H, Tb1, Tb1A e lasiodiplodina) e apresentando atividade *dual*, foram selecionadas para testes mais aprofundados em cultura de Mtb hipervirulenta.

Das seis amostras testadas, a fração ON1A não foi capaz de inibir o crescimento do isolado clínico M299, enquanto ON2H foi moderadamente ativa, apresentando MIC<sub>50</sub> 144,9 ± 1,1 µg/mL. A fração AT6H destacou-se por inibir mais de 60% do crescimento micobacteriano nas concentrações testadas (4, 20 e 100 µg/mL) exibindo MIC<sub>50</sub> 21,1 ± 1,0 µg/mL. As amostras Tb1, Tb1A e lasiodiplodina inibiram em torno de 50-85% nas maiores concentrações testadas apresentando valores de MIC<sub>50</sub> < 100 µg/mL (**Figura 14 e Tabela 3**).

Em relação ao potencial da rifampicina as amostras avaliadas neste ensaio foram menos ativas, contudo deve-se considerar que as mesmas mantiveram seu potencial inibitório enquanto para a rifampicina foi necessário elevar a concentração utilizada em dez vezes para obtenção da atividade observada anteriormente nos testes antimicobacterianos anteriores.



**Figura 14** - Efeito das amostras de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *A. tomentosa*, *O. notata* e *T. bullata* no crescimento do isolado clínico Mtb M299. A suspensão bacteriana ( $1 \times 10^6$  CFU/poço) de Mtb M299 foi tratada ou não tratada com as amostras nas concentrações de (4, 20 e 100 µg/mL) ou com o fármaco anti-TB padrão rifampicina (0,008 - 10 µg/mL) durante 5 dias. Após este período, o método do MTT foi utilizado para estudo do efeito inibitório. As barras para cada amostra referem-se às concentrações em ordem crescente. Valores são reportados como média ± desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,01$  (\*\*).

**Tabela 3-** Concentração inibitória mínima (50% e 90%) apresentada pelas amostras de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *A. tomentosa*, *O. notata* e *T. bullata* na inibição do crescimento micobacteriano de Mtb M299.

Amostras	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)
	M299	
AT6 H	21,1±1,0 <sup>a</sup>	>500
ON1 A	309±1,0	>500
ON2 H	144,9±1,1 <sup>c</sup>	>500
Tb1	80,0±0,1 <sup>b</sup>	>500
Tb1 A	69,4±0,1 <sup>b</sup>	>500
Lasio	92,2±1,8 <sup>b</sup>	>500
Rifampicina <sup>1</sup>	1,1±0,1	2,7±0,5

<sup>1</sup> fármaco anti-TB padrão

Os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de cada amostra foram exibidos como média ± DP (n=3). Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-b) são significativamente diferentes (p< 0,05 ou p< 0,001; determinado pelo teste de Tukey).

Tendo em vista, os resultados apresentados e o fracionamento mais detalhado com a obtenção de uma substância isolada, as amostras do fungo endofítico *Sordaria sp.* oriundas da espécie vegetal *T. bullata* (Tb1, Tb1A e lasiodiplodina) foram selecionadas para testes mais aprofundados nos âmbitos anti-inflamatório e antimicobacteriano. Devido à citotoxicidade apresentada na concentração de 500 µg/mL, a mesma foi excluída das demais avaliações.

### 5.3. Avaliação de Tb1, Tb1A e lasiodiplodina obtidos do fungo *Sordaria sp.* na inibição do crescimento de cepas *M. kansasii*

Entre as micobacterias não tuberculosas (MNT) potencialmente patogênicas, *M. kansasii* é a segunda mais comuns em infecções em humanos (MORIMOTO *et al.*, 2014).

O diagnóstico diferencial da TB e o tratamento para infecções pulmonares por Mkan são complexos, além disso, os sinais clínicos manifestados por Mkan se assemelham ao observado para TB e observa-se a formação de biofilmes pelas MNT (COWMAN *et al.*, 2012; RYU *et al.*, 2016).

Aprofundando os estudos de avaliação do potencial antimicobacteriano de Tb1, Tb1A e da substância isolada lasiodiplodina, avaliou-se a atividade inibitória das amostras frente ao crescimento de três cepas de Mkan, com diferentes níveis

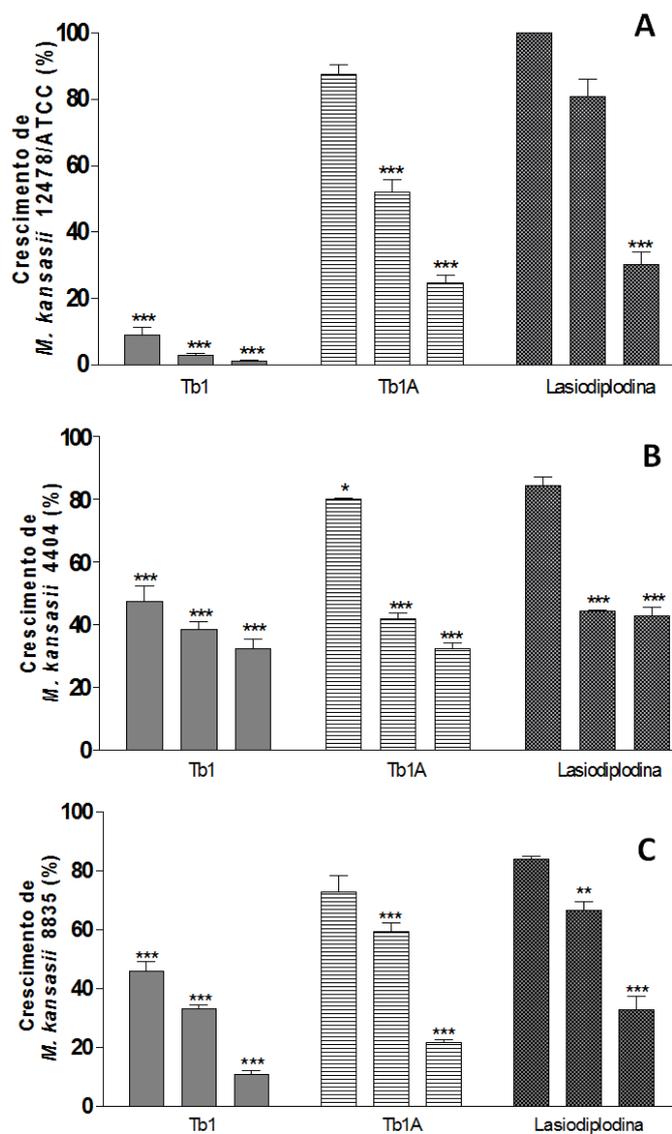
de virulência: a cepa padrão 12478/ATCC, a cepa de baixa virulência 4404 e a cepa de alta virulência 8835.

Como pode ser observado na **Figura 15**, todas as amostras apresentaram capacidade de inibir em torno de 60-90% do crescimento de Mkan nas maiores concentrações testadas. O extrato TB1 foi mais ativo frente a todas as cepas avaliadas quando comparado a sua fração em acetato de etila e a substância isolada. Em comparação aos valores de MIC<sub>50</sub> obtidos para as cepas Mtb H37Rv e M299, o extrato Tb1 e a fração Tb1A foram mais ativos em inibir o crescimento das micobactérias não tuberculosas Mkan enquanto a lasiodiplodina manteve o potencial para ambas as cepas de Mtb e Mkan (**Tabela 4**).

**Tabela 4** - Concentração inibitória mínima (50% e 90%) apresentada pelo extrato Tb1, fração Tb1A e lasiodiplodina obtidos do fungo endofítico *Sordaria* sp. isolado de *T. bullata* na inibição do crescimento micobacteriano de cepas de *M. kansasii*.

Amostras	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)
	12478/ATCC		4404		8835	
<b>Tb1</b>	1,41±0,6 <sup>a</sup>	>500	2,25±3,3 <sup>a</sup>	>500	3,38±1,0 <sup>a</sup>	>500
<b>Tb1 A</b>	25,27±0,4 <sup>b</sup>	>500	20,85±0,8 <sup>b</sup>	>500	23,03±0,8 <sup>b</sup>	>500
<b>Lasio</b>	58,78±0,7 <sup>b</sup>	>500	34,4±1,4 <sup>b</sup>	>500	42,65±05 <sup>b</sup>	>500
<b>Rifampicina</b>	0,004±0,6 <sup>a</sup>	>500	0,004±1,5 <sup>a</sup>	>500	0,001±1,1 <sup>a</sup>	>500
<b>Isoniazida</b>	0,005±2,0 <sup>a</sup>	>500	0,004±1,5 <sup>a</sup>	>500	0,012±0,7 <sup>a</sup>	>500

Os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de cada amostra foram exibidos como média ± DP. (n=3) Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-b) são significativamente diferentes (p< 0,05 ou p< 0,001; determinado pelo teste de Tukey).



**Figura 15** - Avaliação da capacidade inibitória do extrato TB1, da fração TB1A e lasiodiplodina do fungo *Sordaria* sp. no crescimento das cepas de *M. kansasii*. O gráfico (A) representa os resultados obtidos para a cepa 12478/ATCC, (B) cepa 4404e (C) cepa 8835. As suspensões bacterianas ( $1 \times 10^6$  CFU/poço) das cepas de Mkan foram tratadas ou não com as amostras nas concentrações de (4, 20 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou com os fármacos rifampicina e isoniazida (0,0032 - 2  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 7 dias. Após este período, o método do MTT foi utilizado para estudo do efeito inibitório. As barras para cada amostra referem-se às concentrações em ordem crescente. Valores são reportados como média  $\pm$  desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,01$  (\*\*).

#### 5.4. Avaliação das amostras mais ativas quanto à inibição do crescimento micobacteriano intracelular em cultura de macrófagos RAW 2647 infectados por Mbv BCG, Mtb H37Rv e M299.

Os macrófagos são as primeiras células a serem infectadas por *M. tuberculosis* e a ativação continuada destas células, quimioatrai outras células imunes ao foco da lesão e deve ser controlada a fim de evitar danos teciduais excessivos (GARLANDA *et al.*, 2007). Substâncias capazes de inibir o

crescimento intracelular dos bacilos nos macrófagos infectados são candidatos promissores para estudos farmacológicos aprofundados, uma vez que o potencial das amostras é testado no microambiente que mimetiza a fase intracelular da infecção natural da TB (MARRAPU *et al.*, 2011).

Após avaliar o potencial das amostras de fungos endofíticos diretamente em cultura bacteriana, Tb1, Tb1A e a lasiodiplodina foram analisadas quanto a capacidade de inibir o crescimento micobacteriano intracelular por Mbv BCG, Mtb H37Rv ou Mtb M299 e a viabilidade do bacilo foi verificada através da contagem das unidades formadoras de colônia (CFU).

Para atestar a viabilidade e o crescimento bacteriano durante o experimento, as culturas somente infectadas referentes ao controle positivo foram lisadas e semeadas, no dia 0 e dia 4 de infecção. A baixa concentração micobacteriana de infecção foi escolhida por não alterar a viabilidade dos macrófagos no período de observação (ZHANG *et al.*, 1999).

Como observado na **Figura 16**, as três amostras testadas foram capazes de inibir o crescimento intracelular das cepas estudadas, sendo significativo ( $p < 0,001$ ) nas maiores concentrações testadas.

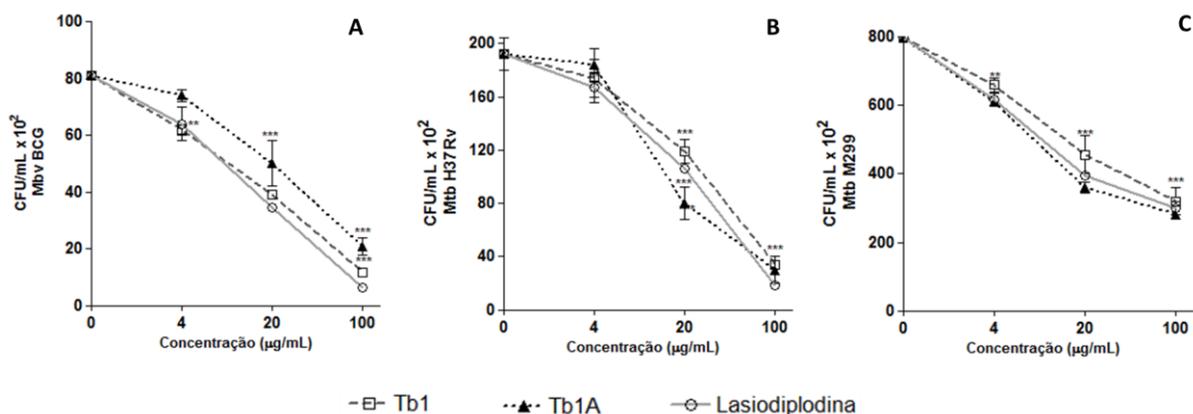
Com relação ao potencial inibitório das amostras frente ao crescimento intracelular de Mbv BCG, o extrato Tb1 e a substância isolada lasiodiplodina foram mais ativas que a fração em acetato de etila, que exibiu valor de MIC<sub>50</sub> superior ( $p < 0,01$ ) (**Tabela 5**).

