

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

DANIELA SANT' ANA DE AQUINO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MICROBICIDA DA FILOSSEPTINA-1 NAS
FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis* *in vitro***

Brasília

2014

AVALIAÇÃO DO EFEITO MICROBICIDA DA FILOSSEPTINA-1 NAS FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis* *in vitro*

DANIELA SANT' ANA DE AQUINO

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Selma Aparecida Souza Kückelhaus

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Kelly Grace Magalhães



Brasília

2014

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Daniela Sant'Ana de Aquino

AVALIAÇÃO DO EFEITO MICROBICIDA DA FILOSSEPTINA-1 NAS FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis* in vitro

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Medicina Tropical: Epidemiologia e Controle de Doenças infecciosas e
Parasitárias

DATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

17 de abril de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Selma Aparecida Souza Kückelhaus – Universidade de Brasília
(orientadora)

Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite – Universidade Federal do Piauí

Prof^a Dr^a Tatiana Karla dos Santos Borges – Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Viviane Urbini Vomero – Universidade de Brasília
(suplente)

*Aos meus pais e irmã, meu alicerce.
Aos pacientes com leishmaniose por não perderem
a esperança de dias melhores.*

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus pela dádiva da vida e saúde para o término deste trabalho.

À minha orientadora prof^a Dr^a Selma Aparecida Souza Kückelhaus por acreditar no meu trabalho e esforço e pela oportunidade confiada.

À minha co-orientadora Kelly Grace Magalhães por aceitar o convite de co-orientação e me ajudar a definir os ensaios deste projeto.

À Prof^a Dr^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira pela excelência no ensino, por contribuir para a minha formação e me proporcionar o entendimento em imunologia.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Tosta pela sua sabedoria e longanimidade em acrescentar ao meu conhecimento em imunologia de uma forma visionária e revolucionária.

Ao Prof. Dr. José Roberto Leite pela parceria e autorização dos experimentos com a filoseptina-1.

À Prof^a Dr^a Tatiana Karla dos Santos Borges na realização dos experimentos e na orientação dos mesmos.

Ao Prof. Dr. José Raimundo Correa pela paciência e disposição em me ensinar, e auxiliar no processamento e visualização do MET.

Aos professores Dr^a Eleuza Magalhães e Dr. Rodrigo Gurgel pela disponibilidade e permitir o uso do microscópio invertido na visualização das minhas culturas de leishmânia e estufa.

À técnica Maria da Glória (Glorinha) pelo processamento dos materiais para o MET e pela disposição em ajudar com muita alegria.

Às técnicas Ingrid e Mariana e às alunas Núbia e Márcia Cristina do IB que sempre me receberam muito bem e me ajudaram no que foi preciso para o MET, além de providenciarem os materiais necessários.

Aos companheiros fiéis Luciana Leite e Danilo Corazza que estavam sempre presentes nos ensaios para me auxiliar.

À estagiária Elisabete Abrão pela amizade, pelos momentos de cafezinho, e principalmente, por providenciar os materiais necessários para os experimentos e cuidar dos animais com tanta dedicação.

À amiga Graciene Araújo que, apesar da distância, sempre estava disponível para sanar as minhas dúvidas.

Aos amigos Thaís Minuzzi, Luciana Leite, Mayara Gabriele de Oliveira, Tatiana Borges, Aline Moraes, Danilo Corazza, Marcelo Nóvoa, André Cunha (que está no Canadá), Carmen Muricy, Andréia Cascaes, Bruna Ester, Mariana Vieira, pelas caronas, lanchinhos, músicas bregas e pela presença de vocês na minha vida que faz toda a diferença!

Às amigas Viviane Yllena e Pollyana Cardoso pelo ombro amigo, pelo estímulo e pelas conversas animadoras.

À minha irmã postiça Hadiane Sampaio pelos conselhos e por ser a prova viva de Provérbios 17:17 (Bíblia Sagrada).

Aos meus pais Fátima e Carlos e irmã Vanessa pelo incentivo, amor e por não medirem esforços em me apoiar.

Aos queridos Tércia Maria Louza de Castro, Emiraldo dos Anjos Brito, Gabriela, Nelson Pelet Nascimento (*in memoriam*) pela contribuição de conhecimento, no preparo de reagentes e apoio.

Aos colegas de classe da Medicina Tropical: Luciana Leite, Carmen Lúcia, Oscar Mesones Lapouble, Roberto Dusi, Ricardo Gadelha, Thaís Minuzzi, Aline Rapelo, Juliana Rossi, Lucas Donato, Artur de Sousa, Lúcia Freitas, Leandro Machado, Glauco Machado, pelo companheirismo e amizade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos os meus amigos, colegas de classe, técnicos e professores que me apoiaram e contribuíram de alguma forma para o meu crescimento.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Tri-Fosfato
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CL	Corpúsculo Lipídico
CO ₂	Dióxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Cicloxygenase
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – <i>Major Histocompatibility Complex</i> , em inglês)
FM	Faculdade de Medicina
H	Hora (s)
FNT	Fator de necrose tumoral
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IFN- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

mg	miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator nuclear Kappa B
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i> , em inglês (Citotóxica Natural)
mM	Milimoles
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	íon superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PFA	Paraformaldeído
PMA	Acetato de forbol miristato
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROS	Reactive Oxygen Species, em inglês. Espécie Reativa de Oxigênio
PS-1	Filosseptina-1
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SFB	Soro Fetal Bovino
STF	Salina Tamponada com Fosfato
Ta 1	Linfócitos T auxiliar do tipo 1 (<i>T helper 1</i> , em inglês)
Ta 2	Linfócitos T auxiliar do tipo 2 (<i>T helper 2</i> , em inglês)
TCD8	Linfócito T CD8
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento – beta
Treg	Linfócito T regulador
UnB	Universidade de Brasília

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos de mecanismos de ação propostos para a permeabilização de membranas celulares por PAMs_____	8
Figura 2. Fluxograma dos ensaios <i>in vitro</i> _____	14
Figura 3. Obtenção das formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> em função do tempo_____	22
Figura 4. Fotomicrografias de diferentes formas de <i>L. amazonensis</i> _____	23
Figura 5. Padronização da infecção de macrófagos peritoneais por formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> em função do tempo_____	24
Figura 6. Efeito da PSN-1 em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> _____	26
Figura 7. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> _____	27
Figura 8. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados ou não com diferentes concentrações da filosseptina-1 (2,16 ou 64 µg/mL)_____	28
Figura 9. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8), infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e tratados ou não com diferentes concentrações da PSN-1 (2, 16 ou 64 µg/mL)_____	29
Figura 10. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados ou não com diferentes concentrações de PSN-1 (2,16 ou 64 µg/mL)_____	30
Figura 11. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8), infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e tratados ou não com diferentes concentrações da PSN-1 (2, 16 ou 64 µg/mL)_____	31
Figura 12. Efeito da PSN-1 na formação de corpúsculos lipídicos em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) infectados ou não com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> _____	33
Figura 13. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais para a identificação dos corpúsculos lipídicos_____	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de formas de <i>L. amazonensis</i> incubadas a 37 °C em função do tempo_____	23
Tabela 2. Infecção dos macrófagos peritoneais por amastigotas axênicas em função do tempo_____	24
Tabela 3. Efeito microbicida da PSN-1 nas formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (A, B e C)_____	61
Tabela 4. Efeito da PSN-1 sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais não infectados de camundongos Swiss_____	63
Tabela 5. Efeito da PSN-1 sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i> de camundongos Swiss_____	64
Tabela 6. Efeito da PSN-1 sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais não infectados de camundongos Swiss_____	65
Tabela 7. Efeito da PSN-1 sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i> de camundongos Swiss_____	66

FINANCIAMENTO

O presente trabalho teve o apoio financeiro da CAPES na concessão de bolsa de estudo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURA	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
2.1. Geral	12
2.2. Específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Delineamento experimental	14
3.2. Peptídeo	14
3.3. Micro-organismos	15
3.4. Animais	15
3.5. Padronização para obtenção das formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania amazonensis</i>	16
3.6. Obtenção das células peritoneais	16
3.7. Padronização da infecção dos macrófagos por amastigotas axênicas	16
3.8. Avaliação do efeito microbicida	17
3.9. Influência da PS-1 na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais	18
3.10. Influência da PS-1 na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais	19
3.11. Influência da PS-1 na formação do corpúsculo lipídico por macrófagos peritoneais	19
3.12. Métodos Estatísticos	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Obtenção das formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	22
4.2. Padronização da infecção de macrófagos por amastigotas axênicas	23

4.3. Efeito microbicida da PS-1 nas formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> _____	25
4.4. Influência da PS-1 na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais_____	27
4.5. Influência da PS-1 na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais_____	29
4.6. Influência da PS-1 na formação do corpúsculo lipídico por macrófagos peritoneais_____	31
5. DISCUSSÃO _____	35
6. CONCLUSÕES _____	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	45
ANEXO I (Parecer do Comitê de Ética)_____	54
ANEXO II (Soluções, Meios e Reagentes)_____	56
ANEXO III (Tabelas)_____	60

RESUMO

Doenças infecciosas são as principais causas de morte no mundo. Dentre essas doenças, a leishmaniose destaca-se no Brasil e no mundo pelo seu caráter endêmico e grande incidência, além disso, as manifestações clínicas, que variam das formas cutâneas à forma visceral, dependem da espécie do parasito bem como do sistema imunitário do indivíduo. O tratamento da doença baseia-se nos compostos antimoniais pentavalentes, que apesar de eficazes apresentam grande toxicidade para o hospedeiro e induzem mecanismos de resistência dos parasitos. Esses aspectos estimulam os estudos para identificar novos compostos voltados ao tratamento da leishmaniose. Os peptídeos antimicrobianos são promissores agentes leishmanicida, pois suas características estruturais e eletrostáticas lhes permitem interagir com as membranas celulares dos parasitos causando seu rompimento. Considerando o efeito microbicida da filosseptina-1 (PSN-1) nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e considerando que os macrófagos são as principais células envolvidas na patogênese da leishmaniose, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito microbicida da PSN-1 nas formas amastigotas de *L. amazonensis* e determinar se esse efeito relaciona-se com a produção das espécies reativas de oxigênio ou com a formação dos corpúsculos lipídicos. Formas amastigotas axênicas foram obtidas pela incubação de cultivos promastigotas de *L. amazonensis* por 96 horas a 37°C, seguindo-se a infecção dos macrófagos por 8 horas. Cultivos infectados foram tratados com diferentes concentrações da PSN-1 (0, 2, 16 e 64 µg/mL) por 2 h para avaliar o efeito microbicida pela determinação do índice de infecção, para determinar no sobrenadante das culturas, a produção de óxido nítrico após 24 h de incubação pelo método de Griess e de peróxido de hidrogênio após 1 h de incubação pelo método de Pick e Keisari; para a quantificação dos corpúsculos lipídicos utilizou-se o método da coloração com óleo vermelho. Os resultados mostraram que, quando comparado ao controle basal, o efeito microbicida da filosseptina-1 ocorreu nas três concentrações reduzindo o índice de infecção de macrófagos em 52%, 81% ou 96% com 2, 16 ou 64 µg/mL, respectivamente ($p < 0,05$); a produção de óxido nítrico aumentou com as três concentrações de PSN-1 ($p < 0,05$); a produção de peróxido de hidrogênio não foi afetada pelo tratamento com as menores concentrações do peptídeo, no entanto a maior delas (64 µg/mL) causou redução desse radical, na presença ou não da infecção. O índice corpuscular aumentou com a menor concentração do peptídeo (2 µg/mL) devido ao aumento no percentual de macrófagos que expressavam corpúsculos lipídicos; o tratamento com 16 µg/mL também aumentou o percentual de macrófagos que exibiam corpúsculos lipídicos. Os resultados mostraram que o efeito microbicida ocorreu em um

padrão dose-dependente, em que, a concentração máxima (64 µg/mL) foi capaz de reduzir em 96% o índice de infecção dos macrófagos, após 2 horas de incubação com o peptídeo. Em conjunto, o efeito das diferentes concentrações da PSN-1 nas formas amastigotas de *L. amazonensis* indicou o potencial desse peptídeo no tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: Filoseptina-1, efeito microbicida, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, corpúsculo lipídico.

ABSTRACT

Infectious diseases are the leading causes of death worldwide. Among these diseases, leishmaniasis stands out in Brazil and in the world for its endemic nature and its widespread prevalence; furthermore its clinical manifestations, range from cutaneous forms to visceral forms, depending upon the species of the parasite and on the immune system of the individual. Disease control is based on treatment with pentavalent antimonial compounds, which, while effective, have high toxicity to the host, and induce the generation of parasitic resistance mechanisms. These aspects encourage studies to identify novel compounds aimed at treating leishmaniasis. Antimicrobial peptides are promising leishmanicidal agents because their structural and electrostatic characteristics allow them to interact with the cell membranes of parasites causing their breakup. Considering the microbicidal effect of phyloseptin-1 (PSN-1) on promastigotes of *Leishmania amazonensis* and considering that macrophages are the main cells involved in the pathogenesis of leishmaniasis, the objective of this study was to evaluate the microbicidal effect of PSN-1 in amastigotes of *L. amazonensis* and to determine whether this effect is related to the production of oxygen reactive species or the formation of lipid bodies. Axenic amastigotes were obtained by incubation of promastigote cultures of *L. amazonensis* for 96 hours at 37 ° C, followed by infection of macrophages for 8 hours. Infected cultures were treated with different concentrations of phyloseptin-1 (0, 2, 16 and 64 µg /mL) for 2 h to evaluate the microbicidal effect by determining the infection rate and also to determine the supernatant of cultures producing nitric oxide after a 24 hour incubation by the Griess method of hydrogen peroxide after a 1 hour incubation by the Pick and Keisari method. For the quantification of lipid bodies we used the method of staining with Red Oil. The results showed that compared to the basal control, the microbicidal effect of PSN-1 was present in all three doses reducing the infection rate of macrophages, after treatment with the peptide or not, by 52%, 81% or 96% with 2, 16 or 64 µg/mL, respectively ($p < 0.05$); The production of nitric oxide increased with the three concentrations of PSN-1 ($p < 0.05$); production of hydrogen peroxide was not affected by treatment with lower concentrations of the peptide, however, most of them (64 µg/mL) caused a reduction of this radical in the presence or absence of infection. The corpuscular index increased with the lowest concentration of the peptide (2 mg/mL) due to the increase in the percentage of macrophages expressing lipid bodies; treatment with 16 µg/mL also increased the percentage of macrophages that exhibited lipid droplets. The results show that the microbicidal effect occurred in a dose-dependent pattern, wherein

the maximum concentration (64 µg/mL) was able to reduce in 96% the rate of infection of macrophages after 2 hours incubation with the peptide. Altogether, the effect of different concentrations of PSN-1 in amastigotes of *L. amazonensis* indicate the potential of this peptide in the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Phylloseptin-1, Microbicidal effect, Hydrogen Peroxide, Nitric Oxide, Lipid droplet.

