Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Bianca de Barros Pereira

Características probióticas e imunomoduladoras de cepas de *Bacillus velezensis* **e seus impactos na infecção** in vitro **por** *Leishmania braziliensis*

Uberaba/MG

2026

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Bianca de Barros Pereira

Características probióticas e imunomoduladoras de cepas de *Bacillus velezensis* **e seus impactos na infecção** in vitro **por** *Leishmania braziliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração "Ciências da Saúde" (Linha de Pesquisa: Aspectos Imunopatológicos, Morfológicos, Celulares E Moleculares Das Doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Hugo Felix Perini.

Uberaba/MG

2026

Catalogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pereira, Bianca de Barros
P489c Características probióticas e imunomoduladoras de cepas de *Bacillus velezensis* e seus impactos na infecção in vitro por *Leishmania braziliensis* / Bianca de Barros Pereira. – 2026.
81 p. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2026
Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Hugo Felix Perini

1. Leishmaniose cutânea. 2. Probióticos. 3. Bacillus. 4. Imunomodulação. I. Silva, Marcos Vinicius da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

Amanda Franzão - Bibliotecária CRB-6/3461

BIANCA DE BARROS PEREIRA

CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS E IMUNOMODULADORAS DE CEPAS DE *BACILLUS VELEZENSIS* E SEUS IMPACTOS NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração "Ciências da Saúde" (Linha de Pesquisa: Aspectos Imunopatológicos, Morfológicos, Celulares E Moleculares Das Doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 26 de março de 2026

Banca Examinadora:

Dr. Marcos Vinicius da Silva – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Aline Dias Paiva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano
Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado eletronicamente por **MARCOS VINICIUS DA SILVA**, **Usuário Externo**, em 26/03/2026, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **ALINE DIAS PAIVA**, **Professor do Magistério Superior**, em 28/03/2026, às 23:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **Lúcio Roberto Cançado Castellano**, **Usuário Externo**, em 30/03/2026, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1742068** e o código CRC **A8E88BB8**.

Dedico este trabalho, primeiramente, aos meus pais, Ana Luisa e Ricardo, que sempre foram meu alicerce. Obrigada por todo amor, incentivo e por acreditarem em mim mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei. Essa conquista é tão minha quanto de vocês.

Às minhas irmãs, Laura, Maria Julia e Heloísa, por serem meu refúgio, minha alegria e minha força diária. Crescer ao lado de vocês tornou o caminho mais leve e mais bonito.

Ao meu namorado, Gabriel, pelo companheirismo, paciência e apoio incondicional durante cada etapa desta jornada. Obrigada por estar presente em todos os momentos, especialmente nos mais desafiadores.

Aos meus sogros e cunhados, pelo acolhimento, incentivo e por torcerem por mim ao longo dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Marcos e Prof. Hugo, pela confiança, orientação e disponibilidade ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, pelas discussões científicas enriquecedoras e pelo incentivo constante ao meu crescimento acadêmico e profissional.

À minha amiga Thaina, pela inspiração, parceria e apoio diário no laboratório. Obrigada por toda ajuda nas rotinas experimentais, pelas trocas de conhecimento e por tornar os dias mais leves, mesmo diante dos desafios.

Aos demais pós-graduandos do laboratório, pela colaboração, pelo auxílio na revisão de protocolos e pela disposição em contribuir sempre que necessário para o andamento das atividades experimentais.

Aos órgãos de fomento, pelo suporte financeiro concedido, essencial para a execução e viabilização desta pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas de ampla relevância em saúde pública, associadas a elevada morbidade e a limitações terapêuticas importantes, como toxicidade, custo elevado e resistência aos fármacos disponíveis. A resposta imunológica contra a infecção é complexa e decisiva para o desfecho clínico, o que torna a modulação da resposta do hospedeiro uma estratégia promissora no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Organismos com propriedades probióticas têm se destacado como potenciais imunomoduladores, e espécies do gênero *Bacillus* apresentam vantagens como a capacidade de sobreviverem a condições adversas do trato gastrointestinal e produção de metabólitos bioativos. Este estudo teve como objetivo caracterizar as propriedades probióticas das cepas de *Bacillus velezensis* (1273, 144 e 118) e avaliar o potencial de aplicação de seus sobrenadantes livres de células (CFS) na modulação da resposta imunológica, bem como sua atividade contra *Leishmania braziliensis in vitro*. Para isso, avaliou-se a capacidade das cepas de sobreviverem à exposição a pH ácido e à presença de sais biliares, simulando a passagem pelo trato gastrointestinal, sua capacidade de adesão e interação com microrganismos patogênicos, além da determinação do perfil de sensibilidade e resistência a antibióticos. Adicionalmente, investigou-se a atividade dos CFS sobre linhagens celulares e formas promastigotas de *L. braziliensis*, incluindo a avaliação do efeito imunomodulador em condições pré e pós infecção parasitária, bem como a mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. As cepas avaliadas apresentaram características de potencial aplicação probiótica. Embora não tenha sido observado efeito leishmanicida direto expressivo em concentrações seguras, os CFS promoveram redução significativa do índice de infecção e da carga parasitária em macrófagos, associada ao aumento de espécies reativas de oxigênio e à modulação de citocinas. Esses achados indicam que os metabólitos derivados de *B. velezensis* podem atuare por meio da modulação da resposta imune do hospedeiro, evidenciando seu potencial como estratégia adjuvante no controle da leishmaniose cutânea. No entanto, estudos adicionais são necessários para validar sua aplicabilidade em modelos *in vivo*.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; Probióticos; *Bacillus*; Imunomodulação

ABSTRACT

Leishmaniasis comprises a group of neglected tropical diseases of major public health relevance, associated with high morbidity and important therapeutic limitations, such as toxicity, high cost, and resistance to available drugs. The immune response against infection is complex and decisive for the clinical outcome, making modulation of the host response a promising strategy for the development of new therapeutic approaches. Organisms with probiotic properties have emerged as potential immunomodulators, and species of the genus *Bacillus* present advantages such as the ability to survive adverse conditions of the gastrointestinal tract and to produce bioactive metabolites. This study aimed to characterize the probiotic properties of *Bacillus velezensis* strains (1273, 144, and 118) and to evaluate the potential application of their cell-free supernatants (CFS) in modulating the immune response, as well as their activity against *Leishmania braziliensis* in vitro. To this end, the ability of the strains to survive exposure to acidic pH and bile salts—simulating passage through the gastrointestinal tract—was assessed, along with their adhesion capacity and interaction with pathogenic microorganisms, in addition to determining their antibiotic susceptibility and resistance profiles. Furthermore, the activity of the CFS was investigated on cell lines and promastigote forms of *L. braziliensis*, including the evaluation of immunomodulatory effects under pre- and post-parasitic infection conditions, as well as the measurement of reactive oxygen species and nitric oxide production. The evaluated strains exhibited characteristics indicative of potential probiotic application. Although no significant direct leishmanicidal effect was observed at safe concentrations, the CFS promoted a significant reduction in the infection index and parasite burden in macrophages, associated with increased reactive oxygen species and cytokine modulation. These findings indicate that metabolites derived from *B. velezensis* may act through modulation of the host immune response, highlighting their potential as an adjuvant strategy in the control of cutaneous leishmaniasis. However, further studies are needed to validate their applicability in in vivo models.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; Probiotics; *Bacillus*; Immunomodulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de sobrevivência das cepas de *B. velezensis* em diferentes condições de pH. Avaliou-se a capacidade de sobrevivência de (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118 em meios de cultura ajustados para condições ácidas (pH 2,5) em comparação ao crescimento em pH neutro (controle). *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 2. Cinética de sobrevivência das cepas de *B. velezensis* em diferentes condições de cultivo. Avaliou-se a capacidade de sobrevivência de (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118 em meio de cultura suplementado com 0,3% de sais biliares bovinos, em comparação ao crescimento em meio não suplementado (controle). *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figuras 3. Capacidade de adesão das cepas de *B. velezensis* em diferentes períodos de incubação. A adesão de (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118 foi avaliada em tempos de 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com os diferentes tempos.

Figura 4. Formação de halo de inibição por cocultura de bactérias potencialmente probióticas com patógenos. (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118. Observa-se a formação de zonas de inibição nas placas onde o inóculo de ponta das cepas potencialmente probióticas foram cocultivados com *E. coli, S. aureus*, MRSA e *S.mutans*

Figura 5. Formação de halo de inibição pelo sobrenadante livre de células (CFS) de bactérias probióticas contra patógenos. (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118. Observa-se a formação de zonas de inibição ao redor dos poços contendo 40 μL de CFS em cocultura com *E. coli, S. aureus*, MRSA e *S. mutans.*

Figura 6. Atividade antibacteriana das cepas de *B. velezensis*. Inibição do crescimento de *S. aureus*, MRSA, *S. mutans* e *E. coli* após tratamento com CFS: (A) CFS 1273, (B) CSF 144 e (C) CFS 118, testados em diluições de 1:2 a 1:1024 pelo método de microdiluição em caldo

(475 nm). *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 7. Porcentagem de viabilidade celular de células VERO-CCL-81 tratadas com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250l/poço: (A) CFS 1273, (B) CFS 144 e (C) CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 8. Porcentagem de viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi avaliado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250l/poço: (A) CFS 1273, (B) CFS 144 e (C) CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 9. Produção de e IL-10 e TNF- por macrófagos RAW 264.7 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250µl/poço: (A) Produção de IL-10 por CFS 1273, (B) Produção de IL-10 por CFS 144, (C) Produção de IL-10 por CFS 118, (D) Produção de TNF- por CFS 1273, (E) Produção de TNF- por CFS 144, (F) Produção de TNF- por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 10. Produção de e IL-10 e TNF- por macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250µl/poço: (A) Produção de IL-10 por CFS 1273, (B) Produção de IL-10 por CFS 144, (C) Produção de IL-10 por CFS 118, (D) Produção de TNF- por CFS 1273, (E) Produção de TNF- por CFS 144, (F) Produção de TNF- por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 11. Produção de IFN-γ e IL-10 por esplenócitos de camundongos Balb/c tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250l/poço: (A) Produção de IFN-γ por CFS 1273, (B) Produção de IFN-γ por CFS 144, (C) Produção de IFN-γ por CFS 118, (D) Produção de IL-10 por CFS 1273, (E)

Produção de IL-10 por CFS 144, (F) Produção de IL-10 por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 12. Cinética de produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250µl/poço. (A) macrófagos RAW tratados com CFS 1273, (B) macrófagos RAW tratados com CFS 144, (C) macrófagos RAW tratados com CFS 118, (D) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 1273, (E) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 144 e (F) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 13. Produção óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250µl/poço. (A) macrófagos RAW tratados com CFS 1273, (B) macrófagos RAW tratados com CFS 144, (C) macrófagos RAW tratados com CFS 118, (D) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 1273, (E) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 144 e (F) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 14. Viabilidade das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* tratadas com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250l/poço: (A) CFS 1273, (B) CFS 144 e (C) CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 15. Ensaio de infecção com amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos RAW 264. 7 tratadas com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. (A) Relação parasita/macrófago, (B) porcentagem de macrófagos RAW 264.7 infectados e (C) índice de infecção. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 16. Ensaio de infecção com amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos diferenciados de THP-1 tratadas com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. (A) Relação parasita/macrófago, (B) porcentagem de macrófagos RAW 264.7 infectados e (C) índice de infecção. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 17. Micrografias do ensaio de infecção com as formas amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 tratadas com CFS das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações.

Figura 18. Produção de e IL-10 e TNF- por macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. braziliensis* e tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250µl/poço: (A) Produção de IL-10 por CFS 1273, (B) Produção de IL-10 por CFS 144, (C) Produção de IL-10 por CFS 118, (D) Produção de TNF- por CFS 1273, (E) Produção de TNF- por CFS 144, (F) Produção de TNF- por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 19. Produção de e IL-10 e TNF- por macrófagos diferenciados de THP-1 infectados com *L. braziliensis* e tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250µl/poço: (A) Produção de IL-10 por CFS 1273, (B) Produção de IL-10 por CFS 144, (C) Produção de IL-10 por CFS 118, (D) Produção de TNF- por CFS 1273, (E) Produção de TNF- por CFS 144, (F) Produção de TNF- por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Figura 20. Produção óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 infectados com *L. braziliensis* e tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250µl/poço. (A) macrófagos RAW tratados com CFS 1273, (B) macrófagos RAW tratados com CFS 144, (C) macrófagos RAW tratados com CFS 118, (D) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 1273, (E) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 144 e (F)

macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da capacidade de formação de biofilme.

Tabela 2 - Sensibilidade das cepas potencialmente probióticas contra antimicrobianos

Tabela 3 - Índice de Seletividade do CFS das cepas de *B. velezensis* em células VERO CCL81 e *L. braziliensis*

Tabela 4 - Índice de Seletividade do CFS das cepas de *B. velezensis* em células RAW 264.7 e *L. braziliensis*

LISTA DE SIGLAS

AFU	Unidades arbitrárias de fluorescência
BHI	*Brain Heart Infusion*
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CFS	Sobrenadante livre de células
DCFH-DA	2′,7′-diclorodihidrofluoresceína
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
HCL	Ácido clorídrico
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCM	Leishmaniose mucocutânea
M199	Meio de cultura 199
MIC	Concentração inibitória mínima
MRSA	*Sthapylococcus aureus* resistente à meticilina
MOI	Multiplicidade de infecção
MTT	Brometo de tiazolil azul de tetrazólio
NaOH	Cloreto e sódio
NO	Óxido nítrico
O.D	Densidade óptica
PBS/EDTA	Solução salina tamponada com fosfato/agente quelante EDTA
PFA	Paraformaldeído
PMA	forbol-12-miristato 13-acetato
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*

SFB	Soro fetal bovino
TMB	3,3’,5,5’-Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO……21
2 REVISÃO DE LITERATURA……...23
2.1 MICROBIOMA E PROBIÓTICO……..23
2.1.1 Efeito Probiótico de *Bacillus velezensis*……24
2.1.2 Sobrenadante Livre de Células……25
2.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR……...26
2.2.1 Ciclo Biológico……27
2.2.2 Imunopatologia……...28
2.2.3 Leishmaniose Cutânea Difusa E Leishmaniose Mucocutânea……...30
2.2.5 Tratamento Convencional no Brasil……31
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA CIENTÍFICA/SOCIAL ….……33
4 OBJETIVOS……33
4.1 OBJETIVO GERAL……...33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS……..33
5 METODOLOGIA……34
5.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS…..34
5.1.1 Cultivo de *B. velezensis*……..34
5.1.2 Preparação do Sobrenadante Livre de Células (CFS).....34
5.1.3 Sensibilidade das cepas após exposição à pH ácido e sais biliares……35
5.1.4 Ensaio de adesão em placas de poliestireno……35
5.1.5 Antibiograma……..36
5.1.6 Ação contra microrganismos patogênicos……...36
5.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES……37
5.2.1 Cultivo e manutenção de fibroblastos VERO CCL-81, macrófagos RAW 264.7 e monócitos THP-1……37
5.2.2 Citotoxicidade com as linhagens VERO CCL-81 e RAW 264.7……37
5.2.3 Diferenciação de monócitos THP-1……..38
5.2.4 Obtenção de Linfócitos derivados de Esplenócitos Murinos……39
5.2.5 Ensaios de imunomodulação com macrófagos RAW 264.7, macrófagos diferenciados de THP-1 e Linfócitos derivados de esplenócitos murinos……..39
5.2.6 Ensaio de cinética de produção de Espécies Reativas de Oxigênio……...40
5.2.7 Ensaio de produção de Óxido Nítrico……..41

5.3 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *L. brasiliensis*……...41
5.3.1 Cultivo de *L. braziliensis*……41
5.3.2 Viabilidade das promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com os CFS de *B. velezensis*……...42
5.3.3 Ensaios de infecção em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1……...42
5.3.4 Avaliação do parasitismo intracelular em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1……..43
5.3.5 Ensaios de imunomodulação com macrófagos RAW 264.7, macrófagos diferenciados de THP-1 após infecção com *L.braziliensis*……44
5.3.6 Ensaio de produção de Óxido Nítrico após infecção com *L. braziliensis*……...44
5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS…….45
6. RESULTADOS……45
6.1 SENSIBILIDADE DAS CEPAS APÓS EXPOSIÇÃO À PH ÁCIDO E SAIS BILIARES…….45
6.2 ENSAIO DE ADESÃO EM PLACAS DE POLIESTIRENO……47
6.3 ANTIBIOGRAMA…….48
6.4 AÇÃO CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS…….49
6.5 CITOTOXICIDADE COM AS LINHAGENS VERO CCL-81 E RAW 264.7……52
6.6 ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO COM MACRÓFAGOS RAW 264.7, MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1 E ESPLENÓCITOS MURINOS……...54
6.7 ENSAIO DE CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO……...57
6.8 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....58
6.9 VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* TRATADAS COM OS CFS DE *B. velezensis*……59
6.10 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....61
6.11 AVALIAÇÃO DO PARASITISMO INTRACELULAR EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 E MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1……..62
6.12 ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO COM MACRÓFAGOS RAW 264.7, MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1 APÓS INFECÇÃO……67
6.13 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO APÓS INFECÇÃO…….68
7. DISCUSSÃO……69
8. CONCLUSÃO……75

REFERÊNCIAS……..77

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) que se manifestam em 97 países, afetando aproximadamente 12 milhões de indivíduos (JUNIOR et al., 2023). A doença é causada por *Leishmania* spp., protozoários intracelulares obrigatórios transmitidos através da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos. As manifestações clínicas incluem as formas tegumentar e visceral, sendo esta última considerada a mais grave e letal. No espectro da Leishmaniose tegumentar (LT), englobam-se manifestações como Leishmaniose Cutânea (LC) simples, LC difusa, LC disseminada e leishmaniose mucocutânea (LMC). No novo mundo, as principais espécies envolvidas na infecção da LT são *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* ou *L. major, L. tropica e L. aethiopica* no velho mundo (JUNIOR et al., 2023; DAGA et al., 2021).

A abordagem terapêutica da Leishmaniose atualmente envolve o uso de medicamentos obsoletos e altamente tóxicos, sendo os antimoniais pentavalentes e a anfotericina-B as opções de primeira escolha. Ambas as classes de medicamentos apresentam efeitos tóxicos sistêmicos, impactando negativamente os tecidos hepático, cardíaco e renal (RODRIGUES et al., 2015). No Brasil, entre 2021 e 2024, foram registrados 56.448 casos de leishmaniose tegumentar, com incidência média anual de 6,09 por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2025). Os custos atribuídos ao sistema de saúde com o tratamento da doença no estado de Minas Gerais, teve uma estimativa de US$ 117,36/paciente, além disso, os custos indiretos foram de US$ 160,12 por paciente (SILVA et al., 2025).

A resposta imune na leishmaniose envolve mecanismos inatos e adaptativos que podem determinar tanto a resolução quanto a progressão da doença. Células inatas, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, atuam na eliminação inicial dos parasitas, mas podem também favorecer sua persistência ao modular a ativação de células T. A imunidade adaptativa, mediada por células Th1, promove resistência por meio da liberação de IFN-γ e IL-2, ativando macrófagos e induzindo produção de óxido nítrico (NO) para eliminar amastigotas intracelulares. Em contraste, células Th2 e citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, inibem a resposta Th1, permitindo a multiplicação do parasita, que ainda manipula o sistema imunológico do hospedeiro para favorecer sua sobrevivência e a progressão da doença (MIRZAEI et al., 2021). Características intrínsecas dos indivíduos, como polimorfismos genéticos, estado nutricional e imunológico, assim como diferenças entre espécies e cepas de *Leishmania*, influenciam diretamente o equilíbrio da resposta imunológica durante a infecção. Consequentemente, fatores que modulam a resposta imune podem afetar o

desenvolvimento, a evolução e a resolução das diferentes formas clínicas da doença. (COSTA-DA-SILVA et al, 2022).

Os probióticos são microrganismos não patogênicos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados de maneira apropriada (ASHOUR; OTHMAN, 2020). A utilização de probióticos tem demonstrado resultados positivos, incluindo a modulação da resposta imunológica, a prevenção de distúrbios gastrointestinais e a estabilização do microbioma intestinal (FREEDMAN et al., 2021).

O uso tradicional de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* como probióticos é amplamente reconhecido. Entretanto, essas cepas podem apresentar limitações relacionadas à estabilidade e à sobrevivência em condições adversas, o que pode comprometer seu desenvolvimento e aplicação (SUVA; SUREJA; KHENI, 2016). No âmbito imunológico, bifidobactérias demonstraram aumentar significativamente os níveis de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA em modelos murinos, evidenciando impacto positivo sobre a imunidade humoral. De forma semelhante, a ingestão de *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) foi associada à modulação da ativação de células B, favorecendo seu desenvolvimento e maturação, além de regular a secreção de imunoglobulinas e aumentar a capacidade de apresentação de antígenos (ROUSSEAUX; BROSSEAU; BODINIER, 2023).

Nesse contexto, bactérias do gênero *Bacillus* têm emergido como alternativas promissoras para aplicações em saúde humana. Esses microrganismos apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas (LEE; KIM; PAIK, 2019), além de exercerem influência significativa sobre o estado imunológico do hospedeiro (SOROKULOVA, 2013). Uma vantagem adicional desse gênero é sua elevada tolerância às condições do trato gastrointestinal, incluindo pH ácido e presença de sais biliares, o que favorece sua sobrevivência e viabilidade como probiótico (DOS REIS et al., 2022).

Do ponto de vista genômico e metabólico, espécies de *Bacillus* destacam-se pela capacidade de destinar aproximadamente 5% de seu genoma à produção de compostos antimicrobianos (SOROKULOVA, 2013). A secreção de proteínas e metabólitos bioativos permite sua aplicação tanto na produção de proteínas recombinantes quanto na bioprospecção de bacteriocinas. Esses metabólitos atuam predominantemente sobre a membrana celular de microrganismos-alvo, mas também podem interferir em mecanismos como quorum sensing, processos intracelulares e integridade da parede celular, frequentemente por meio de ações combinadas que potencializam sua eficácia antimicrobiana (TRAN et al., 2022).

Entre as espécies do gênero, *Bacillus velezensis* tem recebido destaque. Devido à alta similaridade filogenética entre espécies do complexo *Bacillus subtilis*, algumas cepas foram

inicialmente classificadas como *B. subtilis* ou *B. amyloliquefaciens*, sendo posteriormente reclassificadas como *B. velezensis* (ADENIJI et al., 2019). Embora amplamente explorada na agricultura para o controle de fitopatógenos, essa espécie também demonstra potencial para aplicações biomédicas. A análise genômica da cepa GX0002980 identificou genes envolvidos na produção de compostos antimicrobianos, como surfactina, fengicina e bacilicina, evidenciando seu potencial de biocontrole contra *Colletotrichum gloesporioides* (WANG J et al., 2025). Além disso, a suplementação com a cepa A2 mostrou efeito protetor em células intestinais IPEC-J2 expostas à zearalenona, por meio da modulação da via Wnt/FRZB/β-catenina e da preservação da integridade da barreira intestinal (CAI J et al., 2024).

No contexto específico da saúde humana, resultados promissores também foram descritos. Larsen et al. (2023) demonstraram que *B. velezensis* DSM 33864 reduziu a colonização por *Clostridioides difficile* em modelos in vitro e in vivo, incluindo modelos murinos tratados com antibióticos, sem impactar negativamente a microbiota intestinal comensal, sugerindo potencial como probiótico direcionado à prevenção de infecções oportunistas. Adicionalmente, a cepa BV379 apresentou baixo potencial de virulência e, embora carregasse alguns genes de resistência, mostrou-se suscetível a antibióticos clinicamente relevantes. Seus lisados não comprometeram a viabilidade ou a permeabilidade de células intestinais, e seus esporos demonstraram resistência às condições gastrointestinais adversas (BRUTSCHER et al., 2014).

Considerando as limitações das terapias convencionais no contexto da Leishmaniose cutânea, torna-se evidente a urgência de desenvolver novos modelos terapêuticos, inovadores ou adjuvantes dos atualmente empregados. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a potencial aplicação de cepas de *B. velezensis* como probiótico, seu efeito antiparasitário, sua capacidade imunomoduladora além de seu impacto na infecção por *Leishmania braziliensis*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICROBIOMA E PROBIÓTICOS

O microbioma intestinal refere-se aos microrganismos que coexistem simbioticamente no trato gastrointestinal (TGI) humano, proporcionando proteção contra patógenos e aprimorando a resposta imunológica. A população total desses microrganismos é estimada entre 10^{13} e 10^{14}, superando, portanto, o número total de células do próprio organismo humano (CHENG; LING; LI, 2020). O desequilíbrio desse microbioma, conhecido como disbiose,

pode resultar em doenças inflamatórias, alergias, alterações fisiológicas e até mesmo doenças autoimunes. Portanto, intervenções terapêuticas direcionadas ao potencial do microbioma intestinal são de extrema importância para tratar diversas doenças humanas (MUKHERJEE et al., 2018).