Contudo, quando observado a capacidade das amostras inibirem o crescimento intracelular da cepa de baixa virulência, Mtb H37Rv, a fração Tb1A apresentou maior potencial do que o extrato Tb1 (**Figura 16B**). Este maior efeito em cepa Mtb também foi observado nos experimentos realizados com estas amostras diretamente em cultura bacteriana (**Tabela 2**). As amostras Tb1A e a lasiodiplodina apresentaram MIC<sub>50</sub>  $< 21 \mu\text{g/mL}$ , cerca de metade do valor exibido pelo extrato Tb1 (**Tabela 5**).

A três amostras testadas apresentaram significativo potencial de inibição ( $p < 0,001$ ) do crescimento intracelular da cepa hipervirulenta proveniente do isolado clínico, Mtb M299, com valores de MIC<sub>50</sub> inferior a  $43 \mu\text{g/mL}$ , destacando a fração em acetato de etila e a lasiodiplodina como mais ativas (**Tabela 5**).

Deve-se notar que mesmo na presença da cepa hipervirulenta as amostras conseguiram manter a capacidade inibitória com baixa ou nenhuma interferência

da toxicidade como demonstrado anteriormente (**Tabela 2**). Deste modo, o extrato (Tb1), a fração em acetado de etila (Tb1A) e substância isolada (lasiodiplodina) oriundas do fungo endofítico *Sordaria sp*, possuem capacidade de atuar na inibição do crescimento micobacteriano diretamente em suspensão bacteriana ou na cultura de macrófago infectado, mostrando ação seletiva.



**Figura 16** - Efeito do extrato, fração em acetato de etila e lasiodiplodina obtidos do fungo *Sordaria sp*. isolado de *T. bullata* em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados por diferentes cepas de *Mycobacterium*. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com *M. bovis* BCG (**A**) e Mtb H37Rv (**B**) e M299 (**C**) na razão de infecção de 1:1 (macrófago:micobactéria) e tratadas com as amostras na concentração de 4, 20 e 100 µg/mL por 4 dias. A viabilidade intracelular do bacilo foi determinada por contagem do CFU. (n=3). Valores foram reportados como média ± desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,01$  (\*\*).

**Tabela 5** - Concentração inibitória mínima (50%) apresentada pelo extrato, fração e Lasiodiplodina do fungo endofítico isolado da *Tocoyena bullata* na inibição do crescimento micobacteriano em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados por *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv e M299.

Amostras	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
	Mbv BCG		Mtb H37Rv		Mtb M299	
Tb1	16,6±1,6 <sup>b</sup>	>500	39,2±1,7 <sup>a</sup>	>500	43,4±1,7 <sup>b</sup>	>500
Tb1 A	33,7±1,8 <sup>a</sup>	>500	17,8±1,5 <sup>b</sup>	>500	23,3±1,7 <sup>a</sup>	>500
Lasio	14,2±1,3 <sup>b</sup>	>500	21,8±1,6 <sup>b</sup>	>500	31,6±1,6 <sup>ab</sup>	>500

Os valores de MIC<sub>50</sub> de cada amostra foram exibidos como média ± DP. (n=3) Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-b) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$ ; determinado pelo teste de Tukey).

### 2.5.5. Avaliação das amostras mais ativas quanto a inibição da produção dos mediadores inflamatórios IL-1β e PGE<sub>2</sub> em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS

As amostras Tb1, Tb1A e a lasiodiplodina oriundas do fungo endofítico *Sordaria sp*. foram verificados quanto à capacidade de inibir a produção de IL-1β

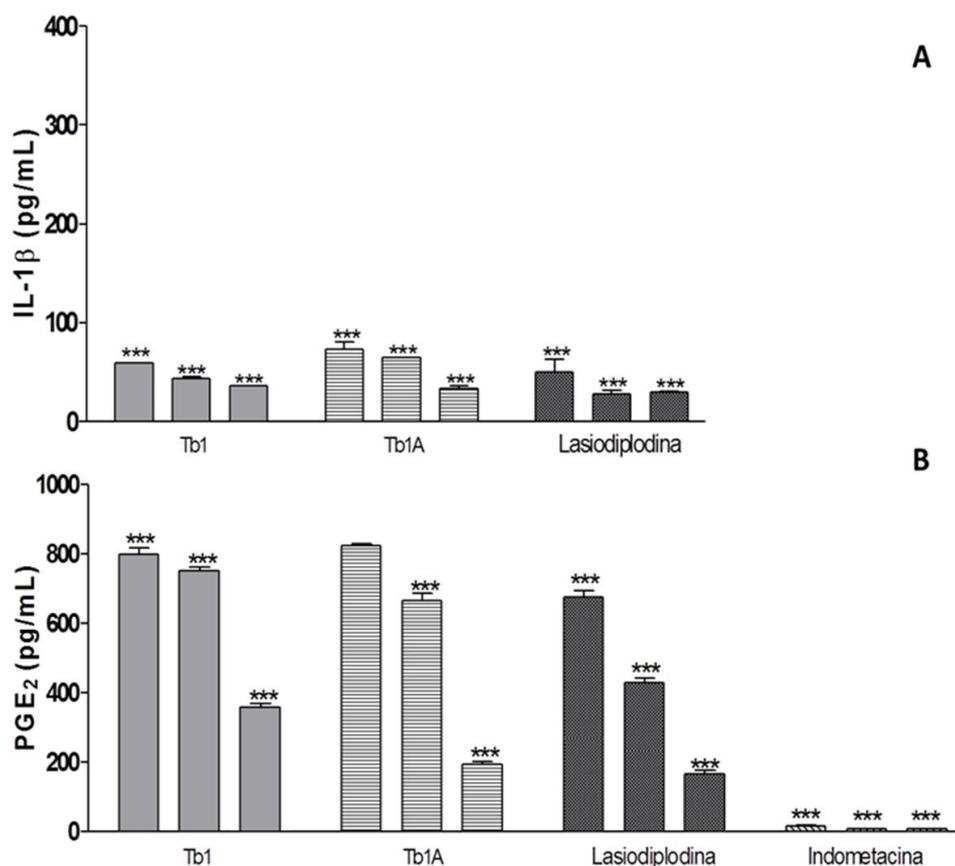
e PGE<sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS através do ensaio de ELISA do tipo sanduíche, nas concentrações de 4, 20 e 100 µg/mL.

A IL-1β possui importante papel no direcionamento e sustentação da inflamação crônica associada a uma série de doenças autoimunes e desordens metabólicas. A presença de níveis sistêmicos elevados de IL-1β durante a infecção por *M. tuberculosis* têm sido associada à extensa necrose no fígado e aumentada mortalidade (GARLANDA *et al.*, 2007).

O mediador inflamatório lipídico, PGE<sub>2</sub>, pertence à classe de prostanoídes derivado do ácido araquidônico, que uma vez liberado da membrana fosfolipídica pela ação de fosfolipases é metabolizado em PGE<sub>2</sub> pela ação das cicloxigenases. A produção aumentada de PGE<sub>2</sub> é observada em diversas condições patológicas decorrentes de excessiva resposta inflamatória (FOSSLIEN, 2001).

A capacidade de inibição da produção de IL-1β foi elevada para todas as amostras testadas (Tb1, Tb1A e lasiodiplodina), apresentando MIC<sub>50</sub> (3,04 ± 0,3 µg/mL, 3,03 ± 1,0 µg/mL e 3,07 ± 0,3 µg/mL, respectivamente) (**Tabela 7**). O potencial de inibição verificado nas maiores concentrações utilizadas não mostrou interferência do efeito citotóxico como mostrado anteriormente no *screening* inicial efetuado (**Tabela 2**).

Quando avaliado a capacidade destas amostras em inibir a produção de PGE<sub>2</sub>, a substância isolada lasiodiplodina (IC<sub>50</sub> 37,7±0,3 µg/mL) foi a mais ativa. A fração em acetato de etila Tb1A (IC<sub>50</sub> 64,2±0,3 µg/mL), apresentou atividade moderada com potencial inibitório principalmente na maior concentração testada (100 µg/mL), enquanto o extrato Tb1 (IC<sub>50</sub> 93,6±0,8 µg/mL) demonstrou baixo efeito inibitório e somente na concentração de 100 µg/mL. Comparado à ação da indometacina, as amostras foram menos ativas em inibir a produção de PGE<sub>2</sub> (**Figura 17**).



**Figura 17** - Efeito do extrato, fração e lasiodiplodina oriundos do fungo endofítico *Sordaria* sp. na produção dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub> por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/mL) na presença das amostras (4, 20 e 100  $\mu$ g/mL) durante 24 h. Os sobrenadantes da cultura foram coletados e avaliados por ELISA do tipo sanduíche para IL-1 $\beta$  (**A**) e PGE<sub>2</sub> (**B**). Os valores obtidos para cada amostra foram comparados a cultura de macrófagos não estimulada e não tratada (C-) e a cultura somente estimulada com LPS (C+). Para (**A**) correspondem respectivamente a 0,03  $\pm$  0,1 pg/mL e 922,0  $\pm$  4,6 pg/mL enquanto para (**B**) corresponde a 0,05  $\pm$  0,1 pg/mL e 436,0  $\pm$  5,8 pg/mL. O fármaco indometacina foi utilizado a fim de comparação do potencial inibitório da produção de PGE<sub>2</sub>, nas concentrações de 0,2, 0,04 e 0,004  $\mu$ g/mL. As barras para cada amostra referem-se às concentrações testadas em ordem crescente. Valores foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*) .

**Tabela 6**- Concentração inibitória mínima (50%) apresentada pelo extrato, fração e Lasiodiplodina do fungo endofítico isolado da *Tocoyena bullata* na inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub>) em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

Amostras	IC50 ( $\mu$ g/mL)	
	IL-1 $\beta$	PGE <sub>2</sub>
Tb1	3,04 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	93,6 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
Tb1 A	3,03 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	64,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Lasio	3,07 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	37,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
Indometacina	XXX	4,7 $\pm$ 0,1

Os valores de MIC<sub>50</sub> de cada amostra foram exibidos como média  $\pm$  DP. (n=3) Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-b) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$ ; determinado pelo teste de Tukey).

## 5.6. Avaliação da atividade antioxidante do extrato Tb1, da fração Tb1A e da substância isolada através do método do SNP

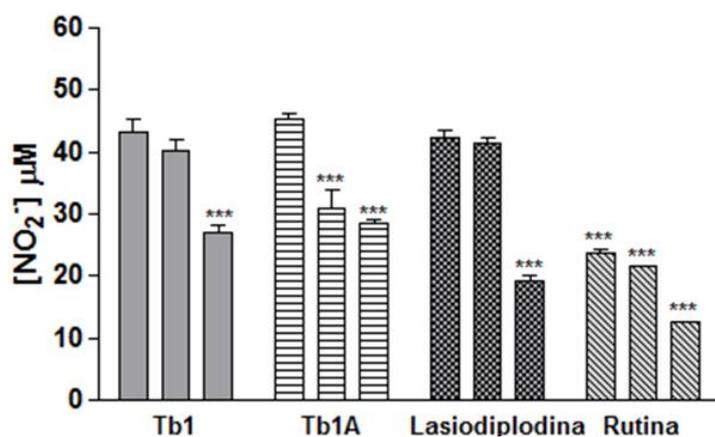
O processo inflamatório conduz a produção de diversos radicais livres de oxigênio (RLO) e nitrogênio (RLN), que exercem importantes funções no controle de doenças infecciosas, mas que também estão associados ao agravamento de processos inflamatórios e degenerativos (BOGDAN, 2001). A neutralização dos radicais livres pode ser aplicada na minimização dos danos teciduais nos quadros inflamatórios.

Tendo como objetivo avaliar o mecanismo de ação pelo qual as amostras Tb1, Tb1A e lasiodiplodina utilizam para inibir a produção de NO, foi verificado inicialmente se estas amostras eram capazes de sequestrar o radical livre NO produzido pelos macrófagos estimulados e disponibilizado no sobrenadante da cultura celular.

Para tal, utilizou-se o método do SNP, uma substância doadora de NO quando em solução e na presença de luz. Para mimetizar a produção de NO observada na cultura de macrófagos estimulados, foi utilizado a concentração de 10 mM de SNP no tempo de incubação de 150 minutos, protocolo previamente padronizado (CALIXTO, 2016).