1. INTRODUÇÃO

A existência de agentes antimicrobianos eficazes é fundamental para o combate e controle de doenças infecciosas que são as principais causas de morte em todo o mundo. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) doenças infecciosas como as do trato respiratório e intestinal, malária, leishmaniose, tuberculose e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) são responsáveis por milhões de mortes anualmente em todo mundo. No entanto, associado à infecção, o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos agentes infecciosos aos agentes antimicrobianos tem sido responsável também pela dificuldade de controlar essas doenças (WHO 2013).

Dentre as doenças infecciosas de grande interesse, a leishmaniose era considerada uma zoonose de animais silvestres que acometia pessoas em regiões rurais, mas que agora é encontrada também de forma autóctone em regiões periurbanas (Ministério da Saúde 2010; Santos et al. 2013); no Brasil foram identificados 248.834 casos de leishmaniose tegumentar e 33.315 casos de leishmaniose visceral entre 2001 e 2010 (Ministério da Saúde 2011). Esta doença está presente de forma endêmica em 88 países do mundo e acomete mais de 12 milhões de pessoas, especialmente nos trópicos.

A infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, ocorre durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos (WHO 2013), quando as formas promastigotas alcançam o tecido conjuntivo do hospedeiro e são ingeridas por células fagocitárias via reconhecimento de lipofosfoglicanos (LPG) e a glicoproteína de superfície principal (gp63) dos parasitos (Desjardins & Descoteaux 1997) por receptores para padrões moleculares de patógenos expressos pelos fagócitos. Uma vez endocitados, os parasitos transformam-se, dentro dos vacúolos parasitóforos, nas formas amastigotas esféricas que possuem glicocálice de menor espessura, quando comparado com as promastigotas, formado por lipofosfoglicano (LPG), glicoesfingolípídeos (GSLs), glicoinositolfosfolípídeos (GIPLs) (do próprio parasito ou incorporado da célula hospedeira), além de uma pequena quantidade de gp63 (Peder 2006; Kaye & Scott 2011). Para estabelecer a infecção, as formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária, rompem a célula e são liberadas no meio extracelular para infectar novos macrófagos.

Estabelecida a infecção, a doença se manifesta de diferentes formas clínicas que depende da espécie do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro (Lupi et al. 2009). Essas formas variam desde úlceras cutâneas isoladas e autolimitadas, até as formas desfigurantes mucocutâneas e a forma grave visceral. As formas clínicas da leishmaniose são dependentes da resposta por linfócitos T (LT) e a resistência ou suscetibilidade à infecção pelo parasito está relacionada aos níveis de desenvolvimento e expansão de LT auxiliares do tipo 1 (Ta1) e do tipo 2 (Ta2) (Reis et al. 2006).

A forma cutânea da leishmaniose apresenta resposta imunológica tipo 1 que controla a proliferação do parasito mas, em contrapartida, produz lesão tecidual. Na forma mucosa o paciente produz altos níveis de interferon-gama (INF- γ) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (FNT- α) e maior produção de células TCD4 que produzem INF- γ e ativação de resposta tipo 1 porque há uma intensa resposta inflamatória que destrói os tecidos. Na forma cutânea difusa os indivíduos apresentam grande produção de IL-10 e IL-4 e baixas quantidades de INF- γ ; esse padrão de citocinas possibilita o aumento das lesões e a incapacidade imunitária do hospedeiro em diminuir a atenuação das lesões. Na forma grave disseminada, o indivíduo apresenta um padrão de resposta tipo 1 com alta expressão de IL-10. As lesões apresentam infiltrado mononuclear com presença de linfócitos e macrófagos e poucos parasitos que apresentam LTCD4, baixas concentrações de INF- γ e FNT- α (Carvalho, Passos & Jesus 2005; Reis et al. 2006; Ministério da Saúde 2007 e 2011; Mansueto et al. 2011).

Em camundongos, a resposta Ta1 está associada ao controle da infecção, uma vez que ela ativa células capazes de produzir substâncias para a destruição do parasito, como citocinas inflamatórias, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (Reis et al. 2006). O controle de estágios tardios da infecção por *Leishmania* é dependente de resposta Ta1 e produção de interleucina – 12 (IL-12) e IFN- γ , enquanto que a progressão da infecção resulta do desenvolvimento de resposta Ta2 e pela produção de IL-4 e IL-10 (Kulkarni et al. 2011). Estudos relatados por Kaye & Scott (2011) mostraram a produção de IL-10 por diversos tipos celulares (LT, LB, macrófagos e neutrófilos) após infecções por *Leishmania*; esses achados apontam para a inibição dos macrófagos, para a multiplicação e crescimento do parasito. Também, tem sido sugerido que a diminuição da

resposta inflamatória pela IL-10 ameniza a resposta Ta1 exacerbada no caso da leishmaniose tegumentar e que, o controle da produção de ON auxilia a eliminação de parasitos intracelulares, em macrófagos infectados (Kulkarni et al. 2011; Abbas, Lichtman & Pillai 2012). No entanto, altos níveis de IL-10 e de citocinas anti-inflamatórias podem inibir os macrófagos na eliminação dos parasitos (Reis et al. 2006).

No controle da infecção o sistema imunitário atua produzindo substâncias que visam a eliminação de patógenos. Células como os macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e o óxido nítrico (ON) respectivamente que comumente causam danos irreversíveis aos parasitos. Também essas células formam estruturas corpusculares no seu citoplasma denominados corpúsculos lipídicos que são inclusões citoplasmáticas ricas em lipídios dispostos dentro de uma monocamada de fosfolipídeos, glicolipídeos e esteroides. Essas estruturas se relacionam com a produção de eicosanoides, prostaglandinas e leucotrienos e que se relacionam com o metabolismo e tráfego de lipídeos, na sinalização celular e na produção de mediadores inflamatórios (Murphy 2001; Bozza, Magalhães & Weller 2009), além de conter citocinas em resposta a um processo inflamatório ou mesmo em infecções por micro-organismos (Martin & Parton 2006). Tem sido reportado que os corpúsculos lipídicos aumentam na presença de lipopolissacarídeos (LPS), em infecções com *T. cruzi* (Bozza & Bandeira-Melo 2005) e *L. amazonensis* (Pinheiro et al. 2009) e na presença de doenças inflamatórias (Bozza & Bandeira-Melo 2005).

Para se contrapor aos mecanismos microbicidas dos macrófagos, os parasitos do gênero *Leishmania* possuem mecanismos de defesa que lhes possibilitam escapar da atividade lítica dos macrófagos, lhes conferindo maior resistência e sobrevivência dentro da célula hospedeira (Genestra et al. 2006; Cruvinel et al. 2010; Kaye & Scott 2011). Dentre esses mecanismos, o constituinte de membrana LPG é o responsável por inibir a formação do fagolisossoma (Desjardins & Descoteaux 1997) e proteger as formas promastigotas das espécies reativas de oxigênio produzidas pelos macrófagos (Spath et al. 2003; Reis et al. 2006), enquanto que a gp63 atua inibindo a ativação das enzimas lisossomais quando ocorre a fusão do lisossoma com o fagossoma (Sorensen et al. 1994).

O tratamento da leishmaniose baseia-se no antimônio pentavalente que constitui a droga de primeira escolha no tratamento da leishmaniose (Ministério da Saúde 2011). Além dos compostos antimoniais, a anfotericina B e paromomicina são utilizadas no tratamento da doença, no entanto, a toxicidade verificada para a anfotericina B e a variação do efeito, em função da espécie do parasito e o tipo de lesões a ser tratada, observada para a paromomicina, respectivamente (Croft, Seifert & Yardley 2006) são obstáculos na administração dessas drogas. Apesar de eficaz no tratamento da leishmaniose, os antimoniais pentavalentes apresentam grande toxicidade para o hospedeiro, causam graves efeitos colaterais como, mialgia, artralgia, dor abdominal, insuficiência hepática, cardíaca e renal aguda (Lima et al. 2007), além de induzirem a geração de mecanismos de resistência pelos parasitos (Croft & Yardley 2002; Croft, Sundar & Fairlamb 2006). Outro aspecto do tratamento com antimoniais refere-se à necessidade de administração parenteral e ser requerida a internação dos pacientes; em função disso muitos desistem do tratamento (Soares-Bezerra, Leon & Genestra 2004).

A geração de resistência aos antimicrobianos convencionais pelos microrganismos cresce mais velozmente que o desenvolvimento de novos fármacos. Aliado a isso, verifica-se que a indústria farmacêutica tem investido recursos predominantemente na modificação de medicamentos existentes e pouco se faz no investimento em pesquisas para a geração de novas moléculas capazes de superar o fenômeno de resistência cruzada aos fármacos. Esses fatores associados às dificuldades apresentadas pelos medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose, representam um importante aspecto para o controle da doença e apontam para a necessidade de identificar novos compostos eficazes e de baixa toxicidade.

O grupo de substâncias denominadas peptídeos antimicrobianos que são produzidas por animais e plantas como parte de seus mecanismos inatos de defesa contra uma variedade de agentes infecciosos (Bowman 1991; Gudmundsson et al. 1996) tem sido muito atrativos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Diferentes estudos mostraram seu potencial microbicida contra bactérias Gram positiva e negativa (Peschel 2002), fungos (Lee et al. 2004) e protozoários (Ghosh et al. 1997; Brand et al. 2002; Kückelhaus et al. 2009) e também contra células tumorais (Chernysh et al. 2002). Aliado ao seu largo

espectro de ação, os peptídeos antimicrobianos apresentam em geral baixa toxicidade para células de mamíferos como identificado *in vitro* em eritrócitos humanos (Leite et al. 2005), para camundongos Swiss *in vivo* (Kückelhaus et al. 2007) e células peritoneais de camundongos *in vitro* (Kückelhaus et al. 2009). Além dos efeitos microbicidas, os peptídeos antimicrobianos atuam no recrutamento e ativação de células, na maturação de células dendríticas, na angiogênese, na cicatrização de feridas, no controle da inflamação e da sepse (Kückelhaus 2007; Wieczorek et al. 2010).

Os peptídeos antimicrobianos são caracterizados por apresentarem uma grande variabilidade e diversidade de formas moleculares e são classificados, segundo Van't Hof et al. (2001), na sua estrutura secundária, em que regiões hidrofóbicas e aminoácidos catiônicos são espacialmente organizados em partes específicas da molécula. Segundo esse critério, os peptídeos são agrupados quatro classes estruturais, que compreendem: 1) peptídeos em hélice- α anfifílica como as filosseptinas, melitina e magainina (Guerrero et al. 2004), 2) peptídeos em cadeias β estabilizadas por pontes de dissulfeto como as defensinas e taquiplesinas (Matsuzaki 1999; Hancock 2001); 3) peptídeos em cadeias lineares com aminoácidos repetitivos e em peptídeos com estruturas cíclicas (em loop) como as histatinas e catelicidinas (Helmerhorst et al. 1999; Linde et al. 2001); 4) peptídeos sem estruturas anfipáticas, mas que formam hélice cíclica ou cadeia β do tipo poliprolina, como os lantibióticos e a nisina (Montville & Chen 1998; Breukink et al. 1999).

Embora ainda a esclarecer, acredita-se que a natureza físico-química das diferentes classes de peptídeos determinem as interações com as membranas celulares dos micro-organismos e conseqüentemente seus mecanismos microbicidas, bem como seu nível de toxicidade (Simone & Souza 2002). Peptídeos como as filosseptinas, melitina e magainina (Guerrero et al. 2004) exibem uma conformação hélice- α em solventes hidrofóbicos ou superfícies lipídicas e apresentam a capacidade de interação com membranas anfipáticas como as membranas biológicas.

Tem sido sugerido que o mecanismo microbicida dos peptídeos antimicrobianos decorra de três possíveis formas de interação com as membranas dos micro-organismos. No primeiro modelo, proposto por Ehrenstein

& Lecar (1977) chamado de “*estaca de barri*” (*barrel-stave*), o peptídeo interage sua face hidrofóbica com as cadeias carbônicas dos lipídeos da membrana plasmática do microrganismo, expondo a sua face hidrofílica para formar um canal transmembranar. No segundo modelo denominado “*carpete*” (Pouny et al. 1992) a interação eletrostática do peptídeo catiônico com os fosfolipídeos aniônicos, forma poros por toda a membrana do parasito, causando sua permeabilização e posterior rompimento (Shai 1999; Chia et al. 2000; Gehman et al. 2008; Melo, Ferre & Castanho 2009; Carvalho & Machini 2013). O terceiro e último modelo denominado “*poro toroidal*” também ocorre a formação de poros na camada lipídica por interação eletrostática, mas o peptídeo separa as cabeças polares dos fosfolipídeos e induz a monocamada lipídica superior a dobrar-se através do poro, dessa forma, moléculas de peptídeos e cabeças polares dos fosfolipídeos são intercaladas (Gehman et al. 2008; Melo, Ferre & Castanho 2009; Carvalho & Machini 2013) (Figura 1).