Os probióticos compõem uma fração do microbioma e caracterizam-se por apresentar baixa ou nenhuma patogenicidade, sendo considerados seguros quando administrados de forma adequada. Geralmente, são obtidos por meio de processos de fermentação ou na forma de suplementos bacterianos liofilizados, atribuindo diversos benefícios à saúde (SORNSENEE et al., 2024, BRON; BAARLEN & KLEEREBEZEM, 2012). Uma característica fundamental dos probióticos é a sua capacidade de resistir a condições fisiológicas adversas, incluindo o ambiente ácido do estômago e a ação dos sais biliares. Essa resistência é essencial para garantir a sobrevivência dos microrganismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), possibilitando que exerçam seus efeitos benéficos no hospedeiro (PAHUMUNTO; TEANPAISAN, 2023).

2.1.1 Efeito Probiótico de *Bacillus velezensis*

Bacillus spp. é reconhecido como o gênero com a maior capacidade de produzir compostos antimicrobianos, apresentando variações em sua estrutura e espectro de atividade. Algumas cepas produzem bacteriocinas eficazes contra bactérias da mesma espécie, enquanto outras têm ação contra bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas. Existem também cepas com amplo espectro de atividade antiprotozoária e antifúngica (SOROKULOVA, 2013).

Dentro do mesmo gênero, *B. velezensis* também tem se destacado por seus efeitos benéficos., inicialmente isolada na Espanha e comumente encontrada em produtos fermentados, destaca-se por apresentar propriedades antifúngicas e antibacterianas, além de atuar como moduladora da resposta imunológica do hospedeiro (BRUTSCHER et al., 2024). Estudos recentes demonstraram que o sobrenadante livre de células da cepa ID-A01 possui ação contra *Streptococcus mutans*, evidenciando efeito anti-biofilme e potencial uso no tratamento de cáries bucais (KIM et al., 2023). Estudos anteriores demonstraram que cepas dessa espécie foram capazes de reduzir a carga de *Clostridium difficile* em modelos *in vivo* e *in vitro*, evidenciando seu potencial probiótico.

Da forma semelhante, O CFS de *B. velezensis* 1273 apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* e MRSA, inibindo crescimento e formação de biofilme, causando danos à membrana celular e induzindo produção de ROS, enquanto a análise

genômica revelou genes para bacteriocinas e metabólitos antibacterianos, evidenciando seu potencial contra patógenos multirresistentes (PERINI & PEREIRA et al., 2024). Adicionalmente, a cepa P45 de *B. velezensis* destacou-se pela ausência de genes associados à virulência e à resistência, bem como pela capacidade de inibir patógenos (da Rosa et al., 2025).

Além disso, diferentes cepas de *B. velezensis* mostraram efeitos probióticos em animais de produção. A cepa CML532 reduziu a colonização intestinal de *Clostridium perfringens* em aves e minimizou danos teciduais, enquanto a cepa 411 modulou a microbiota de suínos, reduzindo o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* e aumentando a capacidade antioxidante intestinal, evidenciando seu potencial como probiótico funcional (ZHU et al., 2024; JI et al., 2025).

Adicionalmente, WU Z et al. (2021) demonstraram que *B. velezensis* B8 exerceu efeito imunomodulador significativo em carpas-capim, fortalecendo tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. Observou-se aumento da expressão de fosfatase alcalina (FA), IgM e TNF-α, o que se refletiu em maior taxa de sobrevivência após desafio com *Aeromonas veronii*, evidenciando sua capacidade de aumentar a resistência do hospedeiro a infecções.

2.1.2 Sobrenadante Livre de Células

Os probióticos são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos com atividade inibitória contra microrganismos patogênicos. Entre esses compostos destacam-se proteínas e bacteriocinas, presentes no sobrenadante livre de células (CFS), que desempenham papel relevante na prevenção de infecções. Além disso, exercem efeitos imunomoduladores diretos, contribuindo para a regulação benéfica da resposta imune (BRON; BAARLEN & KLEEREBEZEM, 2012).

Estudos recentes reforçam o potencial do CFS como alternativa terapêutica em diferentes contextos clínicos e infecciosos. Xu et al. (2024) demonstraram que o CFS de *B. subtilis* G2B9-QUE reduziu a concentração de TNF-α e IL-10 no soro de camundongos infectados por *Clostridium perfringens*, além de diminuir a expressão de genes relacionados à toxina alfa, perfringolisina O, IL-10, IL-22 e TNF-α em tecidos intestinais. Sugerindo que os metabólitos presentes no CFS podem atuar como mediadores essenciais no tratamento dessa infecção.

Em estudos com cepas de *Lactobacillus*, Pahumunto e Teanpaisan (2023) verificaram que o CFS de *L. paracasei* SD1 e *L. rhamnosus* SD11 apresentou forte inibição do

crescimento de patógenos, além de suprimir citocinas pró-inflamatórias em células intestinais Essas cepas também aumentaram a expressão de peptídeos antimicrobianos e IL-10, sugerindo efeitos tanto antimicrobianos quanto imunomoduladores, além de potenciais propriedades anticancerígenas na prevenção do câncer colorretal.

Resultados semelhantes foram descritos por Sornsenee et al. (2024), que avaliaram o CFS liofilizado de *Limosilactobacillus fermentum* T0701 contra *Helicobacter pylori*. O tratamento reduziu significativamente a adesão da bactéria às células epiteliais gástricas humanas, além de causar danos ao patógeno sem apresentar citotoxicidade às células hospedeira, reforçando o perfil de segurança do CFS como agente alternativo contra a colonização gástrica por *H. pylori*.

Além dos efeitos antimicrobianos, alguns estudos destacam o papel imunomodulador do CFS. Quinteiro-Filho et al. (2015) mostraram que o CFS de diferentes cepas de *Lactobacillus* modulou a expressão de citocinas em macrófagos de galinha, induzindo produção de óxido nítrico (NO), além de aumentar a expressão de citocinas como IL-1β, IL-8 e IFN-γ, indicando um potencial regulador da resposta imune inata.

Por fim, estudos recentes têm sugerido também a atividade antitumoral dos sobrenadantes. Akkulak et al. (2024) relataram que o CFS de probióticos associado à hesperidina reduziu de maneira significativa a viabilidade de células de câncer de cólon (Caco-2), além de diminuir a expressão do gene CYP2W1, com efeito semelhante ao tratamento direto com as bactérias probióticas.

Esses resultados evidenciam que os sobrenadantes livres de células de probióticos contêm metabólitos capazes de modular a microbiota intestinal, inibir patógenos resistentes, regular a resposta imune e até apresentar propriedades anticancerígenas, reforçando seu potencial como ferramentas terapêuticas seguras e promissoras.

2.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Leishmaniose tegumentar pode se manifestar em três formas diferentes: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea disseminada (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC). Mais de 20 espécies podem estar evolvidas com a forma tegumentar da doença incluindo: *L. tropica, L. aethiopica, L. major, L. infantum, L. mexicana, L. amazonensis, L. braziliensis e L. guyanensis.* (CORMAN; MACNAMARA; BAKOWSKI, 2023). No Brasil, a *L. braziliensis* é o principal agente causador de LT (SILVA et al., 2017). As manifestações clínicas variam desde lesões cutâneas auto curativas até formas crônicas,

dependendo do estado imunológico do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* envolvida (ALSHAWEESH et al., 2022). A manifestação clínica primária da LC é uma úlcera delimitada, de formato arredondado, com bordas elevadas. A LCD é uma forma menos comum, na qual ocorre o desenvolvimento de nódulos sem ulceração que se estendem por todo o corpo. Já a LMC é considerada a forma mais grave da doença, ela se caracteriza pela formação de úlceras nas mucosas, causando lesões desfigurantes que afetam principalmente a região da face, destruindo septo nasal, lábios e nariz (CARVALHO; BACELLAR; CARVALHO,2022; CONDE L, 2022).

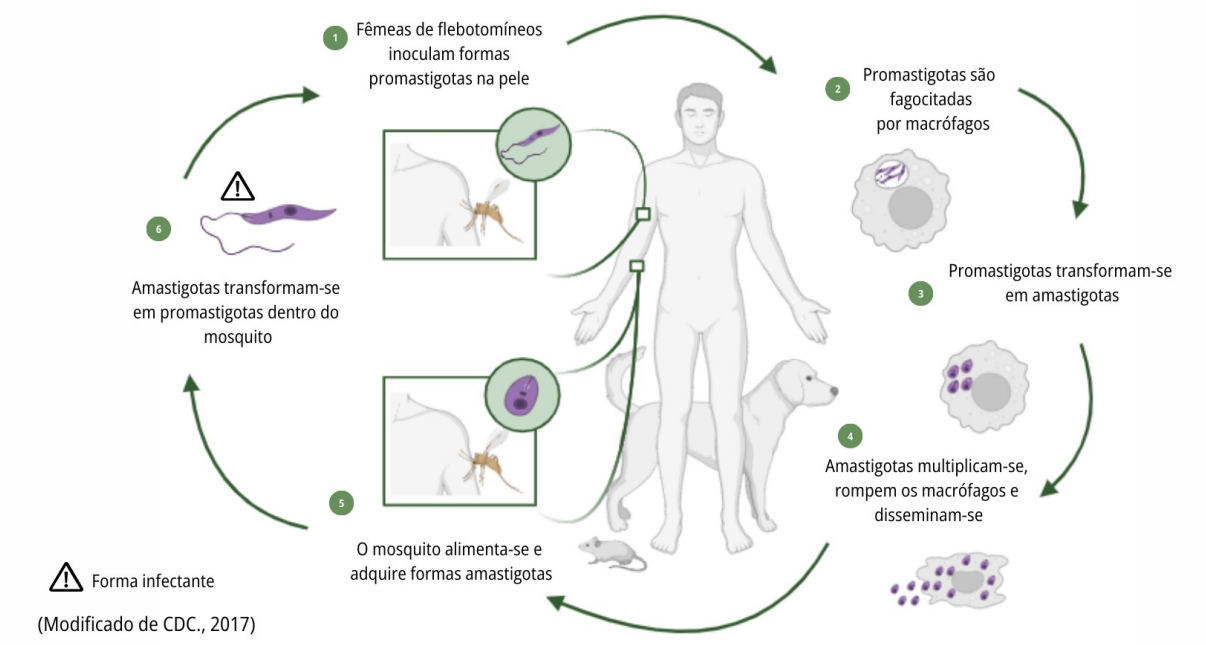
Flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, popularmente conhecidos como mosquito-palha, atuam como vetores responsáveis pela transmissão da doença, através do repasto sanguíneo de fêmeas infectadas (SERAFIM et al, 2021). Os hospedeiros da leishmaniose incluem diversas espécies de mamíferos, sendo os cães os principais reservatórios da doença. Outros mamíferos, como roedores e gambás do gênero *Didelphis* spp., também participam do ciclo de transmissão, enquanto o ser humano atua como hospedeiro definitivo (CARDOSO et al., 2015). Além da transmissão convencional por flebotomíneos, a leishmaniose também pode ser transmitida por outras vias, como transfusões sanguíneas. Ferreira-Silva et al. (2018) relataram soroconversão em dois de seis pacientes que receberam transfusão de doadores soropositivos para *L. infantum*.

2.2.1 Ciclo Biológico

O ciclo de vida da *Leishmania* é considerado relativamente simples, sendo composto por dois estágios morfologicamente e funcionalmente distintos. No vetor, a forma promastigota do parasito é predominante e é responsável pela infecção. Já no hospedeiro (humano ou outros animais) infectado, encontra-se a forma amastigota do parasito, responsável pela patogênese da doença. Essa forma é capaz de infectar macrófagos e se propagar entre eles (WIJESOORIYA et al., 2023). Nestas condições, o parasita demonstra a capacidade de modular a expressão de macrófagos, impactando negativamente em sua atividade microbicida e, consequentemente, na resposta imunológica do hospedeiro (ZANATTA et al., 2023). No hospedeiro invertebrado, o parasito apresenta-se como promastigota extracelular, que se multiplica no intestino médio do flebotomíneo (forma procíclica) ou diferencia-se em promastigota metacíclica, adaptada para a infecção e transmitida ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (BATES; ROGERS, 2005). Durante seu desenvolvimento no trato digestivo do vetor, os parasitas enfrentam barreiras

naturais e precisam aderir ao epitélio intestinal para evitar a excreção. Em estágios avançados, acumulam-se, formando tampões gelatinosos e causando danos à válvula estomodeal, o que facilita a transmissão. A transformação para formas metacíclicas altamente infecciosas é, portanto, um passo crucial para a infecção do hospedeiro vertebrado (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

No hospedeiro vertebrado, *Leishmania* spp., transformam-se em amastigotas intracelulares, forma esférica e imóvel que se multiplica no interior de células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos. Como consequência da replicação contínua, ocorre a ruptura da célula hospedeira e a liberação de novos parasitos, que passam a reinfectar células vizinhas. O ciclo se completa quando um flebotomíneo ingere células infectadas através do repasto sanguíneo, fazendo com que os amastigotas se convertam em promastigotas no intestino do mosquito-palha. (COSTA-DA-SILVA, 2022; KAYE; SCOTT, 2011).



Fonte: Adaptado de CDC, 2017

2.2.2 Imunopatologia

Logo após a infecção no hospedeiro, o sistema imunológico é ativado com o objetivo de combater o agente infeccioso, principalmente por meio da ativação do sistema complemento, que pode promover a lise de aproximadamente 90% dos parasitos. Entretanto, ao longo do processo evolutivo, *Leishmania* spp. desenvolveram estratégias de evasão imune

que lhes conferem maior capacidade de persistência no organismo. Entre esses mecanismos, destaca-se a expressão de proteínas capazes de fosforilar componentes do complemento, como C3, C5 e C9, dessa forma inibindo a ativação desse sistema (COSTA-DA-SILVA, 2022). Além disso, *Leishmania* spp. expressam em sua superfície moléculas essenciais para resistir à lise mediada pelo complemento, entre as quais se destacam a glicoproteína 63 (GP63) e o lipofosfoglicano (LPG). Essas moléculas atuam clivando o componente C3b, convertendo-o em sua forma inativa (iC3b), o que não apenas impede a formação do complexo de ataque à membrana, mas também favorece a internalização do parasito por meio da ligação aos receptores do complemento (CRs) presentes nas células hospedeiras. (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Estudos recentes descobriram outros mecanismos envolvidos na inativação de C3b, através de mecanismos que envolvem a ligação da molécula reguladora do complemento fator H do soro (ALVES et al., 2021).

As principais células do sistema imune inato envolvidas na resposta contra a infecção por *Leishmania* são os neutrófilos e os macrófagos. Os neutrófilos constituem a primeira população celular a migrar para o sítio de infecção, onde fagocitam a forma promastigota e liberam mediadores microbicidas, como óxido nítrico (NO), elastase neutrofílica (NE) e armadilhas extracelulares, desempenhando um papel protetor inicial (PACHECO-FERNADEZ et al., 2021; FILARDY et al., 2014)

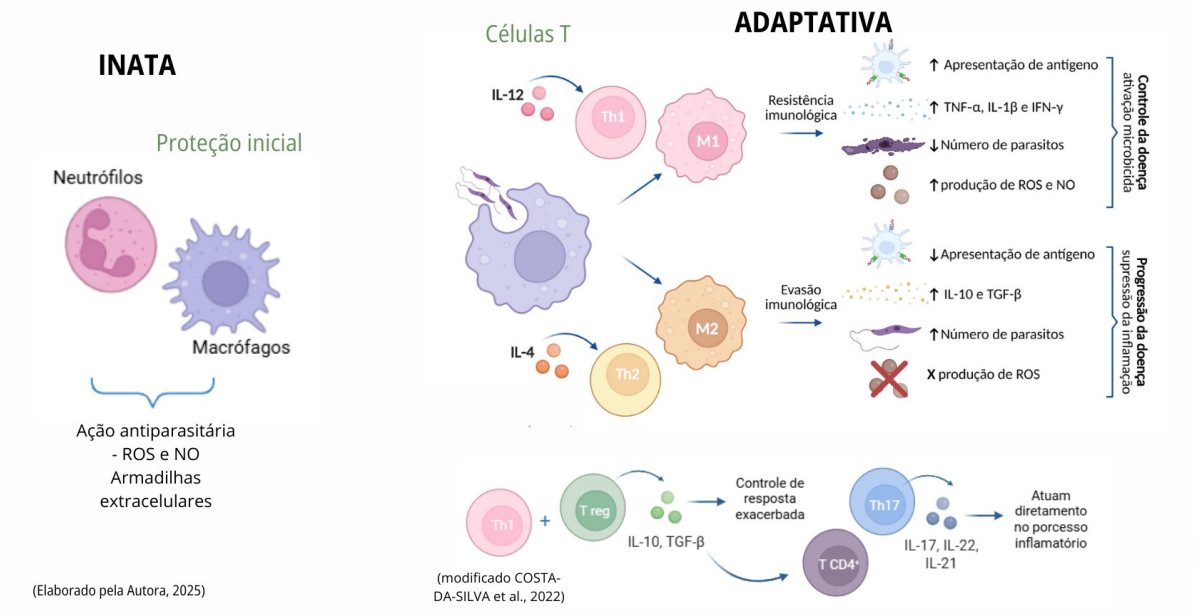
Os macrofágos são responsáveis por confinar as promastigotas em um fagolisossomo, que são organelas repletas de enzimas líticas e que possuem pH baixo. Esses macrófagos desempenham um papel essencial, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), contribuindo significativamente para a eliminação do parasita (CONDE et al., 2022). No entanto, para escapar dessa resposta microbicida, *Leishmania* spp. utilizam estratégias de evasão, sendo a principal delas mediada pela glicoproteína 63 (GP63), que inibe o estresse oxidativo e interfere na produção de NO e ROS (RALTON et al., 2021).

Outro componente essencial no controle da infecção é a atuação das células do sistema imune adaptativo, em especial os linfócitos T, que secretam citocinas capazes de modular a resposta dos macrófagos, promovendo ou inibindo sua atividade antiparasitária (COSTA-DA-SILVA et al., 2022). Nesse contexto, a eliminação do parasita está associada ao perfil de resposta Th1, no qual as células $CD4^+$ produzem citocinas como IFN-y, TNF-a, IL-12 e IL-2 que estimulam a ativação de macrófagos M1, favorecendo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), fundamentais para a destruição do parasito (ALSHWEESH et al., 2022; CONDE et al., 2022). As células T $CD8^+$ contribuem para a resposta imune por meio da secreção de citocinas; entretanto, evidências experimentais

indicam que, quando a atividade citotóxica se torna desregulada, ocorre liberação de granzimas e perforina que ativa o inflamassoma NLRP3, promovendo a produção de IL-1β e resultando na intensificação do dano tecidual e na piora das lesões cutâneas (NOVAIS et al., 2017).

Em contrapartida, o perfil Th2 contribui para a progressão da doença, uma vez que promove a secreção de IL-10, IL-4 e IL-13, citocinas que reprimem a ativação dos macrófagos M1 e induzem a diferenciação para o fenótipo M2 anti-inflamatório, dessa forma contribuindo com o crescimento dos parasitas nas lesões. Assim, ocorre a inibição das respostas microbicidas mais efetivas contra a *Leishmania*, tornando o hospedeiro mais suscetível à infecção (CONDE et al., 2022).

Além disso, estudos recentes indicam que as células Th17 e as T reguladoras (Treg) também participam da resposta imunológica contra *Leishmania* spp. As células Treg secretam TGF-β e IL-10, citocinas que, em conjunto com a resposta Th1, atuam no controle de uma ativação exacerbada do sistema imune. Paralelamente, essas mesmas citocinas favorecem a diferenciação de células Th17 a partir de linfócitos T CD4⁺ naïve, os quais produzem IL-21, IL-17 e IL-22, que irão atuar diretamente no processo inflamatório (ZAYATS et al., 2023; COSTA-DA-SILVA, 2022).



Fonte: Adaptado de COSTA-DA-SILVA et al., 2022.

2.2.3 Leishmaniose Cutânea Difusa E Leishmaniose Mucocutânea

As formas clínicas mais severas da leishmaniose tegumentar, como a leishmaniose LCD e a LMC, estão associadas a respostas imunes em extremos opostos. Em ambos os casos, observa-se que a modulação das respostas celulares e adaptativas desempenha papel central na determinação da gravidade e evolução desses quadros clínicos (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Na LCD , o parasito se dissemina por meio das vias hematogênicas, resultando no surgimento de múltiplas lesões em diferentes segmentos do corpo. Essa apresentação clínica, embora rara, é considerada grave e caracteriza-se pela presença de inúmeras lesões cutâneas, frequentemente com alta carga parasitária, distribuídas de maneira ampla e associadas, em alguns casos, a sintomas sistêmicos como febre e mal-estar (MACHADO et al., 2019). Nessa condição, predomina uma resposta imune de perfil Th2, caracterizada por baixa produção de citocinas inflamatórias, como IFN-γ, e por níveis elevados de IL-4 e IL-10, que modulam negativamente os mecanismos efetores da fagocitose, essenciais para a eliminação do parasito (SCOTT; NOVAIS, 2016). Além disso, ocorre uma intensa produção de mediadores da resposta imune humoral, os quais, entretanto, mostram-se ineficazes para impedir a infecção de novas células (ANVERSA et al., 2018).

A LMC por sua vez, também considerada uma forma grave da LT, caracteriza-se por lesões destrutivas nas mucosas, especialmente das vias aéreas superiores, comprometendo o septo nasal e podendo levar à destruição da cartilagem, além de complicações adicionais. Essa condição impacta significativamente a qualidade de vida do hospedeiro, uma vez que provoca desfiguração facial e pode evoluir para óbito devido a complicações ou infecções secundárias (ELOI et al., 2023). Diferente da LCD, a resposta imunológica da LMC envolve tanto o perfil Th1 quanto o Th2, resultando em uma resposta exacerbada. Esse processo é marcado pela alta produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ, TNF-α, além da liberação de ROS e NO, associada a baixos níveis de IL-10, IL-5, IL-4 e TGF-β (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Apesar do balanço entre as respostas Th1 e Th2 desempenhar papel central na determinação da gravidade da infecção, a manifestação clínica da doença também está relacionada pelo tipo de *Leishmania* envolvida e por diversos fatores adicionais. Entre eles, destacam-se o estado imunológico do hospedeiro, características genéticas individuais e condições nutricionais. Esses fatores podem influenciar diretamente a capacidade de controle ou progressão da infecção (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

2.2.4 Tratamento Convencional no Brasil

Os principais fármacos empregados no tratamento das Leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como a N-metilglucamina (Glucantime), e o antifúngico Anfotericina B, ambos disponibilizados no Brasil pelo Ministério da Saúde. Entretanto, o uso dessas drogas enfrenta limitações, sobretudo pela necessidade de administração parenteral em ambiente hospitalar e pelos efeitos colaterais e tóxicos associados, que podem gerar desconforto ao paciente e, em alguns casos, levar ao abandono do tratamento (RODRIGUES et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A Anfotericina B apresenta alta taxa de cura, atingindo aproximadamente 97% nos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (LV), o fármaco atua principalmente ligando-se ao ergosterol, componente essencial das membranas celulares de *Leishmania* spp.. Essa interação provoca a formação de poros transmembranares, levando à perda de íons, desregulação osmótica e eventual morte celular. Contudo, está relacionada a diversos efeitos colaterais, incluindo febre, cefaléia, hipotensão, anemia e alterações cardiovasculares e renais. Para reduzir tais complicações, foi desenvolvida a formulação lipossomal da Anfotericina B, que apresenta menor toxicidade e menos efeitos colaterais. Apesar disso, o fármaco ainda requer administração hospitalar, além de possuir custo elevado e tempo de aplicação mais prolongado (MONCADA-DIAZ et al., 2024).

Já os antimoniais pentavalentes demonstram eficácia próxima a 90%. No entanto, seu uso também é limitado pelos efeitos tóxicos nos sistemas hepático, cardíaco e renal, o que restringe sua indicação em pacientes de maior risco (ANVERSA et al., 2018, BALASEGARAM et al., 201).

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças que impactam de forma significativa a qualidade de vida das pessoas acometidas, tanto no aspecto físico quanto funcional. Os anos de vida ajustados por incapacidade (DALY) representam um indicador utilizado para mensurar a perda de saúde decorrente da carga de doenças fatais e não fatais. No Brasil, entre 1990 e 2019, foi registrado um aumento de 83,6% no DALY, sendo esse crescimento atribuído, em grande parte, à LV, que apresenta elevadas taxas de mortalidade. Já a LT, especialmente na forma mucocutânea (LMC), foi identificada como a principal responsável pela incapacidade entre os indivíduos afetados (BEZERRA et al., 2018). Além do impacto físico e social, as Leishmanioses também acarretam custos econômicos expressivos. No caso da LT, o tratamento pode corresponder a aproximadamente 22,5% da renda mensal dos pacientes. Somam-se ainda os gastos com hospitalizações, que representam cerca de 40% do total. Estima-se que os custos indiretos, decorrentes do afastamento laboral e da morte precoce, tenham ultrapassado US$ 12 milhões em apenas um ano (DE CARVALHO et al.,

2017). Além disso, no período de 2000 a 2017, a taxa de abandono do tratamento intravenoso da LC foi de 3,4% entre 90 pacientes, o que ressalta a importância do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2021).