Neste ensaio, as amostras Tb1, Tb1A e lasiodiplodina foram diluídas somente em meio de cultura DMEM-F12 e posteriormente foi acrescentado a solução de SNP.

O extrato Tb1 e a substância isolada lasiodiplodina demonstraram baixa capacidade de sequestrar o radical NO quando comparado ao potencial do flavonoide rutina, conhecido pela atividade antioxidante, apresentando valores de  $IC_{50}$  (**Tabela 7**) pelo menos 10 vezes maior do que o exibido pela rutina ( $7,3 \pm 1,0$   $\mu\text{g/mL}$ ). Dentre as amostras testadas, a fração em acetato de etila Tb1A apresentou moderado potencial de seqüestro, apresentando  $IC_{50}$   $51,4 \pm 1,3$  (**Figura 18**). A capacidade de sequestrar o radical livre NO pode ser um dos mecanismos utilizados por Tb1A para inibição da produção deste mediador inflamatório, observado na **Tabela 2**, enquanto para o extrato e a lasiodiplodina, outro mecanismo de ação está majoritariamente envolvido.



**Figura 18** - Efeito do extrato, fração Tb1A e lasiodiplodina obtido do fungo endófito *Sordaria* sp. isolado da espécie vegetal *T. bullata* no sequestro do radical livre NO. As amostras foram diluídas em meio de cultura DMEM-F12 nas concentrações de 4, 20 e 100 μg/mL e acrescidas da solução de SNP (10 mM), por 90 min a temperatura ambiente. O método de Griess foi utilizado para quantificação do nitrito presente em solução. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura DMEM-F12 e como controle positivo meio de cultura DMEM-F12 acrescido com 10 mM de SNP. O flavonoide rutina foi utilizado como referência de potencial antioxidante. As três barras para cada amostra são referentes às concentrações testadas em ordem crescente. Valores são reportados como média ± desvio padrão, e valores diferentes do cotrole positivo foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*) . (n=3).

**Tabela 7**- Concentração inibitória mínima (50%) apresentada pelo extrato, fração Tb1A e lasiodiplodina fungo endófito isolado da espécie vegetal *T. bullata* no sequestro dos radicais livres avaliados pelo método do SNP.

Amostras	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
Tb1	83,1±1,3 <sup>b</sup>
Tb1A	51,4±1,6 <sup>a</sup>
Lasio	92,1±0,3 <sup>b</sup>
Rutina	7,3±1,0

O valor de IC<sub>50</sub> de cada amostra foi exibido como média ± DP. ( n=3). Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-e) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$ ).

### 5.7. Avaliação das amostras selecionadas na modulação da expressão enzimática da iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS

A enzima óxido nítrico sintase induzida, iNOS, é responsável pela conversão da L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO tendo como doador de elétrons o NADPH. A exposição a produtos microbianos, como LPS induzem a expressão enzimática da iNOS em várias células inflamatórias e é responsável

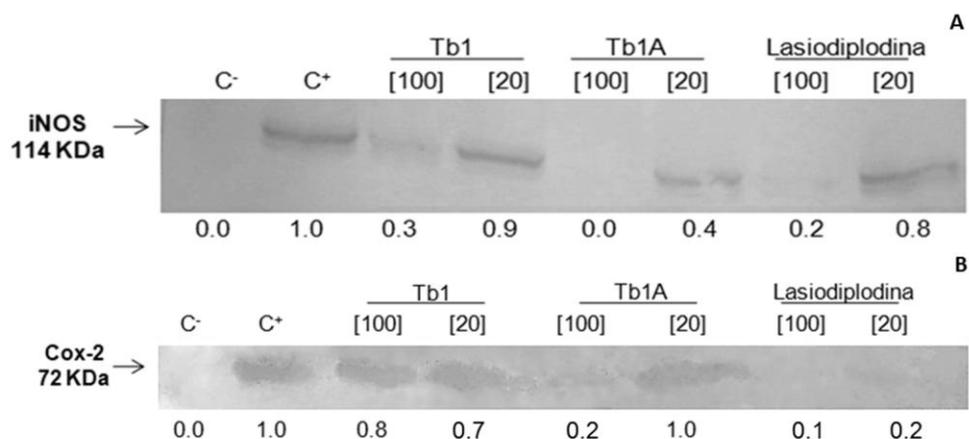
pela produção de altos níveis de NO durante períodos prolongados (MOLLACE *et al.*, 2005).

O estímulo inflamatório também é responsável pela indução da expressão enzimática da COX-2, e consequente síntese de prostaglandinas (RAO *et al.* 2008). A produção excessiva de NO e prostaglandinas, devido a elevada expressão das enzimas iNOS e COX-2, está associada ao papel patológico da inflamação e evidenciam a importância de substâncias que possam modular a expressão enzimática das mesmas (MOLLACE *et al.*, 2005).

Para a avaliação da modulação da expressão destas enzimas foi utilizada a técnica de eletroforese SDS-PAGE, seguido por Western blot. Foram utilizadas duas concentrações (100 e 20 µg/mL) de cada amostra selecionada para o tratamento da cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. O peso molecular padrão foi utilizado para confirmar a marcação da banda protéica de interesse, tendo a enzima iNOS peso molecular de aproximadamente 114 kDa enquanto a COX-2 possui 72 kDa.

Como observado na **Figura 19A** e pelos dados de densitometria da imagem, todas as amostras foram capazes de inibir quase completamente a produção da iNOS na concentração de 100 µg/mL, em comparação ao controle positivo (C<sup>+</sup>), cultura de macrófagos somente estimulado com LPS. Na concentração de 20 µg/mL, o extrato Tb1 e a lasiodiplodina não mantiveram sua capacidade de inibição, enquanto a fração em acetato de etila Tb1A continuou a apresentar capacidade de inibir a expressão enzimática da iNOS. Estes resultados estão de acordo com a curva de concentração-resposta obtida no *screening* inicial, para cada amostra (**Tabela 2**).

Avaliando os resultados obtidos para as amostras quanto à capacidade de inibir a expressão enzimática de COX-2, observou-se que a lasiodiplodina inibiu significativamente a produção deste mediador nas concentrações de 100 e 20 µg/mL. A fração Tb1A foi capaz de inibir a expressão da enzima COX-2 somente na maior concentração avaliada enquanto o extrato Tb1 demonstrou baixo potencial de inibição (**Figura 19B**). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos para a avaliação da inibição da produção de PGE<sub>2</sub> (**Figura 17**).



**Figura 19-** Efeito do extrato Tb1, fração Tb1A e lasiodiplodina obtidos do fungo endofítico *Sordaria* sp. isolado das espécies vegetal *T. bullata* sobre a expressão enzimática da iNOS e COX-2 de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. As células estimuladas com LPS (1 µg/mL) e tratadas ou não (100 e 20 µg/mL) por 24 h, foram lisadas e submetidas a análise por Western blot para avaliação da expressão da enzima iNOS (A) e COX-2 (B). As células estimuladas com LPS foram utilizadas como controle positivo de estimulação de macrófagos (C<sup>+</sup>). As células não estimuladas foram usadas como controle negativo (C<sup>-</sup>) (n=2). Na parte inferior de cada imagem, foi quantificado por análise densitométrica a imunoreatividade das bandas. Cada banda foi comparada com a respectiva banda de controle positivo na mesma membrana e o valor para o controle positivo (células estimuladas por LPS) foi definido como 1 e outras condições foram calculadas de forma correspondente para permitir comparações de relação.

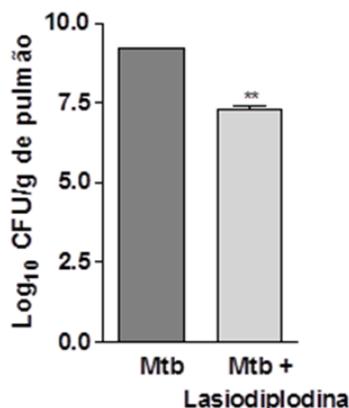
### 5.8. Avaliação do efeito terapêutico da lasiodiplodina no modelo murino C57BL/6 infectado por cepa hipervirulenta *M. tuberculosis* M299

Após a avaliação *in vitro* das amostras obtidas quanto à atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana, a lasiodiplodina, foi selecionada como substância mais ativa para continuação dos estudos visando a abordagem *dual* para o tratamento da tuberculose pulmonar.

A avaliação do efeito terapêutico da lasiodiplodina foi efetuada em modelo murino C57BL/6 infectado pela cepa *M. tuberculosis* hipervirulenta, já estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa (AMARAL *et al.*, 2014 e RIBEIRO *et al.*, 2014). Este modelo se caracteriza pela indução de tuberculose progressiva, crescimento bacilar nos pulmões e reprodução de várias manifestações patológicas das formas clínicas severas da TB humana, incluindo pneumonia tuberculosa com áreas de necrose e disseminação miliar para o baço e o fígado (AMARAL *et al.*, 2014). Assim, o estabelecimento deste modelo animal possibilitou o estudo do efeito terapêutico da lasiodiplodina na redução das lesões necróticas (prevenção ou minimização dos danos teciduais) e no crescimento do bacilo. Devido à

quantidade limitada da lasiodiplodina, realizamos um estudo piloto utilizando baixo número de animais (2 animais/grupo) e repetindo o experimento duas vezes.

Os animais tratados com a lasiodiplodina na dose de 20 mg/kg durante 15 dias de tratamento, diferiu significativamente do grupo de animais somente infectados ( $p < 0,01$ ), apresentando redução de 2,5 em  $\text{Log}_{10}$  do CFU, como demonstrado na **Figura 20**.



**Figura 20.** Efeito do tratamento com a lasiodiplodina no crescimento micobacteriano nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados por cepa *Mtb* hipervirulenta. Os camundongos foram infectados intratraquealmente com 100 bacilos da cepa *Mtb* M299, e após 15 dias de infecção foram tratados diariamente por 15 dias (via intraperitoneal) com lasiodiplodina (20 mg/Kg). O crescimento micobacteriano nos pulmões foi avaliado no dia 30 p.i. através da contagem de CFU. Os resultados obtidos em dois experimentos independentes estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de  $\text{Log}_{10}$  CFU/g de pulmão ( $n=4$ ).  $p < 0,01$  (\*\*) comparando o grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa de *Mtb* M299.

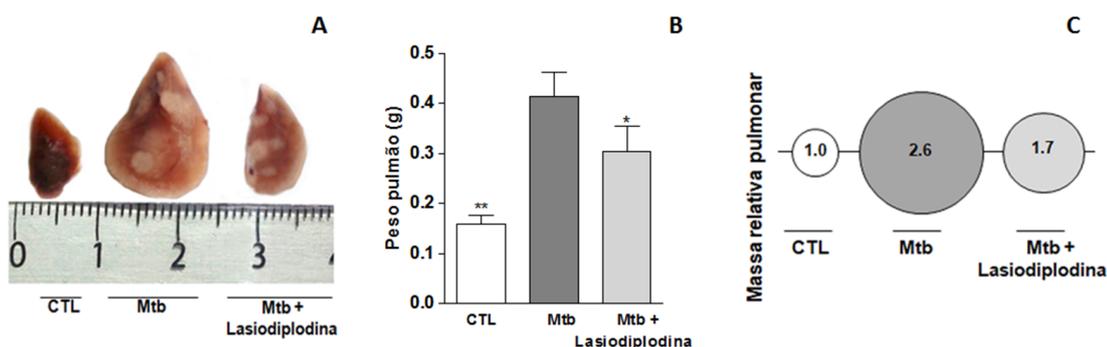
### 5.8.1. Efeito da lasiodiplodina na patologia dos pulmões de camundongos infectados

Para avaliar o efeito do tratamento com a lasiodiplodina na progressão da tuberculose severa, foi realizada a análise da patologia pulmonar no grupo dos animais infectados e tratados com lasiodiplodina, em comparação com os animais infectados e não tratados.

Os pulmões foram coletados 30 dias após a infecção. O lóbulo superior do pulmão esquerdo de cada animal foi fixado com formol e fotografado para comparação da macropatologia induzida (**Figura 21A**). O peso do pulmão inteiro dos diferentes grupos de animais foi verificado e apresentado em gramas como média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo (**Figura 21B**) e a massa pulmonar relativa dos grupos infectados foi obtida em relação ao grupo controle, não infectado (**Figura 21C**).