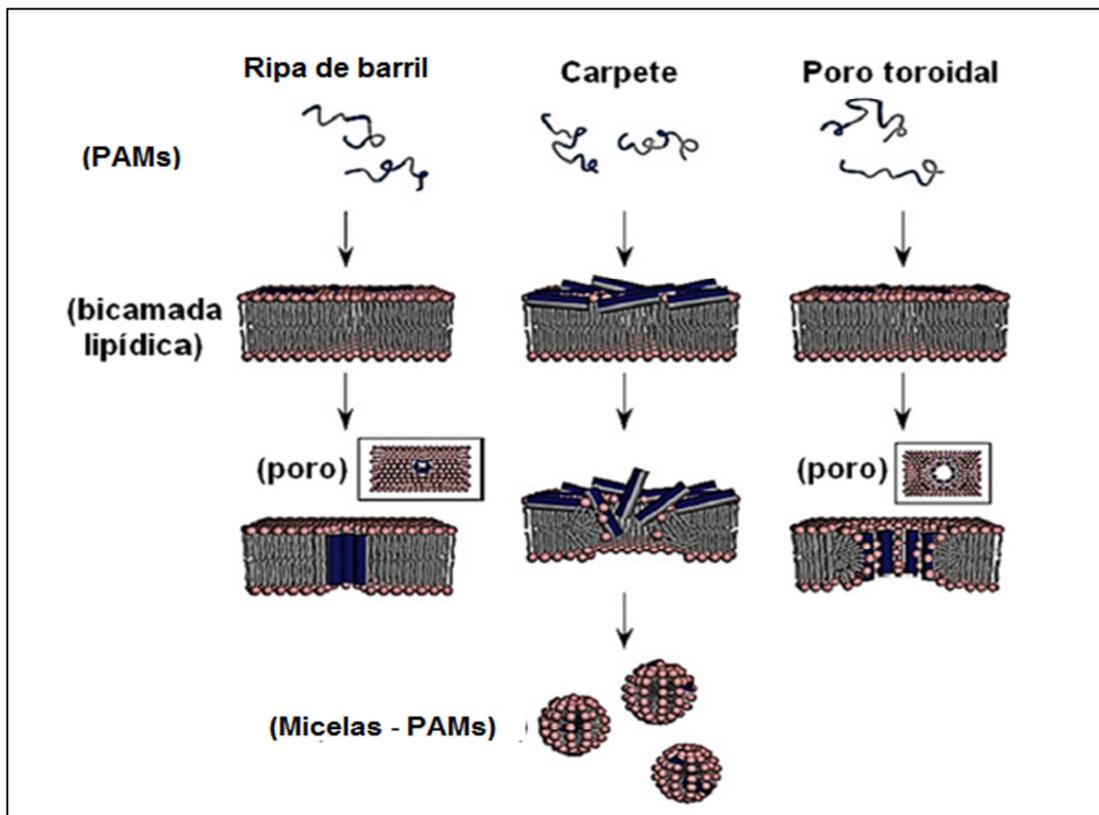


Figura 1. Modelos de mecanismos de ação propostos para a permeabilização de membranas celulares por PAMs. Esses estão representados como cilindros, cuja face cinza é hidrofóbica e a azul hidrofílica. Adaptado (Carvalho & Machini 2013).

Uma relativa baixa toxicidade dos peptídeos antimicrobianos tem sido reportada para as células de mamíferos. Acredita-se que isso esteja relacionado ao perfil de lipídeos expressos nessas membranas, que comumente é constituída principalmente por fosfolipídeos neutros como a fosfatidilcolina (Williamson & Schlegel 1994; Matsuzaki 1999). Fosfolipídeos aniônicos, como a fosfatidilserina e fosfatidilinositol, são comumente ausentes na superfície da membrana plasmática, mas presentes no interior da bicamada lipídica na maioria das células normais de mamíferos. Segundo Oren & Shai (1998), a presença do colesterol aumenta a rigidez e diminui a permeabilidade das membranas plasmáticas aos efeitos dos peptídeos antimicrobianos em temperaturas fisiológicas.

Contrariamente ao observado para as células de mamíferos observa-se que os peptídeos antimicrobianos são potencialmente ativos contra diferentes micro-organismos como os protozoários do gênero *Leishmania* (Williamson & Schlegel 1994). Alguns estudos reportam que a presença de fosfolipídeos aniônicos e a ausência de colesterol confere maior fluidez a essas membranas

mais atrativas eletrostaticamente aos peptídeos catiônicos (Williamson & Schlegel 1994; Epand et al. 1995; Oren & Shai 1998; Feder, Dagan & Mor 2000).

Além dos efeitos microbicidas, os peptídeos antimicrobianos estão relacionados a uma variedade de ações imunomoduladoras (Hancock & Sahl 2006), como na modulação da expressão de citocinas e espécies reativas. Hucke et al. (2004) mostrou que a cecropina-A aumentou a produção e expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) por macrófagos. Outros peptídeos como as defensinas HNP-1, HNP-2 e HNP-3 causaram aumento na proliferação de linfócitos T e aumento da secreção de IgG (Lillard et al. 1999). Também foi demonstrado que os peptídeos LL-37 e CP-28 estimularam a expressão de cerca de 30 genes e inibição de outros 40 genes relacionados à imunidade inata, em linhagens de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) (Hancock & Scott 2000).

Estudos realizados com a filosseptina-1 (PS-1), posteriormente renomeada para PSN-1 por Amiche et al. (2008), mostraram o potencial leishmanicida desse peptídeo sobre formas promastigotas, bem como sua baixa toxicidade para células peritoneais de camundongos nas concentrações microbicidas (>200 µg/mL). Aliado a isso, baixas concentrações de PSN-1 (1 µg/mL) causou aumento da aderência de macrófagos, o que foi sugerido como um efeito hormético que decorreu possivelmente de uma resposta adaptativa a um estresse moderado (Kückelhaus et al. 2009). Como sugerido, a reação celular a estresse químico ou físico envolve a ativação de vias transcricionais que podem resultar na produção de proteínas, citocinas, antioxidantes e fatores de crescimento (Mattson 2008; Zhang et al. 2010). Além disso, Kückelhaus (2007) demonstrou que a filosseptina-1 inibiu a síntese de H₂O₂ e ON por macrófagos peritoneais de camundongos, e aumento da produção de FNT por monócitos.

Considerando a incidência da leishmaniose associada às dificuldades de controle da doença, os achados para a PSN-1 nas formas promastigotas de *L. amazonensis* (Kückelhaus et al. 2009) e que os macrófagos são os alvos da infecção por leishmânias, é possível que esse peptídeo atue como microbicida em células infectadas por amastigotas. Também, considerando os achados imunomoduladores para a PSN-1 em cultivos de macrófagos (Kückelhaus 2007) e que, os macrófagos produzem substâncias como espécies reativas de oxigênio e

nitrogênio, além de corpúsculos lipídicos em resposta à infecção por protozoários, demonstra-se a importância de determinar o potencial desse peptídeo no controle da infecção de macrófagos pelo protozoário, in vitro, visando a possíveis aplicações biomédicas na leishmaniose.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o efeito microbicida da filosseptina-1 nas formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

2.2. Específicos

- Obter as formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss;
- Avaliar o efeito do peptídeo sobre a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos peritoneais;
- Determinar a presença do corpúsculo lipídico em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*, na presença ou não de diferentes concentrações de PSN-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Neste estudo avaliou-se o efeito microbicida da filosseptina-1 (PSN-1) e seu efeito sobre a produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e formação de corpúsculo lipídico em cultivos de macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. amazonensis*, conforme demonstrado no organograma abaixo (figura 2).

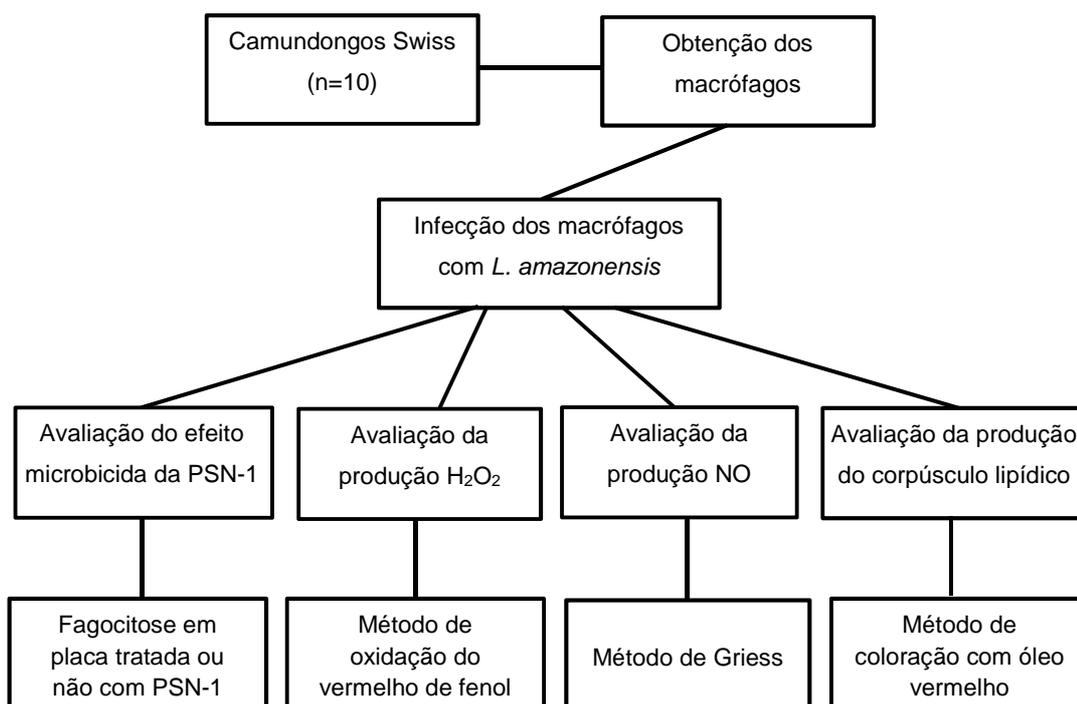


Figura 2. Fluxograma dos ensaios *in vitro*

3.2. Peptídeo

O peptídeo antimicrobiano filosseptina-1 (PSN-1) (FLSLIPHAINAVSAIAKHN-NH₂) identificado na secreção cutânea de *Phyllomedusa azurea* apresenta 19 resíduos de aminoácidos em hélice- α , possui domínios hidrofílicos e hidrofóbicos bem definidos e massa molecular de 2,016 kDa. O peptídeo sintético foi obtido pelo sistema Pioneer da Applied Biosystems (Foster, EUA) (Merrifield 1963) e purificado em coluna de fase reversa C18 218 TP 1022 (Vydac, Columbia, EUA) do sistema HPLC (Shimadzu Corporation,

Kyoto, Japão); seu grau de pureza foi avaliado pelo sistema MALDI/TOF-MS (PerSeptive Biosystems, Framingham, EUA) e MALDI TOF-TOF MS Ultraflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.3. Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados nesse estudo foram leishmânias da espécie *Leishmania (L.) amazonensis* da cepa MHOM/BR/PH8, mantidos sob criopreservação no laboratório de Leishmaniose do Instituto de Medicina Tropical, da Universidade de Brasília. Para a descriopreservação, uma alíquota era transferida para meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e mantida a 26°C até que os parasitos alcançassem fase log de crescimento. Em seguida, a suspensão era transferida para o meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 0,2% de sulfato de gentamicina, a 26 °C, até que os parasitos atingissem novamente na fase log de crescimento. As formas amastigotas axênicas foram obtidas a partir de um cultivo de formas promastigotas contendo 10⁷ parasitos/mL a 26 °C. Nessas condições o cultivo foi transferido para a estufa a 37 °C por 96 horas até que 100% das formas esféricas (amastigotas axênicas) fossem adquiridas.

3.4. Animais

Os animais utilizados nos ensaios eram camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, não isogênicos, pesando de 28 a 35g provenientes do alojamento de animais da Faculdade de Medicina. Os camundongos eram mantidos a temperatura ambiente (Média anual = 21,2°C; Instituto Nacional de Meteorologia – INMET), ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração balanceada e água potável *ad libitum*; a cama da gaiola era composta de maravalha estéril trocada duas vezes por semana.

O projeto de pesquisa desenvolvido nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília em 07 de junho de 2013. Os critérios adotados para a experimentação e manutenção dos animais que foram estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os procedimentos para o uso

científico de animais estabelecidos pela Lei Arouca nº 11.794/2008 foram rigorosamente cumpridos durante a execução desse estudo.

3.5. Padronização para obtenção das formas amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*

Ao alcançar a fase log de crescimento, as formas promastigotas de leishmânia, em cultura Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 0,2% de sulfato de gentamicina, foram incubadas a 37°C onde permaneceram por até 7 dias para mudança da forma promastigota para a forma amastigota (Teixeira et al. 2002). As diferentes formas dos parasitos (promastigota flagelada, alongada sem flagelo, oval sem flagelo e amstigota esférica) foram quantificadas decorridas 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ou 168 horas para determinar o tempo necessário para a aquisição de 100% das formas amastigotas axênicas. Depois de padronizado os cultivos contendo somente formas amastigotas foram utilizados na infecção dos macrófagos.

3.6. Obtenção das células peritoneais

As células peritoneais de camundongos Swiss submetidos à eutanásia em câmara contendo CO₂, eram obtidas pela lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL de solução de salina tamponada com fosfato (STF) 0,15M e pH 7,2, a 4°C. Depois de coletadas, as células peritoneais eram centrifugadas a 400xg por 10 min, ressuspendidas com 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) sem soro fetal bovino (meio incompleto), quantificadas em hematocítômetro (Câmara de Neubauer) e mantidas sob refrigeração em tubos plásticos graduados de 15 mL (LAbTech, Melbourn, Inglaterra) até o início dos experimentos.