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA CIENTÍFICA/SOCIAL

A necessidade de estratégias eficazes para prevenção e tratamento da leishmaniose cutânea é crucial, dada a limitada disponibilidade e eficácia dos fármacos existentes no mercado. O tratamento convencional é marcado por efeitos colaterais graves, como toxicidade, e apresenta custos elevados, impactando especialmente as comunidades de baixa renda (CORMAN; MACNAMARA; BAKOWSKI, 2023). No Brasil, os custos do tratamento da leishmaniose cutânea representam aproximadamente 22,5% da renda mensal dos pacientes (GALVÃO et al., 2020), Além disso, a taxa de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY) associada à leishmaniose no Brasil registrou um aumento significativo de cerca de 83,6% (BEZERRA et al., 2018).

Nesse cenário, *Bacillus velezensis* desponta como um microrganismo com potencial aplicação probiótica e atividade contra patógenos. A utilização de metabólitos derivados dessa bactéria pode contribuir tanto para a modulação da resposta imunológica quanto para possíveis efeitos diretos sobre *Leishmania* spp., configurando uma abordagem inovadora. Assim, a investigação de seu potencial terapêutico pode subsidiar o desenvolvimento de estratégias complementares mais acessíveis, seguras e eficazes no enfrentamento da leishmaniose cutânea.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as propriedades probióticas das cepas de *B. velezensis* (1273, 144 e 118) e avaliar o potencial de aplicação de seus CFS na modulação da resposta imunológica, bem como sua atividade contra *Leishmania braziliensis in vitro.*

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar propriedades probióticas das cepas de *B. velezensis* por meio da análise de sua tolerância a condições adversas, bem como de sua capacidade de adesão e interação com microrganismos patogênicos, além de determinar, por meio de testes de antibiograma, o perfil de sensibilidade e resistência a antibióticos.
- Analisar o impacto da administração do CFS das cepas de *B. velezensis* em linhagens celulares (VERO CCL-81, RAW 264.7).
- Analisar o impacto da administração do CFS das cepas de *B. velezensis* sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis.*
- Quantificar as citocinas inflamatórias expressas por esplenócitos de camundongos Balb/C tratados com CFS para investigar o efeito imunomodulador.
- Quantificar as citocinas inflamatórias expressas por macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 para investigar a imunomodulação dos CFS, incluindo a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio.
- Analisar o impacto da administração do CFS das cepas de *B. velezensis* na carga parasitária de macrófagos RAW 264.7 e macrofágos diferenciados de THP-1 infectados in vitro por *L. braziliensis.*

5. METODOLOGIA

5.1 CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS

5.1.1 Cultivo de *B. velezensis*

As cepas *B. velezensis* 1273, 144 e 118 foram isoladas de solo e caracterizadas previamente por colaboradores do Laboratório de Genética Molecular e Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Essas cepas foram identificadas por não apresentarem capacidade de hemólise e demonstraram uma baixa indução de necrose em células de hepatócitos de galinha (SOROKULOVA, 2013). As células armazenadas (em BHI 20% de glicerol) foram transferidas (20µl) para 3 ml de meio LB (Luria Bertani). A suspensão resultante foi incubada a 37ºC por 24 horas sob agitação (180 RPM). Após o cultivo, o número de células bacterianas para os ensaios subsequentes foi estimado utilizando escala de McFarland. (PERINI & PEREIRA et al, 2024).

5.1.2 Preparação do Sobrenadante Livre de Células (CFS)

O procedimento para obtenção do CFS seguiu o protocolo de Rocha et al. (2019), com adaptações. As culturas de cada cepa de probiótica, previamente incubadas, foram ajustadas para atingir uma concentração equivalente ao tubo 0.5 de McFarland (1 x 10^8 células/ml) e incubadas a 37 ºC por 24 horas sob agitação (180 RPM). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 15 minutos, o sobrenadante separado, neutralizado com HCl até atingir o pH de 6,5 e filtrado (0,22 μm). O sobrenadante, isento de células, foi armazenado a -80 ºC para os procedimentos subsequentes.

5.1.3 Sensibilidade das cepas após exposição à pH ácido e sais biliares

Foi conduzido um ensaio de tolerância a condições gastrointestinais, conforme o protocolo descrito por Pennacchia (2004), com o objetivo de simular a passagem das bactérias pelo trato gastrointestinal. As culturas bacterianas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, sob agitação de 180 rpm. Após esse período, a concentração das suspensões foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland.

Em seguida, alíquotas foram inoculadas em tubos contendo: (a) meio LB ajustado para pH 2,5 (condição de estresse ácido) e pH 7,0 (controle), e (b) meio LB suplementado com 0,3% de sais biliares bovinos, além do LB sem suplementação (controle). As culturas permaneceram por 3 horas a 37 °C e 180 rpm. Após a exposição às condições experimentais, as amostras foram centrifugadas, ressuspendidas em meio LB com pH neutro e distribuídas em placas de 96 poços.

O crescimento bacteriano foi monitorado ao longo de 24 horas por meio de leituras de absorbância a 475 nm em espectrofotômetro, permitindo a análise da cinética de crescimento após exposição das cepas bacterianas às condições de estresse ácido e na presença de sais biliares bovinos.

5.1.4 Ensaio de adesão em placas de poliestireno

A capacidade de adesão das potenciais cepas probióticas a substratos seguiu o protocolo adaptado de Silva, M. O et al. (2025). As culturas foram incubadas a 37 °C por 1, 3, 6 e 24 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes com solução salina estéril (NaCl 0,85%) para eliminar células não aderidas. Em seguida, as células fixadas com metanol (Synth) por 15 minutos foram deixadas secar à temperatura

ambiente. Posteriormente, adicionou-se solução de cristal violeta a 1%, seguida de três lavagens com solução salina. Após nova secagem, os cristais retidos foram solubilizados com solução de ácido acético a 33% e a biomassa aderida foi quantificada pela leitura de absorbância a 600 nm. Cada cepa foi testada em triplicata em três ocasiões distintas.

5.1.5 Antibiograma

A análise de resistência a antibióticos é crucial para avaliar a segurança das potenciais cepas probióticas empregadas. A avaliação foi conduzida através do ensaio de antibiograma, utilizando valores de corte microbiológicos e métodos quantitativos da Concentração Inibitória Mínima (MIC) apresentados em normativas internacionais como CLSI (M100 ED34:2024). Os antibióticos utilizados foram Penicilina, Oxacilina, Gentamicina, Eritromicina, Tetraciclina, Ciprofloxacino, Clindamicina, Rifampicina, Teicoplanina e Vancomicina.

5.1.6 Ação contra microrganismos patogênicos

A fim de avaliar o potencial de secreção de compostos antibacterianos por cepas de *Bacillus velezensis* (1273, 144 e 118), foi realizado um ensaio de co-cultivo com cepas patogênicas (*Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*) seguindo o protocolo de Perini & Pereira et al. (2024). Culturas bacterianas overnight foram padronizadas para turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland. As cepas patogênicas foram semeadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton, e, em seguida, um inóculo pontual das cepas de *B. velezensis* foi depositado no centro das placas. Após incubação a 37 °C por 24 horas, a atividade antibacteriana foi avaliada pela formação de halos translúcidos ao redor da colônia de *B. velezensis*.

Adicionalmente, a atividade antibacteriana do sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* foi investigada por meio do ensaio de difusão em poço. Para isso, as bactérias patogênicas foram previamente semeadas em ágar Mueller-Hinton, e 50 µL de CFS foram adicionados em poços confeccionados no centro das placas. Após incubação a 37 °C por 24 horas, a presença de halos de inibição ao redor dos poços foi considerada indicativa de atividade antibacteriana.

Na sequência, a capacidade inibitória do CFS foi investigada pelo método de microdiluição em caldo, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).

Suspensões padronizadas de bactérias patogênicas (*S. aureus*, MRSA, *S. mutans* e *E. coli*) foram incubadas a 37 °C por 18 horas com diluições seriadas do CFS (1:2 a 1:512). O crescimento bacteriano foi monitorado pela leitura da absorbância a 475 nm, sendo os resultados expressos em densidade óptica (O.D.).

5.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

5.2.1 Cultivo e manutenção de fibroblastos VERO CCL-81, macrófagos RAW 264.7 e monócitos THP-1

Células da linhagem de macrófagos Raw 264.7, derivadas de macrófagos murinos peritoneais imortalizados, VERO CCL-81, derivada do tecido epitelial renal de macaco verde Africano e a linhagem celular humana de leucemia monocítica, denominada THP-1, foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 20 µg/ml de Gentamicina. O cultivo ocorreu em frascos de cultura de 25 cm^3 que foram mantidos em estufa a 37 ºC com 5 % de dióxido de carbono (CO_2). (ZHANG et al, 2020).

Para realizar os ensaios, as células aderentes foram dissociadas dos frascos utilizando PBS/EDTA (0,25%) e Tripsina 1X (Sigma™). Para determinar o número de células e ajustar a concentração desejada em cada experimento, as células foram coradas com líquido de Turk (Cristal Violeta 0,1% e solução de ácido acético 1%) e, posteriormente, contadas em uma câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer). Os experimentos foram conduzidos após doze horas de plaqueamento em placas de 96 poços, permitindo a aderência celular.

5.2.2 Citotoxicidade com as linhagens VERO CCL-81 e RAW 264.7

O ensaio de citotoxicidade seguiu o protocolo adaptado de Abbasi et al. (2023). Células epiteliais da linhagem VERO CCL-81 foram removidos das garrafas de cultura por tratamento com tripsina 1X (Sigma™) em PBS/EDTA. Já os macrófagos RAW 264.7 foram destacados das garrafas utilizando um espalhador de células estéril. As células suspensas foram coletadas com pipeta estéril e transferidas individualmente para tubos de 15 mL, contendo 1,5 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SBF para inibir a ação da tripsina.

Os tubos foram centrifugados a 600 g por 6 minutos, formando o pellet celular. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 5 mL de meio RPMI com 10% de SBF e submetidas à contagem em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para 1×10^5 células/poço. Cada linhagem foi então plaqueada separadamente em placas de 96 poços de fundo chato e incubada a 37 °C em estufa com 5% de CO_2 por 12 horas, para permitir a adesão celular.

Após o período de adesão celular, os tratamentos foram adicionados aos poços contendo as culturas, utilizando diferentes concentrações de CFS (2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, correspondente ao volume final de 250 μL/poço), em triplicata. Também foram incluídos, igualmente em triplicata, os seguintes controles: poços apenas com células (controle positivo/viabilidade), poços com células tratadas com paraformaldeído (PFA) a 4% (controle negativo/morte) e poços contendo apenas meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF (controle de esterilidade).

As placas foram incubadas novamente a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO_2, por 24 horas. Após esse período, adicionou-se 25 µL de resazurina (Sigma™; 1,0 mg/mL), correspondendo a 10% do volume final de cada poço (250 μL). As placas foram mantidas sob as mesmas condições e monitoradas a cada 30 minutos para observar a alteração da coloração do corante, que é reduzido enzimaticamente por células viáveis em resorufina, pigmento fluorescente de coloração rósea. A viabilidade celular foi quantificada em leitor de microplacas (EnSpire, Perkin-Elmer – EUA), com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. A partir das leituras, calcularam-se as porcentagens de viabilidade celular e, em seguida, a concentração citotóxica capaz de reduzir 50% da viabilidade (CC_{50}), expressa em µg/mL, para ambas as linhagens.

5.2.3 Diferenciação de monócitos THP-1

A diferenciação de monócitos THP-1 seguiu o protocolo adaptado de Chang et al. (2021). Os monócitos THP-1 foram coletados das garrafas de cultura e transferidos para um tubo e 50 mL, para então, serem centrifugados a 600g por 6 minutos. Após o pellet foi ressuspendido em 5mL de meio RPMI 1640 a 10% de SBF e as células foram contadas na Câmara de Neubauer e a concentração de células foi ajustada para $1x10^4$ células/poço; após ajuste de concentração o forbol-12-miristato 13-acetato (PMA) foi adicionado em uma concentração de 100ng/mL. Após, as células foram plaqueadas e incubadas na estufa a 5% de CO_2 e a 37ºC durante 24 horas, posterior ao período de incubação, o meio dos poços foi

retirado e adicionado 200µL de meio RPMI 1640 a 10% SBF e as placas foram incubadas na estufa a 5% de CO_2 a 37ºC durante 48 horas.

5.2.4 Obtenção de Linfócitos derivados de Esplenócitos Murinos

Para a obtenção dos esplenócitos de camundongos Balb/c seguimos o protocolo de Harada et al., (2022) com adaptações. A origem dos camundongos foi a partir de doação do Biotério Central da UFTM, proveniente de animais utilizados para manutenção da criação e destinados ao descarte. A utilização da carcaça desses camundongos não necessita da aprovação do Comitê de ética no uso de animais (CEUA).

O baço foi removido de camundongos eutanasiados sob condições assépticas e transferido para uma placa de Petri contendo 5 mL de meio RPMI incompleto. Em seguida, o órgão foi macerado com auxílio de uma pinça tipo "pata de gato" para promover a dissociação celular. O material resultante foi transferido para um tubo de 15 mL contendo 10 mL de meio RPMI incompleto e centrifugado a 400 g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspenso em 10 mL de RPMI incompleto. O procedimento de centrifugação foi repetido nas mesmas condições, e o pellet final foi ressuspenso em 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2×10^6 células/mL. Em seguida, foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 48 h para permitir a adesão celular. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e as culturas foram tratadas com o CFS das cepas de *B. veleznensis* 1273, 144 e 118

5.2.5 Ensaios de imunomodulação com macrófagos RAW 264.7, macrófagos diferenciados de THP-1 e Linfócitos derivados de esplenócitos murinos

Para a dosagem de citocinas, foi empregado o método de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) no formato sanduíche. Foram utilizados kits comerciais Mouse IFN-γ (BD OptEIA™), Mouse IL-10 (BD OptEIA™), Mouse TNF-α (BD OptEIA™) para células de linhagem animal e Human IL-10 (BD OptEIA™), Human TNF-α (BD OptEIA™) para células de linhagem humana. Os ensaios foram realizados seguindo as recomendações dos fabricantes, utilizando o sobrenadante das culturas celulares tratados com diferentes concentrações do CFS das cepas de *B. velezensis.*

Foram utilizadas placas de 96 poços de meia área com alta afinidade. Inicialmente, cada placa destinada a uma citocina foi sensibilizada com 50 µL do anticorpo de captura diluído 1:250, conforme o tampão recomendado pelo fabricante: tampão fosfato pH 7,2 para IL-10 e tampão carbonato pH 9,5 para IFN-γ e TNF-α. As placas foram incubadas overnight em câmara úmida a 4 °C.

As placas foram então lavadas três vezes com 100 µL de PBS-Tween 0,5% e bloqueadas com 200 µL de PBS-SBF 20% por 4 horas em câmara úmida a 25 °C. Após o bloqueio, as placas foram lavadas novamente com 100 µL de PBS-Tween 0,5%, e adicionou-se 25 µL de PBS-SBF 10% nos poços das amostras tratadas e 50 µL nos poços da curva padrão e do branco.

Para a construção da curva padrão, foram adicionados 50 µL do padrão nos dois primeiros pontos da curva, localizados nas últimas duas colunas da placa, seguindo a concentração estoque e a concentração recomendada pelo kit. As diluições subsequentes foram realizadas em série (1:2), e dois poços foram mantidos apenas com PBS-SBF 10% (branco). Em seguida, 25 µL dos sobrenadantes coletados da imunomodulação da células foram adicionados aos poços das amostras, e as placas foram incubadas na câmara úmida por 2 horas.

Após a incubação, as placas foram lavadas com 100 µL de PBS-Tween 0,5% e adicionou-se 50 µL do anticorpo de detecção diluído 1:250 em PBS-SBF 10%, conjugado à estreptavidina-HRP, seguido de incubação por 1 hora na câmara úmida. A reação foi revelada com 50 µL de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina), incubando as placas no escuro por 30 minutos. Para interromper a reação, adicionou-se 50 µL de ácido sulfúrico 2N, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Eon – NewRoute™) a 450 nm e 570 nm.

As concentrações das citocinas foram calculadas a partir da curva padrão, após correção pelo branco, utilizando regressão linear simples.

5.2.6 Ensaio de cinética de produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Para realização do ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi utilizado o protocolo adaptado de Zhang et al. (2020), os macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 foram marcados com diacetato de 2′,7′-diclorodihidrofluoresceina (DCFH-DA, 0,1 µM) por 45 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas três vezes com RPMI 1640 sem a adição de SBF, posteriormente, as células foram tratadas com os CFS nas mesmas concentrações do item

5.2.2 . As leituras de fluorescência foram realizadas durante 60min para avaliar a cinética. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda Ex485/Em535 e expressa em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

5.2.7 Ensaio de produção de Óxido Nítrico

Para realização do ensaio de produção de óxido nítrico, seguindo o protocolo adaptado de Chang et al. (2021), os macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 foram processados da mesma forma descrita no item 5.2.2 e 5.2.3 respectivamente. Após a contagem, as células foram adicionadas na placa de 96 poços em uma concentração de $1x10^3$ e $1x10^4$ célula/poço respectivamente e incubadas na estufa a 5% de CO_2 e a 37ºC por um período de 12 horas para adesão celular. Após as células foram tratadas, nas mesmas concentrações selecionadas e descritas no item 5.2.2, por um período de 24 horas. Após, foi realizada a reação de Griess para detecção do nitrito, um subproduto da oxidação do NO presente no sobrenadante das culturas celulares. Foi realizada a adição do sobrenadante à placa, seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Para criar a curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio foi preparada com diluições seriadas da concentração inicial, sendo o último poço o branco, contendo apenas com PBS 1x. Após uma incubação de 10 minutos no escuro, a leitura é realizada no espectrofotômetro (EnSpire Perkin-Elmer – USA) a 450 nm. As concentrações foram calculadas a partir das leituras da curva padrão, após correção pelo branco, utilizando regressão linear simples.

5.3 CULTIVO E MANUTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *L. brasiliensis*

5.3.1 Cultivo de *L. braziliensis*

O cultivo das formas promastigotas de *L. braziliensis* foi realizado conforme protocolo adaptado de Rodrigues et al. (2025), utilizando meio de cultura 199 (M199) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas em frascos de 25 cm³ e incubadas em estufa do tipo BOD a 26 °C, sob condições controladas. Para os ensaios de toxicidade e infecção celular, os parasitas em fase estacionária de crescimento (5º dia de cultura) foram submetidos a um processo de centrifugação diferencial, em que foi realizada a centrifugação a 150g por 1 minuto, coleta do sobrenadante para realização da segunda centrifugação a 2.000g por 30 minutos, sendo ambas em uma temperatura de 4ºC. Esse

processo garantiu que as leishmanias mortas e debris, assim como os possíveis cristais formados no meio, fossem descartados, de modo que não interferissem na qualidade do experimento. Posteriormente, uma alíquota de *L. braziliensis* foi diluída em paraformaldeído (PFA) 4%, contados em câmara de Neubauer e as concentrações ajustadas para cada experimento.

5.3.2 Viabilidade das promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com os CFS de *B. velezensis*

O ensaio de viabilidade parasitária seguiu o protocolo adaptado de Shaikh et al. (2024). As formas promastigotas de *L. braziliensis* foram retiradas da garrafa de cultura e transferidas para um tubo Falcon de 50 mL, sendo então submetidas à centrifugação diferencial. Primeiro, foi realizada uma centrifugação a 150 g por 1 minuto, coletando-se o sobrenadante para uma segunda centrifugação a 2.000 g por 30 minutos, ambas a 4 ºC. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as promastigotas foi ressuspendido em 10 mL de meio M199 suplementado com 10% de SBF. A suspensão foi levada à Câmara de Neubauer para contagem dos parasitas e ajuste da concentração para $1x10^6$ parasitas/poço.

Na placa de 96 poços de fundo chato, a suspensão contendo os parasitas foi adicionada, seguida da aplicação dos tratamentos de CFS das cepas de *B. velezensis* na seguindo o mesmo padrão de concentração da citotoxicidade. Na mesma placa, foram distribuídos, em triplicata, os diferentes grupos experimentais e controles: poços apenas com promastigotas (controle positivo/viabilidade), poços com promastigotas tratadas com PFA a 4% (controle negativo/morte) e poços contendo apenas meio M199 suplementado com 10% de SBF (controle de esterilidade).

Após o tratamento, foi adicionado à placa o corante MTT (0,5 mg/mL) [brometo de (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Sigma), correspondente a 10% do volume final de cada poço (100 µL), e a placa foi incubada a 37°C por 4 horas. Em seguida, 100 µL de tampão de solubilização (HCl 0,1 M em álcool isopropílico) foram adicionados para dissolver os cristais formados. A absorbância foi determinada a 540 e 650 nm, e a viabilidade das promastigotas foi calculada em relação aos controles, determinado a (IC_{50}).

5.3.3 Ensaios de infecção em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1

Foram realizados dois ensaios em placas de 96 poços de fundo chato, de forma independente quanto à linhagem de células, seguindo protocolo adaptado de Oliveira et al. (2025). Os macrófagos RAW 264.7 foram desagregados de suas respectivas garrafas de cultura de 25cm³ a partir da utilização de um espalhador de células estéril. Após serem suspensos, o sobrenadante da garrafa contendo as células foi transferido para um tubo de 50mL e esse levado à centrifugação a 600g por 6 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 5mL de RPMI 1640 a 5% de SBF e as células foram contadas na Câmara de Neubauer e a concentração de células foi ajustada para $1x10^3$ célula/poço. Após a contagem, as células foram adicionadas na respectiva placa de 96 poços e incubadas na estufa a 5% de CO_2 e a 37ºC durante 12h para aderência celular. Já os monócitos THP-1 foram diferenciados de acordo com o item 5.2.3.

Transcorrido o período de adesão celular dos macrófagos RAW 264.7 e a diferenciação dos monócitos THP-1, as promastigotas de *L. braziliensis* foram transferidas para um tubo de 50mL, e submetidas à centrifugação diferencial, em que foi realizada a centrifugação a 150g por 1 minuto, coleta do sobrenadante para realização da segunda centrifugação a 2.000g por 30 minutos, sendo ambas em uma temperatura de 4ºC. O *pellet* foi ressuspendido em 5mL de RPMI 1640 a 10% de SBF. Após, os parasitas foram contados na Câmara de Neubauer para ajuste de concentração, respeitando a multiplicidade de infecção (MOI) 10:1 e a solução foi adicionada nas placas contendo as respectivas linhagens celulares. Transcorridas 24 horas, os parasitas extracelulares foram retirados e foi adicionado RPMI 1640 a 10% de SBF e as placas receberam os tratamentos em triplicata de cada CFS. Também foram adicionados, em triplicata, um controle de infecção isento de tratamento e poços apenas com RPMI 1640 a 10% de SBF como controle de esterilidade e, após essa etapa, as placas seguiram para estufa a 37ºC e 5% de CO_2 por 48 horas. Ao fim das 48 horas, o sobrenadante da placa foi armazenado a -20ºC para futuras análises e ao volume restante nas placas originais, foram adicionados 100µL de metanol gelado overnight para fixação das células, e em seguida, realizado o protocolo de imunofluorescência.

5.3.4 Avaliação do parasitismo intracelular em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1

A avaliação do parasitismo intracelular seguiu o protocolo adaptado de Oliveira et al. (2025). As placas de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1, após

fixação com 100µL de metanol gelado foram submetidas à marcação por imunofluorescência. O metanol foi retirado dos poços e, em seu lugar, foram adicionados 50µL/poço de PBS-saponina 0,1% com soro de cabra a 10%, para o bloqueio de ligações inespecíficas, e as placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Após 10 minutos, o conteúdo dos poços foi retirado e as placas foram lavadas quatro vezes com 100µL PBS-saponina 0,1%, adicionou-se mais 50µL da mesma solução nos poços e as placas foram novamente incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o conteúdo foi novamente retirado e se adicionou 50µL de PBS-saponina 0,1% com anticorpo anti-*L. infantum* ("pool" de soro de pacientes infectados) na diluição de 1:10 e a placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. Após transcorrido o intervalo, o conteúdo dos poços foi retirado e as placas foram lavadas quatro vezes com 100µL de PBS-saponina 0,1%. Foram adicionados 50µL do anticorpo anti-IgG-FITC humano ("*fluorescein isothiocyanate"*) com PBS-saponina 0,1% na diluição 1:200, acrescido de 1µL/poço de Iodeto de Propídio, (25mg/mL); as placas foram mantidas no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, as placas foram novamente lavadas com 100µL de PBS-saponina 0,1% por quatro vezes e adiciona-se 150µL de PBS 1x em todos os poços. Após finalizadas, as placas seguiram para o microscópio de fluorescência (EVOS™) para visualizar as marcações. O anti-IgG-FITC é responsável pela cor verde na membrana dos parasitos e o Iodeto de Propídio cora o núcleo das células e dos parasitas em vermelho.