Como observado na **Figura 20A**, o pulmão do animal infectado mostrou-se maior do que o do animal não infectado e do animal infectado e tratado com lasiodiplodina por 15 dias. Macroscopicamente, os pulmões dos animais infectados apresentavam grandes lesões inflamatórias, onde pode-se observar nódulos difusos de coloração esbranquiçada de diferentes tamanhos, o que associa-se com o aumento do peso (**Figura 21B**) e da massa relativa pulmonar, que foi 2,6 vezes maior que dos animais de controle (**Figura 21C**). O peso pulmonar dos animais tratados com lasiodiplodina foi cerca de 20% menor do que o peso dos pulmões dos animais infectados ( $p < 0,05$ , **Figura 21B**) e a massa relativa dos pulmões destes animais reduziu em torno de 35% comparado ao exibido pelos animais infectados e não tratados (**Figura 21C**).

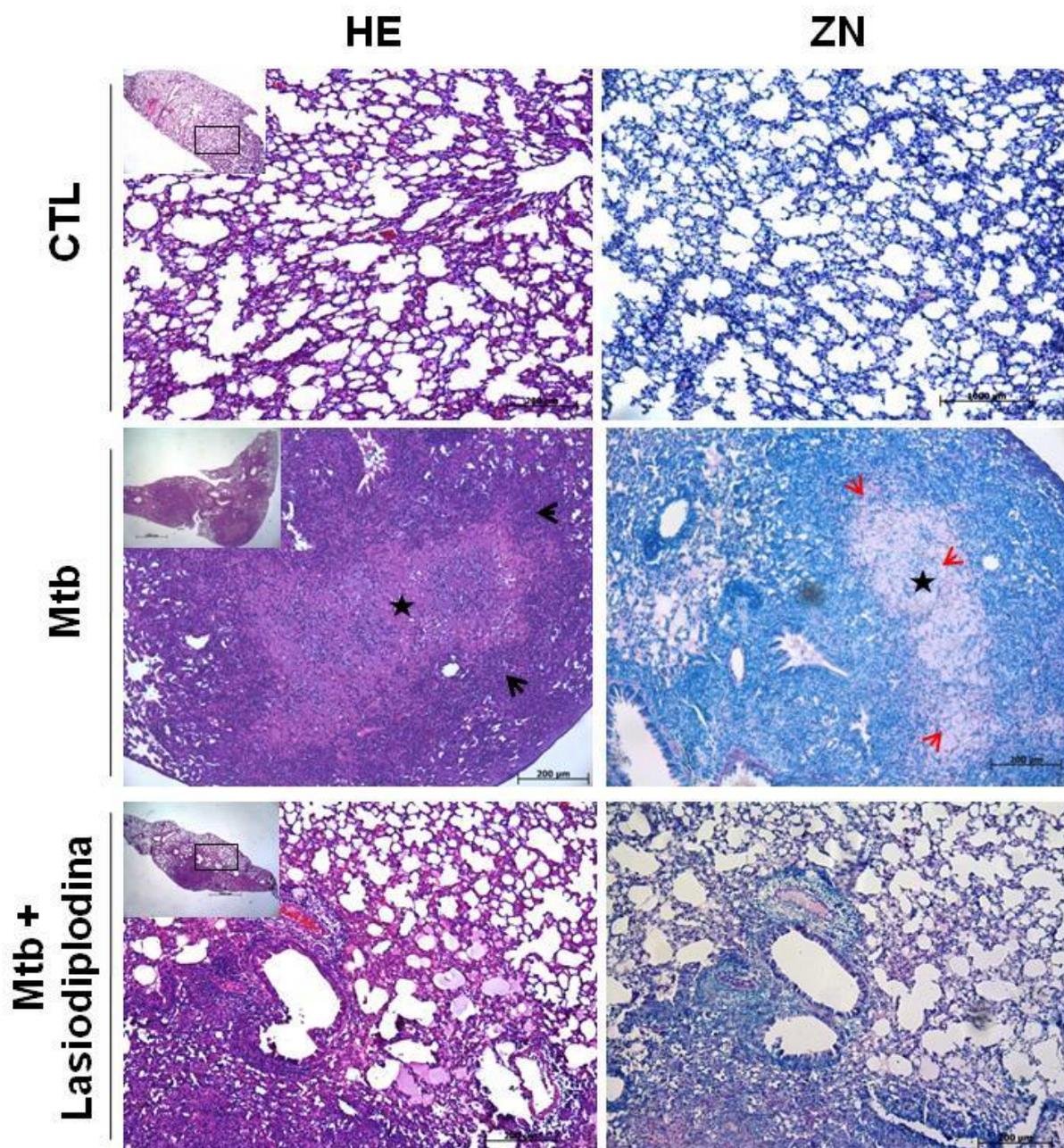
Além disso, os pulmões dos animais tratados exibiram menor número de lesões inflamatórias, que foram mais definidas e de menor tamanho, sugerindo a redução da intensidade de infiltração celular no pulmão pelas células inflamatórias.



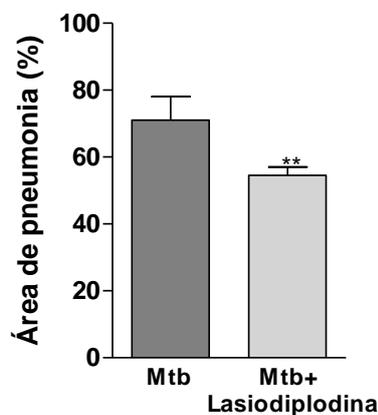
**Figura 21** - Efeito do tratamento com a lasiodiplodina na macropatologia pulmonar induzida nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa *Mtb* hipervirulenta. **(A)** Macropatologia do lóbulo superior do pulmão esquerdo obtido no dia 30 p.i. de um animal representativo de cada grupo. O peso do total do pulmão foi aferido em balança de precisão, e os resultados obtidos em dois experimentos independentes estão apresentados **(B)** como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ). A massa relativa pulmonar foi determinada através da razão entre a média do peso pulmonar dos animais de cada grupo em separado pela média do peso pulmonar dos animais controles **(C)**.  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,01$  (\*\*), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado.

O estudo histopatológico demonstrou que os pulmões dos animais infectados apresentaram extensas áreas de alveolite, necrose nas áreas granulomatosas e exsudato seroso nos alvéolos das regiões adjacentes (**Figura 22**). Grande quantidade dos bacilos ácido-resistentes (BAAR) foi observado nas amostras do tecido pulmonar coradas pelo método ZN. Após o tratamento com

a lasiodiplodina, grande parte do tecido pulmonar apresentava áreas livres da patologia e menor quantidade de BAAR (**Figura 22**). Os granulomas foram menores e sem necrose. A quantificação morfométrica da área de pneumonia tuberculosa nos animais tratados demonstrou uma redução em torno de 20% (**Figura 23**), comparado aos animais apenas infectados com Mtb.



**Figura 22** - Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (30 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 15 dias com lasiodiplodina. Os lóbulos superior esquerdo do pulmão foram fixados em formol e processados para a obtenção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e método de Ziehl Neelsen (ZN). As microfotografias foram obtidas com aumento de 100X. No canto superior direito de cada lâmina corada com H&E, encontra-se a secção do tecido total fotografada no aumento de 25X. Setas pretas indicam áreas de alveolite, enquanto as setas vermelhas e estrela indicam área necrótica. Os BAAR estão coradas em vermelho (ZN).

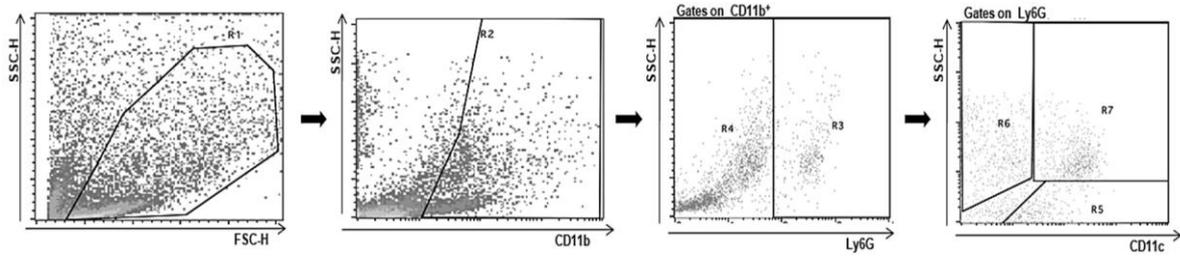


**Figura 23** - Análise morfométrica da área de pneumonia nos pulmões dos animais infectados sobre efeito do tratamento com a Lasiodiplodina. Imagens de dez seções dos pulmões de cada grupo de animais foram capturadas pela câmera Axiocam MCR-5 Zeiss, no aumento de 10X, e analisadas com o uso do programa Image J para a determinação morfométrica da área de inflamação no pulmão (área de pneumonia). Para quantificar área de pneumonia, foi calculada a porcentagem da área pulmonar não aerada em relação da área pulmonar total (100%) de cada grupo infectado, subtraindo da média percentual da área não aerada nos pulmões de controle (tecido pulmonar). Os resultados obtidos em dois experimentos independentes são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).  $p < 0,01$  (\*\*) comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa de Mtb M299.

### 5.8.2. Análise fenotípica das células inflamatórias nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com lasiodiplodina

Para entender o mecanismo do efeito terapêutico da lasiodiplodina na redução da patologia estudamos o influxo de leucócitos inflamatórios para os pulmões dos animais infectados através da avaliação fenotípica das subpopulações das células mieloides obtidos dos pulmões destes animais.

Inicialmente, considerou-se o gate de interesse contendo células positivas para expressão de CD11b, uma integrina expressa na superfície de células mieloides. A partir deste gate, o número de células positivas para expressão de Ly6G foi avaliada, uma proteína expressa majoritariamente por neutrófilos. As células CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> foram avaliadas quanto a expressão de CD11c, uma integrina expressa predominantemente na superfície de células dendríticas e em macrófagos alveolares, quanto para a expressão de Ly6C, um marcador das populações de monócitos (Ly6C<sup>low</sup>) e macrófagos ativados (Ly6C<sup>high</sup>) (**Figura 24**).

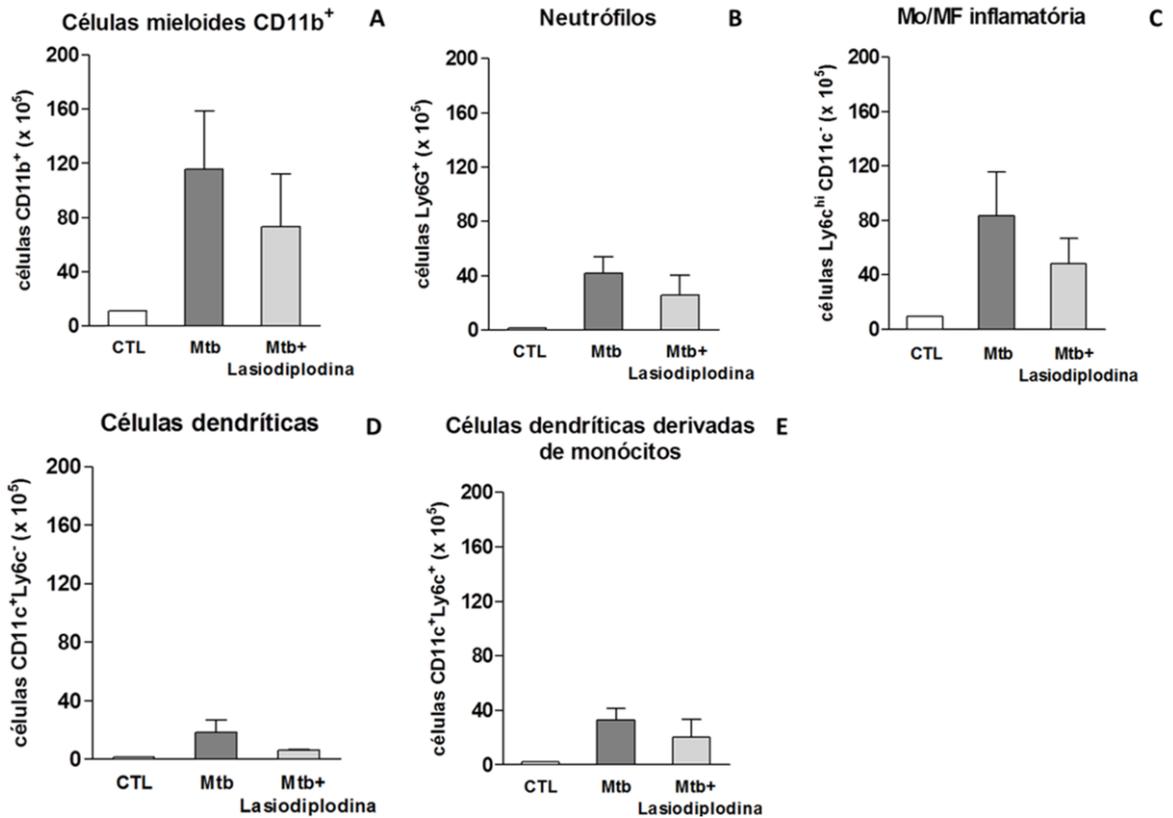


**Figura 24** - Dot plots representativos da imunofenotipagem da amostra de células mieloides obtidas do pulmão do animal infectado através da citometria de fluxo. As áreas delimitadas representam o selecionamento da população pretendida para avaliação.