3.7. Padronização da infecção dos macrófagos por amastigotas axênicas

Na presença de células peritoneais de camundongo, as formas amastigotas de *L. amazonensis* (10^6) foram incubadas em meio RPMI 1640 completo, acrescido com 10% de soro fetal bovino, em cada escavação da placa, em duplicata, e então as células foram novamente incubadas em diferentes tempos, por 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h a 37°C com 5% de CO₂ em ar.

Ao final de cada tempo, as escavações respectivas foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C para a remoção das leishmânias não ingeridas e lavadas com RPMI 1640 completo acrescido com 30% de soro fetal bovino, para remover a salinidade. Aspiradas e secas em ar quente foram fixadas em metanol por 1 min. Por fim, coradas em Giemsa 10% por 10 min, foram lavadas em água destilada. As lamínulas secas foram montadas em meio para montagem rápida sobre uma lâmina de microscopia para contagem e determinação da porcentagem de células infectadas e a média de leishmânias por macrófagos definindo assim, o melhor tempo para fagocitose das formas amastigotas de leishmânia.

3.8. Avaliação do efeito microbicida

O efeito microbicida da PS-1 sobre formas amastigotas de leishmânias foi avaliado incubando-se macrófagos peritoneais infectados com o peptídeo. O ensaio foi realizado em placa de 24 escavações, em duplicata, incubando-se as células peritoneais (2×10^5 /escavação) por 2 h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, em 500 µL de meio RPMI 1640 incompleto, para a obtenção dos macrófagos; decorrido esse tempo as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C para a remoção das células não aderidas. Em seguida, acrescentou-se à cada escavação, 10^6 formas amastigotas de *L. amazonensis*/500 µL de meio RPMI 1640 completo (meio acrescido com 10% soro fetal bovino) e então a placa foi incubada por 8 h nas mesmas condições descritas para a infecção dos macrófagos. A seguir as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C para a remoção das leishmânias não ingeridas e então, as células foram novamente incubadas por 2 h com diferentes concentrações do peptídeo (0, 2, 16 ou 64 µg/mL). Finalizada essa incubação as células/escavações foram lavadas 2 vezes com STF a 37°C, 1 vez com RPMI acrescido com 20% de soro fetal, secas com ar

quente, fixadas com metanol, secas, coradas com solução de Giemsa a 10%, lavadas em água e montadas em lâminas para microscopia.

O índice de infecção (% macrófagos infectados x média de leishmânias ingeridas) foi calculado analisando-se 200 macrófagos em microscópio óptico (1000x).

3.9. Influência da PSN-1 na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais

A quantificação da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos foi avaliada utilizando-se o reagente de Greiss, segundo método descrito por Green et al. (1982).

O experimento foi realizado em triplicata e em placa de 96 escavações (LABTech, Melbourn, Inglaterra). Células peritoneais depois de coletadas conforme descrito foram incubadas (2×10^5 células/200 μ L) em meio RPMI 1640 incompleto, em câmara úmida a 37°C, por 2 h, em atmosfera de ar 5% de CO₂ para a obtenção dos macrófagos. Após esse período, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C e então incubadas, nas mesmas condições anteriores, com 10^6 formas amastigotas de leishmânias por 8 horas para a infecção dos macrófagos. Em seguida, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C e novamente incubadas por 24 h na presença de diferentes concentrações da PSN-1 (0, 2, 16 ou 64 μ g/mL); como controle positivo utilizou-se 20 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS *Escherichia coli*, sorotipo 055:b5, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Finalizada essa incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 200xg por 10 min e em seguida, 100 μ L do sobrenadante de cada escavação foi transferido para outra placa. Uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂ em água destilada) contendo oito diferentes concentrações (0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100 nM) foi preparada e adicionada à nova placa. Em seguida adicionou-se 100 μ L do reagente de Greiss em todas as escavações, inclusive sobre a curva e as leituras das reações colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro de placa com filtro de 540 nm (SpectraMax® Plus 384 Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os resultados foram expressos em milimoles (mM) de ON.

3.10. Influência da PSN-1 na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais

A investigação do efeito da PSN-1 na produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais foi realizada segundo o método descrito por Pick & Keisari (1980) que consiste na oxidação de vermelho de fenol na presença de peroxidase.

O ensaio foi realizado em triplicata em placa de microcultivo de 96 escavações (LAbTech, Melbourn, Inglaterra). Células peritoneais (2×10^5 /200 μ L/escavação) foram incubadas em meio RPMI incompleto por 2 h a 37°C com 5% de CO₂ em ar para aderência dos macrófagos. Depois dessa incubação, as escavações foram lavadas com STF a 37 °C para remover as células não aderidas, acrescidas com 10^6 formas amastigotas de leishmânias/200 μ L e novamente incubadas por 8 horas para a infecção dos macrófagos. Decorrido esse tempo, as escavações foram lavadas com STF a 37 °C para remover as leishmânias não ingeridas e então, os macrófagos foram novamente incubados com as diferentes concentrações da PSN-1 (0, 2, 16 ou 64 μ L/mL) por 1 hora em 140 μ L de uma solução de vermelho fenol, com ou sem o estímulo com 100 nM de PMA (acetato de forbol miristato). Uma curva padrão de peróxido de hidrogênio foi preparada nas concentrações de 0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100 μ M para expressar os resultados em micromoles (μ M) de H₂O₂. A reação de oxidação do vermelho de fenol foi interrompida adicionando-se 10 μ L de NaOH 1N a todas as escavações e então, as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 620nm (SpectraMax® Plus 384 Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

3.11. Influência da PSN-1 na formação do corpúsculo lipídico por macrófagos peritoneais

A formação do corpúsculo lipídico por macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratadas ou não de diferentes concentrações de PSN-1 foi avaliada pela coloração com óleo vermelho (Oil Red-O®) (Borges 2013; Mehlem et al. 2013). Células peritoneais obtidas conforme descrito anteriormente foram incubadas (2×10^5 células/escavação/500 μ L) em

placa de microcultivo de 24 escavações contendo lamínulas para a aderência das células, por 2h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Decorrido o tempo de incubação as escavações foram lavadas com STF pH 7,2 a 37°C para remover as células não aderidas, adicionadas com 10⁶ formas amastigotas de leishmânias/500 uL em meio RPMI 1640 completo e novamente incubadas por 8 horas a 37°C com 5% de CO₂ em ar, para a infecção dos macrófagos. Finalizado o tempo de incubação as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C para a remoção das leishmânias não ingeridas e então, as células foram novamente incubadas por 2 h com as diferentes concentrações de PSN-1 (0, 2, 16 e 64 µL/mL). Depois de lavadas, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos, lavadas com STF pH 7,2 e com álcool isopropílico a 60%, em seguida as células foram coradas com óleo vermelho (Oil Red-O®), lavadas com água destilada, coradas com hematoxilina por 5 min, novamente lavadas em água, secas e montadas em meio de montagem gelatinoso.

Para a avaliação dos corpúsculos lipídicos analisou-se 200 macrófagos em microscópio óptico (1000x), considerando o percentual de macrófagos que apresentavam os corpúsculos e o número deles por célula (Borges 2013).

3.12. Métodos Estatísticos

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias, empregando-se o teste de Bartlett. Múltiplas comparações com distribuição normal foram analisadas pelo teste de ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls, e comparações entre dois grupos com distribuição normal foi usado o teste t-pareado ou Wilcoxon para dados não normais. Diferenças de p<0,05 foram consideradas significantes. Para as análises empregou-se o programa Prism® 5 Software Package (GraphPad, USA, 2005).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção das formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

As formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* foram adquiridas, in vitro, a partir da incubação das formas promastigotas flageladas a 37°C, posteriormente as leishmânias foram analisadas em microscopia para determinar o tempo necessário para a aquisição de 100% das formas amastigotas (esféricas).

A análise morfológica mostrou que para a aquisição das formas amastigotas (Figura 4D) primeiramente as leishmânias promastigotas (Figura 4A) perdem seus flagelos (Figura 4B), mas mantêm a forma alongada, em seguida elas se tornam ovais (Figura 4C) e posteriormente esféricas (Figura 3).

Os resultados das análises quantitativas mostraram que as formas promastigotas diminuem seu percentual na cultura em função do tempo até que decorridas 72 horas 100% das leishmânias perderam seus flagelos. De forma oposta, as formas amastigotas esféricas aumentam seu percentual na cultura para 100% com 168 horas (Figura 3, Tabela 1).

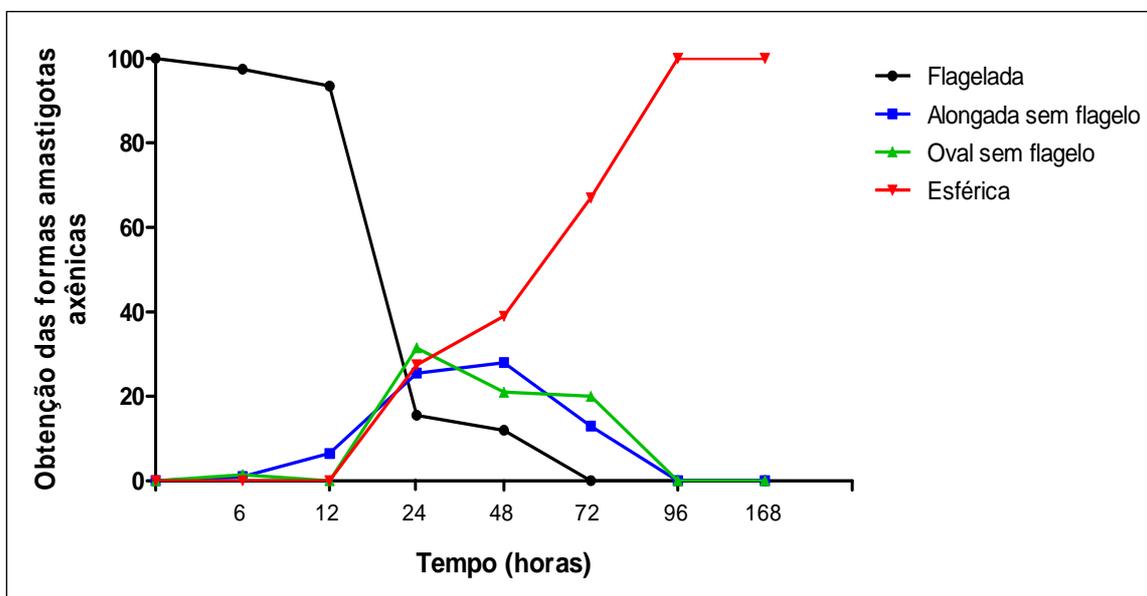


Figura 3. Obtenção das formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* em função do tempo. Formas promastigotas de leishmânias, mantidas a 26°C em meio Schneider até que atingissem a fase log de crescimento, foram incubadas por 96 horas a 37°C para a aquisição das formas aflageladas. Amostras dos cultivos foram distendidas sobre lâminas 6, 12, 24, 48, 72, 96 ou 168 horas, fixadas e coradas com Giemsa. A análise das

leishmânias em microscopia (1000x) mostrou que decorridas 168 horas 100% delas adquiriram a forma amastigota.

Tabela 1. Percentual de formas de *L. amazonensis* incubadas a 37 °C em função do tempo.

Tempo (horas)	Promastigota Flagelada (%)	Alongada sem flagelo (%)	Oval sem flagelo (%)	Amastigota Esférica (%)
0	100,0	0,0	0,0	0,0
6	97,5	1,0	1,5	0,0
12	93,5	6,5	0,0	0,0
24	15,5	25,5	31,5	27,5
48	12,0	28,0	21,0	39,0
72	0,0	13,0	20,0	67,0
96	0,0	0,0	5,0	85,0
168	0,0	0,0	0,0	100,0

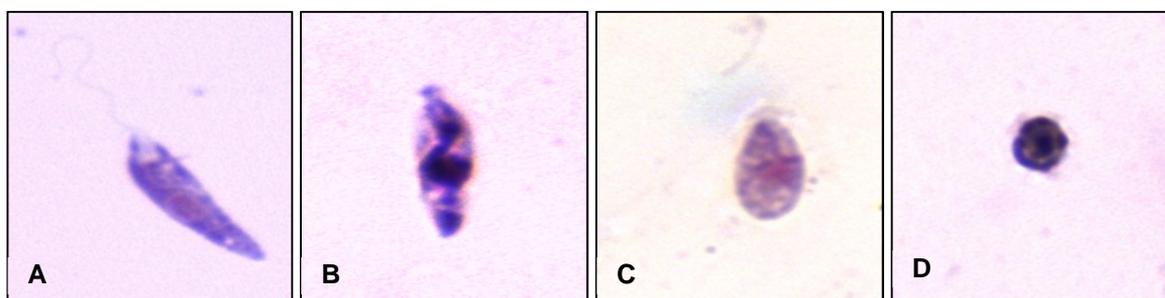


Figura 4. Fotomicrografias de diferentes formas de *L. amazonensis*. (A) promastigotas flageladas, (B) alongadas não flageladas, (C) oval não flagelada e (D) amastigotas esféricas. Coloração Giemsa (1000x).

4.2. Padronização da infecção de macrófagos por amastigotas axênicas

Para determinar o tempo adequado para a infecção dos macrófagos por amastigotas axênicas, cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos foram incubados com 10^6 leishmânias em função do tempo.

Os resultados da análise de 200 macrófagos mostraram que o índice de infecção aumentou em função do tempo, sendo de 118,2% decorridas 8 horas de

incubação. Similarmente, o percentual de células infectadas e a média de leishmânias ingeridas aumentaram ao longo de 8 horas de incubação (Tabela 2, Figura 5).

Tabela 2. Infecção dos macrófagos peritoneais por amastigotas axênicas em função do tempo.