Para análise dos dados, foram capturadas fotos em sobreposição para fazer a contagem. Para a contagem, pelo menos 100 células foram contadas para serem registradas em planilhas digitais (Microsoft Excel™) a nível de média de *L. braziliensis* por célula, percentual de células infectadas e índice de infecção, calculado pela multiplicação da média de *L. braziliensis* por célula e o percentual de células infectadas.

5.3.5 Ensaios de imunomodulação com macrófagos RAW 264.7, macrófagos diferenciados de THP-1 após infecção com *L.braziliensis*

Para a dosagem de citocinas após a infecção celular, foram utilizados os sobrenadantes previamente armazenados, conforme descrito no item 5.3.3. O ensaio foi conduzido de acordo com o protocolo estabelecido no item 5.2.5.

5.3.6 Ensaio de produção de Óxido Nítrico após infecção com *L. braziliensis*

Para a dosagem de NO após infecção celular foram utilizados os sobrenadantes previamente armazenados, conforme descrito no item 5.3.3. O ensaio foi conduzido de acordo com o protocolo estabelecido no item 5.2.7.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram tabulados e as variáveis foram avaliadas quanto à distribuição normal por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, e a homogeneidade de variância foi verificada com o Teste de Bartlett. Quando a distribuição foi considerada normal e a variância homogênea, foram aplicados os testes paramétricos ANOVA, seguidos pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Em caso de distribuição não gaussiana, foram empregados os testes não paramétricos Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (5%). Para a análise, foi utilizado o software GRAPHPAD PRISM 8.0 (GRAPHPAD SOFTWARE – EUA).

6. RESULTADOS

6.1 SENSIBILIDADE DAS CEPAS APÓS EXPOSIÇÃO À PH ÁCIDO E SAIS BILIARES

Em relação à capacidade de sobrevivência após exposição à pH alterado, os resultados demonstram que as cepas analisadas (*B. velezensis* 1273, 144 e 118) foram capazes de tolerar essas condições. Observou-se que a cepa 1273, quando exposta a pH ácido, apresentou redução do crescimento nas primeiras horas avaliadas, entretanto, a partir de 12 horas de incubação, atingiu um padrão de crescimento semelhante ao do controle (Figura 1A). De forma semelhante, a cepa 144 apresentou queda inicial na viabilidade, mas recuperou o crescimento após 13 horas (Figura 1B), enquanto a cepa 118 restabeleceu o padrão de crescimento em 14 horas de incubação (Figura 1C). Esses dados indicam que todas as cepas possuem resistência a variações de pH, sugerindo que são capazes de sobreviver à passagem pelo ambiente ácido do trato gastrointestinal, fator essencial para a manutenção de sua viabilidade e potencial efeito probiótico.

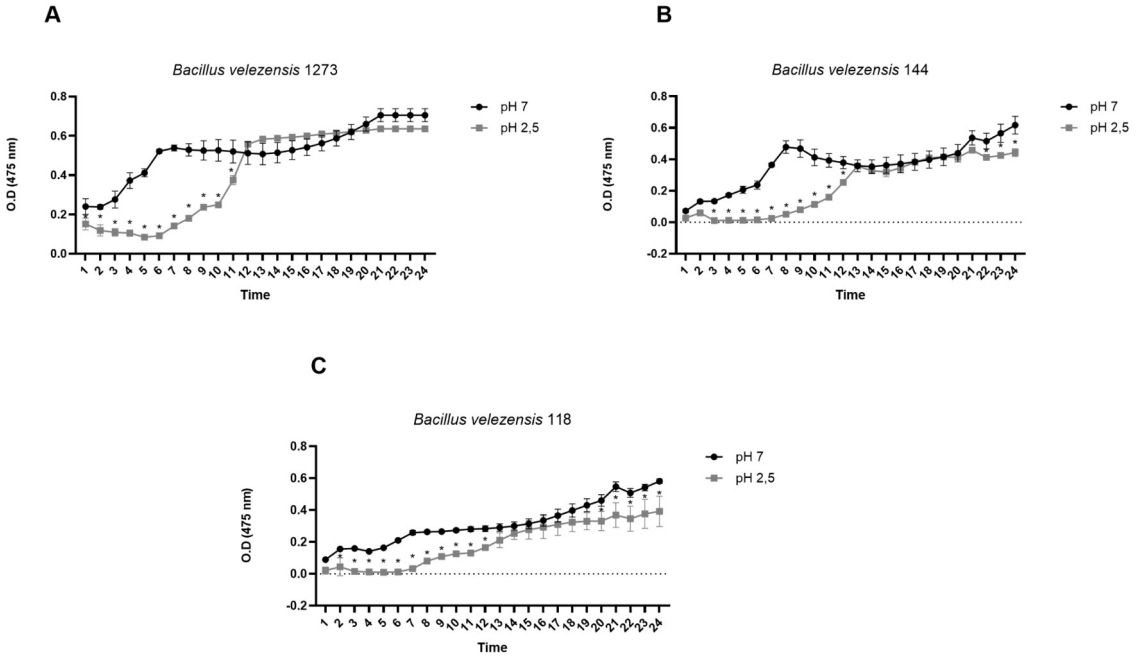


Figura 1. Cinética de sobrevivência das cepas de *B. velezensis* em diferentes condições de pH. Avaliou-se a capacidade de sobrevivência de (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118 em meios de cultura ajustados para condições ácidas (pH 2,5) em comparação ao crescimento em pH neutro (controle). *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Quanto à sobrevivência das cepas potencialmente probióticas na presença de 0,3 % de sais biliares bovinos, a cepa 1273 apresentou redução do crescimento nas primeiras horas avaliadas, entretanto, a partir de 9h de incubação atingiu um padrão de crescimento semelhante ao do controle (Figura 2 A). De forma semelhante, a cepa 144 apresentou queda inicial na viabilidade, mas recuperou o crescimento com 8 horas (Figura 2 B), enquanto a cepa 118 restabeleceu o padrão de crescimento em 9 horas de incubação (Figura 2 C). Esses dados sugerem que as três cepas possuem mecanismos eficientes de adaptação a estresses gastrointestinais, preservando sua viabilidade e potencial de colonização intestinal.

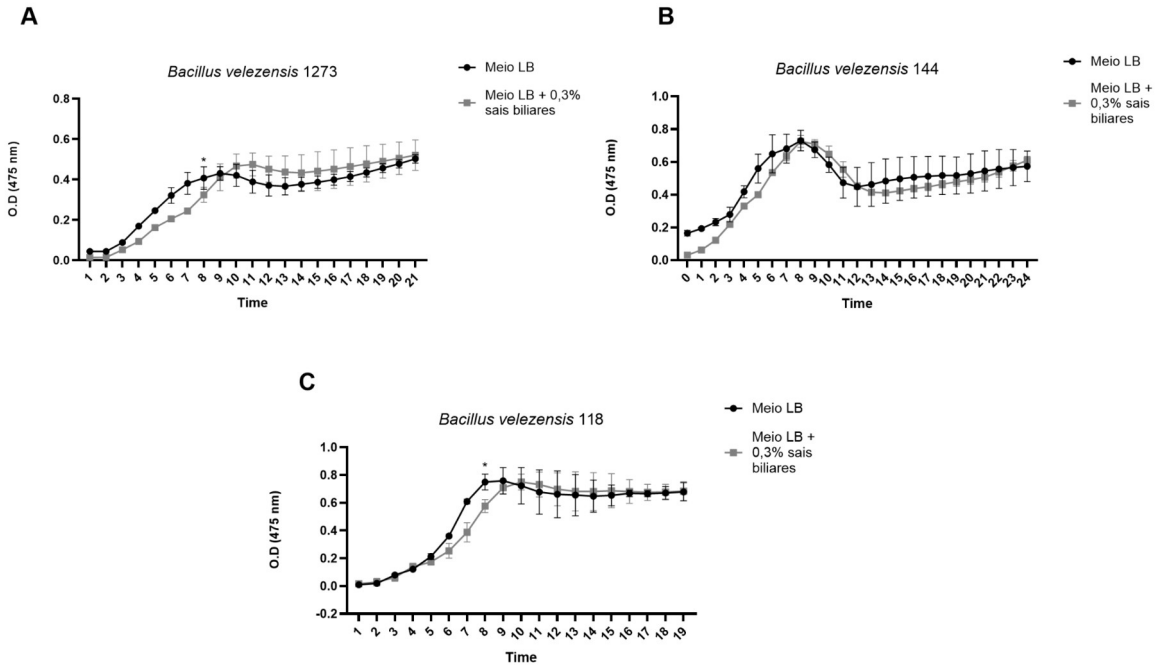
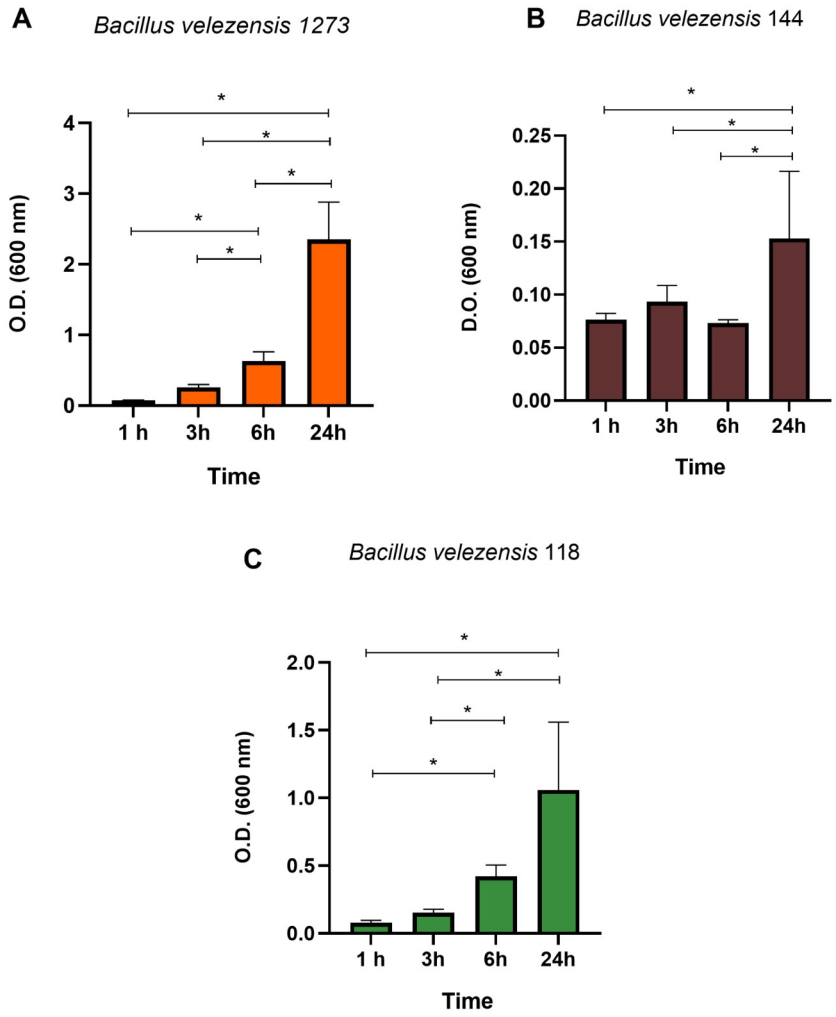


Figura 2. Cinética de sobrevivência das cepas de *B. velezensis* em diferentes condições de cultivo. Avaliou-se a capacidade de sobrevivência de (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118 em meio de cultura suplementado com 0,3% de sais biliares bovinos, em comparação ao crescimento em meio não suplementado (controle). *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

6.2 ENSAIO DE ADESÃO EM PLACAS DE POLIESTIRENO

As cepas de *B. velezensis* analisadas demonstraram capacidade de adesão ao longo de diferentes períodos de incubação (1 h, 3 h, 6 h e 24 h), com valores de p <0,05, sugerindo que são capazes de se manter no intestino por tempo suficiente para exercer seus efeitos funcionais. A classificação da formação de biofilme foi realizada conforme o método descrito por George et al (2025) que categoriza a intensidade de formação como fraca, moderada ou forte, de acordo com a absorbância a 600 nm (Fraco: $A_{600} < 0,086$; Moderado: $0,086 \leq A_{600} < 0,172$; Forte: $A_{600} \geq 0,172$). Em relação à cepa 1273 observou-se que a capacidade de adesão começa fraca nas primeiras horas, mas depois se intensifica, atingindo níveis fortes a partir de 3h. Já a cepa 144 apresentou capacidade de adesão moderada ao decorrer do tempo, com aumento entre 3 h e 24 h, mas sem atingir níveis fortes de formação. A cepa 118 apresentou aumento progressivo da formação de biofilme ao longo do tempo, com a maturação completa observada entre 6 h e 24 h (Figura 3, Tabela 1).



Figuras 3. Capacidade de adesão das cepas de *B. velezensis* em diferentes períodos de incubação. A adesão de (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118 foi avaliada em tempos de 1 h, 3 h, 6 h e 24 h. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com os diferentes tempos.

Tabela 1 - Classificação da capacidade de formação de biofilme.

Tempo	*B. velezensis* 1273	*B. velezensis* 144	*B. velezensis* 118
	Média Absorbância	Média Absorbância	Média Absorbância
1h	0,08	0,08	0,08
3h	0,26	0,09	0,15
6h	0,63	0,07	0,42
24h	2,35	0,15	1,06

Fonte: Da autora, 2025.
Nota: Fraco: $A_{600} < 0,086$; Moderado: $0,086 \leq A_{600} < 0,172$; Forte: $A_{600} \geq 0,172$.

6.3 ANTIBIOGRAMA

As cepas avaliadas (B. *velezensis* 1273, 144 e 118) apresentaram, em geral, sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados. A cepa *B. velezensis* 1273 exibiu sensibilidade a todos os antimicrobianos aos quais foi exposta. De forma semelhante, *B. velezensis* 144 foi resistente à penicilina e à oxacilina, mas sensível aos outros antimicrobianos. Já a cepa 118 mostrou resistência apenas à penicilina, mantendo-se sensível aos demais compostos (Tabela 2).

Tabela 2 - Sensibilidade das cepas potencialmente probióticas contra antimicrobianos

Antimicrobianos	**Valor de referência do halo de inibição (mm)**			***Bacillus velezensis* cepa 1273**			***Bacillus velezensis* cepa 144**			***Bacillus velezensis* cepa 118**		
	S	**SDD**	**R**	**Valor**	**S**	**R**	**Valor**	**S**	**R**	**Valor**	**S**	**R**
PENICILINA	≥29	—	≤28	29	sim	não	21	não	sim	25	não	sim
OXACILINA	≥22	—	≤21	23	sim	não	20	não	sim	24	sim	não
GENTAMICINA	≥15	—	≤12	30	sim	não	29	sim	não	30	sim	não
ERITROMICINA	≥23	—	≤13	30	sim	não	30	sim	não	34	sim	não
TETRACICLINA	≥19	—	≤14	30	sim	não	15	sim	não	19	sim	não
CIPROFLOXACINA	≥21	—	≤15	34	sim	não	30	sim	não	32	sim	não
CLINDAMICINA	≥21	—	≤14	22	sim	não	24	sim	não	25	sim	não
CLORANFENICOL	≥18	—	≤12	24	sim	não	31	sim	não	35	sim	não
RIFAMPICINA	≥20	—	≤16	20	sim	não	18	sim	não	19	sim	não
LEVOFLOXACINA	≥19	—	≤15	35	sim	não	33	sim	não	35	sim	não
TEICOPLANINA	—	—	—	20	—	—	20	—	—	21	—	—
VANCOMICINA	—	—	—	20	—	—	20	—	—	25	—	—

Fonte: Da autora, 2025.
Notas: S, sensível; SDD, suscetível dependente da dose; R, resistente.

6.4 AÇÃO CONTRA MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Realizamos um inóculo de ponta em cocultura utilizando cepas potencialmente probióticas (*B. velezensis* 1273, 144 e 118) e cepas patogênicas (*E. coli, S. aureus* e MRSA e *S.mutans*) para avaliar a formação de halo de inibição. Todas as cepas potencialmente probióticas testadas apresentaram halo de inibição contra o crescimento de *S.aureus*, MRSA e *S.mutans* (Figura 4A, B e C) indicando ação antimicrobiana dos probióticos contra as bactérias gram-positivas. Em relação à *E.coli* não houve formação de halo de inibição.

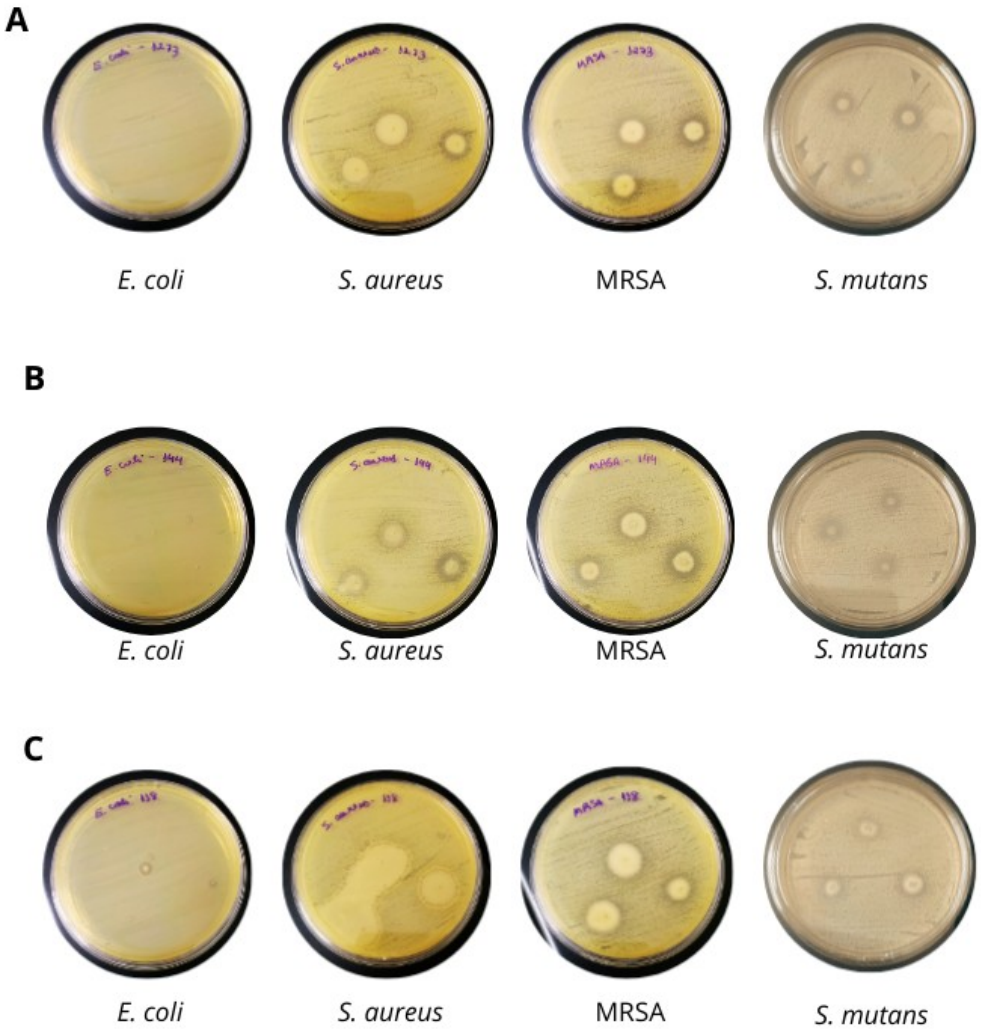


Figura 4. Formação de halo de inibição por cocultura de bactérias potencialmente probióticas com patógenos. (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118. Observa-se a formação de zonas de inibição nas placas onde o inóculo de ponta das cepas potencialmente probióticas foram cocultivados com *E. coli*, *S. aureus*, MRSA e *S.mutans*

De maneira semelhante, avaliamos a ação do CFS das cepas de *B. velezensis* frente às mesmas bactérias patogênicas. Para isso, realizamos ensaio de poço-difusão, inoculando 40 μL do CFS em um poço central da placa de ágar Mueller Hinton. Também observamos que as três cepas de *B. velezensis* apresentaram a formação de halo de inibição contra o crescimento de *S.aureus*, MRSA e *S.mutans* (Figura 5A, B e C), evidenciando que tanto as bactérias probióticas quanto seus metabólitos presentes no CFS apresentam atividade antimicrobiana contra esses microrganismos.

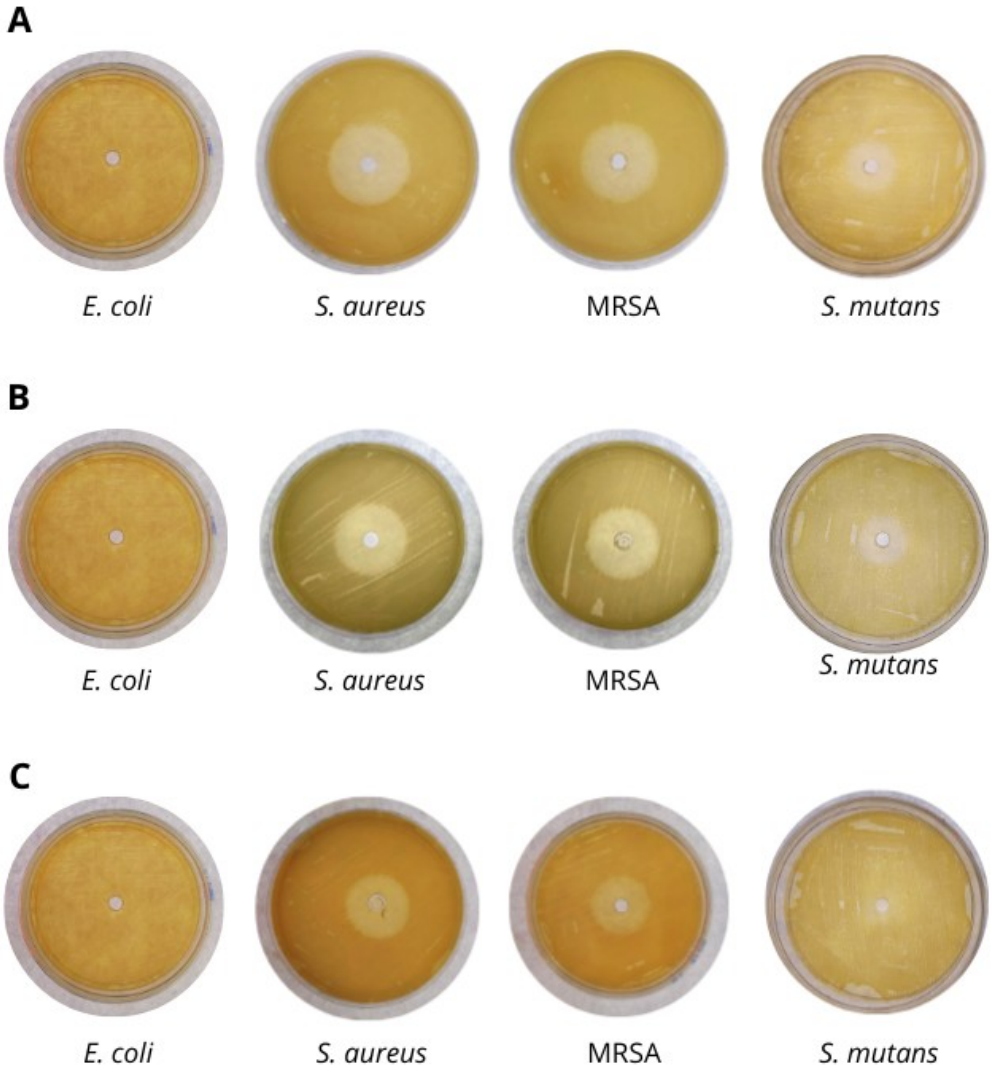


Figura 5. Formação de halo de inibição pelo sobrenadante livre de células (CFS) de bactérias probióticas contra patógenos. (A) *B. velezensis* 1273, (B) *B. velezensis* 144 e (C) *B. velezensis* 118. Observa-se a formação de zonas de inibição ao redor dos poços contendo 40 µL de CFS em cocultura com *E. coli*, *S. aureus*, MRSA e *S.mutans.*

Para avaliar a concentração mínima do CFS necessária para inibir o crescimento de bactérias patogênicas (*S. aureus*, MRSA, *S. mutans* e *E. coli*), foram realizados ensaios de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) das cepas potencialmente probióticas. Os resultados mostraram que o CFS 1273 demonstrou elevada capacidade de inibição frente a todas as bactérias avaliadas: *S. aureus* (aproximadamente 100% até a diluição 1:8 e 70% na diluição 1:16), MRSA (≈100% na diluição 1:2 e 40% na 1:4), *S. mutans* (98% na diluição 1:2, mantendo-se em 50% até a diluição 1:8) e *E. coli* (≈ 100% até a diluição 1:4, reduzindo-se para 65% na diluição 1:8) (Figura 6A). O CFS 144 destacou-se pela atividade contra *S. aureus*, MRSA e *S. mutans*, com aproximadamente 98% de inibição na diluição 1:2 para as três bactérias, mantendo a inibição em menor intensidade

até a diluição 1:4; a atividade contra *E. coli* foi mais limitada, atingindo cerca de 60% de inibição na diluição 1:2 (Figura 6B) Já o CFS 118 apresentou o maior efeito inibitório contra *E. coli* e *S. mutans*, alcançando 96% de inibição na diluição 1:2 e cerca de 80% na diluição 1:4, embora também tenha inibido *S. aureus* e MRSA em menor intensidade (Figura 5C).