De acordo com as análises microscópicas dos pulmões dos animais infectados, que demonstraram grandes aglomerados dos leucócitos, principalmente macrófagos e neutrófilos, os dados de citometria apresentaram elevado percentual de células  $CD11b^+$  (cerca de 30% de toda população celular analisada) nos pulmões dos animais após 30 dias de infecção (**Figura 25A**). O número destas células nos pulmões dos animais tratados com a lasiodiplodina foi menor do que nos animais infectados e não tratados.

Mais da metade das células  $CD11b^+$  expressavam também o marcador Ly6G, sugerindo que a maioria destas células foi representada pelos neutrófilos (**Figura 25B**).

A população das células  $CD11b^+ Ly6G^-$  incluiu duas principais subpopulações: células  $Ly6C^+ CD11c^-$  (incluindo monócitos e macrófagos inflamatórios) e células  $Ly6C^+ CD11c^+$  (incluindo células dendríticas e macrófagos alveolares ativados). Todas as populações celulares foram reduzidas nos pulmões dos animais tratados com lasiodiplodina (**Figura 25C-E**).



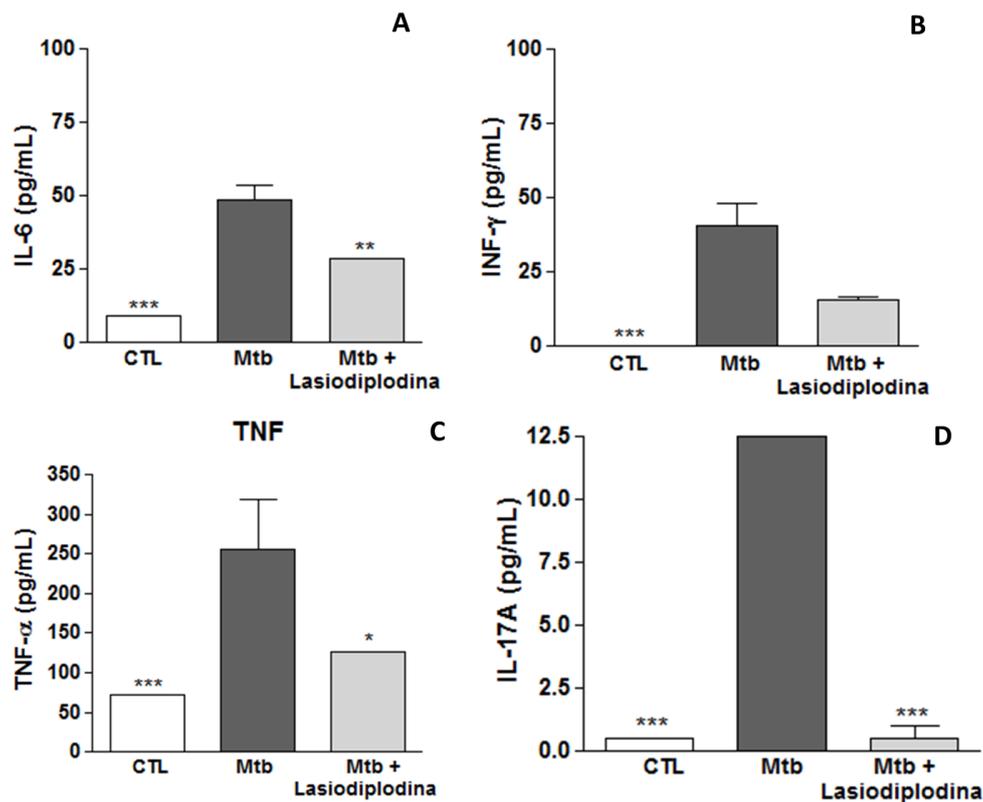
**Figura 25** - Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar dos animais infectados pela cepa Mtb hipervirulenta sobre efeito do tratamento com lasiodiplodina. O lóbulo inferior esquerdo e os lóbulos superior, médio e inferior direito dos pulmões dos camundongos infectados de cada grupo foi utilizado para obtenção das células. As células pulmonares de cada animal foram tratadas com uma combinação de anticorpos (anti-CD11b-PE, Ly6G-PercP, CD11c-APC, Ly6C-FITC). Posteriormente ao tratamento, as células foram fixadas e analisadas em citômetro de fluxo para identificação das subpopulações de células (A) mielóides, (B) neutrófilos, (C) macrófagos e monócitos inflamatórios (D), células dendríticas (E) e dendríticas derivadas de monócitos.

### 5.8.3. Análise do perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células dos pulmões dos camundongos infectados tratados com lasiodiplodina

Os perfis de citocinas/ quimiocinas produzidas pelas células pulmonares dos animais infectados são decorrentes dos diferentes níveis de ativação celular para cada sub-população no foco inflamatório granulomatoso (ALMEIDA *et al.*, 2017). Para avaliar o perfil de citocinas produzido pelas células pulmonares, a produção dos mediadores químicos (IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17A) foi quantificada no sobrenadante da cultura das células do pulmão cultivadas *ex vivo* por 48 h através do kit comercial CBA.

Quando comparado aos animais infectados e não tratados foi verificado altos níveis das citocinas pró-inflamatórias avaliadas, demonstrando uma potente

indução da resposta imune do tipo Th1 (**Figura 26**). Para os animais tratados com lasiodiplodina observou-se a diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias avaliadas, IL-6 ( $p < 0,01$ ), INF- $\gamma$  ( $p < 0,1$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0,5$ ) e IL-17A ( $p < 0,1$ ). A diminuição das citocinas pró-inflamatórias está associado à redução do acúmulo de células mieloides nos pulmões dos animais infectados e da patologia associada à infecção por cepas Mtb hipervirulentas.



**Figura 26** - Produção de citocinas pelas células pulmonares dos animais infectados com cepa Mtb hipervirulenta e tratados com a lasiodiplodina. Os gráficos representam os resultados obtidos para as citocinas: IL-6 (**A**), INF- $\gamma$  (**B**), TNF- $\alpha$  (**C**) e IL-17A (**D**). Os resultados foram obtidos em dois experimentos independentes e foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).  $p < 0,01$  (\*\*\*) ,  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*) comparando cada grupo com o grupo apenas infectado com a cepa Mtb M299.

## 6. DISCUSSÃO

Os fungos endofíticos constituem uma fonte promissora de novas substâncias bioativas proporcionando o isolamento de diversos metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, quinonas, terpenoides, xantonas, esteroides e outros. Tais metabólitos possuem aplicações na agricultura, indústria farmacêutica e na indústria biotecnológica (KUSARI *et al.*, 2012).

Neste estudo investigamos os efeitos antimicobacterianos e anti-inflamatórios de 51 amostras de fungos endofíticos obtidos de diferentes espécies vegetais. O *screening* inicial foi realizado através da avaliação dos efeitos inibitórios das amostras obtidas na produção de NO e TNF- $\alpha$  por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Também foi avaliado a citotoxicidade celular em cultura de macrófagos e os efeitos antimicobacterianos diretamente em cultura de *M. bovis* BCG e cepas Mtb H37Rv M299.

Para estudos de *screening* por novas substâncias anti-inflamatórias *in vitro*, o modelo de macrófagos murino RAW 264.7 estimulado por LPS tem sido amplamente utilizado por gerar um modelo de inflamação rápido e reproduzível para avaliação de substâncias com possível ação farmacológica em reduzir os níveis de mediadores inflamatórios em meio de cultura, importantes no processo fisiopatológico da inflamação (JUHN *et al.*, 2008). Portanto, o modelo celular utilizado neste trabalho para *screening* de produtos naturais com possível ação farmacológica apresenta consistência para avaliação de inibidores potenciais contra a produção de iNOS, NO e TNF- $\alpha$ .

Vinte e cinco amostras foram capazes de inibir a produção de NO enquanto apenas cinco destas apresentaram atividade inibitória da produção de TNF- $\alpha$ , o que pode sugerir mecanismos de ação diferentes para as amostras que apresentaram capacidade de inibir somente um dos mediadores inflamatórios. Em geral, as amostras de fungos endofíticos obtidos de *O. notata* (ON1A, ON1H, ON2A, ON6A) e *T. bullata* (Iasiodiplodina) foram mais ativas quanto à modulação de ambos os mediadores inflamatórios avaliados.

Produtos naturais provenientes de fungos endofíticos do gênero *Sordaria* sp. ainda não foram descritos na literatura quanto ao potencial anti-inflamatório. Em nosso trabalho, observamos que o extrato etanólico Tb1 apresentou similar capacidade inibitória da produção de NO que a fração em acetato etila Tb1A,

enquanto as demais frações demonstraram menor potencial inibitório, o que sugere que o fracionamento permitiu a concentração de substância(s) na fração Tb1A apresentando capacidade de inibir este mediador inflamatório.

Com atenção na atividade da lasiodiplodina, substância isolada de Tb1A, a mesma foi capaz de inibir moderadamente a produção de NO, o que pode indicar que outras substâncias presentes na fração Tb1A estejam associadas a este potencial. Entretanto, o elevado potencial inibitório da produção de TNF- $\alpha$  observado para esta substância pode sugerir que outras substâncias presentes na fração Tb1A e, portanto no extrato Tb1 possam interferir na atividade para este mediador quando em conjunto. Chuan-Li *et al.* (2015) descreveu o efeito inibitório na produção de TNF- $\alpha$  para a lasiodiplodina na cultura de macrófagos estimulados e baixo efeito citotóxico, o que corrobora os dados obtidos.

Interessantemente, o extrato Tb1, sua fração Tb1A e a lasiodiplodina apresentaram capacidade de inibir a produção de IL-1 $\beta$ , enquanto as duas últimas amostras também foram capazes de inibir a produção de PGE<sub>2</sub>. A capacidade de inibir a produção de IL-1 $\beta$  foi superior ao apresentado frente ao mediador lipídico PGE<sub>2</sub>. Embora, a PGE<sub>2</sub> seja o principal mediador lipídico liberado durante as respostas inflamatórias, é também liberado de forma basal em condições fisiológicas e participa de alguns processos homeostáticos, tais como a manutenção da integridade da mucosa gástrica e da pressão sanguínea (GIULIANO and WARNER, 2002 e HARRIS *et al.*, 2002), o que demonstra a importância da modulação e não forte supressão da produção deste mediador inflamatório pelas amostras.

Além disso, pode-se perceber que a lasiodiplodina está diretamente associada ao potencial inibitório da produção de IL-1 $\beta$  da fração e, por conseguinte do extrato Tb1, tendo em vista similar valores de IC<sub>50</sub> obtidos neste ensaio. Enquanto que, para a inibição de PGE<sub>2</sub> o isolamento da substância favoreceu a capacidade inibitória.

Conjuntamente estas amostras foram avaliadas quanto à capacidade de modulação da expressão enzimática iNOS e da COX-2, induzidas em processos inflamatórios/infecciosos ou sob situações de estresse conduzindo as células a produção de NO e prostaglandinas, respectivamente (DUBOIS *et al.*, 1998).

As amostras apresentaram elevada capacidade de inibição da expressão enzimática da iNOS, em acórdância com o observado nos ensaios para

verificação da modulação da produção de NO. O mecanismo de inibição da produção de NO foi substancialmente fundamentado pela capacidade de suprimir a expressão enzimática da iNOS, embora para a fração Tb1A o potencial de sequestrar o radical livre NO esteja também associado, tendo em vista que a fração em acetato de etila concentra compostos fenólicos em geral com potencial antioxidante.

A capacidade de inibir a produção de PGE<sub>2</sub> por estas amostras decorreu da supressão da expressão de COX-2, destacando-se a lasiodiplodina, sendo ativa nas duas concentrações testadas (20 e 100 µg/mL).

Além da investigação das propriedades farmacológicas, para fins terapêuticos é fundamental a avaliação dos produtos naturais promissores quanto à avaliação da toxicidade celular em cultura de células eucarióticas. DASHTI *et al.* (2014) descreveu que 11% dos possíveis candidatos a fármacos anti-TB são excluídos das fases mais avançadas de estudo devido à alta toxidez. Sob este prisma, todas as amostras avaliadas no trabalho foram submetidas à análise de toxicidade celular, onde observou-se que para a maioria das amostras de fungos endofíticos isolados de *Anemia tomentosa* e *Stachytarpheta schottiana* havia a presença de alta citotoxicidade, sendo portanto excluídas das avaliações subsequentes. As amostras de fungos endofíticos isolados de *O. notata* que apresentaram citotoxicidade elevada também foram excluídas. Em contraste, baixa ou nenhuma citotoxicidade foi exibida pelas amostras oriundas do fungo endofítico *Sordaria* sp. isolado de *T. bullata*.