Tempo	% Macrófagos infectados	Media leishmânias ingeridas	Índice de infecção
30mim	1,5	1,5	3,3
1h	1,3	2,5	6,3
2h	4,0	2,0	6,2
4h	15,8	2,4	33,5
6h	24,0	2,8	66,6
8h	35,5	3,3	118,2

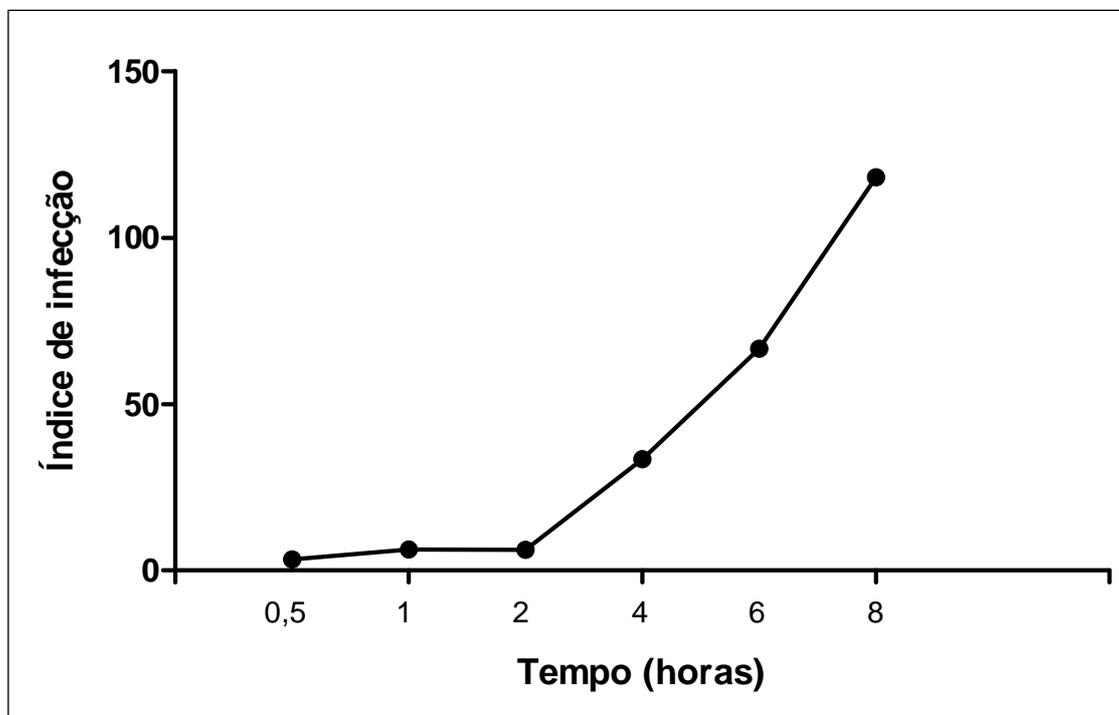


Figura 5. Padronização da infecção de macrófagos peritoneais por formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* em função do tempo. Formas amastigotas (10^6) foram incubadas com macrófagos por 30 mim, 1, 2, 4, 6 ou 8 horas. A quantificação de 200

macrófagos em microscopia (1000x) mostrou que o índice de infecção aumentou ao longo do tempo e alcançou 118,2% após 8 horas.

4.3. Efeito microbicida da PSN-1 nas formas amastigotas de *L. amazonensis*

O efeito microbicida da PSN-1 sobre formas amastigotas de leishmânias foi avaliado incubando-se macrófagos peritoneais infectados com diferentes concentrações do peptídeo (Tabela 3) ver anexo.

Os resultados, analisados pelo teste t pareado, mostraram que incubação dos macrófagos peritoneais com as diferentes concentrações de PSN-1 diminuiu a média±DP do índice de infecção por *L. amazonensis* em relação ao controle não tratado (80,9±30,0) para 39,0±15,1 com 2 µg/mL, para 15,2±7,9 com 16 µg/mL e para 3,4±2,0 com 64 µg/mL (teste t pareado, p<0,05) (figura 6A). Especificamente, o tratamento com PSN-1 por 2 horas com 2, 16 ou 64 µg/mL do peptídeo reduziu em 52%, 81% ou 96%, respectivamente o índice de infecção dos macrófagos.

Semelhantemente, quando analisados pelo teste t pareado, o percentual de macrófagos infectados também foi reduzido em todos os cultivos tratados com a PSN-1, em relação à média±DP do controle de 38,1±7,9 para 21,0±4,7 com 2µg/mL (p=0,0004), 9,0±3,7 com 16µg/mL (p<0.0001) ou 3,4±2,7 com 64µg/mL (P<0.0001) (figura 6C).

Quanto à média de leishmânias ingeridas por macrófagos, os resultados indicaram que apenas nos cultivos tratados com 64µg/mL (1,4±0,7) houve redução nessa média em relação ao controle (2,1±0,5) (Teste t pareado; p=0,0408). Nos demais cultivos tratados com 2 (1,8±0,4) ou 16 (1,7±0,4) µg/mL as médias foram semelhante ao controle (2,1±0,5) (Teste t pareado; p>0,05) (Figura 6B).

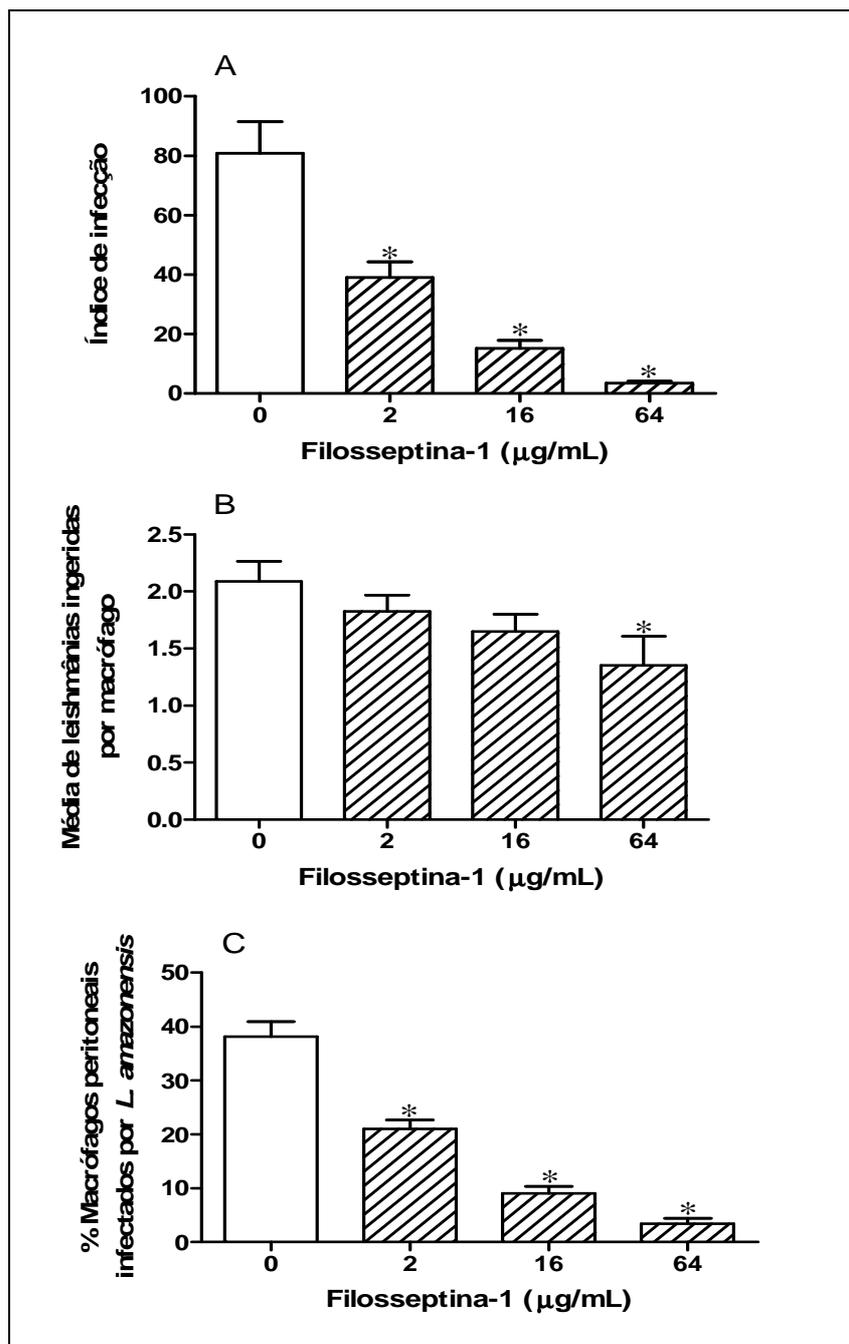


Figura 6. Efeito da PSN-1 em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais obtidos por aderência (2×10^5 células/escavação) foram incubados por 8 h com 10^6 formas amastigotas axênicas de leishmânias para a infecção. Depois de lavadas, os cultivos foram tratados com diferentes concentrações de PSN-1 (0, 2, 16, 64 µg/mL) por 2 h. Em A, percentual de macrófagos infectados, em B, média de leishmânias ingeridas por macrófagos e em C, índice de infecção. Os resultados, analisados pelo teste t pareado, mostraram que as três concentrações de PSN-1 reduziram o índice de infecção dos macrófagos ($p < 0,05$) (C), porquanto também reduziram o percentual de macrófagos infectados ($p < 0,05$). Quanto ao número de leishmânias ingeridas/macrófago, apenas a maior concentração 64 µg/mL causou redução significativa ($p < 0,05$), as demais não afetaram esse parâmetro ($p > 0,05$). Estão representadas médias e desvios padrão.

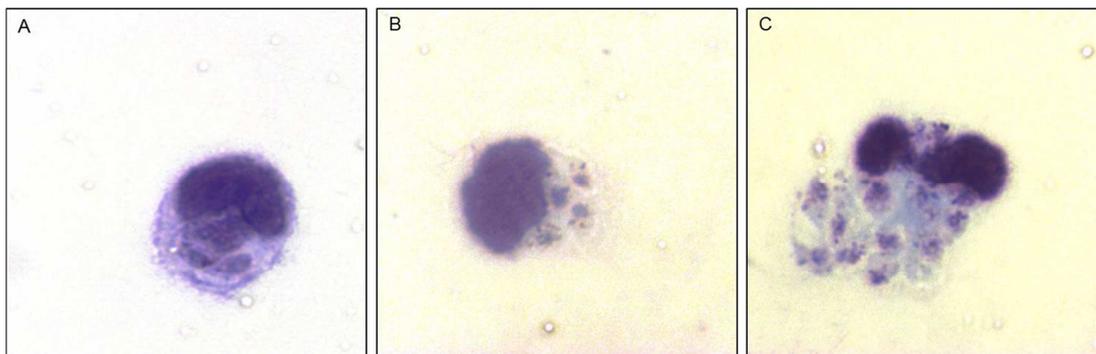


Figura 7. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Controle não tratado (A) e tratado com 16 (B) ou 64 (C) µg/mL de PSN-1. Observar morfologia anormal das amastigotas em B e C; amastigotas normais são observadas no macrófago não tratado (A). As células foram coradas com Giemsa. 1000X.

4.4. Influência da PSN-1 na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais

A produção de óxido nítrico (ON) por macrófagos peritoneais de camundongos, infectados ou não com *L. amazonensis* e incubados por 24 horas, com ou sem PSN-1, foi avaliada no sobrenadante de cultivos utilizando-se o reagente de Greiss (Tabela 4 e 5) ver anexo.

A média±DP da produção de ON por macrófagos peritoneais não infectados foi aumentada na presença do estímulo com 20ng/mL de LPS (21,9±0,9) ou com as diferentes concentrações de PSN-1 2 (21,8±0,4), 16 (21,1±1,7) ou 64 µg/mL (20,4±0,3), em relação à produção basal (19,6±1,1) (teste t pareado; p<0,05) (Figura 8 A).

Semelhantemente, todos os cultivos infectados, tratados ou não com a PSN-1, apresentaram aumento na média±DP da produção de ON em relação à produção basal (19,6±1,1), sendo de 21,2±0,5 para os cultivos infectados não tratados, de 21,3±0,3 para o tratado com 2µg/mL, de 20,7±0,7 para o tratado com 16µg/mL e de 20,5±0,5 para o tratado com 64µg/mL (teste t pareado; p<0,05) (Figura 8 B).

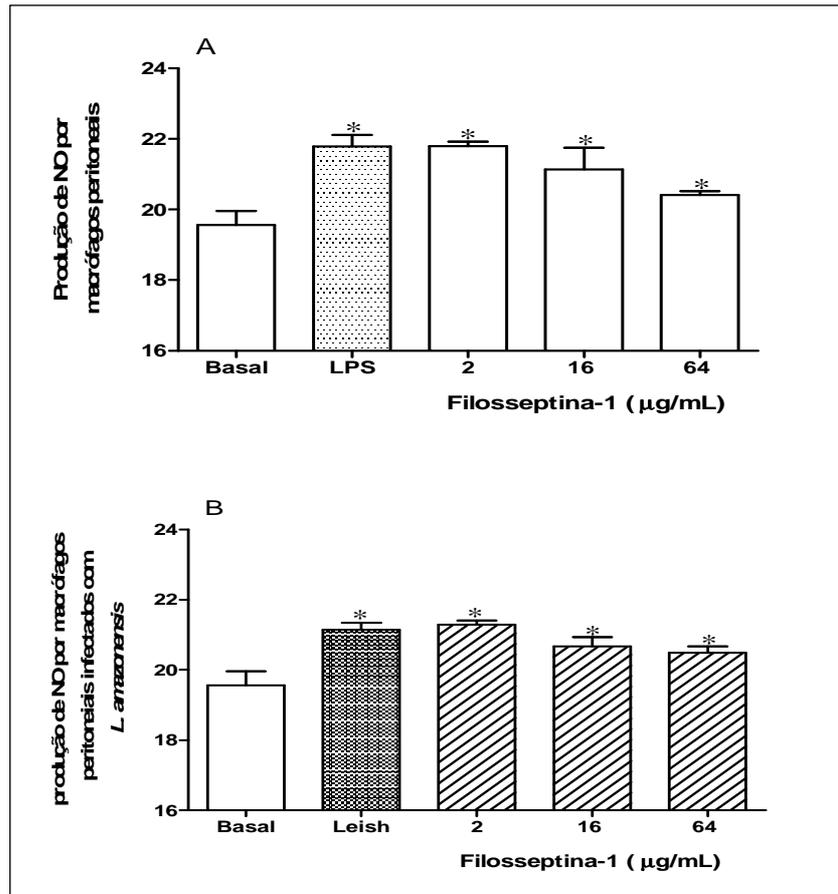


Figura 8. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados ou não com diferentes concentrações da filosseptina-1 (2, 16 ou 64µg/mL). Em A, macrófagos não infectados e estimulados com LPS e com a PSN-1 e em B, macrófagos infectados e tratados ou não com a PSN-1. Os resultados, analisados pelo teste t pareado, mostraram que a produção basal de ON foi menor que o estímulo com LPS e com as diferentes concentrações de PS-1 ($p < 0,05$); o mesmo ocorreu com os cultivos infectados, a infecção pela leishmânia associada ou não com o tratamento com a PSN-1 aumentou a produção de ON, na comparação com a produção basal ($p < 0,05$). Estão representados as médias e os desvios padrão.