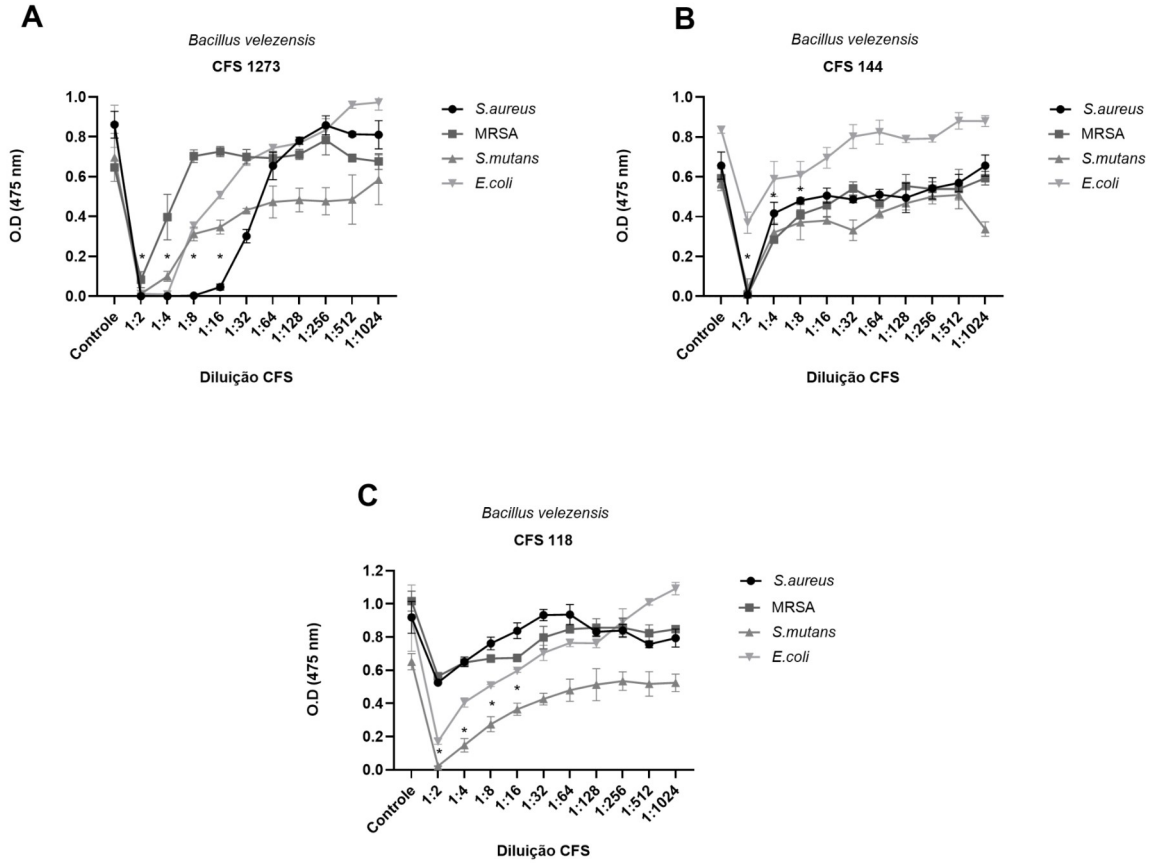


Figura 6. Atividade antibacteriana das cepas de *B. velezensis*. Inibição do crescimento de *S. aureus*, MRSA, *S. mutans* e *E. coli* após tratamento com CFS: (A) CFS 1273, (B) CSF 144 e (C) CFS 118, testados em diluições de 1:2 a 1:1024 pelo método de microdiluição em caldo (475 nm). *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

6.5 CITOTOXICIDADE COM AS LINHAGENS VERO CCL-81 E RAW 264.7

Para avaliar a toxicidade celular dos CFS nas linhagens VERO CCL-81 e RAW 264.7, foi realizado o ensaio de resazurina. Os CFS foram testados nas concentrações de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% do volume final de 250 µL/poço, com densidade celular de 1×10^5 células/poço.

Sobre a linhagem celular VERO CCL-81, o CFS 1273 manteve a viabilidade acima de 75% em todas as condições avaliadas com uma CC_{50} de 69,81 (Figura 7A), indicando baixa toxicidade (≤25%). Já CFS 144 apresentou viabilidade superior a 75% em todas as

concentrações, exceto em 50% uma CC_{50} de 54,72 (Figura 7B). Por fim, o CFS 118 demonstrou uma viabilidade celular acima de 75% nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 30% e uma CC_{50} de 34,53 (Figura 7C). (TUNES L.G, 2015).

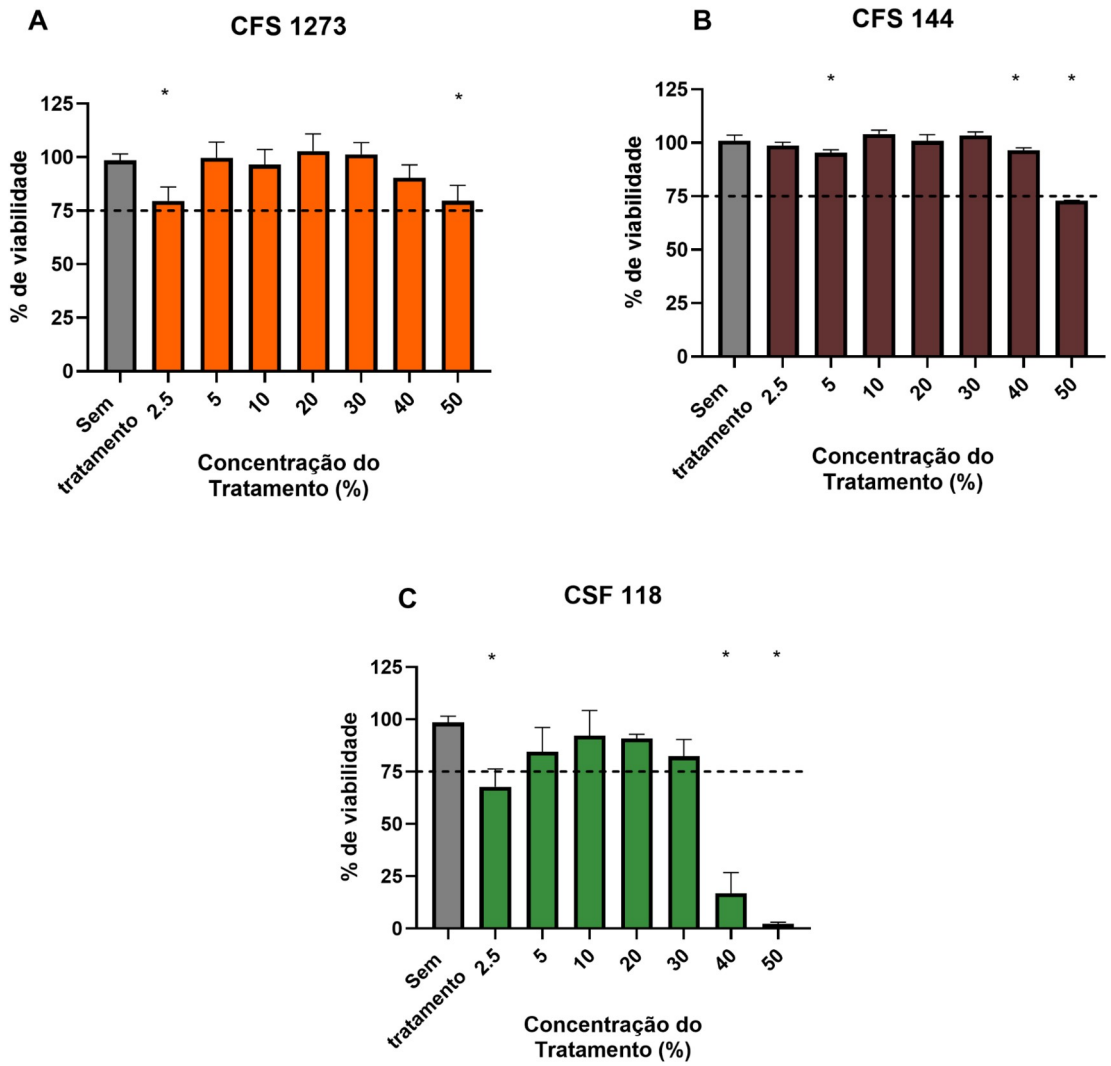


Figura 7. Porcentagem de viabilidade celular de células VERO-CCL-81 tratadas com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250μl/poço: (A) CFS 1273, (B) CFS 144 e (C) CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Nos macrófagos RAW 264.7, o CFS 1273 manteve a viabilidade acima de 75% em todas as condições testadas, com exceção de 50%, com uma CC_{50} de 51,87 (Figura 8A), indicando baixa toxicidade (≤25%). O CFS 144 apresentou viabilidade superior a 75% em todas as concentrações, exceto em 40% e 50% e uma CC_{50} de 42,45 (Figura 8B). Por fim, o CFS 118 manteve viabilidade celular acima de 75% nas concentrações de 2,5%, 5%, 10% e 20% e uma CC_{50} de 33,98 (Figura 8C).

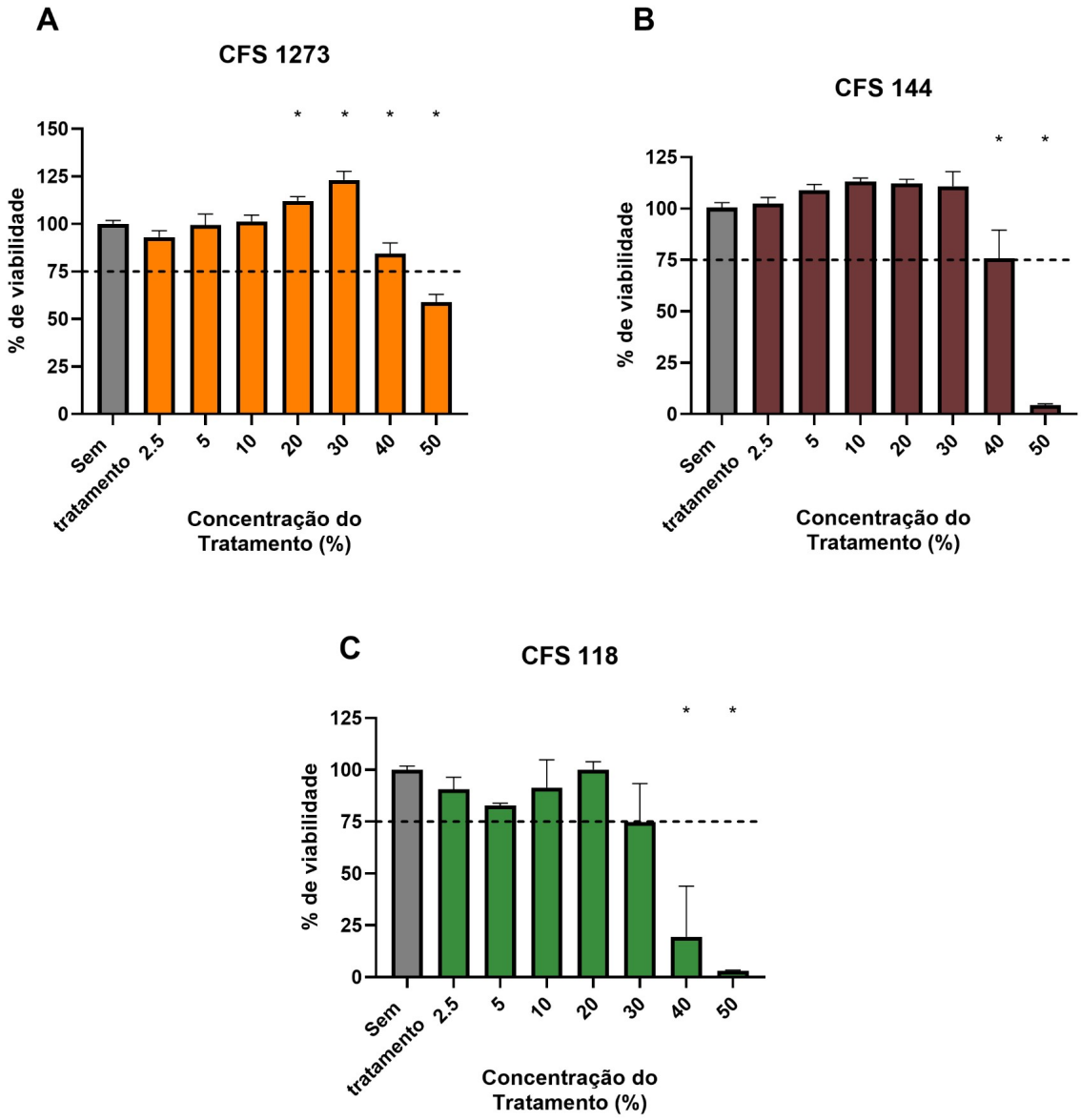


Figura 8. Porcentagem de viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi avaliado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250 μl/poço: (A) CFS 1273, (B) CFS 144 e (C) CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

6.6 ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO COM MACRÓFAGOS RAW 264.7, MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1 E ESPLENÓCITOS MURINOS

Para avaliar a capacidade do CFS das cepas de *B. velezensis* em modular a resposta imunológica, foram realizados ensaios de ELISA com o objetivo de quantificar as citocinas produzidas após o tratamento de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1, utilizando as mesmas concentrações descritas no item 6.5.

Nos macrófagos RAW 264.7, observou-se efeito imunomodulador positivo apenas com o CFS 144, que estimulou a produção de TNF-α nas concentrações de 5% e 10% (Figura 9E).

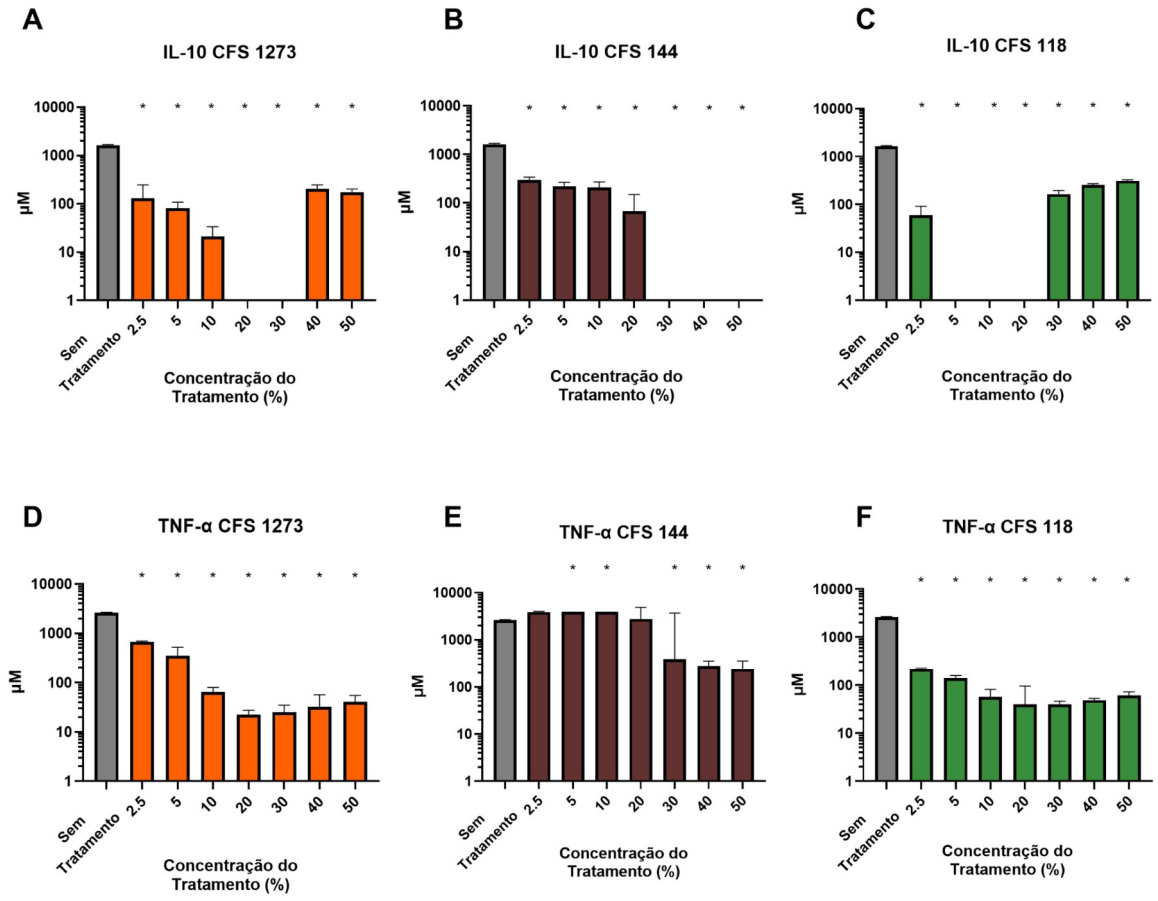


Figura 9. Produção de e IL-10 e TNF-α por macrófagos RAW 264.7 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250 μl/poço: (A) Produção de IL-10 por CFS 1273, (B) Produção de IL-10 por CFS 144, (C) Produção de IL-10 por CFS 118, (D) Produção de TNF-α por CFS 1273, (E) Produção de TNF-α por CFS 144, (F) Produção de TNF-α por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Já nos macrófagos diferenciados de THP-1, foi identificado efeito imunomodulador positivo exclusivamente para a citocina IL-10. O CFS 1273 e 118 promoveram aumento dessa citocina na concentração de 50% (Figura 10A e C), enquanto o CFS 144 apresentou efeito positivo nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% do tratamento (Figura 10B).

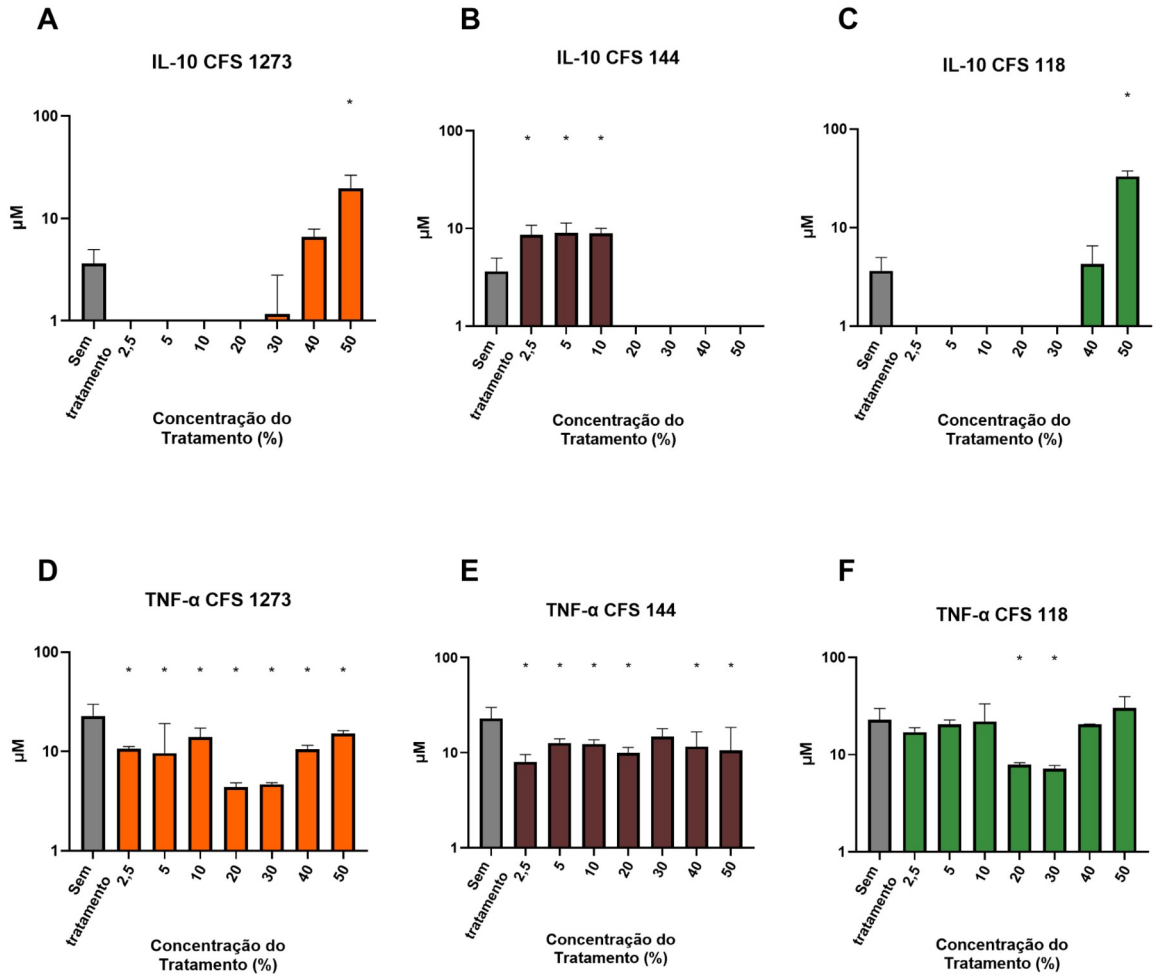


Figura 10. Produção de e IL-10 e TNF-α por macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250 μl/poço: (A) Produção de IL-10 por CFS 1273, (B) Produção de IL-10 por CFS 144, (C) Produção de IL-10 por CFS 118, (D) Produção de TNF-α por CFS 1273, (E) Produção de TNF-α por CFS 144, (F) Produção de TNF-α por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Adicionalmente, foi realizado ensaio de ELISA para quantificação de citocinas em esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c tratados com o CFS nas mesmas concentrações descritas no item 6.5. Controles tratados com CON-a foram utilizados para verificar a capacidade dos esplenócitos de produzirem citocinas após estímulo policlonal, sendo observados aumentos significativos para todas as citocinas avaliadas.

Em relação à citocina pró-inflamatória IFN-γ, observou-se que o CFS das cepas 1273 e 118 apresentaram efeito imunomodulador positivo a partir da concentração de 30% (Figura 11A, C). Já o CFS 144 não apresentou efeito significativo nas concentrações avaliadas (Figura 11B).

O tratamento com os CFS 1271 e 118 apresentaram efeito imunomodulador positivo sobre a produção da citocina IL-10, a partir da concentração de 30% (Figura 11A, C). Já o CFS 144 apresentou esse efeito significativo apenas nas concentrações de 10 e 30% (Figura 11B).

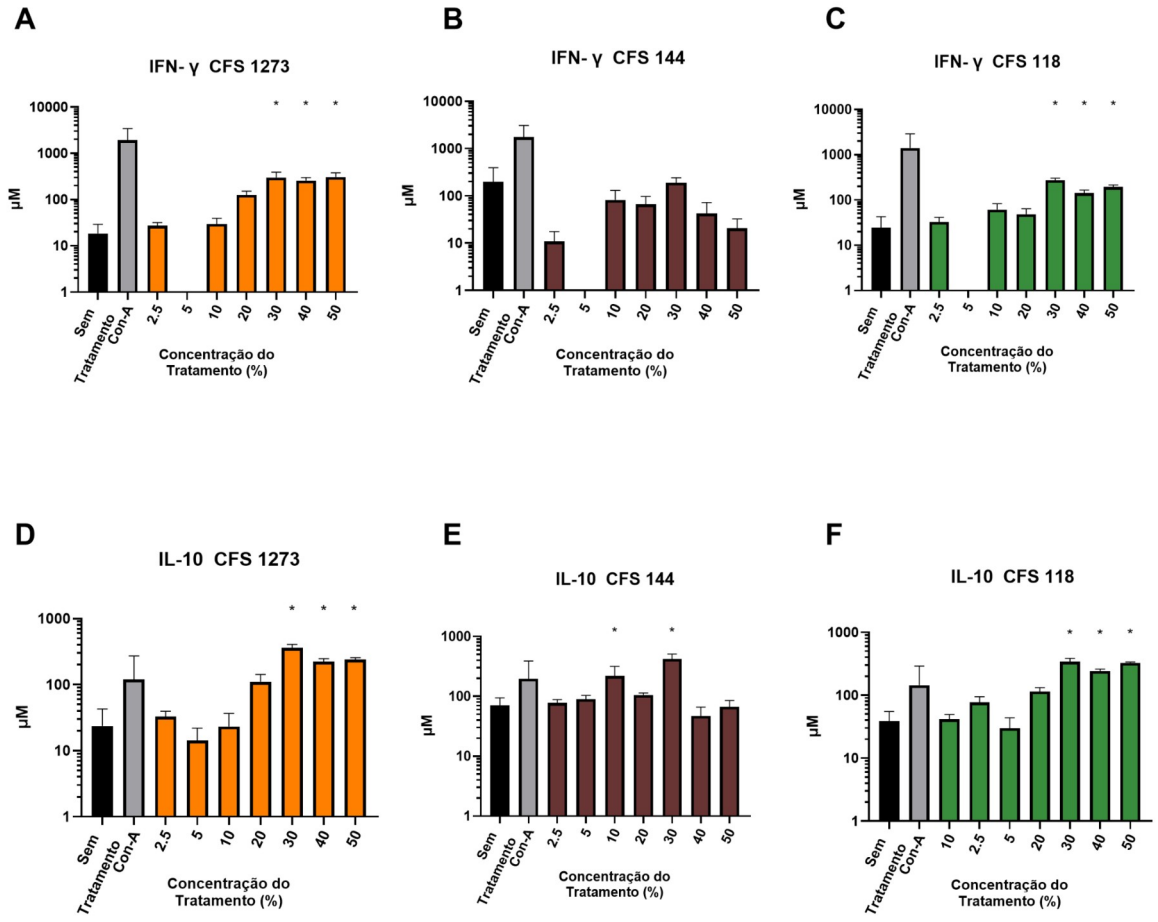


Figura 11. Produção de IFN-γ e IL-10 por esplenócitos de camundongos Balb/c tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250 μl/poço: (A) Produção de IFN-γ por CFS 1273, (B) Produção de IFN-γ por CFS 144, (C) Produção de IFN-γ por CFS 118, (D) Produção de IL-10 por CFS 1273, (E) Produção de IL-10 por CFS 144, (F) Produção de IL-10 por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

6.7 ENSAIO DE CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Após o tratamento de marófagos RAW 264.5 e macrófagos diferenciados de THP-1 com o CFS de *B. velezensis* (cepas 1273, 144 e 118) foi realizada uma cinética da produção de ROS no sobrenadante destas culturas (Figura 12). Em relação aos macrófagos RAW 264.7

foi observado que houve produção de ROS apenas no CFS 144 na concentração de 40%. Já nos macrófagos diferenciados de THP-1, o CFS 1273 induziu produção de ROS nas concentrações de 2,5%, 5%, 40% e 50%. O CFS 144 promoveu aumento nas concentrações de 10%, 40% e 50%, enquanto o CFS 118 induziu produção de ROS apenas na concentração de 30%.