Tem sido cada vez mais reconhecido que a interação fungo endofítico e determinada espécie vegetal hospedeira, o estágio de desenvolvimento da planta e a condição climática afetam a qualidade e a quantidade de substâncias bioativas produzidas pelos fungos endofíticos, deste modo os fungos podem produzir substâncias tóxicas para adaptação e tolerância a estresses bióticos e abióticos (GOUDA *et al.*, 2016).

Além da avaliação da atividade anti-inflamatória, 13 amostras foram capazes de inibir o crescimento de ambas as cepas de micobactérias, *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv, destacando-se as amostras AT6H, ON1A, ON1H, ON2H, Tb1, Tb1A e lasiodiplodina. Contudo, somente as amostras AT6H, Tb1, Tb1A e lasiodiplodina mantiveram a capacidade de inibição do crescimento da cepa hipervirulenta Mtb M299 em cultura bacteriana.

Além disso, as amostras Tb1, Tb1A e lasiodiplodina foram capazes de inibir o crescimento intracelular em macrófagos RAW 264.7 infectados *in vitro* com as diferentes cepas micobacterianas sem interferência da toxicidade. Comparando os valores de MIC<sub>50</sub> pode-se inferir que a lasiodiplodina está diretamente associada ao potencial demonstrado pela fração Tb1A e para o extrato Tb1, sendo em torno de 2X mais ativa que o mesmo.

Ressalta-se a importância de avaliar a atuação de substâncias com ação em cultura bacteriana, também em cultura de macrófagos infectados. Isto possibilita a averiguação da capacidade da substância em adentrar o ambiente intracelular a fim de exercer o efeito desejado, além de ampliar a compreensão de possíveis atividades imunomodulatórias e serem bons candidatos para estudos farmacológicos *in vivo* (MARRAPU et al., 2011). Para a classe de fungos endofíticos nenhum trabalho foi realizado sob este prisma.

Trabalhos anteriores demonstraram atividade antimicobacteriana foi demonstrada para o óleo essencial obtido da *Anemia tomentosa* (PINTO et al., 2009) e substâncias isoladas das folhas de *Ocotea notata* apresentaram a atividade antioxidante, antimicobacteriana e foram capazes de inibir a produção do NO pelos macrófagos (COSTA et al., 2015). Nossos dados demonstraram que os fungos endofíticos isolados destas plantas apresentam efeitos similares.

Descrições anteriores demonstraram que fungos endofíticos podem adquirir a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários semelhantes aos produzidos pela planta hospedeira, provavelmente devido à recombinação genética ocorrida durante a fase evolutiva entre as espécies (ALY et al., 2010). O fármaco Taxol, utilizado para o tratamento de câncer de mama e útero, é um exemplo, pois tanto a planta *Taxus brevifolia*, quanto o fungo endofítico *Taxomyces andreanea* isolado da mesma, produzem a substância com a mesma atividade (TAN et al., 2001; STROBEL, 2003).

A lasiodiplodina isolada de *Ficus nervosa* (CHEN et al., 2010) foi ativa frente a cepa Mtb H37Rv (MIC<sub>50</sub> < 200 µg/mL) e outros micro-organismos, sendo que seus análogos já foram descritos como inibidores da síntese de prostaglandinas (YAO et al., 1991).

Outros fungos endofíticos que possuem atividade antimicobacteriana também foram relatados. Deshmukh et al. (2014) demonstrou que substâncias produzidas pelo fungo *Phomopsis* sp, obtido da folha de *Tectona grandis* L.,

apresentou atividade contra Mtb H37Rv e produtos naturais obtidos do fungo *Phoma* sp, isolado da planta *Saurauia scaberrinae*, apresenta atividade inibitória frente a outras espécies micobacterianas.

É importante ressaltar, as amostras Tb1, Tb1A e a lasiodiplodina, avaliadas neste trabalho, que foram ativas frente ao *M. tuberculosis*, também foram capazes de inibir o crescimento de micobactérias não tuberculosas tais como *M. kansasii*, que podem causar sinais clínicos semelhantes ao da tuberculose nos indivíduos suscetíveis.

Foram avaliadas três cepas com diferentes níveis de virulência, sendo uma cepa padrão 12478/ATCC, a cepa de média virulência 4404 e cepa hipervirulenta 8835 (MUSSI, 2017). Ambas as amostras inibiram 60-90% do crescimento de todas as cepas de *M. kansasii* testadas, na concentração de 100 µg/mL, sendo Tb1 a mais ativa, inibindo o crescimento destas cepas em todas as concentrações testadas. Visto que o tratamento das infecções causadas por MNT, em geral, é bastante complexo e demorado, sendo de pelo menos doze meses, utilizando combinações de diferentes antibióticos (COWMAN *et al.*, 2012; RYU *et al.*, 2016), a busca por substâncias ativas contra estas micobactérias é de extrema importância.

Para a continuação do estudo de produtos de fungos endofíticos como fármacos anti-TB, a substância mais ativa e menos citotóxica em experimentos *in vitro*, a lasiodiplodina, foi selecionada para investigação preliminar dos efeitos terapêuticos em modelo murino de tuberculose severa estabelecido em nosso laboratório (AMARAL *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012). A combinação das atividades anti-inflamatória e antimicobacteriana para uma mesma amostra pode proporcionar uma vantagem importante no seu uso contra a TB, tendo em vista a possibilidade de redução do período de tratamento, do número de fármacos anti-TB a serem utilizados e da preservação de função pulmonar (HAWN *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores enfatizam a importância da avaliação *in vivo* de substâncias potencialmente ativas contra *Mycobacterium*, em modelos animais adequados, utilizando para infecção cepas Mtb emergentes e resistentes ao tratamento, e não somente cepas laboratoriais, para de fato se obter substâncias de eficácia relevante (ORME, 2011). Além disso, a busca por novos fármacos anti-TB para o tratamento adjuvante da TB grave, associada à inflamação excessiva, têm sido especialmente incentivada (LECHARTIER *et al.*, 2014;

ZUMLA *et al.*, 2014). O modelo murino estabelecido no nosso laboratório está baseado na infecção intratraqueal dos camundongos C57BL/6 pela cepa Mtb hipervirulenta (cepa M299), que induz nos pulmões dos camundongos pneumonia tuberculosa necrótica associada ao recrutamento excessivo dos neutrófilos. Este modelo tem sido utilizado para testes de diferentes novos fármacos anti-TB, utilizando os fármacos padrão para comparação: antibiótico anti-Mtb, rifampicina, e fármaco anti-inflamatório, ibuprofeno (VENTURA, 2015a).

Primeiramente, foi avaliado o efeito da lasiodiplodina no crescimento bacteriano nos pulmões dos animais infectados. O tratamento durante quinze dias, iniciado no décimo quinto dia após a infecção, reduziu a carga bacteriana no pulmão cerca de 2,5 Log<sub>10</sub> CFU em comparação aos animais não tratados.

Além de atuar no controle da proliferação bacilar, o tratamento com a lasiodiplodina foi capaz de diminuir o número e tamanho das lesões inflamatórias no pulmão, o que foi compatível com a diminuição do peso, em cerca de 20% e da massa relativa pulmonar em 3% comparada aos animais não tratados.

Em adição, a análise histopatológica dos pulmões dos animais tratados exibiu redução da área de pneumonia tuberculosa, associada à diminuição das áreas de alveolite e prevenção do desenvolvimento da necrose nas áreas granulomatosas. A diminuição da área de patologia está diretamente relacionada à inibição do influxo de células inflamatórias no pulmão e consequente peso e massa relativa do pulmão. O tratamento com a lasiodiplodina levou a diminuição no número de células recrutadas ao pulmão, principalmente dos macrófagos\monócitos inflamatórios.

O tratamento com a lasiodiplodina também reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias produzidas. A diminuição do influxo celular nos pulmões e redução da patologia está associada com a menor produção de citocinas pró-inflamatórias, o que pode sugerir uma modulação da produção local de citocinas pelas células do pulmão.

O acúmulo excessivo de infiltrado celular inflamatório no pulmão e sua relação com a imunopatologia da TB severa têm sido abordados por diversos autores e fundamentado no fato que o acúmulo excessivo de leucócitos no pulmão, o que conduz a compressão e colapso da estrutura alveolar e endotelial, o que em combinação com altas concentrações dos mediadores inflamatórios produzidos por estas células, leva a necrose tecidual (ORME, 2011; TORRADO *et*

*al.*, 2010; MARZO *et al.*, 2014). Além disso, o recrutamento de células fagocitárias permissíveis induz novos ciclos de replicação bacteriana e favorece a disseminação do bacilo (AMARAL *et al.*, 2014).

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que Tb1, Tb1A e lasiodiplodina são promissoras para estudos prospectivos que visam à geração de novos fármacos anti-TB para o tratamento dos casos graves da TB, associados com a inflamação exacerbada. Este foi o primeiro estudo descrevendo uma nova abordagem para o *screening* de substâncias obtidas de fungos endofíticos anti-TB focando a atividade biológica *dual*, anti-inflamatória e antimicobacteriana.

## 7. CONCLUSÕES

- Vinte e cinco amostras foram capazes de inibir a produção de NO (AT2A, AT5A, AT6H, ON1A, ON1H, ON2A, ON2H, ON3A, ON3H, ON4A, ON4H, ON5H, ON5A, ON6A, ON6H, ON7A, ON7H, SS2A, SS4H, Tb1, Tb1A, TB1Ap, TB1E, TB1B e lasiodiplodina);
- Cinco amostras foram capazes de inibir a produção de NO e TNF- $\alpha$  (ON1A, ON1H, ON2A, ON6A e lasiodiplodina). A lasiodiplodina destacou-se quanto à inibição da produção de TNF- $\alpha$ ;
- As amostras Tb1, Tb1A e lasiodiplodina apresentaram baixa capacidade antioxidante, sendo capazes de inibir a expressão enzimática da iNOS, o que justificou substancialmente o mecanismo de inibição da produção de NO. As amostras também suprimiram a expressão de COX-2 sem interferência da citotoxicidade;
- Onze amostras foram capazes de inibir o crescimento de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv em cultura bacteriana (AT6A, AT6H, ON1A, ON1H, ON2H, ON7H, SS1H, Tb1, Tb1A, Tb1Ap e lasiodiplodina);
- Quatro amostras apresentaram capacidade de inibir o crescimento da cepa hipervirulenta Mtb M299 em cultura bacteriana (AT6H, Tb1, Tb1A e lasiodiplodina);
- Três amostras, Tb1, Tb1A e lasiodiplodina, apresentaram inibição de cepas de *M. kansasii*, em diferentes níveis de virulência;
- Tb1, Tb1A e lasiodiplodina foram capazes de suprimir o crescimento intracelular bacteriano em macrófagos infectados por Mtb, exibindo capacidade de adentrar este microambiente e exercer o efeito desejado;

- Em camundongos, o tratamento com a lasiodiplodina inibiu o crescimento bacteriano nos pulmões e reduziu em número e tamanho as lesões inflamatórias e a área de pneumonia tuberculosa;
- A diminuição da patologia no pulmão foi relacionada à capacidade da lasiodiplodina diminuir o influxo de células inflamatórias no pulmão, propiciando a redução da necrose nestas áreas e por conseguinte também reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias;
- Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que Tb1, Tb1A e lasiodiplodina são promissores para estudos prospectivos que visam à geração de novos fármacos anti-TB para o tratamento dos casos graves da TB, associados com a inflamação exacerbada.