A comparação entre as médias \pm DP obtidas para os cultivos tratados com 2 µg/mL de PS-1 mostrou que, quando infectados a produção de ON ($21,3 \pm 0,3$) foi menor do que a obtida para os cultivos não infectados ($21,8 \pm 0,4$) (teste t pareado; $p = 0,018$). Para as demais concentrações de PSN-1, as média \pm DP foram semelhantes quando comparados os cultivos infectados com os não infectados (Figura 9).

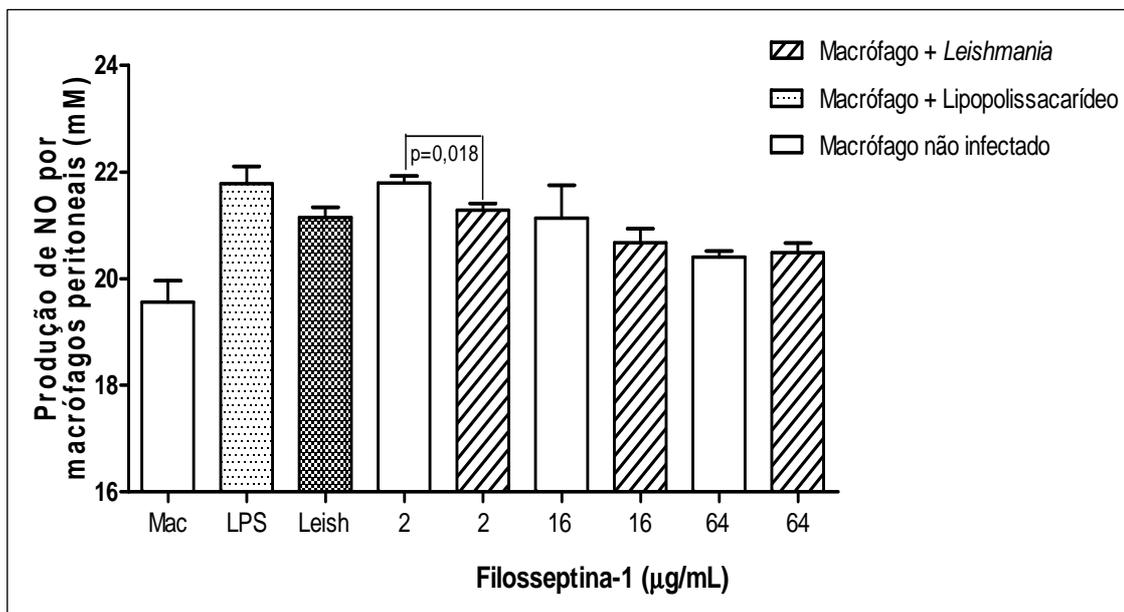


Figura 9. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8), infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações da PSN-1 (2, 16 ou 64 µg/mL). Os resultados, analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo método de Student-Neuman-Keuls, mostraram que a produção basal de ON foi menor do que nos cultivos infectados e tratados ou não com LPS e PSN-1 ($p < 0,0001$). A comparação entre os cultivos tratados com 2µg/mL de PSN-1 mostrou que, quando infectados a produção de ON foi menor do que a obtida para os cultivos não infectados (teste t pareado; $p = 0,018$). Estão representados as médias e os desvios padrão.

4.5. Influência da PSN-1 na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos peritoneais de camundongos, infectados ou não com *L. amazonensis* e incubados por 1 hora, com ou sem PSN-1, foi avaliada no sobrenadante de cultivos pelo método da oxidação do vermelho de fenol na presença da peroxidase (Tabela 6 e 7) ver anexo.

Os resultados, analisados pelo teste t pareado, mostraram a média±DP da produção de H_2O_2 por macrófagos peritoneais não infectados aumentou nos cultivos estimulados com 20ng/mL de PMA ($2,5 \pm 0,3$), mas diminuiu na presença de 64 µg/mL de PS-1 ($1,6 \pm 0,2$), em relação à produção basal que foi de $2,0 \pm 0,3$ ($p < 0,05$) (Figura 10A).

Nos cultivos infectados com *L. amazonensis* apenas o tratamento com 64 µg/mL de PSN-1 ($1,5 \pm 0,2$) diminuiu a produção de H_2O_2 , quando comparado com a produção basal de $2,0 \pm 0,3$ (Teste t pareado; $p=0,0198$), para os cultivos tratados com as demais concentrações de PSN-1, 2 ou 16 µg/mL, bem como para o controle infectado a produção de H_2O_2 não diferiu da produção basal (Teste t pareado; $p>0,05$) (Figura 10B).

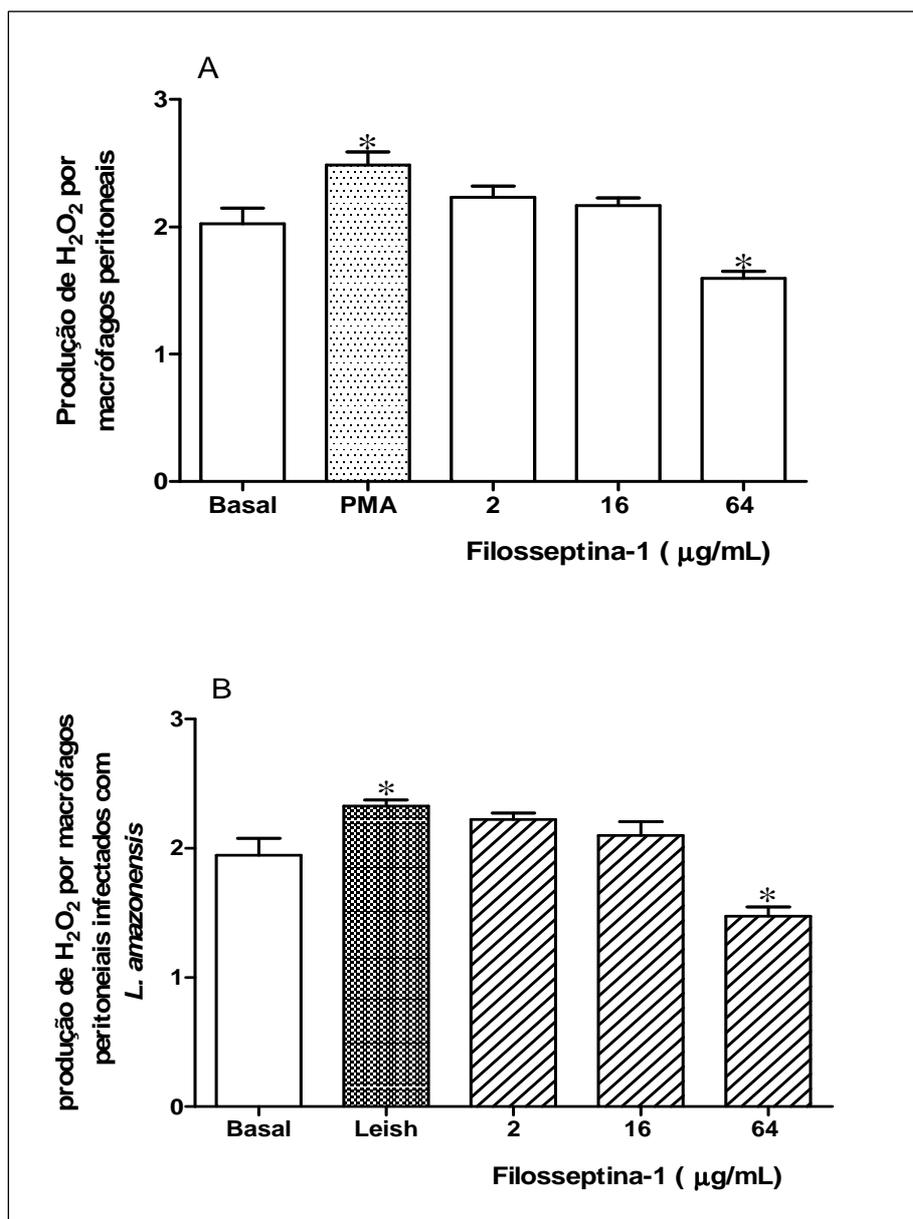


Figura 10. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados ou não com diferentes concentrações de PSN-1 (2,16 ou 64 µg/mL). Em A, macrófagos não infectados e estimulados com PMA e com o peptídeo e em B, macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados ou não com a PSN-1. Os resultados, analisados pelo teste t pareado, mostraram que a produção basal

de H_2O_2 foi maior quando estimulada com PMA e menor na presença de $64\mu g/mL$ de PSN-1 ($p < 0,05$); nos cultivos infectados a produção de H_2O_2 foi menor quando tratados com $64\mu g/mL$ de PSN-1 ($p = 0,0198$), nas demais concentrações de PSN-1, bem como no controle infectado, a produção de H_2O_2 não diferiu da produção basal ($p > 0,05$). Estão representados as médias e os desvios padrão.

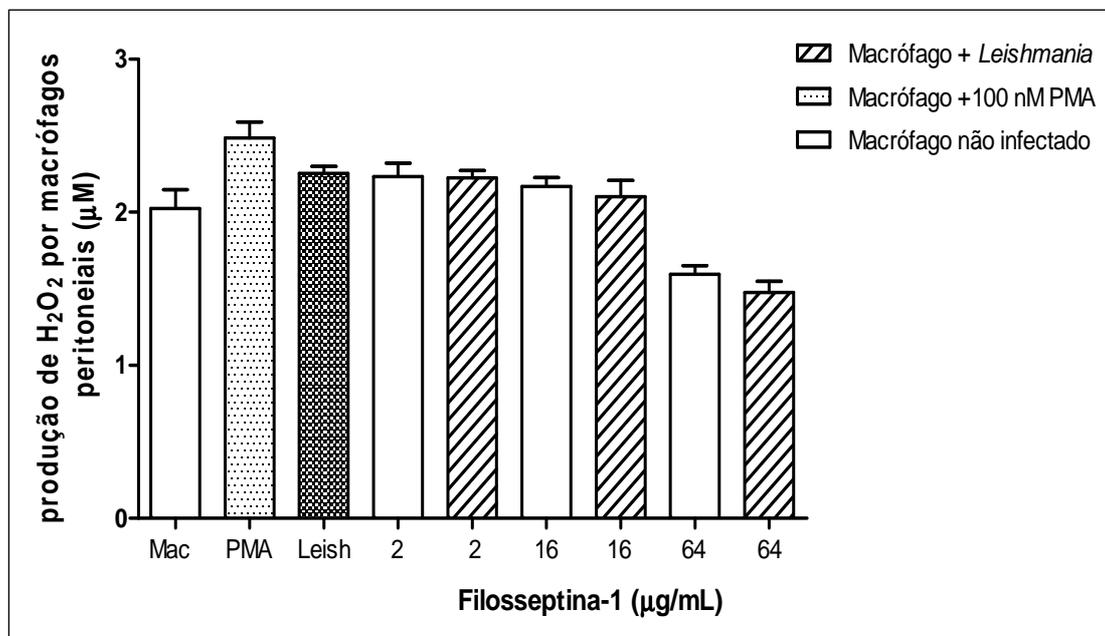


Figura 11. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ($n=8$), infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações da PSN-1 (2, 16 ou $64\mu g/mL$). Os resultados, analisados pelo teste de ANOVA mostraram diferenças entre os grupos ($p < 0,0001$); nos cultivos não infectados a produção basal de H_2O_2 foi menor que nos cultivos estimulados com PMA e maior que $64\mu g/mL$ de PSN-1 (Teste t pareado; $p < 0,05$), nos cultivos infectados a produção de H_2O_2 diminuiu com $64\mu g/mL$ de PSN-1 (Teste t pareado; $p = 0,0198$). Estão representados as médias e os desvios padrão.

4.6. Influência da PSN-1 na formação do corpúsculo lipídico por macrófagos peritoneais

A formação do corpúsculo lipídico por macrófagos foi avaliada pela coloração com óleo vermelho em cultivos de macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratadas ou não de diferentes concentrações de PSN-1 (Figura 13).

O índice corpuscular dos macrófagos, quando comparado com o controle (5,5), aumentou a mediana com a infecção com *L. amazonensis* para 3,1

(Wilcoxon, $p=0,0313$) e para 3,2 nos cultivos infectados e tratados com $2\mu\text{g/mL}$ de PSN-1 (Teste t pareado, $p=0,0126$); nas demais concentrações de PS-1 o índice corpuscular não diferiu do controle basal ($p>0,05$) (Figura 12A).