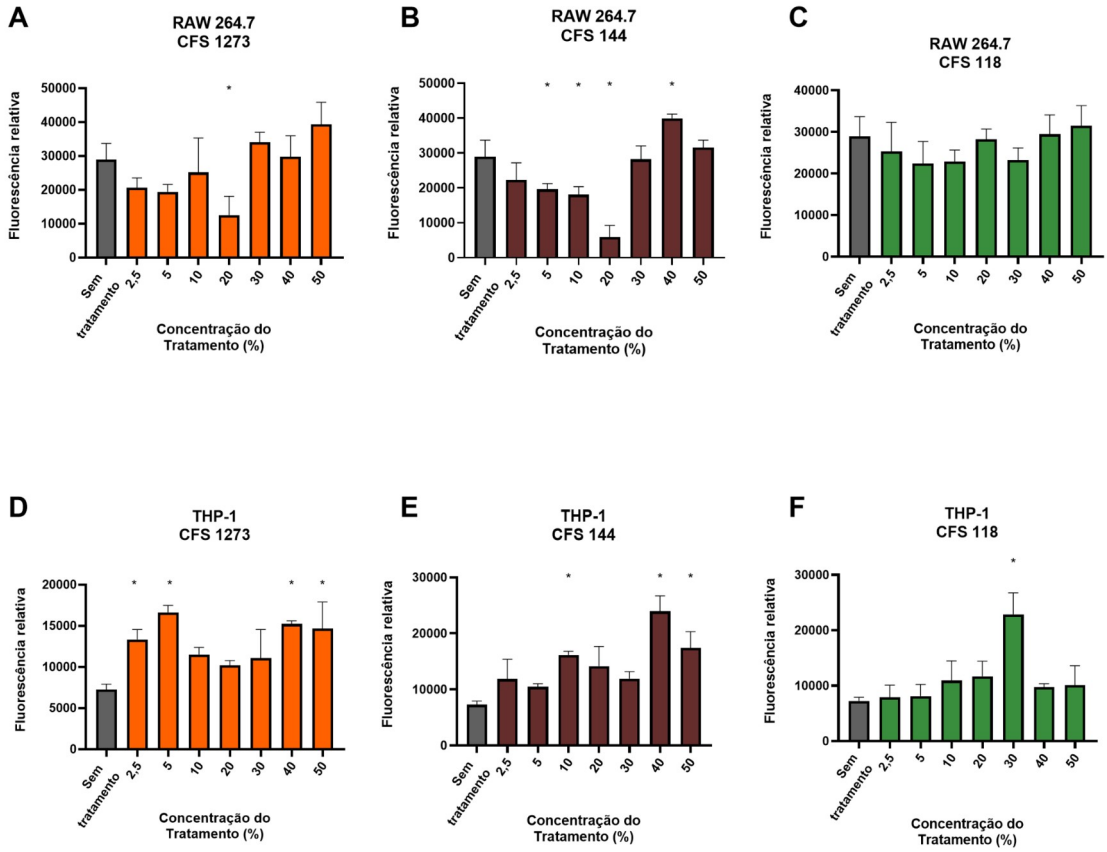


Figura 12. Cinética de produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250μl/poço. (A) macrófagos RAW tratados com CFS 1273, (B) macrófagos RAW tratados com CFS 144, (C) macrófagos RAW tratados com CFS 118, (D) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 1273, (E) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 144 e (F) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

6.8 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Após o tratamento de marófagos RAW 264.5 e macrófagos diferenciados de THP-1 com o CFS de *B. velezensis* (cepas 1273, 144 e 118) foi realizada a dosagem de NO no

sobrenadante destas culturas (Figura 13). De acordo com a análise estatística, não foram observadas aumentos significativos na produção de NO em nenhuma das condições avaliadas.

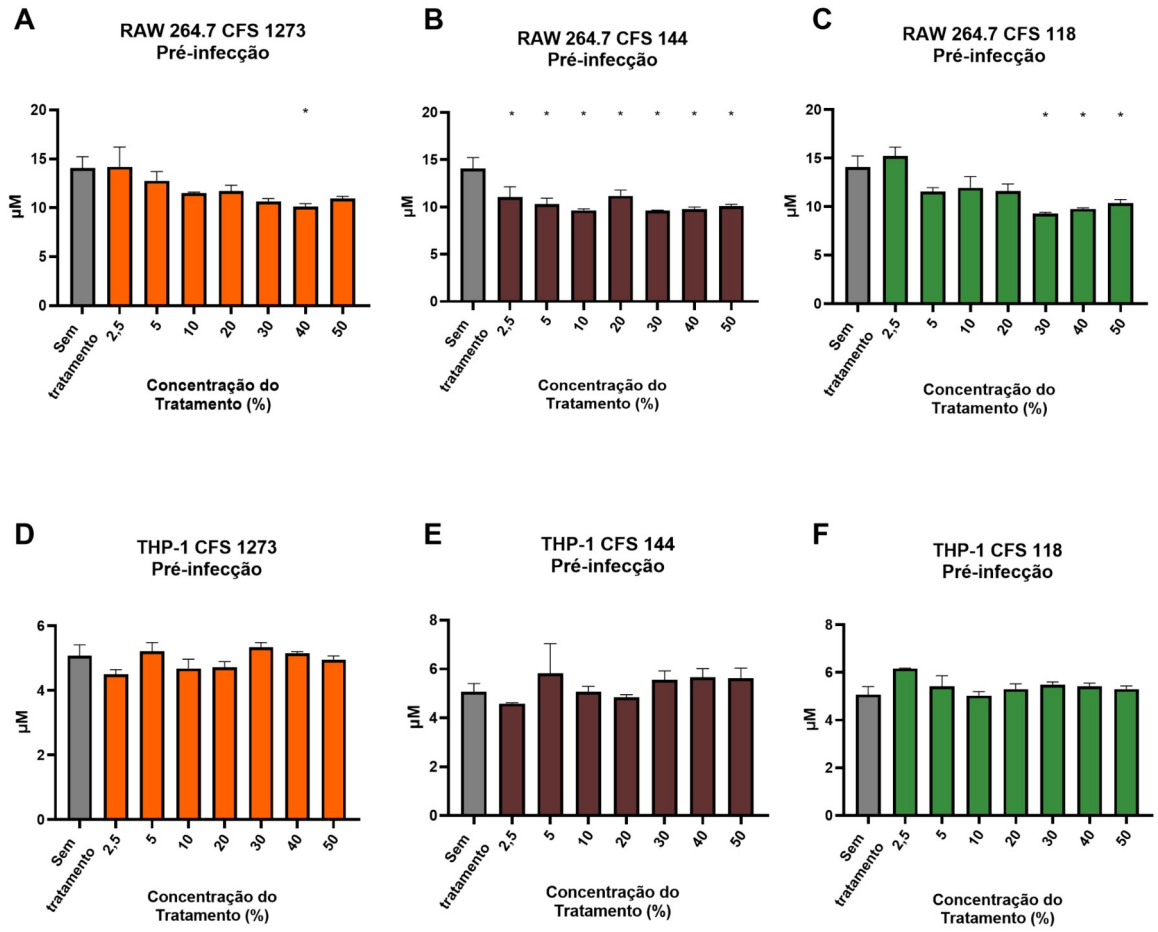


Figura 13. Produção óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250 μl/poço. (A) macrófagos RAW tratados com CFS 1273, (B) macrófagos RAW tratados com CFS 144, (C) macrófagos RAW tratados com CFS 118, (D) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 1273, (E) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 144 e (F) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

6.9 VIABILIDADE DAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* TRATADAS COM OS CFS DE *B. velezensis*

Realizamos o ensaio de viabilidade também nas formas promastigotas de *L. braziliensis*, utilizando MTT em substituição à resazurina. Ambas as substâncias apresentam o mesmo comportamento de ação.

Em geral, os CFS testados apresentaram, mantiveram a viabilidade parasitária em torno de 75%. O CFS 1273 mostrou redução da viabilidade para abaixo de 75% na concentração de 40%, com uma uma IC_{50} de 42,14 (Figura 9A). O CFS 144 não apresentou inibição inferior a 75% em nenhuma das concentrações avaliadas, com uma IC_{50} de 107,8 (Figura 9B), enquanto o CFS 118 demonstrou efeito inibitório apenas nas concentrações de 40% e 50%, com uma uma IC_{50} de 51,59 (Figura 9C). Os resultados indicam que os CFS não apresentam efeito tóxico sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis.*

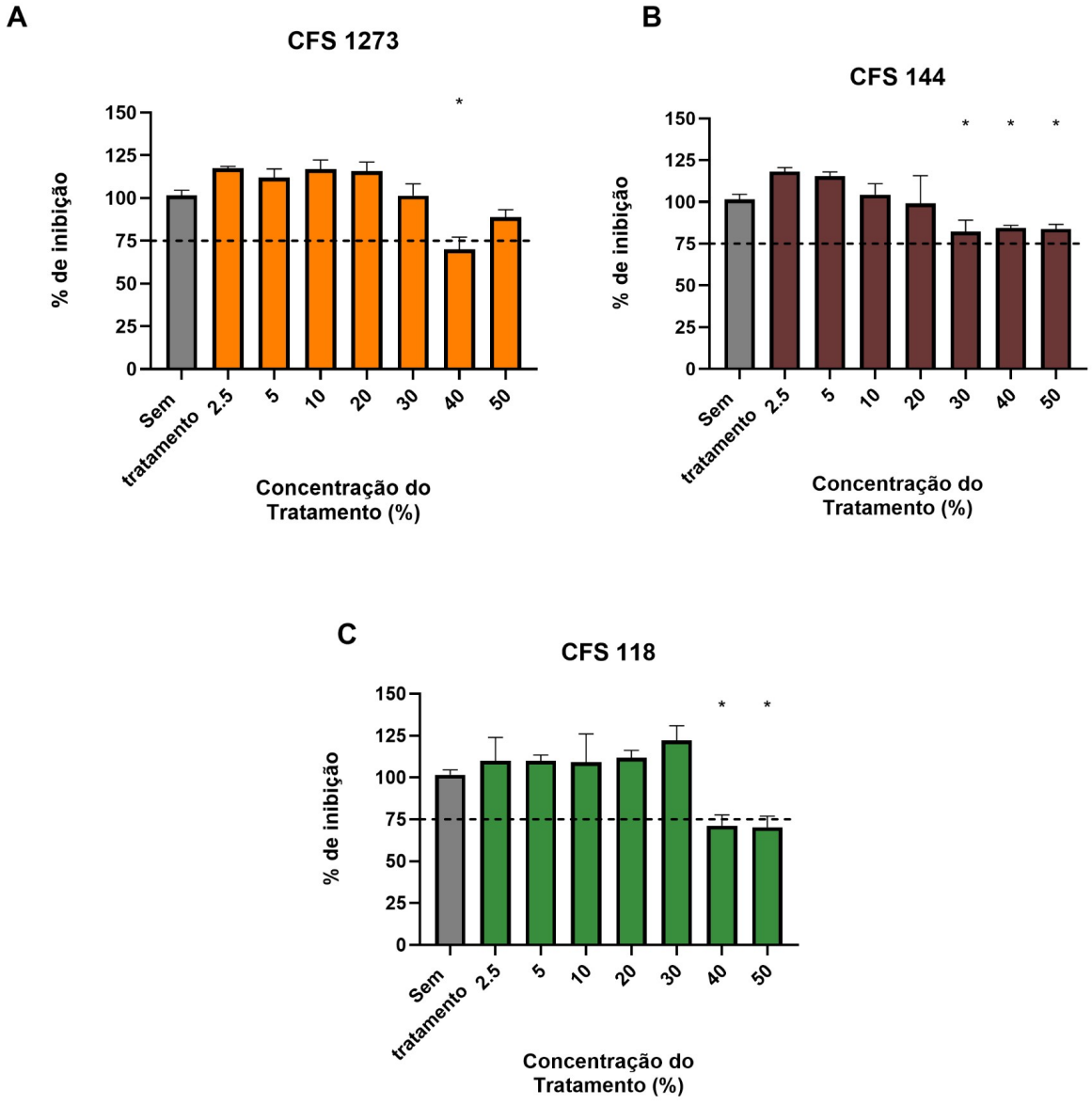


Figura 14. Viabilidade das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* tratadas com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250μl/poço: (A) CFS 1273, (B) CFS 144 e (C) CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

6.10 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

Inicialmente, foi avaliada a toxicidade celular dos CFS tanto em células VERO CCL-81 (Tabela 3) quanto em macrófagos murinos RAW 264.7 (Tabela 4), por meio do ensaio de resazurina após 24 horas de exposição, com o objetivo de posteriormente determinar o índice de seletividade de cada CFS. O mesmo procedimento foi realizado para as formas promastigotas de *L.braziliensis,* utilizando MTT.

A concentração do CFS capaz de induzir citotoxicidade em 50% das células (CC_{50}) foi estimada por meio de análise de regressão logarítmica dos dados obtidos. O mesmo procedimento foi aplicado para determinar a concentração inibitória em 50% (IC_{50}) do CFS, correspondente ao efeito tóxico sobre as promastigotas de *L. braziliensis.* O índice de seletividade (IS) foi determinado pela razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} (de AZEVEDO et al., 2024).

Os resultados indicam que os CFS das cepas de *B. velezensis* apresentam baixa toxicidade em linhagens celulares e nas formas promastigotas de *L. braziliensis*. Além disso, os índices de seletividade permaneceram abaixo do valor de referência (<10), sugerindo que, nas condições testadas, os CFS não demonstram seletividade relevante entre linhagens celulares e formas promastigotas (Tabela 3 e 4) (PEÑA MORÁN et al., 2016).

Tabela 3 - Índice de Seletividade do CFS das cepas de *B. velezensis* em células VERO CCL81 e *L. braziliensis*

CFS	Célula-Alvo	CC_{50}/IC_{50}	IS
1273	Vero CCL-81	69,81	1,65
	L.braziliensis	42,14	
144	Vero CCL-81	54,72	0,50
	L.braziliensis	107,8	
118	Vero CCL-81	34,53	0,66
	L.braziliensis	51,59	

Fonte: Da autora, 2025.

Tabela 4 - Índice de Seletividade do CFS das cepas de *B. velezensis* em células RAW 264.7 e *L. braziliensis*

CFS	Célula-Alvo	CC_{50}/IC_{50}	IS
1273	Raw 264.7	51,87	1,23
	L.braziliensis	42,14	
144	Raw 264.7	42,45	0,39
	L.braziliensis	107,8	
118	Raw 264.7	33,98	0,65
	L.braziliensis	51,59	

Fonte: Da autora, 2025.

6.11 AVALIAÇÃO DO PARASITISMO INTRACELULAR EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 E MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1

Foi realizado ensaio de infecção celular com o objetivo de avaliar se o tratamento com o CFS das cepas de *B. velezensis* influenciaria a carga parasitária por célula, a porcentagem de células infectadas e o índice de infecção. A infecção foi conduzida em macrófagos RAW 264.7 e em macrófagos diferenciados de THP-1, conforme protocolo descrito no item 5.3.3.

Nos macrófagos RAW 264.7, observaram-se reduções significativas no número de parasitas por célula, na porcentagem de macrófagos infectados e no índice de infecção apenas após tratamento com os CFS 118 e 144, nas concentrações de 2,5% e 5%, respectivamente (Figura 15).

Já nos macrófagos diferenciados de THP-1, a diminuição dos parâmetros avaliados foi observada exclusivamente com o CFS 118, nas concentrações de 2,5% e 5% (Figura 16).

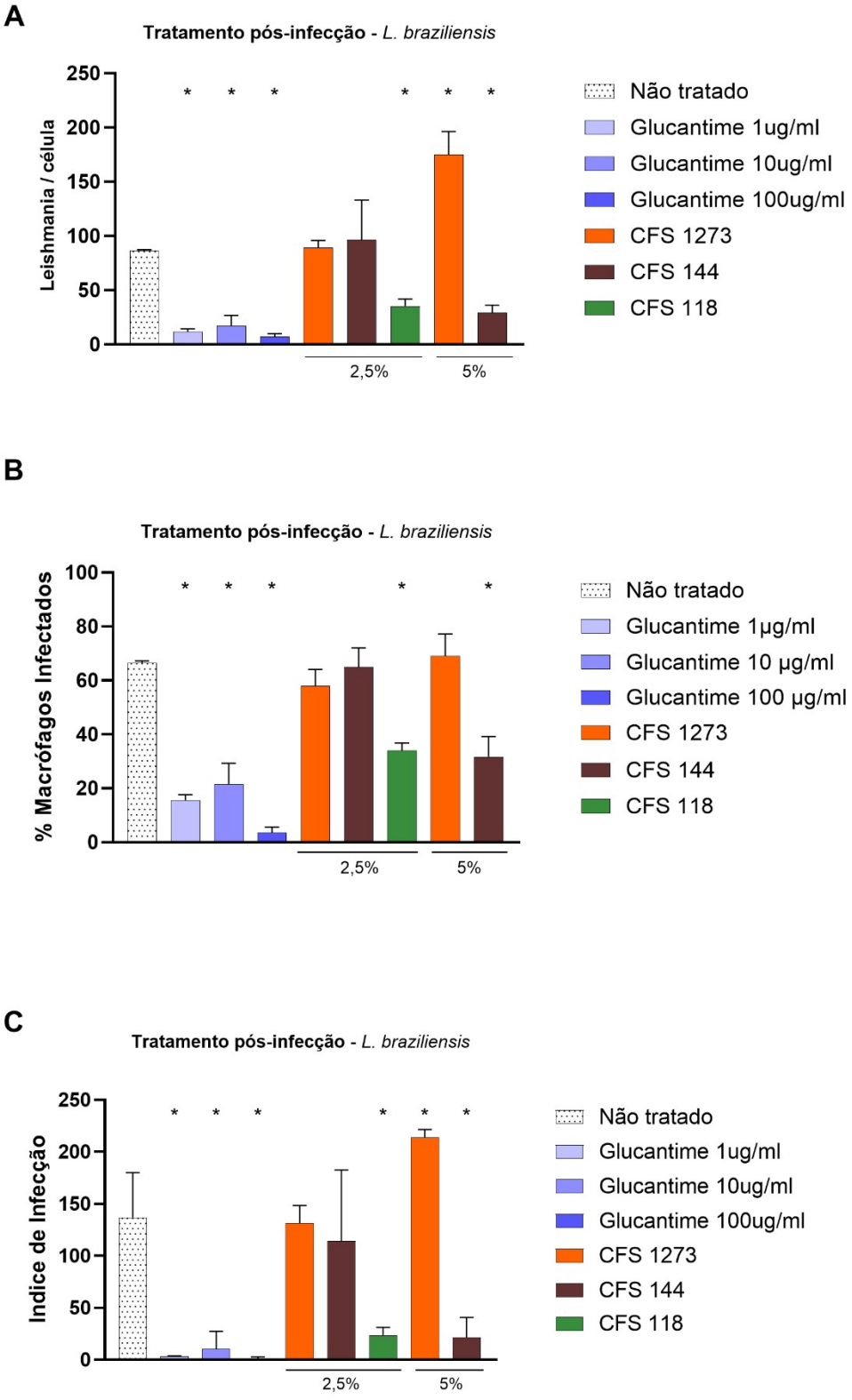


Figura 15. Ensaio de infecção com amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos RAW 264. 7 tratadas com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. (A) Relação parasita/macrófago, (B) porcentagem de macrófagos RAW 264.7 infectados e (C) índice de infecção. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

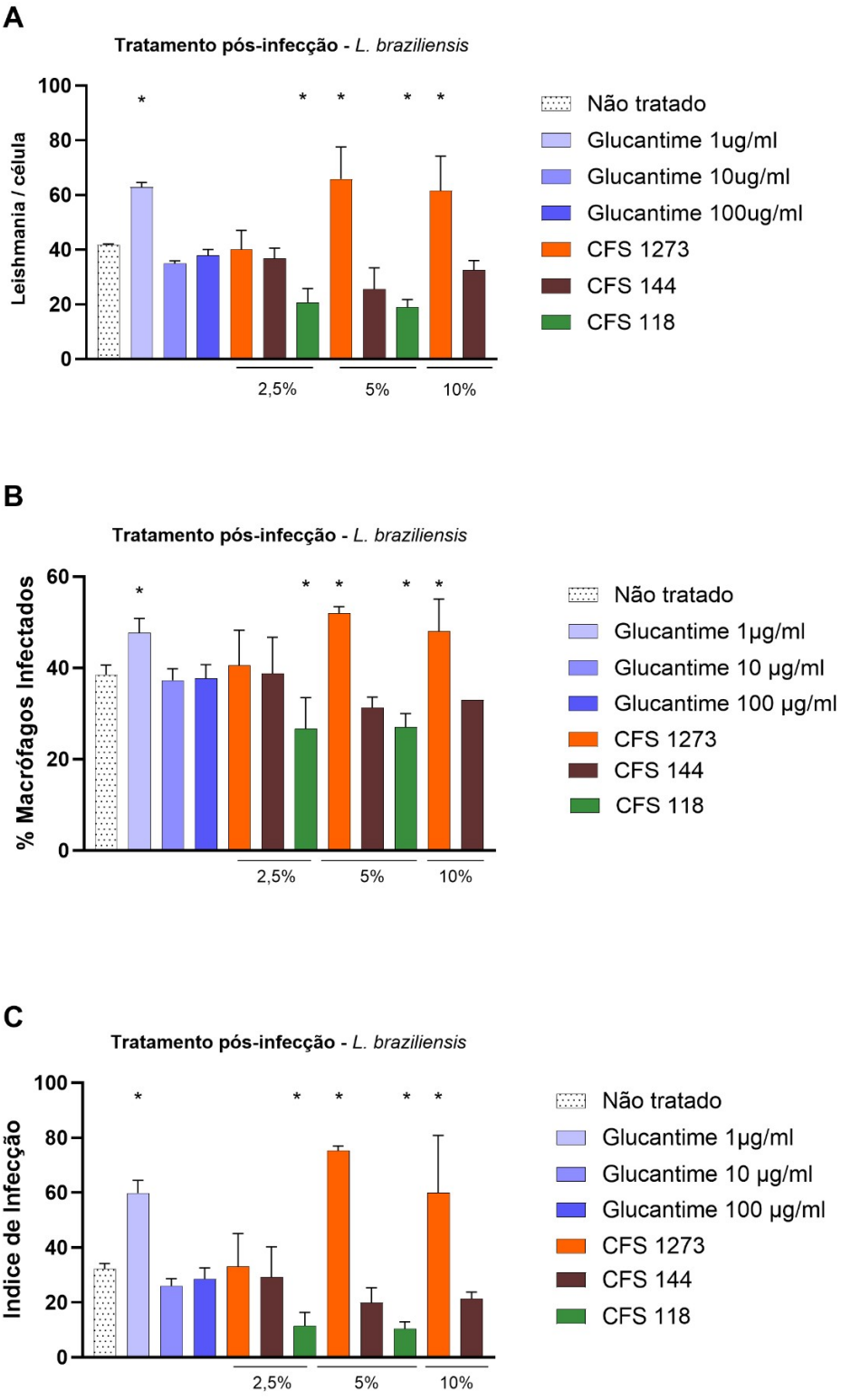


Figura 16. Ensaio de infecção com amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos diferenciados de THP-1 tratadas com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. (A) Relação parasita/macrófago, (B) porcentagem de macrófagos RAW 264.7 infectados e (C) índice de infecção. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Micrografias de imunofluorescência representativas do ensaio de infecção com amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1, tratados com o CSF das cepas de B. velezensis. A presença de amastigotas no interior dos macrófagos, foi confirmada pela coloração verde dos parasitos intracelulares.