## 8. REFERÊNCIAS

1. **ALMATAR**, M.; **MAKKY**, E. A.; **YAKICI**, G.; **VAR**, I.; **KAYAR**, B.; **KÖKSAL**, F. (2017) Antimicrobial peptides as an alternative to anti-tuberculosis drugs. *Pharmacological Research*, v. 128, n. 1, p. 288-305.
2. **ALMEIDA**, F. M.; **VENTURA**, T. L. B.; **AMARAL**, E. P.; **RIBEIRO**, S. C. M.; **CALIXTO**, S. D.; **MANHÃES**, M. R.; **REZENDE**, A. L.; **SOUZA**, G. S.; **CARVALHO**, I. S.; **SILVA**, E. C.; **SILVA**, J. A.; **CARVALHO**, E. C. Q.; **KRITSKI**, A. L.; **LASSOUNSKAIA**, E. (2017) Correction: Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. *PLoS One*, v. 12, n. 4, p. e0175652.
3. **ALY**, A. H.; **DEBBAD**, A.; **KJER**, J.; **PROKSCH**, P. (2010) Fungal endophytes from plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity*, v. 41, n.1, p. 1-16.
4. **AMARAL**, E. P. (2011) Avaliação da virulência micobacteriana e modulação da resposta imune durante a infecção por isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertação de Mestrado.
5. **AMARAL**, E. P.; **LASUNSKAIA**, E. B.; **D'IMPÉRIO-LIMA**, M. R. (2015) Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. *Microbes and Infection*, v. 18, n. 1, p. 11-20.
6. **AMARAL**, E. P.; **RIBEIRO**, S. C. M.; **LANES**, V. R.; **ALMEIDA**, F. M.; **ANDRADE**, M. R. M.; **BOMFIM**, C. C. B.; **SALLES**, E. M.; **BORTOLUCI**, K. R.; **COUTINHO-SILVA**, R.; **HIRATA**, M. H.; **ALVAREZ**, J. M.; **LASUNSKAIA**, E. B.; **D'IMPÉRIO-LIMA**, M. R. (2014) Pulmonary infection with hypervirulent *Mycobacterium* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *Plos Pathogens*, v. 10, n. 7, p. e1004188.
7. **ANDRADE**, M. R. M.; **AMARAL**, E. P.; **RIBEIRO**, S. C. M.; **ALMEIDA**, F. M.; **PERES**, T. V.; **LANES**, V. R.; **D'IMPÉRIO-LIMA**, M. R.; **LASUNSKAIA**, E. B. (2012) Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. *BMC Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 166.
8. **ARRANZ-TRULLÉN**, J., **LU**, L.; **PULIDO**, D.; **BHAKTA**, S.; **BOIX**, E. (2017) Host Antimicrobial Peptides: the promise of new treatment strategies against Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1499.
9. **BALKWILL**, F.; **MANTOVANI**, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, v. 357, n. 9255, p. 539-545.
10. **BASHYAL**, B. P.; **WIJERATNE**, E. M. K.; **FAETH**, S. H.; **GUNATILAKA**, A. A. L. (2005) Globosumones A-C, cytotoxic orsellinic acid esters from the Sonoran Desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. *Journal of Natural Products*, v. 68, n. 5, p. 724-728.

- 11. BEHAR, S. M.; BOOTY, M. G.; NISHIMURA, T.; ZHAO, X.; GAN, H-X.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. (2011)** Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunology*, v. 4, n. 3, p. 279-287.
- 12. BOGDAN, C. (2001)** Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, n. 10, p. 907-916.
- 13. BUONSENSO, D.; SERRANTI, D.; VALENTINI P. (2010)** Management of central nervous system tuberculosis in children: light and shade. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 14, n. 10, p. 845-853.
- 14. CALIXTO, S. D. (2016)** Avaliação da atividade antimicrobacteriana e anti-inflamatória de extratos de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *Tocoyena bullata* e *Humiria balsamifera*. Monografia.
- 15. CAMPOS, R.; PIANTA, C. (2001)** Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunológica, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul - Brasil. *Boletim da Saúde*, v. 15, n. 1, p. 61-71.
- 16. CASTELLANI, A. (1939)** Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, n. 225, p. 65-72.
- 17. CAVIEDES, L.; DELGADO, J. AND GILMAN, R.H. (2002)** Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 5, p. 1873-1874.
- 18. CHAN, B.; KHADEM, T. M.; BROWN, J. (2013)** A review of tuberculosis: focus on bedaquiline. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 70, n. 22, p. 1984-1994.
- 19. CHANDRASEKARAN, P.; SARAVANAN, N.; BETHUNAICKAN, R.; TRIPATHY, S. (2017)** Malnutrition: Modulator of Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1316.
- 20. CHANG, Y. C.; LI, P. C.; CHEN, B. C.; CHANG, M. S.; WANG, J. L.; CHIU, W. T.; LIN, C. H. (2006)** Lipoteichoic acid-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E<sub>2</sub>, protein kinase A, p38 MAPK, and nuclear factor- $\kappa$ B pathways. *Celular Signalling*, v. 18, p. 1235-1243.
- 21. CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. (2012)** Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 3, p. 421-437.
- 22. CHEN, L. W.; CHENG, M. J.; PENG, C. F.; SHENG, I. (2010).** Secondary Metabolites and Antimycobacterial Activities from the Roots of *Ficus nervosa*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 7, p. 1814-1821.

- 23. CHEN, P.;** SHI, M.; FENG, G.; LIU, J.; WANG, B.; SHI, X.; MA, L.; LIU, X.; YANG, Y.; DAI, W.; LIU, T.; HE, Y.; LI, J.; HAO, X.; ZHAO, G. (2012) A highly efficient ziehl-neelsen stain: identifying de novo intracellular *Mycobacterium tuberculosis* and improving detection of extracellular *M. tuberculosis* in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1166-1170.
- 24. CHUAN-LI, LU.;** WEI, ZHU.; DONG-MEI, W.; WEN-LONG, C.; MENG-MEI, HU.; MIN, W.; XIAO-JIE, XU.; CHUAN-JIAN, LU. (2015) Inhibitory Effects of Chemical Compounds Isolated from the Rhizome of *Smilax glabra* on Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Cell. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 602425.
- 25. COGLIATTI-CARVALHO, L.;** NUNES-FREITAS, A. F.; ROCHA, C. F. D.; VAN SLUYS, M. (2001). Variação na estrutura e composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 24, n. 1, p. 1-9.
- 26. COOPER, A. M.** (2009) Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 393-422.
- 27. COSTA, I. F. B.;** CALIXTO, S. D.; HEGGDORNE DE ARAUJO, M.; KONNO, T. U. P.; TINOCO, L. W.; GUIMARÃES, D. O.; MUZITANO, M. F. (2015) Antimycobacterial and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of *Ocotea notata* from Brazilian Restinga. *The Scientific World Journal*, v. 2015, p. 1-9
- 28. COUTINHO, M. A. S.;** MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. (2009) Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 3, p. 241-256.
- 29. COWMAN, S.;** WILSON, R.; LOEBINGER, M. R. (2012) Opportunistic mycobacterial diseases. *Medicine*, v. 40, n. 6, p. 346-348.
- 30. DASHTI, Y.;** GRKOVIC, T. (2014) Quinn RJ. Predicting natural product value, an exploration of anti-TB drug space. *Natural Product Reports*, v. 31, n. 8, p. 990–998.
- 31. DHANYA, N.;** PADMAVATHY, S. (2014) Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1-11.
- 32. DORHOI, A.;** REECE, S.T.; KAUFMANN, S. H. (2011) For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunological Reviews*, v. 240, n. 1, p. 235-251.
- 33. DUBOIS, R. N.;** ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, F.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B. (1998) Cyclooxygenase in biology and diseases. *The FASEB Journal*, v. 12, n. 12, p. 1063-1073.

- 34. FOSSLIEN, E.** (2001) Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v. 31, n. 4, p. 325-338.
- 35. FUNDAÇÃO DOM CINTRA** (2005) Fundação Dom Cintra; Plano Diretor de Desenvolvimento Sustentável de Quissamã - Relatório Final Parte 1 - Estudos de Diagnósticos; 2005.
- 36. GARLANDA, C.; DI LIBERTO, D.; ANNUNCIATA, V.; LA MANNA, M. P.; BURACCHI, C.; CACCAMO, N.; SALERNO, A.; DIELI, F.; MANTOVAN, A.** (2007) Damping excessive inflammation and tissue damage in *Mycobacterium tuberculosis* infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 5, p. 3119-3125.
- 37. GIULIANO, F.; WARNER T. D.** (2002) Origins of prostaglandin E2: involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 303, n. 3, p. 1001-1006.
- 38. GOUDA, S.; DAS, G.; SEM, S. K.; SHIN, H. S.; PATRA, J. K.** (2016) Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Frontiers Microbiology*, v. 7, p.1538.
- 39. GRAYBILL, J. R.** (2001) Treatment alternatives for *Mycobacterium kansasii*. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, n. 4, p.417-420,
- 40. GRIESS, J. P.** (1864) *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 154: 679. / A.C. Bratton, E.K.Marshall Jr., *Journal of Biology and Chemical*, v.128, n. 1939, p. 537.
- 41. GROENEWALD, W.; BAIRD, M. S.; VERSCHOOR, J. A.; MINNIKIN, D. E.; CROFT, A. K.** (2013) Differential spontaneous folding of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Phys. Lipids*. 180, 15-22.
- 42. GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O.** (2011) Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Molecular Medicine*, v.17, n.3-4, p.293-307.
- 43. GUIMARÃES, D. O.** (2006) Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a '*Viguiera arenaria*' (Asteraceae). Dissertação de Mestrado.
- 44. GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMAN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T.** (2008) Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 134-144.

- 45. HARRIS, S. G.; PADILHA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. O. (2002)** Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunology*, v. 23, n. 3, p. 144-150.
- 46. HAWN, T. R.; MATHESON, A. I.; MALEY, S. N.; VANDALC, O. (2013)** Host-directed therapeutics for tuberculosis: can we harness the host? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 77, n. 4, p. 608-627.
- 47. HEGGDORNE-ARAUJO, M.; SILVA, C. V. I.; OLIVEIRA, P. F.; BARRETO, A. R. R.; KONNO, T. U. P.; ESTEVES, F. A.; BARTH, T.; AGUIAR, F. A.; LOPES, N. P.; DERMENJIAN, R. K.; GUIMARÃES, D. O.; LEAL, I. C. R.; LASUNSKAIA, E.; MUZITANO, M. F. (2017).** Biological activities and phytochemical profile of *Passiflora mucronata* from the Brazilian restinga. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 27, n. 6, p. 702-710.
- 48. JAYACHANDRAN, R.; SUNDARAMURTHY, V.; COMBALUZIER, B.; MUELLER, P.; KORF, H.; HUYGEN, K.; MIYAZAKI, T.; ALBRECHT, I.; MASSNER, J.; PIETERS, J. (2007)** Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin dependent activation of calcineurin. *Cell*, v.130, n.1, p. 37-50.
- 49. JOHNSON, M. M.; ODELL, J. A. (2014)** Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*, v. 6, n. 3, p. 210-220.
- 50. JUHN, S. K., JUNG, M. K., HOFFMAN, M. D., DREW, B. R., PRECIADO, D. A., SAUSEN, N. J., ... HUANG, T. (2008).** The Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Otitis Media and Sequelae. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, v. 1. N. 3, p. 117–138.
- 51. KARAKOUSIS, P. C.; BISHAI, W. R.; DORMAN, S. E. (2004)** Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology*, v. 6, n. 2, p. 105–116.
- 52. KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. (2011)** The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, v. 469, n. 7331, p. 483-490.
- 53. KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. (2004)** The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Seminars in immunology*, v. 16, n. 1, p. 35-41.
- 54. KUMAR, A.; FARHANA, A.; GUIDRY, L.; SAINI, V.; HONDALUS, M.; STEYN, A. J. C. (2011)** Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 13, p. 1-25.
- 55. KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. (2012)** Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, v. 19, n. 7, p. 792-798.

- 56. LECHARTIER, B.; RYBNIKER, J.; ZUMLA, A.; COLE, S. T. (2014)** Tuberculosis drug discovery in the post post-genomic era. *EMBO Molecular Medicine*, v. 6, p. 158-168.
- 57. LOPEZ, B.; AGUILAR, D.; OROZCO, H.; BURGER, M.; ESPITIA, C.; RITACCO, V.; BARRERA, I; KREMER, K.; HERNANDEZ-PANDO, R.; HUYGEN, K.; VAN SOOLINGEN, E. D. (2003)** A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 133, n. 1, p. 30-37.
- 58. LYADOVA, I. V.; TSIGANOV, E. N.; KAPINA, M. A.; WINSLOW, G. M. (2010)** In Mice, Tuberculosis Progression Is Associated with Intensive Inflammatory Response and the Accumulation of Gr-1dim Cells in the Lungs. *Plos one*, v. 5, n. 5, p. 1-16.
- 59. LYADOVA, I.V.; PANTELEEV, A. V. (2015)** Th1 and Th2 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology and Biomarkers. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, p. 1-13.
- 60. MARRAPU, V. K.; CHATURVEDI, V.; SINGH, S.; SINGH, S.; SINHA, S.; BHANDARI, K. (2011)** Novel aryloxy azolyl chalcones with potent activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 4302-4310.
- 61. MARZO, E.; VILAPLANA, C.; TAPIA, G.; DIAZ, J.; GARCIA, V.; CARDONA, P-J (2014)** Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 94, n. 1, p. 55-64.
- 62. MATVEYCHUK, A.; FUKS, L.; PRIESS, R.; HAHIM, I.; SHITRIT, D. (2012)** Clinical and radiological features of *Mycobacterium kansasii* and other NTM infections. *Respiratory Medicine*, v. 106, n. 10, p. 1472-1477.
- 63. MELLO, K. G. C.; MELLO, F. C. Q.; BORGA L.; ROLLA, V.; DUARTE, R. S.; SAMPAIO, E. P.; HOLLAND, S. M.; PREVOTS, D. R.; DALCOLMO, M. P. (2013)** Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Disease journal*, v. 19, n. 3, p. 393-399, 2013.
- 64. MINISTÉRIO DA SAÚDE, (2017)** Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil. *Boletim Epidemiológico*, v.48, n. 8, p. 1-11.
- 65. MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. (2005)** Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological Reviews*, v. 57, n.2, p. 217-252.
- 66. MORIMOTO, K.; IWAI, K.; UCHIMURA, K.; OKUMURA, M.; YOSHIYAMA, T.; YOSHIMORI, K.; OGATA, H.; KURASHIMA, A.; GEMMA, A.; KUDOH, S. (2014)** A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan. *Annals of the American Thoracic Society*, v. 11, n. 1, p. 1-8.