Quanto ao número de corpúsculos lipídicos por macrófago, os cultivos tratados com as diferentes concentrações de PSN-1, 2 (3,2), 16 (2,4) ou 64 (1,7) $\mu\text{g/mL}$ não diferiu do controle basal (1,6) (Teste t pareado, $p>0,05$), mas aumentou no controle infectado (3,1) (Teste t pareado, $p=0,0009$) (Figura 12B, 13).

Os resultados mostraram que incubação dos macrófagos peritoneais não infectados, com 2 ou $16\mu\text{g/mL}$ de PSN-1, aumentaram a mediana do percentual de células contendo corpúsculos lipídicos para 8,8% ou 6,3%, respectivamente na comparação com o controle (3,0%) (teste t pareado, $p<0,05$) (Figura 12C).

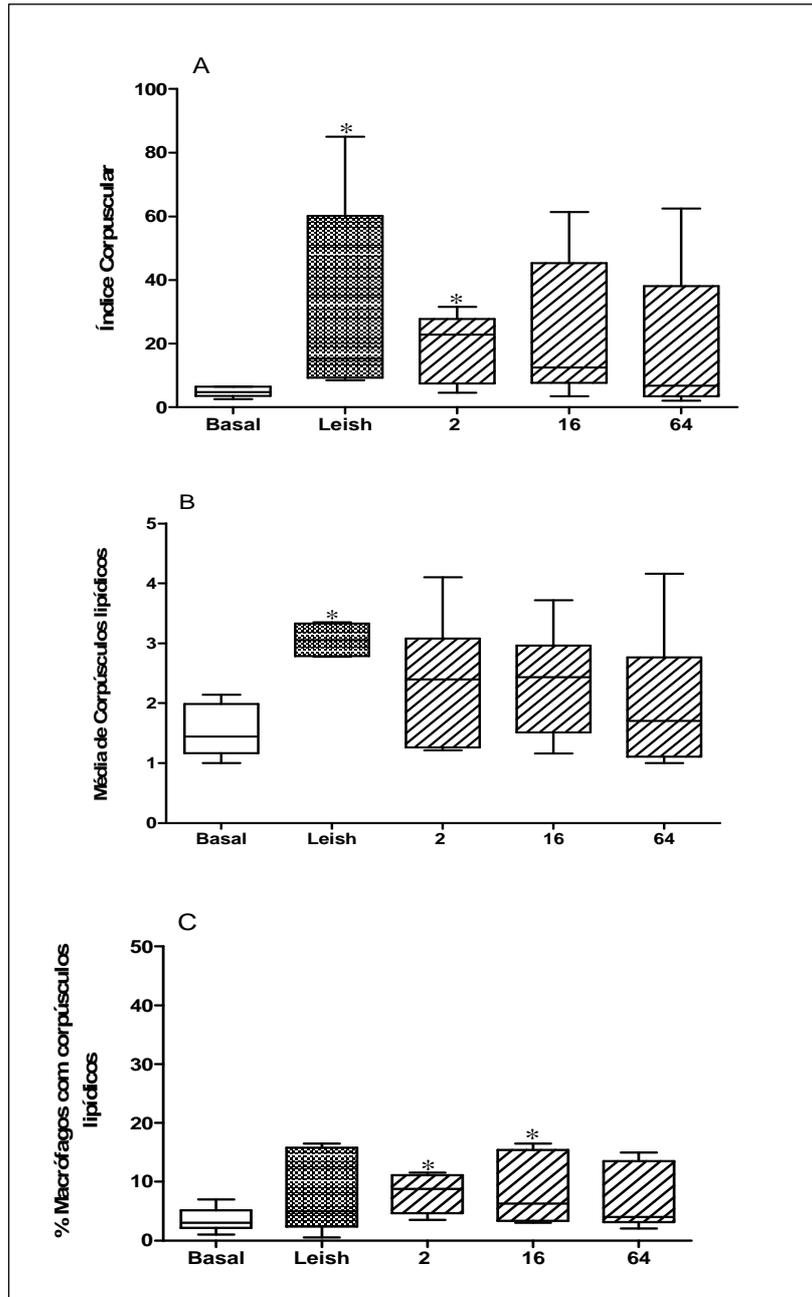


Figura 12. Efeito da PSN-1 na formação de corpúsculos lipídicos em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Em A, índice corpuscular, em B média de corpúsculos por macrófagos e em C, percentual de macrófagos contendo corpúsculos lipídicos. Os resultados mostraram que, na comparação com o controle, 2 µg/mL de PS-1 (Teste t pareado, $p=0,0126$) e a infecção pela leishmânia (Wilcoxon, $p=0,0313$) aumentaram a mediana do índice corpuscular. O número de corpúsculos lipídicos nos cultivos tratados com PSN-1 não diferiu do basal (Teste t pareado, $p>0,05$), mas aumentou no controle infectado (Teste t pareado, $p=0,0009$). O percentual de células contendo corpúsculos lipídicos aumentou com o tratamento com 2 ou 16 µg/mL de PSN-1 na comparação com o controle basal não infectado (teste t pareado, $p<0,05$). Estão representadas as medianas, quartis e valores máximos e mínimos.

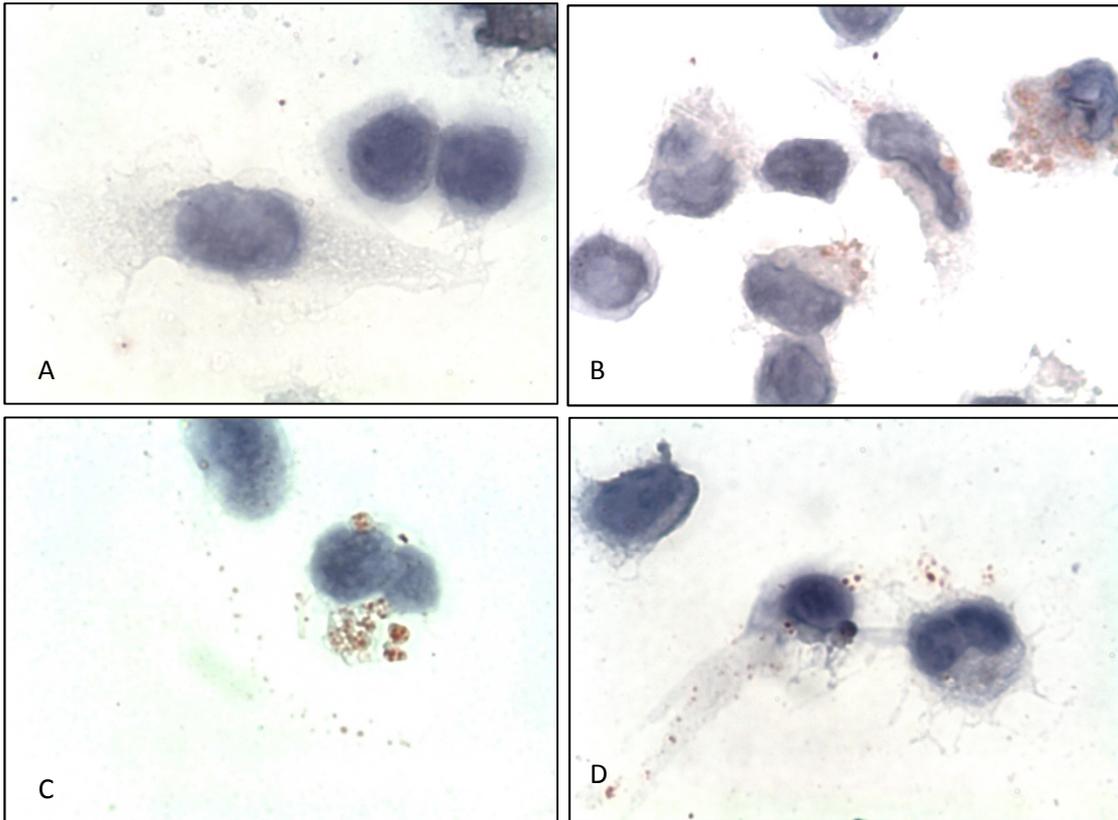


Figura 13. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais para a identificação dos corpúsculos lipídicos. Em A, macrófagos não infectados, em B macrófagos infectados, em C e D macrófagos infectados e tratados com 16 ou 64 µg/mL de PSN-1, respectivamente. Observar em vermelho os corpúsculos lipídicos no citoplasma dos macrófagos, mais expressivamente nas células infectadas. As células foram coradas com óleo vermelho e hematoxilina. 1000X.

5. DISCUSSÃO

Diferentes estudos têm mostrado o potencial microbicida dos peptídeos antimicrobianos sobre diversos micro-organismos. O estudo realizado com a filoseptina-1 por Kückelhaus (2007) mostrou que esse peptídeo apresentou grande potencial leishmanicida quando determinou as concentrações inibitórias, *in vitro*, em cultivos de formas promastigotas *L. amazonensis* (2 a 64 µg/mL), mas até o momento era desconhecido seu efeito nas formas intracelulares. Logo, esse estudo buscou determinar o efeito de três concentrações de PSN-1, que inibiram o crescimento de cultivos de *L. amazonensis* em promastigotas (Kückelhaus et al. 2009), em cultivos de macrófagos infectados com formas amastigotas, que é a forma circulante e intracelular no hospedeiro vertebrado, e ainda determinar se esse efeito relaciona-se com a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (óxido nítrico e peróxido de hidrogênio) bem como com a formação de enzimas responsáveis pela produção de eicosanoides (corpúsculo lipídico).

Com o ciclo biológico da *Leishmania* sabe-se que logo após a inoculação das formas promastigotas pelo flebótomo ocorre a infecção dos macrófagos teciduais, então essas formas flageladas transformam-se, dentro de vacúolos parasitóforos nas suas formas não flageladas chamadas amastigotas. Neste estudo formas amastigotas axênicas foram obtidas por incubação de promastigotas durante 96 horas a 37 °C (esse tempo foi similar ao encontrado por Teixeira et al. 2002), seguindo-se a infecção dos macrófagos pela sua incubação por 8 (oito) horas com as formas amastigotas axênicas.

Estudos anteriores mostraram o efeito leishmanicida da PSN-1 sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* em um padrão dose-dependente (Brand et al 2006; Kückelhaus et al 2009) , agora este estudo determinou o efeito de três diferentes concentrações (2, 16 ou 64 µg/mL), *in vitro* , em macrófagos infectados por formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

Nossos resultados mostraram que o efeito microbicida da PSN-1 ocorreu nas três doses avaliadas reduzindo o índice de infecção de macrófagos, após o tratamento ou não com o peptídeo em 52%, 81% ou 96% com 2, 16 ou 64 µg/mL, respectivamente. Esse efeito foi observado pela diminuição no percentual de macrófagos infectados e também pela diminuição na média de leishmânias ingeridas pelos macrófagos.

Estas concentrações causaram redução significativa no percentual de células infectadas em um padrão dose-dependente, sem causar danos evidentes aos macrófagos, pela microscopia óptica, como lise celular, alterações morfológicas, picnose celular ou cariólise. Estudos anteriores demonstraram a ausência de toxicidade aguda *in vivo* da PSN-1, até a dose intravenosa de 32 mg/kg a camundongos Swiss (Kückelhaus et al. 2007) ou no tratamento *in vitro* de células peritoneais com concentrações superiores a 200 µg/mL (Kückelhaus et al. 2009). Sabe-se que a membrana de células de mamífero, que são compostas principalmente por fosfolípidos neutros, mas com cargas positivas localizadas devido à presença de grupos ionizados (Williamson & Schlegel 1994), apresentam baixa interação com peptídeos catiônicos. Embora reduzida, essa interação pode ocorrer, mas especialmente com o aumento da concentração do peptídeo, causando aumento da permeabilidade das membranas celulares e ruptura estrutural (Sansom 1993; Dathe et al. 2002; Brand et al. 2006). Os efeitos tóxicos de peptídeos antimicrobianos relacionados à sua interação com a membranas celulares de mamíferos foi demonstrado para a melitina de abelha (Perez-Paya et al. 1994), para a caribdoxina presente no veneno de escorpião (Tenenholz et al. 2000) e para a temporina-L oriunda da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Rana* (Rinaldi et al. 2002). No nosso estudo não foi observado alterações morfológicas nos macrófagos até a maior concentração de PSN-1, o que sugere que esse peptídeo não causou danos estruturais identificáveis pela microscopia óptica aparentes nas membranas dessas células.

Os efeitos morfológicos observados para as amastigotas sugerem que a interação do PSN-1 com o parasito possa ter ocorrido dentro dos vacúolos parasitóforos pela visualização com a microscopia óptica. Possivelmente, o peptídeo inicialmente interagiu, por um mecanismo desconhecido, com as membranas celulares de macrófagos e, subsequentemente, com a membrana celular do parasito, como sugerido por outros peptídeos antimicrobianos (El Amri et al. 2006). Também, é possível que o peptídeo tenha interagido com receptores/moléculas de superfície dos macrófagos e consequentemente endocitado e atuado dentro dos vacúolos parasitóforos sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*.

A atividade antimicrobiana dos peptídeos catiônicos como a PSN-1 tem sido associada à presença de fosfolipídeos fortemente carregados com cargas positivas, o que lhes permite interagir com as membranas celulares dos microrganismos que geralmente apresentam cargas negativas, causando alterações na bomba de sódio e potássio, aumento do volume celular e ruptura (Dolis et al. 1997; Matsuzaki et al. 1999; Ilgoutz & McConville 2001; Guerrero et al. 2004; Leite et al. 2005). A permeabilização de membranas de leishmânias por filoseptinas foi demonstrada nos estudos de Pinto et al. (2013), em que baixas concentrações de PSN-7 (7,86 a 12,85 μM) foi capaz de permeabilizar a membrana celular de *Leishmania infantum*, de forma dependente do tempo até a inibição de 95% dos parasitos com 1 (uma) hora de incubação. Segundo Cobb & Denny (2010) esses mecanismos microbicidas do peptídeo tendo como alvos membranas celulares dos parasitos podem ser vantajosos no controle da doença, uma vez que o desenvolvimento de membranas resistentes ou mesmo mudança de carga elétrica é desconhecido.