Nos macrófagos RAW 264.7, observou-se redução no número de amastigotas intracelulares após tratamento com os CFS 144 e 118. Já nos macrófagos diferenciados de THP-1, a diminuição da carga parasitária foi verificada apenas com o CFS 118. Esses achados foram confirmados pelas análises quantitativas da relação parasitos/célula, da porcentagem de células infectadas e do índice de infecção (Figura 17).

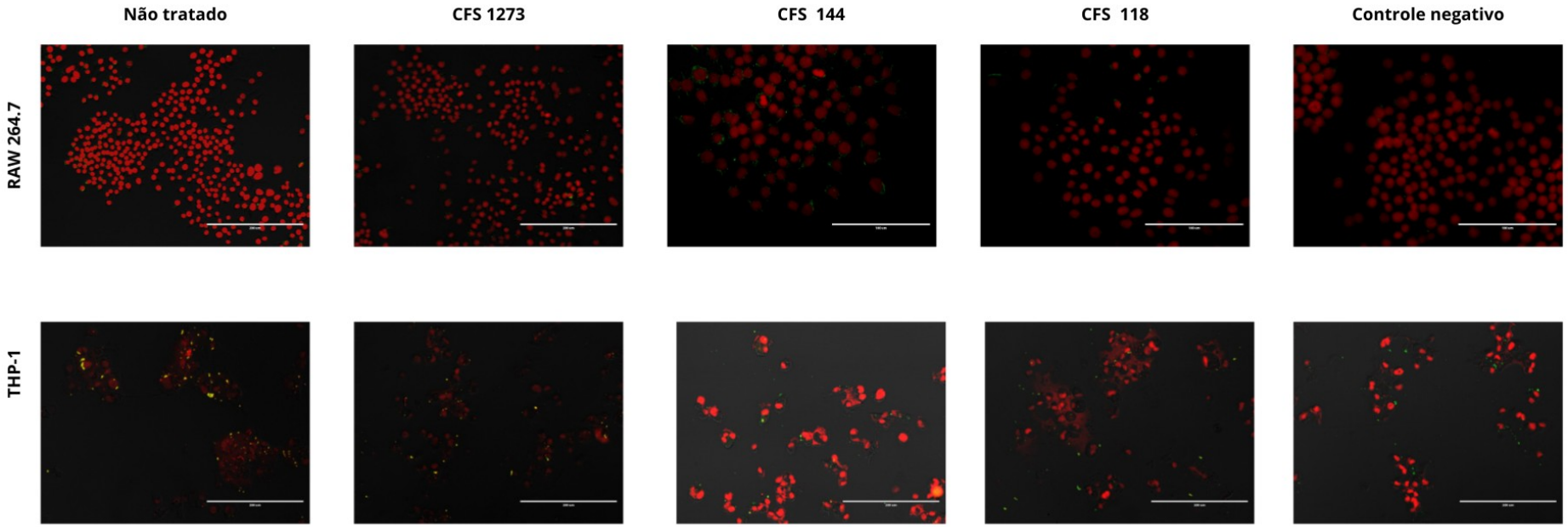


Figura 17. Micrografias do ensaio de infecção com as formas amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 tratadas com CFS das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações.

6.12 ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO COM MACRÓFAGOS RAW 264.7, MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1 APÓS INFECÇÃO

Foi realizado o ensaio de ELISA com o objetivo de quantificar as citocinas produzidas após a infecção células com as forma promastigotas de L. braziliensis e adição do tratamento (CFS) nas linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1, utilizando as mesmas concentrações descritas no item 6.5.

Nos macrófagos RAW 264.7 infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com os CFS, observou-se efeito imunomodulador positivo para a citocina IL-10 na concentração de 50% do CFS 1273 e nas concentrações de 40% e 50% do CFS 118 (Fifura 18A, C).

Quanto à produção de TNF-α, o efeito imunomodulador positivo foi verificado exclusivamente com o CFS 144, que promoveu aumento dessa citocina nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% (Figura 18E).

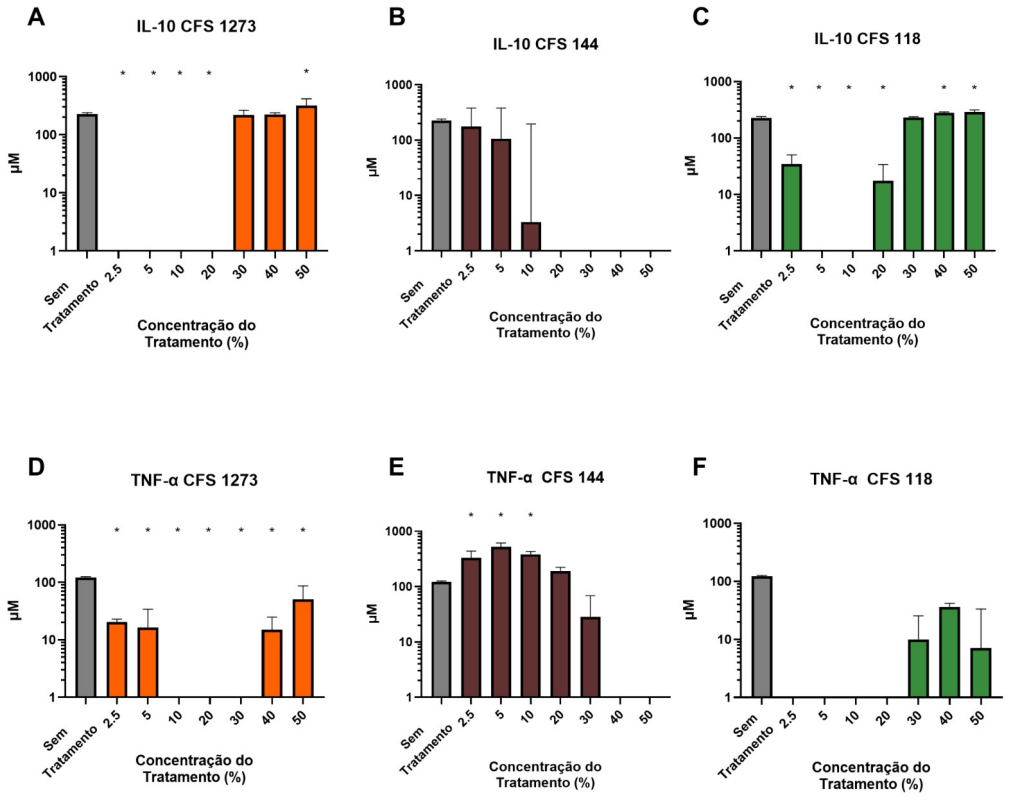


Figura 18. Produção de e IL-10 e TNF-α por macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. braziliensis* e tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250 μl/poço: (A) Produção de IL-10 por CFS 1273, (B) Produção de IL-10 por CFS 144, (C) Produção de IL-10 por CFS 118, (D) Produção de TNF-α por CFS 1273, (E) Produção de TNF-α por CFS 144, (F) Produção de TNF-α por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

Já nos macrófagos diferenciados de THP-1, infectados com *L. braziliensis* e tratados com os CFS de *B. velezensis*, não foi identificado efeito imunomodulador positivo em nenhuma das condições avaliadas (Figura 19).

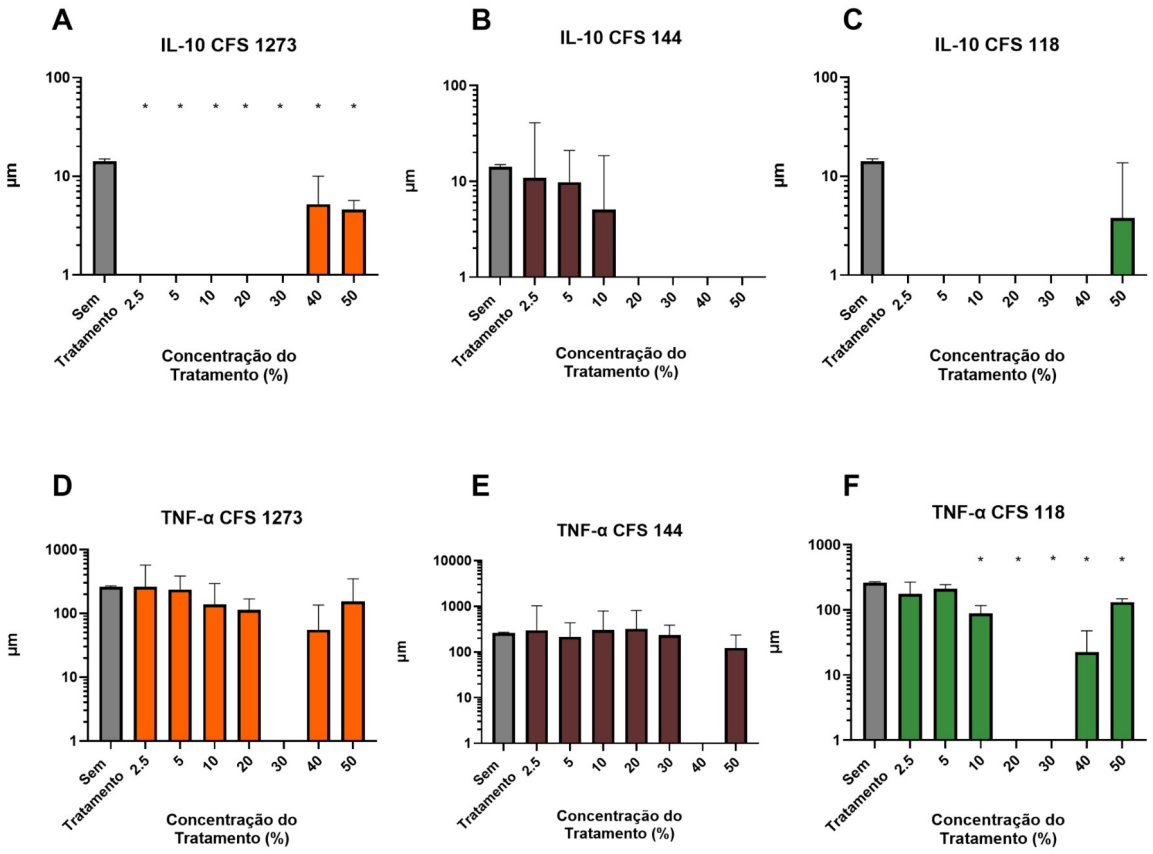


Figura 19. Produção de e IL-10 e TNF-α por macrófagos diferenciados de THP-1 infectados com *L. braziliensis* e tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250μl/poço: (A) Produção de IL-10 por CFS 1273, (B) Produção de IL-10 por CFS 144, (C) Produção de IL-10 por CFS 118, (D) Produção de TNF-α por CFS 1273, (E) Produção de TNF-α por CFS 144, (F) Produção de TNF-α por CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

6.13 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO APÓS INFECÇÃO

Após a infecção de marófagos RAW 264.5 e macrófagos diferenciados de THP-1 com *L. braziliensis* e adição do tratamento como descrito no item 5.3.3 foi realizada a dosagem de NO no sobrenadante destas culturas (Figura 13). De acordo com a análise estatística, não foram observados aumentos significativos na produção de NO em nenhuma das condições avaliadas.

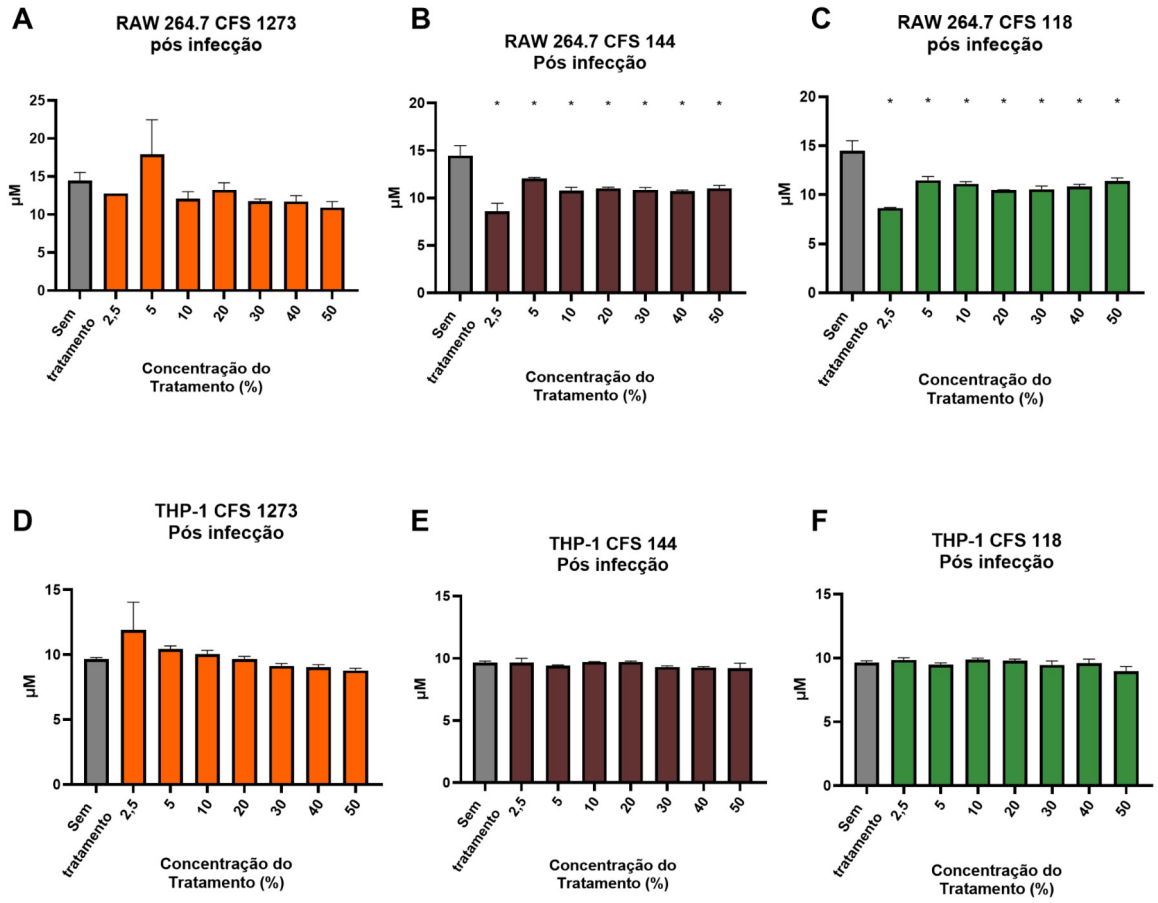


Figura 20. Produção óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados de THP-1 infectados com *L. braziliensis* e tratados com sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B. velezensis* em diferentes concentrações. O CFS foi testado nas proporções de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de acordo com o volume final de 250μl/poço. (A) macrófagos RAW tratados com CFS 1273, (B) macrófagos RAW tratados com CFS 144, (C) macrófagos RAW tratados com CFS 118, (D) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 1273, (E) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 144 e (F) macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com CFS 118. *p < 0,05 pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey em comparação com a condição controle (não tratada).

7. DISCUSSÃO

Embora o tratamento disponível para a leishmaniose seja eficaz em vários casos, ainda apresenta limitações significativas, como elevada toxicidade, alto custo e a crescente resistência do parasita, reforçando a necessidade de novas abordagens terapêuticas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2018). Nesse contexto, estudos recentes têm demonstrado o potencial de substâncias bacterianas derivadas de probióticos com atividade leishmanicida. Abengózar et al. (2017), por exemplo, mostraram que a enterocina AS-48, produzida por *Enterococcus faecalis*, exerce efeito letal sobre as formas promastigotas e, em baixas

concentrações, também sobre os amastigotas de *Leishmania donovani*, esse achado reforça a possibilidade de que substâncias secretadas por probióticos, como os sobrenadantes livres de células, possam conter compostos bioativos de interesse terapêutico.

O uso de probióticos no contexto da saúde tem se destacado como uma estratégia promissora, com efeitos benéficos já demonstrados no combate a doenças infecciosas e em condições relacionadas a processos inflamatórios (EL FAR et al., 2023). Esses microrganismos não apenas competem com patógenos por nutrientes, mas também produzem metabólitos bioativos capazes de modular a resposta imune e alterar o microambiente do hospedeiro (MARKOWIAK & ŚLIŻEWSKA, 2017).

Nesse cenário, avaliamos o efeito do sobrenadante livre de células (CFS) das cepas de *B.velezensis* 1271, 144 e 118 e seus impactos na infecção por *L. braziliensis*. Visto que outros estudos relataram o efeito antiparasitário de probióticos contra *Leishmania* spp. através da administração oral de formulações probióticas e infecção de macrófagos peritoneais (PMMs) dos camundongo tratados, evidenciando que a administração do probiótico reduziu de forma significativa a infecção celular (den BROECK et al, 2025). Além disso, caracterizamos essas cepas quanto à sua capacidade de sobreviver em ambientes adversos e ao seu potencial de inibição frente a outros microrganismos patogênicos, o que amplia a perspectiva de aplicação na saúde humana.

Realizamos uma análise cinética da sobrevivência das cepas de *B. velezensis* em condições adversas que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal. A capacidade de sobreviver à passagem pelo TGI é um fator essencial para que os probióticos possam chegar ao intestino grosso e dessa forma iniciarem sua colonização e proliferação (NAISSINGER DA SILVA M et al, 2021). Nossos resultados evidenciaram que as cepas avaliadas apresentaram tolerância a essas condições, corroborando os achados de Wang et al. (2025), que, em experimentos in vitro, demonstraram que *B. velezensis* MZ-09 possui elevada resistência a NaCl, sais biliares e fluidos digestivos artificiais. Essa resistência de probióticos, especialmente do gênero *Bacillus*, ao passar pelo TGI, pode estar relacionada com a formação de esporos que são estruturas altamente resistentes à condições adversas, atribuindo uma vantagem adaptativa frente à acidez gástrica e à presença de sais biliares (CORTE S. M, 2011). Dessa forma, nossos resultados indicam que as células planctônicas também foram capazes de sobreviver ao estresse gerado.

A capacidade de adesão de um probiótico é uma fator essencial que ajuda a promover efeitos imunomoduladores e também está relacionada com a sua capacidade de competir com

bactérias patogênicas e inibir seu crescimento e consequentemente a formação de biofilme (MONTEAGUDO-MERA et al, 2019). A adesão também possibilita que o probiótico forme comunidades bacterianas mais complexas, conhecidas como biofilmes, constituídas por polímeros extracelulares que conferem estabilidade estrutural e protegem as células bacterianas. Além disso, o biofilme estabelece um microambiente coordenado, mediado pelo "quorum sensing", que permite a comunicação entre bactérias, regula atividades celulares e contribui para a manutenção da integridade e funcionalidade da comunidade (YAO P et al., 2025). Com base nessas propriedades, avaliamos a adesão das cepas de *B. velezensis* e observamos que nossos resultados corroboram os de Scillato et al. (2012), que demonstraram que *Lactobacillus* spp. são capazes de potencializar a formação de biofilme, favorecendo a colonização e proteção da mucosa vaginal.

Os probióticos oferecem múltiplos benefícios à saúde humana, incluindo a redução de patógenos resistentes e a restauração do equilíbrio da microbiota em condições de disbiose. Esses efeitos estão associados à produção de metabólitos bioativos, capazes de exercer ação antibacteriana e contribuir para um ambiente microbiano mais saudável (ZHU J et al., 2023). Dessa forma, investigamos a atividade das cepas de *B. velezensis* e de seus CFS frente a microrganismos patogênicos. Observamos que tanto as cepas quanto seus respectivos sobrenadantes foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, MRSA, *S. mutans* e *E. coli*.

E. coli, *S. aureus* e *S. mutans* são microrganismos comensais que podem atuar como patógenos oportunistas. A *E. coli* pode adquirir fatores de virulência e causar infecções entéricas graves; o *S. aureus*, especialmente o MRSA, está associado a infecções nosocomiais pela formação de biofilmes; e o *S. mutans* é um importante agente de doenças bucais devido à produção de toxinas e degradação de tecidos orais. (ABDELHAMID et al., 2018; PERINI & PEREIRA et al., 2024; PARK et al., 2015).

Entre os isolados testados, foi realizado o ensaio de MIC para determinar até qual concentração o CFS consegue inibir o crescimento da bactéria patogênica. Nossos resultados evidenciaram que o CFS da cepa 1273 de *B. velezensis* apresentou efeito expressivo contra todas as bactérias avaliadas. Em contrapartida, a cepa 118 demostrou maior eficácia frente a *E. coli* e *S. mutans*, enquanto a cepa 144 destacou-se por sua ação mais pronunciada contra *S. mutans*, *S. aureus* e MRSA. Nossos resultados corroboram com os de El Far et al. (2023), que demonstraram que cepas de *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* e *Pediococcus acidilactici* também possuem capacidade de inibir microrganismos patogênicos. Além disso, verificaram que o CFS das cepas avaliadas apresentou atividade antibiofilme contra *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como potencial anti-inflamatório.

Sabe-se que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas diferem na composição de suas paredes celulares. No caso das Gram-negativas, a presença de uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos (LPS) constitui uma barreira física eficiente contra diversos compostos antimicrobianos convencionais (NIKAIDO, 2003). Entretanto, alguns lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp. têm demonstrado capacidade de transpor essa barreira, exibindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, incluindo *E. coli* (ZONG et al., 2017). Esse aspecto pode justificar a ausência de halos de inibição do CFS frente às bactérias gram-negativas. Contudo, a análise de MIC revelou que o CFS 118 apresentou forte efeito inibitório sobre o crescimento de *E. coli* na diluição 1:2.

Os resultados obtidos reforçam o potencial das cepas de *B. velezensis* avaliadas como agentes antimicrobianos contra diferentes bactérias patogênicas. Tanto as culturas das cepas de *B. velezensis* quanto seus metabólitos presentes no CFS demonstraram capacidade de inibição, evidenciada pela formação de halos e pela determinação do MIC. Esses achados sugerem que probióticos, associados aos seus produtos metabólicos, podem representar uma estratégia promissora para o controle de microrganismos patogênicos, contribuindo para a manutenção do equilíbrio microbiano e para potenciais aplicações clínicas no combate a infecções.

Considerando esses resultados frente a bactérias patogênicas, o presente estudo buscou ampliar a investigação, avaliando a ação do CFS das cepas de *B. velezensis* 1273 e 144 e 118, sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*. Além disso, analisou-se o potencial desses metabólitos em modular a resposta imune de células de defesa saudáveis. Para isso, um dos aspectos fundamentais é garantir a segurança da administração de probióticos por meio de ensaios *in vitro*, que permitem não apenas determinar efeitos citoprotetores, mas também estabelecer a dose máxima segura para seu uso (SHAIKH et al., 2024).

Nossos resultados de citotoxicidade, obtidos por meio do ensaio de resazurina, indicaram que os CFS avaliados foram capazes de manter a viabilidade celular na maioria das concentrações testadas, sendo tóxicos apenas nas maiores concentrações, corroborando com os achados de Shaikh et al. (2024) que demonstraram, através de estudos *in vitro* com células VERO, que o probiótico *Bacillus coagulans* BCP92 apresentou efeito citoprotetor, sendo considerado seguro para o consumo humano. De forma semelhante, Xu X et al. (2012) avaliaram a citotoxicidade de *Bacillus subtilis* (*natto*) B4 em células RAW 264.7 de macrófagos murinos e também observaram efeito citoprotetor, reforçando o potencial de produtos derivados de probióticos em preservar a viabilidade celular.

Por outro lado, o ensaio de viabilidade parasitária com MTT revelou que os CFS não apresentaram efeitos consideráveis sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis*, demonstrando ação tóxica apenas nas maiores concentrações testadas, as quais também se mostraram nocivas às linhagens celulares. Nossos achados diferem dos de Azevedo et al. (2024), que investigaram os efeitos leishmanicida e citotóxico de metabólitos derivados de *Streptomyces* spp. Os autores observaram que esses metabólitos apresentaram atividade leishmanicida já na menor concentração testada, enquanto em concentrações mais elevadas demonstraram toxicidade em células de mamíferos, sugerindo seu potencial como alternativa terapêutica contra doenças causadas por patógenos.