- 67. MOSMANN, T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunology Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63.
- 68. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAÜER, M. A.** (2010) *Mycobacterium*. *Microbiologia Médica*, v. 6, p. 297-310.
- 69. MUSSI, V. O.** (2017) Caracterização da virulência das cepas de *Mycobacterium kansasii* isoladas de pacientes com doença pulmonar não tuberculosa.
- 70. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.** (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461-477.
- 71. NICOLETTI, R.; DE FILIPPIS, A.; BUOMMINO, E.** (2013) Antagonistic aptitude and antiproliferative properties on tumor cells of fungal endophytes from the Astroni Nature Reserve, Italy. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, n. 31, p. 4073-4083.
- 72. NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, A.** (2015) Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis*, v. 8, p. 50-59.
- 73. ORGEUR, M.; BROSCH, R.** (2017) Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Current Opinion in Microbiology*, v. 41, p. 68–75.
- 74. ORME, I.** (2011) Development of new vaccines and drugs for TB: limitations and potential strategic errors. *Future Microbiology*, v. 6, n. 2, p. 161-177.
- 75. ORME, I.** (2014) A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Nature Immunology*, v. 14, n. 1, p. 8-14.
- 76. ORME, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M.** (2015) The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature Immunology*, v. 16, n. 1, p. 57-63.
- 77. OTTENHOFF, T. H. M.; KAUFMANN, S. H. E.** (2012) Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *Plos Pathogens*, v. 8, n. 5, p. 1-12.
- 78. PADHI, L.; MOHANTA, Y. K.; PANDA, S. K.** (2013) Endophytic fungi with great promises: A Review. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, v. 3, n. 3, p. 152-170.
- 79. PAN, J. H.; CHEN, Y.; HUANG, Y. H.; TAO, Y. W.; WANG, J.; LI, Y.** (2011) Antimycobacterial activity of fusaric acid from a mangrove endophyte and its metal complexes. *Archives of Pharmacal Research*, v. 34, n. 7, p. 1177–1181.

- 80. PINTO, S. C.; LEITÃO, G. G.; OLIVEIRA, D. R.; BIZZO, H. R.; RAMOS, D. F.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; LOURENCO, M. C.; LEITÃO, S. G. (2009)** Analysis of the Chemical Composition and Antimycobacterial Activity of the Essential Oil from *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* (Pteridophyta). *Natural Product Communications*, v. 4, n. 12, p. 1733-1736.
- 81. PRASAD, K.; SINGH, M. B. (2008)** Corticosteroids for managing tuberculous meningitis. *Cochrane Database Systematic Reviews*, v. 1, n. 1, p. 1-11.
- 82. PRETSCH, A.; NAGL, M.; SCHWENDINGER, K.; KREISEDER, B.; WIEDERSTEIN, M.; PRETSCH D. (2014)** Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities of Endophytic Fungi *Talaromyces wortmannii* Extracts against Acne-Inducing Bacteria. *PLoS One*, v. 9, n. 6, p. e97929.
- 83. PREVOTS, D. R.; SHAW, P. A.; STRICKLAND, D.; JACKSON, L. A.; RAEBEL, M. A.; BLOSKY, M. A.; DE OCA, R. M.; SHEA, Y. R.; SEITZ, A. E.; HOLLAND, S. M.; OLIVIER, K. N. (2010)** Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 182, n. 7, p. 970-976.
- 84. RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S. M. (2017).** Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 60, p.1678-4324
- 85. RAO, P. N. P.; KNAUS, E. E. (2008)** Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 11, n. 2, p. 81-110.
- 86. RIBEIRO, S. C. M.; GOMES, L. L.; AMARAL, E. P.; ANDRADE, M. R. M.; ALMEIDA, F. M.; REZENDE, A. L.; LANES, V. R.; CARVALHO, E. C. Q.; SUFFYS, P. N.; MOKROUSOV, I.; LASUNSKAIA, E. B. (2014)** *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2615-2624.
- 87. RICKETTS, W. M.; O'SHAUGHNESSY, T. C.; VANINGEN, J. (2014)** Human-to-human transmission of *Mycobacterium kansasii* or victims of a shared source? *European Respiratory Journal*, v. 44, n. 4, p. 1085-1087.
- 88. RUMA, k.; KUMAR SUNIL, H. S. (2013)** Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic properties of fungal endophytes from *Garcinia* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 3, p. 889-897.
- 89. RYU, Y. J.; KOH, W. J.; DALEY, C. L. (2016)** Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, v. 79, n. 2, p. 74-84.
- 90. SANTOS, I. P.; SILVA, L. C. N.; SILVA, M. V.; ARAÚJO, J. M.; CAVALCANTI, M. S.; LIMA, V. L. M. (2015)** Antibacterial activity of endophytic

fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-7. 350.

**91. SHIAU**, M. Y.; CHIOU, H. L.; LEE, Y. L.; KUO, T. M.; CHANG, Y. H. (2001) Establishment of a consistent L929 bioassay for TNF- $\alpha$  quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytomitogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF- $\alpha$  secreted by adherent human mononuclear cells. *Mediator of Inflammation*, v. 10, n. 4, p. 199-208.

**92. STROBEL**, G. A. (2003) Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v. 5, n. 6, p. 535-544.

**93. SUBBIAN**, S.; TSENOVA, L.; O'BRIEN, P.; YANG, G.; KOO, M-S.; PEIXOTO, B.; FALLOWS, D.; ZELDIS, J. B.; MULLER, G.; KAPLAN, G. (2011) Phosphodiesterase-4 inhibition combined with isoniazid treatment of rabbits with pulmonary tuberculosis reduces macrophage activation and lung pathology. *The American Journal of Pathology*, v. 179, n. 1, p. 289-301.

**94. TAN**, R. X.; ZOU, W. X. (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v.18, n. 4, p. 448-459.

**95. THAISS**, C. A.; KAUFMANN, S. H. (2010) Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 83, n. 4, p. 209-215.

**96. TORRADO**, E.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. (2010) Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends in Immunology*, v. 32, n. 2, p. 66-72.

**97. TORTOLI**, E. (2006) The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 48, n. 2, p. 159-178.  
*Tuberculosis*, v. 94, n. 1, p. 8-14.

**98. VALLANCE**, P.; LEIPER, J. (2002) Blocking no synthesis: How, where and why? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 12, p. 939-950.

**99. VENTURA**, T. L. B. S. (2015a) Estudo de chalconas substituídas com potencial ação anti-inflamatória e antimicobacteriana como nova estratégia para o tratamento da tuberculose. Tese de Doutorado.

**100. VENTURA**, T. L. B.; CALIXTO, S. D.; ABRAHIM-VIEIRA, B. A.; DE SOUZA, A. M. T.; MELLO, M. V. P.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F. (2015b) Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on anti-tuberculosis dual treatment approach. *Molecules*, v. 20, n. 5, p. 8072-8093.

**101. WANG**, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. (2002) Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces sp.* and *Aspergillus*

*clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, v. 34, n.1, p. 51-57.

**102. WANG, K.; LEI, J.; WEI, J.; YAO, N.** (2012) Bioactive natural compounds from the plant endophytic fungi *Pestalotiopsis spp.* Mini Reviews in Medicinal Chemistry, v. 12, n. 13, p. 1382-1393.

**103. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO.** (2017) Relatório Global de Tuberculose 2017. Acessado em 10 Novembro de 2017. Disponível a partir de <[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)>.

**104. YAO, X. S.; EBIZUKA, Y.; NOGUCHI, H.; KIUCHI, F.; SHIBUYA, M.; IITAKA, Y.; SETO, H.; SANKAWA, U.** (1991). Biologically active constituents of *Arnebia euchroma*: Structure of Arnbiol, na Ansa-Type Monoterpenylbenzenoid with inhibitory activity on Prostaglandin biosynthesis. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. v. 39, n. 11, p. 2956-2961.

**105. ZHAI, Z.; SOLCO, A.; WUD, L.; WURTELED, E. S.; KOHUTE, M. L.; MURPHY, P. A.; CUNNICKA, J. E.** (2009) Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophage cells, indicative of alternative macrophage activation. Journal of Ethnopharmacology, v. 122, n. 1, p. 76-85.

**106. ZHANG, M.; GONG, J.; YANG, Z.; SAMTEN, B.; CAVE, M. D.; BARNES, P. F.** (1999) Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. The Journal of Infectious Diseases, v. 179, n. 5, p. 1213–1217.

**107. ZUMLA, A. I.; GILLESPIE, S. H.; HOELSCHER, M.; PHILIPS, P. P. J.; COLE, S. T.; ABUBAKAR, I.; MCHUGH, T. D.; SCHITO, M.; MAEURER, M.; NUNN, A. J.** (2014) New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. The Lancet Infectious Diseases, v. 14, n. 4, p. 327-340.

**108. ZUMLA, A.; RAO, M.; PARIDA, S. K.; KESHAVJEE, S.; CASSELL, G.; WALLIS, R.; AXELSSON-ROBERTSSON, R.; DOHERTY, M.; ANDERSSON, J.; MAEURER, M.** (2015) Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies. Journal of Internal Medicine, v. 277, n. 4, p. 373-387.

## 9 – ANEXO

### Anexo 1 –

Efeito inibitório apresentada pelos extratos de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *Tocoyena bullata* na produção de NO e TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, no crescimento de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv em cultura e avaliação da citotoxicidade celular pelo método de MTT e LDH.

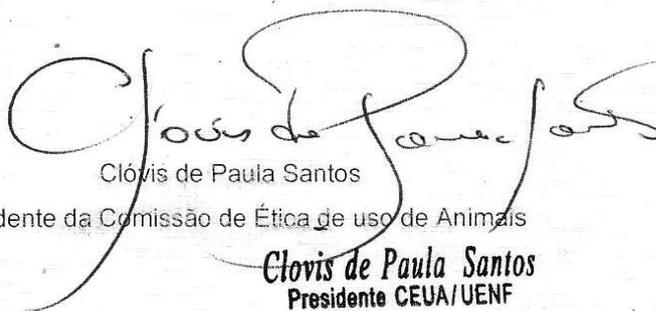
Amostras	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )				MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	NO	TNF- $\alpha$	LDH	MTT	<i>M. bovis</i> BCG		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		<i>M. tuberculosis</i> M299	
	Tb1	30,1 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	291,7 $\pm$ 2,4	>500	228,8 $\pm$ 1,5	1,5 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	66,8 $\pm$ 0,1	374,2 $\pm$ 3,4	80,0 $\pm$ 0,1
Tb2	142,6 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	204,1 $\pm$ 2,3	>500	>500	1,6 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	99,9 $\pm$ 1,2	>500	184,6 $\pm$ 2,4	>500
Tb3	148,2 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	74,6 $\pm$ 1,9	>500	>500	1,4 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	84,5 $\pm$ 0,2	475,2 $\pm$ 0,9	96,5 $\pm$ 0,2	>500
Tb4	181,9 $\pm$ 1,8	>500	>500	>500	1,0 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	>500	>500	>500	>500
Tb5	322,6 $\pm$ 4,5 <sup>c</sup>	332,6 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	>500	>500	1,9 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	>500	>500	>500	>500

Os valores de IC<sub>50</sub> e MIC<sub>50</sub> de cada amostra foram exibidos como média  $\pm$  DP. (n=3) Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-c) são significativamente diferentes ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$ ; determinado pelo teste de Tukey).

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 350, intitulado "Estudo de virulência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e novas abordagens terapêuticas para o tratamento adjuvante da tuberculose pulmonar no modelo murino" sob a responsabilidade da Dra. Elena Lassounskaia, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 28/03/2017. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 28/03/2021.

Campos dos Goytacazes, 28 de março de 2017.



Clóvis de Paula Santos  
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais  
**Clóvis de Paula Santos**  
Presidente CEUA/UENF