Além do efeito direto sobre o parasita, há evidências de que probióticos e a microbiota intestinal podem modular a resposta imune do hospedeiro, influenciando o curso da infecção por *Leishmania* spp., Lopes et al. (2021) demonstraram que a resistência contra *L. major* depende da ativação de macrófagos guiada pela microbiota, evidenciando o papel das bactérias intestinais na indução de mecanismos efetores contra leishmania. De forma semelhante, Andrade et al. (2023) observaram que o tratamento oral com *Lactococcus lactis* geneticamente modificado para produzir Hsp65 induziu células T regulatórias, modulando a resposta inflamatória e reduzindo a carga parasitária em modelo experimental de *L. braziliensis*. Esses dados sugerem que, além do efeito antiparasitário direto, os probióticos podem atuar de maneira indireta, equilibrando a resposta inflamatória do hospedeiro e promovendo maior controle da infecção, reforçando seu potencial como alternativa terapêutica ou adjuvante ao tratamento das leishmanioses.

Diante disso, avaliamos a ação imunomoduladora dos CFS em esplenócitos de camundongos BALB/c, por meio do ensaio de ELISA, para a quantificação de citocinas envolvidas na resposta imune frente a infecção por *L. braziliensis*. Nossos resultados indicaram um potencial efeito imunomodulador dos CFS em células tratadas, estimulando a produção da citocina pró-inflamatórias, como IFN-γ, associada à resposta Th1, considerada essencial para o controle de *L. braziliensis*. Além disso, observou-se aumento na produção de IL-10, fundamental para manter o equilíbrio da resposta imunológica, correlacionando-se com uma inflamação mais controlada e menor dano tecidual. Esses achados estão em concordância com os observados por Khadum Ali, Hasen Essa e Taher Mohammed (2015), que demonstraram que a administração de kefir derivado de bactérias probióticas, em camundongos infectados por *L. donovani*, promoveu aumento significativo de IFN-γ e IL-12, concomitante à redução de IL-4, favorecendo a indução de uma resposta do tipo Th1. Em conjunto, nossos resultados indicam que os CFS derivados de probióticos podem modular a

resposta imune, favorecendo uma resposta Th1 eficaz contra *L. braziliensis* e contribuindo para o controle da infecção com menor dano tecidual.

Também avaliamos a ação imunomoduladora em macrófagos RAW 264.7, os resultados demonstraram efeito imunomodulador positivo sobre a produção de TNF-α exclusivamente com o CFS 144, nas menores concentrações testadas (2,5% a 5%). Nos macrófagos diferenciados de THP-1, o efeito imunomodulador foi observado em relação à IL-10. O CFS 1273 induziu produção dessa citocina apenas nas concentrações mais elevadas (40% e 50%), enquanto o CFS 144 promoveu aumento de IL-10 nas concentrações mais baixas. Já o CFS 118 apresentou efeito positivo somente na concentração de 50%.

Após a infecção com *L. braziliensis*, observou-se efeito imunomodulador apenas em macrófagos RAW 264.7 tratados com CFS 144, mantendo-se o padrão de resposta nas mesmas concentrações utilizadas no período pré-infecção. Esses achados estão em consonância com estudos prévios que demonstraram que a suplementação com *B. velezensis* JW promove modulação significativa da resposta imunológica, especialmente em relação às citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-10, favorecendo a ativação da resposta imune pró-inflamatória e o fortalecimento dos mecanismos de defesa contra patógenos (YI Y et al, 2018).

A produção de óxido nítrico (NO) também foi avaliada, porém os níveis observados foram discretos e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os CFS testados, tanto na condição de pré-infecção quanto após a infecção por *L. braziliensis*. Esses resultados indicam que, nas condições experimentais analisadas, os CFS não exerceram efeito imunomodulador relevante sobre a síntese de NO.

Esse achado é particularmente importante, considerando que a produção de NO desempenha papel central na resposta imune contra *Leishmania* spp., especialmente na forma cutânea da doença. O NO atua não apenas na eliminação direta do parasita, mas também na limitação de sua atividade metabólica e na modulação do recrutamento celular para o sítio da lesão, influenciando a chegada de monócitos e, consequentemente, de fagócitos derivados dessas células (FRICK L et al., 2022). Dessa forma, embora os CFS tenham demonstrado capacidade de modular determinadas citocinas pró- e anti-inflamatórias, seus efeitos não parecem estar associados à via do óxido nítrico nas condições avaliadas. Esses dados reforçam a hipótese de que a modulação observada ocorre predominantemente por meio de mecanismos dependentes de citocinas, destacando a necessidade de investigações adicionais para elucidar as vias moleculares envolvidas.

A avaliação da atividade dos CFS frente à infecção por *Leishmania braziliensis* foi realizada por meio da análise do índice de infecção, da relação parasito/macrófago e da

porcentagem de macrófagos infectados, parâmetros amplamente utilizados para mensurar a progressão e o controle da infecção em modelos in vitro. Esses indicadores permitem compreender tanto a capacidade de invasão do parasito quanto sua sobrevivência e multiplicação no ambiente intracelular.

Os resultados demonstraram que os CFS 118 e 144 reduziram significativamente esses parâmetros apenas nas menores concentrações testadas (2,5% e 5%, respectivamente). A diminuição do índice de infecção e da porcentagem de células infectadas indica que os tratamentos comprometeram a eficiência do estabelecimento da infecção. Paralelamente, a redução da relação parasito/macrófago sugere limitação da replicação intracelular dos amastigotas, evidenciando impacto direto na manutenção do parasito dentro da célula hospedeira.

Esses resultados sugerem um possível efeito antiparasitário, potencialmente associado ao aumento do estresse oxidativo intracelular. O ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS) indicou uma tendência de elevação na produção dessas moléculas, especialmente em macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com os CFS, o que pode refletir uma modulação dos mecanismos microbicidas dessas células. A literatura corrobora essa perspectiva: Namaei et al. (2021) demonstraram que compostos bioativos de origem vegetal foram capazes de reduzir a carga parasitária de *Leishmania major* em macrófagos tratados.

Assim, os dados sugerem que os metabólitos presentes nos CFS avaliados apresentam potencial leishmanicida, atuando tanto na redução da invasão quanto na limitação da sobrevivência intracelular do parasito, o que reforça sua relevância como candidatos promissores para estratégias complementares no controle da leishmaniose

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que os CFS das cepas de *B. velezensis* apresentam propriedades biológicas relevantes, incluindo atividade antimicrobiana, capacidade de sobrevivência em condições que simulam o trato gastrointestinal, potencial de adesão e formação de biofilme, além de efeitos imunomoduladores e antiparasitários *in vitro*.

Embora os CFS não tenham apresentado efeito leishmanicida direto expressivo sobre formas promastigotas nas concentrações seguras para células de mamíferos, observou-se impacto significativo na infecção intracelular por *L. braziliensis*, com redução do índice de infecção, da relação parasito/macrófago e da porcentagem de macrófagos infectados, especialmente nas menores concentrações testadas. Esses efeitos estiveram associados ao

aumento da produção de ROS e à modulação de citocinas-chave, como IFN-γ, TNF-α e IL-10. Destaca-se que o TNF-α, em sinergia com o IFN-γ, contribui para a ativação de macrófagos e para a indução de mecanismos microbicidas, incluindo a produção de espécies reativas, sendo sua regulação fundamental para prevenir danos teciduais exacerbados. Em conjunto, esses resultados sugerem que os metabólitos avaliados atuam por meio da modulação da resposta imune do hospedeiro, em vez de exercerem efeito leishmanicida direto.

A ausência de modulação significativa da produção de óxido nítrico indica que os mecanismos envolvidos parecem estar predominantemente relacionados a vias dependentes de citocinas e ao estresse oxidativo mediado por ROS. Esse perfil reforça a hipótese de que os CFS atuam como moduladores do microambiente imunológico, favorecendo uma resposta do tipo Th1 equilibrada, capaz de contribuir para o controle da infecção com menor potencial de dano tecidual.

Dessa forma, os achados sustentam o potencial de metabólitos derivados de *B. velezensis* como candidatos promissores para estratégias adjuvantes no tratamento da leishmaniose, especialmente considerando as limitações terapêuticas atualmente existentes. Estudos adicionais, incluindo análises moleculares mais aprofundadas e modelos *in vivo*, serão fundamentais para elucidar os mecanismos envolvidos e consolidar a aplicabilidade clínica desses compostos.

REFERÊNCIAS

ABBASI, A et al. cytotoxic potentials of cell-free supernatant derived from *lactobacillus casei* crl431 on hct-116 and ht-29 human colon cancer cell lines. **biointerface research**, v. 13, n. 5, 2023.

ABDELHAMID, A.G. et al. Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant *E. coli*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p.603–607, 2018

ABENGÓZAR MÁ et al. Enterocin AS-48 as Evidence for the Use of Bacteriocins as New Leishmanicidal Agents. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 61, n. 4, p. e02288-16, 24 Mar 2017.

ADENIJI, A.A., LOOTS, D.T. & BABALOLA, O.O. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 103, p. 3669–3682, 2019.

ALVES, A et al. Evasion of the complement system by Leishmania through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. A**cta Tropica,** v. 224, p. 106152, 2021.

ANDRADE, C. M. et al. Oral Treatment With Heat Shock Protein 65-Producing *Lactococcus lactis* Induces Regulatory T Cells, Modulating Inflammatory Response in *Leishmania braziliensis* Infection. **Immunology**, p. 1–11, 2025

ALSHAWEESH, J et al. *Leishmania major* Strain-Dependent Macrophage Activation Contributes to Pathogenicity in the Absence of Lymphocytes. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. e01126-22, 3 out. 2022.

ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018

ASHOUR, D. S; OTHMAN, A. A. Parasite–bacteria interrelationship. **Parasitology Research**, v. 119, p. 3145-3164, 4 ago. 2020.

BALASEGARAM M et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 17, n. 4, p. 493-510, 2012.

BEZERRA, J. M. T et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 9, p. e0006697, 18 set. 2018.

BRON, P., VAN BAARLEN, P. & KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 66–78, 21 Nov 2011.

BRUTSCHER, L. M et al. Genetic and Phenotypic Characterization of *Bacillus velezensis* Strain BV379 for Human Probiotic Applications. **Microorganisms**, v. 12, n.3, p. 436, 21 Feb 2024.

CAI, J. *Bacillus velezensis* A2 Can Protect against Damage to IPEC-J2 Cells Induced by Zearalenone via the Wnt/FRZB/β-Catenin Signaling Pathway. **Toxins (Basel)**, v. 16, n. 1, p. 44, 13 Jan 2024.

CARDOSO, R.M. et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites Vectors,** v. 8, n. 171, 2015.

CARVALHO, A. M; BACELLAR, O; CARVALHO, E. M. Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 466, 14 abril 2022 p. 466.

CHANG, Y. Y et al . Phorbol myristate acetate induces differentiation of THP-1 cells in a nitric oxide-dependent manner. **Nitric Oxide**, v, 109-110, p. 33-41, 2021.

CONDE, L et al. Humoral response in Leishmaniasis. **Cell. Infect. Microbiol**, v. 12, p. 1063291, 12 dez. 2022.

CORMAN, H. N.; McNAMARA, C. W.; BAKOWSKI, M. A. Drug Discovery for Cutaneous Leishmaniasis: A Review of Developments in the Past 15 Years. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, p. 2845, 23 nov. 2023.

CORTE S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

COSTA-DA-SILVA, A.C et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Trop. Med. Infect. Dis**, v. 7, n. 4, p. 54, 31 mar. 2022**.**

CROFT S. L, YARDLEY V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 319-42, 2002.

DAGA M. K, ROHATGI I, MISHRA R. Leishmaniasis. **Indian J Crit Care Med**, S166-S170, 25 May 2021.

da ROSA, C. E et al.In Silico and In Vitro Characterization of *Bacillus velezensis* P45: Screening for a Novel Probiotic Candidate. **Foods,** v. 14, n. 13, 2025.

de AZEVEDO VLS et al. An Evaluation of the Antibacterial, Antileishmanial, and Cytotoxic Potential of the Secondary Metabolites of *Streptomyces* sp. ARH (A3). **Microorganisms**, v. 12, n. 3, p. 476, 2024.

den BROECK L.V et al. The impact of probiotic administration *in vivo* on peritoneal mouse macrophages infected by *Leishmania amazonensis ex vivo*. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 120, p. e250014, 22 Sep 2025.

DOS REIS, T. F. M et al. Chicken embryos are a valuable model for the selection of *Bacillus subtilis* for probiotic purposes. **Archives of Microbiology**, v. 204, p. 715, 19 nov. 2022.

DOSTÁLOVÁ, A., VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites Vectors, v.** 5, n. 276, 2012.

EL FAR, MS et al. Promising biotherapeutic prospects of different probiotics and their derived postbiotic metabolites: in-vitro and histopathological investigation. **BMC Microbiol,** v. 23, n. 1, p. 122, 3 May 2023.

ELOI, I et al. Nasal mucocutaneous leishmaniasis – A rare manifestation of the disease. **Rev Portuguesa De Otorrinolaringologia-Cirurgia De Cabeça E Pescoço**, v. 61, n. 1, p. 101–105, 2023.

FERREIRA-SILVA , M. M et al. Socio-epidemiological characterisation of blood donors with asymptomatic *Leishmania infantum* infection from three Brazilian endemic regions and analysis of the transfusional transmission risk of visceral leishmaniasis. **Transfuse Medicine**, v. 28, n. 6, p. 433-439, 2018.

FILARDY A. A et al. Infection with Leishmania major induces a cellular stress response in macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, p. e85715, 2014.

FOLIGNÉ, B et al. Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6 substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 987-994, 2012.

FREEDMAN, K. E et al. Examinando os efeitos gastrointestinais e imunomoduladores do novo probiótico *Bacillus subtili*s DE111. **Internacional J. Mol**. **Ciência**, v. 22, n. 5, p. 2453, 22 fev. 2021.

FRICK L., HINTERLAND L et al. Acidic Microenvironments Found in Cutaneous *Leishmania* Lesions Curtail NO-Dependent Antiparasitic Macrophage Activity. **Front Immunol**, v.13, p. e789366, abr 2022.

GEORGE, T et al. Standardizing biofilm quantification: harmonizing crystal violet absorbance measurements through extinction coefficient ratio adjustment. **Arch Microbiol**, v. 207, n. 59, 2025.

GHOSH, K et al. Successful Therapy of Visceral Leishmaniasis With Curdlan Involves T-Helper 17 Cytokines. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 6, p. 1016-1025, 15 mar. 2013.

GUPTA G, OGHUMU S, SATOSKAR AR. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Adv Appl Microbiol**, v. 82, p. 155-84, 2013.

HARADA Y, MIYAMOTO K, SUJINO T. Protocol to isolate and enrich mouse splenic naive CD4+ T cells for in vitro CD4+CD8αα+ cell induction. **STAR Protoc**, v. 3, n. 4, p. 101728, 16 Dec 2022.

JI, Let al. Dietary *Bacillus velezensis* Improves Piglet Intestinal Health and Antioxidant Capacity via Regulating the Gut Microbiota. **Int. J. Mol. Sci**, v. 26, n. 12, p. 5875, 2025

JUNIOR, J. dES et al. A fine mapping of single nucleotide variants and haplotype analysis of IL13 gene in patients with *Leishmania guyanensis*-cutaneous leishmaniasis and plasma cytokines IL-4, IL-5, and IL-13. **Front. Immunol**, v. 14, p. 1232488, 16 out. 2023.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology,** v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KIM, H .Inhibitory effects of *Bacillus velezensis* ID-A01 supernatant against *Streptococcus mutans*. **BMC Microbiol,** v. 23, p. 362, 2023.

LARSEN, I. S. et al. *Bacillus velezensis* DSM 33864 reduces *Clostridioides difficile* colonization without disturbing commensal gut microbiota composition. **Sci Rep**, v. 13, p. 14941, 2023.

LEE, N. K; KIM, W. S; PAIK, H. D. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. **Food Sci Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 1297–1305, 8 out. 2019.

LOPES et al. Resistance Against *Leishmania major* Infection Depends on Microbiota-Guided Macrophage Activation. **Front. Immunol**, v. 12, 2021.

MACHADO, G. U. PRATES, F. V. MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 94, n. 1, p. 9-16, 2019.

MARKOWIAK, P. & ŚLIŻEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.

MERVE AKKULAK et al. Modulation of Caco-2 Colon Cancer Cell Viability and CYP2W1 Gene Expression by Hesperidin-treated *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) Cell-free. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 24, n.5, 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim epidemiológico. **Brasília: Ministério da Saúde,** v. 56, n. 17, 10 dez 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. **Brasília: Ministério da Saúde;** 2017.

MIRZAEI A et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 145, p. 155297, 2021.

MONCADA-DIAZ, M. J et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Leishmania* spp. **Pathogens**, v. 13, n. 10, 2024.

MONTEAGUDO-MERA A ET AL. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **Appl Microbiol Biotechnol, v. 103, n. 16**, p. 6463-6472, 2019.

MUKHERJEE, S et al. Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases: Lessons from recent findings. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 61, p. 111–128, 2018.

NAISSINGER DA SILVA M et al. *In vitro* test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. **Curr Res Food Sci**, v. 4, p. 320-325, 12 May 2021.

NAMAEI, M. H et al. The Efficacy of Hydroalcoholic Extracts of Prosopis farcta Against Leishmania major. **Turkiye Parazitol Derg**, v. 45, n. 1, p. 1-4, 2021.

NIKAIDO, Hiroshi. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

NOVAIS, F. O et al. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1β production. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 2, p. e1006196, 13 Fev 2017.

OLIVEIRA F. C et al. Synthesis and Biological Evaluation of 4-(4-Nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazole Derivatives as Antitrypanosomal Agents. **ACS Omega**, v. 10, n. 20, p. 20299-20314, 2025.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C et al. An old drug and different ways to treat cutaneous leishmaniasis: Intralesional and intramuscular meglumine antimoniate in a reference center, Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 15, n. 9, p. e0009734, 2021.

PACHECO-FERNANDEZ T et al.. Understanding the immune responses involved in mediating protection or immunopathology during leishmaniasis. **Biochem. Soc. Trans,** v. 49, p. 297-311, 2021.

PAHUMUNTO, N., TEANPAISAN, R. Anti-cancer Properties of Potential Probiotics and Their Cell-free Supernatants for the Prevention of Colorectal Cancer: an In Vitro Study. **Probiotics & Antimicro. Prot,** v. 15, p. 1137–1150, 2023.

PARK, JY., LEE, J.Y., KIM, Y. et al. Biosafety characteristics and antibacterial activity of probiotic strains against *Streptococcus mutans*, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Porphyromonas gingivalis. **Ann Microbiol,** v. 75, n. 2, 2025.

PEÑA-MORÁN, O.A. et al. Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from Bursera fagaroides var. fagaroides on breast Cancer cell lines. **Molecules,** v. 21, 2016

PENNACHIA, C et al. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat science**, v. 67, n. 3, p. 309-317, 2004.

PERINI & PEREIRA et al. Inhibitory effect of *Bacillus velezensis* 1273 strain cell-free supernatant against developing and preformed biofilms of Staphylococcus aureus and MRSA. **Microbial Pathogenesis**, v. 197, p. 107065, 2024.

RALTON, J. E, SERNEE, M. F, McCONVILLE, M. Evolution and function of carbohydrate reserve biosynthesis in parasitic protists. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 988-1001, 2021.

ROCHA, K. R et al. Inhibitory effect of bacteriocins from enterococci on developing and preformed biofilms of Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii and Listeria innocua. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 35, n. 7, p. 96, 20 jun. 2019.

RODRIGUES, I. A et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-12, 11 out, 2015.

RODRIGUES, R. R. L. et al. Evaluation of SB-83, a 2-amino-thiophene derivative, against Leishmania species that cause visceral leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 148, p. 114106, 24 jan. 2025.

ROUSSEAUX, A; BROSSEAU, C. BODINIER, M. Immunomodulation of B Lymphocytes by Prebiotics, Probiotics and Synbiotics: Application in Pathologies. **Nutrients**, v. 15, n. 2, p. 269, 5 jan. 2023.

SCILLATO M et al. Antimicrobial properties of Lactobacillus cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. **Microbiologyopen.** 2021

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SERAFIM et al. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021.

SHAIKH S SOHEL et al. Efficacy and safety assessment of probiotic *Bacillus coagulans (Heyndrickxia coagulans)* BCP92 for treatment of diarrhea. **Toxicology Research**, v. 13, n. 6, 2024.

SILVA J et al. Dynamics of American tegumentary leishmaniasis in a highly endemic region for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Northeast Brazil. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 11, n. 11, p. e0006015, 2017.

Silva, M.O et al. Exploring the Probiotic Potential and Immunomodulatory Capacity of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 Against Bacterial Pathogens and *Trypanosoma cruzi*. ***Probiotics & Antimicro. Prot,*** 2025.

SILVA S. N et al.The burden of out-of-pocket and indirect costs of cutaneous leishmaniasis patients in Minas Gerais, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 19, n. 4, p. e0013020, 2025.

SORNSENEE P et al. Lyophilized cell-free supernatants of *Limos Lactobacillus fermentum* T0701 exhibited antibacterial activity against *Helicobacter pylori.* **Sci Rep**, v. 14, n. 1, p. 1363, 13 Jun 2024.

SOROKULOVA, I. Modern Status and Perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics. **J Prob Health**, v. 1, n. 4, p. 1000e106 , 25 nov. 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 10, p. 1–14, 2018.

SUVA, M. A; SUREJA , V. P; KHENI, D. B Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. **J Curr Res Sci Med**, v. 2, p. 65-72, 18 nov. 2016.

TANG, Z et al. The immunological characteristics and probiotic function of recombinant *Bacillus subtilis* spore expressing *Clonorchis sinensis* cysteine protease. **Parasit Vectors**, v. 9, p. 648, 19 dez. 2016.

TRAN, C et al. Antimicrobial *Bacillus*: Metabolites and Their Mode of Action. **Antibiotics**, v. 11, n. 1, p. 88, 2022.

TUNES, L.G.Investigation of the Leishmanicidal and/or Trypanocidal Activity and Mechanisms of Action of Natural Products and a Derivative. Master's Thesis, **Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, Brazil, 2015.

WANG J et al. Complete genome analysis and antimicrobial mechanism of *Bacillus velezensis* GX0002980 reveals its biocontrol potential against mango anthracnose disease. **Microbiol Spectr**, v. 13, p. e02685-24, 2025.

WANG, ZE et al. Probiotic potential of Bacillus velezensis MZ-09: Assessing characteristics and safety through in vitro and in vivo analyses, **Microbiological Research**, v. 301, p. 128321, 2025.

WIJESOORIYA, H et al. Cytokine and phenotypic cell profiles in human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **PLoS ONE**, v. 18, n. 1, p. e0270722, 5 jan. 2023.

W.M. QUINTEIRO-FILHO, J.T. BRISBIN, D.C. HODGINS, S. SHARIF. *Lactobacillus* and *Lactobacillus* cell-free culture supernatants modulate chicken macrophage activities. **Research in Veterinary Science**, v. 103, p. 170-175, 2015.

XU X, et al. Immunomodulatory effects of *Bacillus subtilis* (natto) B4 spores on murine macrophages. **Microbiol Immunol**, v. 56, n. 12, p. 817-24, 2012.

XU Z et al. Cell-Free Supernatant of *Bacillus subtilis* G2B9-Q Improves Intestinal Health and Modulates Immune Response to Promote Mouse Recovery in Clostridium perfringens Infection. **Curr Microbiol**, v. 81, n. 8, p. 243, 27 Jun 2024.

YAO P, MOHD ESAH E, ZHAO C. Regulatory mechanisms and applications of *Lactobacillus* biofilms in the food industry. **Front Microbiol**, v. 15, p. 1465373, 7 Jan 2025.

YI YANGLEI, et al. Probiotic potential of Bacillus velezensis JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on Carassius auratus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 78, p. 322-330, 2018

ZAINEB KHADUM ALI, RAJWA HASEN ESSA and SABAA TAHER MOHAMMED. Immunological Study for the Role of Probiotic for Control on the *Leishmania donovani.* **International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology,** v. 3, n. 10, p. 2348-7968, 2016.

ZANATTA, J. M et al. Putrescine supplementation shifts macrophage L-arginine metabolism related-genes reducing *Leishmania amazonensis* infection. **PLoS ONE**, v. 18, n. 3, p. e0283696, 31 mar. 2023.

ZAYATS, R et al. Antigen recognition reinforces regulatory T cell mediated *Leishmania major* persistence. **Nat Commun, v.** 14, p. 8449, 2023.

Zhang L et al. Investigation of Cytotoxicity, Oxidative Stress, and Inflammatory Responses of Tantalum Nanoparticles in THP-1-Derived Macrophages**. Mediators Inflamm**, 2020.

ZHU, J., CHEN, Y., IMRE, K. *et al.* Mechanisms of probiotic *Bacillus* against enteric bacterial infections. **One Health Adv**, v. 1, n. 21, 2023.

Zhu La et al. A New *Bacillus velezensis* Strain CML532 Improves Chicken Growth Performance and Reduces Intestinal Clostridium perfringens Colonization. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 77, 2024.

ZONG, Z et al. *Bacillus* lipopeptides as a promising antibiotic: Insights into their molecular mechanisms of action and potential clinical applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1235, 2017.