Embora não tenha sido possível avaliar como a PSN-1 interagiu com as membranas celulares das leishmânias, especula-se que os restos de parasitos observados no citoplasma dos macrófagos (Figura 7 B e C) resultem da formação de poros de forma similar ao modelo de *estacas de barril* proposto por Ehrenstein & Lecar (1977); neste modelo, os poros são formados pela acumulação de peptídeos monoméricos, num ponto específico da membrana, culminando com a perfuração da bicamada lipídica.

A diminuição do índice de infecção observado nas preparações tratadas com diferentes concentrações de PSN-1 pode ser explicada pela interferência do peptídeo com as vias metabólicas do parasito. Estudos realizados por Guerrero et al. (2004) com magaininas, que possuem a mesma conformação em α -hélice que as filoseptinas, mostraram que estes peptídeos causaram diminuição na produção de trifosfato de adenosina (ATP) em culturas de *Leishmania donovani*, num padrão dose dependente que culminou com a morte dos parasitos. Logo, especula-se que a PSN-1, tenha afetado negativamente o processo de fosforilação oxidativa e conseqüentemente a produção de ATP pelas amastigotas, ocasionando sua morte dentro dos vacúolos parasitóforos.

Células fagocitárias como os macrófagos comumente produzem espécies reativas por meio de seu sistema enzimático como resposta a infecções, também se sabe que vinculada à produção de peróxido de hidrogênio encontra-se a produção de espécies reativas de nitrogênio; esses achados foram verificados também nesse estudo, em que a infecção por *L. amazonensis* causou aumento na produção tanto de ON como de H₂O₂. Também, observou-se que a PSN-1 estimula a produção de ON em todas as concentrações avaliadas, mas não interfere na produção de peróxido de hidrogênio, exceto na sua maior concentração que inibiu a produção dessa espécie reativa, na comparação com a produção basal.

A influência da PSN-1 na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais foi analisada e os resultados mostraram que tanto a infecção quanto o estímulo com LPS, bem como as diferentes concentrações de PSN-1 aumentaram a produção de ON na comparação com a produção basal. No entanto, quando infectados, macrófagos tratados com a menor concentração de PSN-1 diminuiu sua produção de ON na comparação com a produção de células não infectadas.

O ON é uma molécula gasosa instável derivada do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos macrófagos na presença de estímulos como INF- γ e FNT- α (Brunet 2001). Sabe-se que o ON exerce um papel importante no controle de agentes infecciosos como os causadores da leishmaniose. Isso foi comprovado nos estudos de Campos et al. (2008), em que os maiores índices de infecção de macrófagos de camundongos BALB-c por *L. brasiliensis* foram observados na presença de baixa produção de ON. Os estudos sugerem que a gravidade da infecção pela *Leishmania spp* parece estar vinculada à capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico pela célula infectada (Giudice et al. 2007; Campos et al. 2008). Os resultados desse estudo indicaram que a infecção por *L. amazonensis* foi capaz de aumentar a produção de ON, indicando que os macrófagos de camundongos Swiss conservam esse mecanismo microbicida para o controle da infecção. Na presença da infecção, macrófagos tratados com a menor concentração de PSN-1 (2 μ g/mL) diminuíram sua produção de ON, na comparação com o não tratado. Esse resultado pode sugerir um mecanismo de

competição para a produção de ON entre *L. amazonensis* e PSN-1, causando diminuição dessa molécula.

Diferentemente do observado para óxido nítrico, a produção de peróxido de hidrogênio não foi afetada pelo estímulo com as menores concentrações de PSN-1, no entanto a maior delas (64 µg/mL) causou redução dessa espécie reativa, na presença ou não da infecção, quando comparada com a produção basal. O H₂O₂ é formado a partir da dismutação espontânea de íon superóxido (O₂⁻) que, por sua vez, é produzido pela enzima NADPH oxidase e oxigênio; sua formação se dá pelo aumento de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias e está relacionada à endocitose de micro-organismos (Pick & Keisari 1980; Martino & Castello 2011).

Em conjunto, os resultados obtidos para ON e H₂O₂ permitem supor que as diferentes concentrações do peptídeo podem interferir nas vias metabólicas que geram radicais livres, como a fosforilação oxidativa, ou mesmo sobre a ativação das vias de produção de substâncias antioxidantes; também, é possível que a PSN-1 atue em vias transcricionais que culminam: ou com o aumento da expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) causando aumento na produção de ON, à semelhança do que foi observado para a cecropina-A e um derivado da melitina (Velasco et al. 1997), ou com a inibição do complexo enzimático NADPH oxidase, ou mesmo da SOD, que catalisa a redução do oxigênio molecular (O₂) para ânion superóxido (O₂⁻) e H₂O₂ (Griendlink & Ushio-Fukal 1998), a exemplo do observado para a maior concentração de PSN-1 (64 µg/mL).

A análise dos corpúsculos lipídicos também foi objeto desse estudo, tendo em vista o seu aumento está relacionado à resposta inflamatória contra os micro-organismos intracelulares. Os resultados indicaram que a infecção por *L. amazonensis* causou aumento no índice corpuscular, porque aumentou a média de corpúsculos presentes nos macrófagos, sem, contudo aumentar o percentual de macrófagos que expressavam corpúsculos. O tratamento com PSN-1, de macrófagos infectados com as leishmânias aumentou o índice corpuscular com a menor concentração do peptídeo (2 µg/mL) devido ao aumento no percentual de macrófagos que expressavam corpúsculos lipídicos; embora não tenha aumento o

índice corpuscular, o tratamento com 16 µg/mL também aumentou o percentual de macrófagos que exibiam corpúsculos lipídicos.

O aumento no índice corpuscular observado para a infecção evidencia o papel dessas estruturas no mecanismo de controle da infecção por leishmânias pelos macrófagos. Também, o aumento desse índice observado para a menor concentração de PSN-1 (2 µg/mL) sugere que o peptídeo pode interferir em vias transcricionais que culminam com a formação de citocinas pelos macrófagos. Sabe-se que na presença de citocinas, bem como quimiocinas e LPS os macrófagos rapidamente formam corpúsculos lipídicos (Pacheco et al. 2002).

Os resultados encontrados nesse estudo para a PSN-1 mostraram que o peptídeo pode influenciar na resposta contra infecção pela *L. amazonensis* em células de mamíferos, pois diminuiu a infecção dos macrófagos e afetou a produção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na formação dos corpúsculos lipídicos, indicando que o peptídeo pode atuar na modulação da resposta imunológica na leishmaniose.

Embora as maiores concentrações da PSN-1 mostrassem maior eficácia na eliminação do parasito, nossos dados contribuíram para demonstrar de forma inédita o efeito microbicida nas formas intracelulares de *L. amazonensis* de um peptídeo antimicrobiano catiônico e estrutura secundária em α -hélice.

Os resultados desse estudo apontam para novos ensaios que visem a elucidar o mecanismo de interação do peptídeo com as membranas celulares tanto dos parasitos quanto das células de mamíferos, bem como para esclarecer os mecanismos microbicidas do peptídeo dentro de vacúolos parasitóforos ou mesmo, como esse peptídeo interage com os macrófagos favorecendo a eliminação dos parasitos via efeito imunomodulatório. Também, a quantificação da produção de citocinas relacionadas às respostas tipo Th1 e Th2 e dos mediadores da inflamação como o inflamassoma (IL-1 β), prostaglandinas e leucotrienos pelas vias COX (ciclooxigenase) e LOX (lipoxigenase) pode auxiliar na elucidação do efeito microbicida, bem como esclarecer como as vias celulares se comportam na presença do peptídeo. Logo, como perspectiva sugere-se a continuidade das pesquisas com a PSN-1 que até o momento é considerado um composto promissor no desenvolvimento de uma nova droga aplicável no tratamento da leishmaniose.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo para avaliar o efeito microbicida de diferentes concentrações de PSN-1, em cultivos de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*, e se esse efeito relaciona-se com a produção dos radicais de oxigênio ou com a formação de corpúsculo lipídico estão sumarizados abaixo.

1. As três concentrações de PSN-1 (2, 16 ou 64 µg/mL) diminuíram o índice de infecção de macrófagos por *L. amazonensis* em 52%, 81% ou 96%, respectivamente na comparação com o controle basal;
2. As três concentrações de PSN-1 (2, 16 ou 64 µg/mL) diminuíram o percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis* na comparação com o controle basal;
3. A concentração de 64 µg/mL de PSN-1 reduziu a média de leishmânias ingeridas na comparação com o controle basal;
4. As três concentrações de PSN-1 (2, 16 ou 64 µg/mL) aumentaram a produção de ON, em cultivos não infectados de macrófagos na comparação com a produção basal;
5. As três concentrações de PSN-1 (2, 16 ou 64 µg/mL) aumentaram a produção de ON, em cultivos de macrófagos infectados com *L. amazonensis* na comparação com a produção basal;
6. O tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* com 2 µg/mL de PSN-1 diminuiu a produção de ON na comparação com os macrófagos infectados;
7. A concentração de PS-1 64 µg/mL de PS-1 diminuiu a produção de H₂O₂, em cultivos de macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*, na comparação com a produção basal;

8. O tratamento com PSN-1, de macrófagos infectados com *L. amazonensis* aumentou o índice corpuscular com a menor concentração do peptídeo (2 µg/mL) pelo aumento no percentual de macrófagos que expressavam corpúsculos lipídicos;
9. O tratamento com 16 µg/mL de PSN-1 aumentou o percentual de macrófagos que exibiam corpúsculos lipídicos.

Em conjunto, o efeito das diferentes concentrações de PSN-1 nas formas amastigotas de *L. amazonensis* indicou o potencial desse peptídeo no tratamento da leishmaniose. Os resultados mostraram que o efeito microbicida ocorreu em um padrão dose-dependente, em que a concentração máxima (64 µg/mL) foi capaz de reduzir em 96% o índice de infecção dos macrófagos, após 2 horas de incubação com o peptídeo. Apesar de promissores, mais estudos, *in vitro* e *in vivo*, em modelos animais são necessários para esclarecer os mecanismos de ação da PSN-1 e sua interação com o sistema imunológico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier, 2012.

Amiche M, Ladram A, Nicolas P. A consistente nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. *Peptides Journal* 2008; 29: 2074 – 2082.

Borges TKS. Mecanismos de resposta inflamatória em modelos murinos de *Plasmodium berghei* ANKA, suscetíveis ou não à malária cerebral. [tese de doutorado]. Brasília, Distrito Federal, Brasil: Universidade de Brasília; 2013.

Bowman HG. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 1991; 65: 205 – 207.

Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and fuction in inflammation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2005; 100: 113 – 120.

Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies – biogenesis and fuctions in inflammation. *Biochimica Biophysica Acta* 2009; 1791: 540 – 551.

Brand GD, Leite JRSA, Sa Mandel SM, Mesquita DA, Silva LP, Prates MV, Barbosa EA, Vinecky F, Martins GR, Galasso JH, Kückelhaus SAS, Sampaio RN, Furtado Júnior JR, Andrade AC, Bloch Júnior C. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2006; 47: 739 – 746.

Brand GD, Leite JRSA, Silva LP, Albuquerque S, Prates MV, Azevedo RB, Carregaro V, Silva JS, Sá VCL, Brandão RA, Bloch Júnior C. Dermaseptins from *Phylomedusa oreades* and *Phylomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 227: 49332 – 49340.

Brasil. Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais e regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*. 9 de outubro de 2008. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: Fev/2013.

Breukink E, Wiedemann I, Van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 1999; 286: 2361 – 2364.

Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *International immunopharmacology* 200; 11: 1457 – 1467.

Campos MB, Gomes CMC, de Souza AA, Iainson R, Corbett CE, Silveira FT. In vitro infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American Cutaneous Leishmaniasis. *Parasitology Research* 2008; 103: 771 – 776.

Carvalho AC, Machini MT. Hemocidinas derivadas da hemoglobina: Estruturas, propriedades e perspectivas. *Química Nova* 2013; 36: 1021 – 1029.

Carvalho LP, Passos ST, Jesus AR. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia* 2005; 75: 57 – 65.

Chernysh S, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, Platonov VG, Bulet Philippe. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 12628 – 12632.

Chia BCS, Lam YH, Dyall-Smith M, Separovic F, Bowie JH. A ³¹P NMR study of the interaction of amphibian antimicrobial peptides with the membranes of live bacteria. *Letters in Peptide Science* 2000; 7: 151 – 156.

Cobb SL, Denny PW. Antimicrobial peptides for leishmaniasis. *Current opinion in investigational drugs* 2010; 11: 868 – 875.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos. Disponível em: < http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65> Acesso em: Fev/2013.

Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal Medicine Research* 2006; 123: 399 – 410.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 111 – 126.

Croft SL, Yardley V.. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8: 319–342.

Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Pereira JA, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010; 50: 434 – 461.

Dathe M, Meyer J, Beyermann M, Maul B, Hoischen C, Bienert M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1558: 171 – 186.

Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine* 1997; 185: 2061 – 2068.

Dolis D, Moreau C, Zachowski C, Devaux PF. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophysical Chemistry* 1997; 68: 221 – 231.

El Amri C, Lacombe C, Zimmerman K, Ladram A, Amiche M, Nicolas P, Bruston F. The plasticins: membrane adsorption, lipid disorders, and biological activity. *Biochemistry* 2006; 45: 14285 – 14297.

Ehrenstein G, Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics* 1977; 10: 1 – 34.

Epanand RM, Shai Y, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. *Biopolymers* 1995; 37: 319 – 338.

Feder R, Dagan A, Mor A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequence of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 4230 – 4238.

Genestra M, Guedes-Silva D, Souza WJS, Cysne-Finkelstein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro FP, et al. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. *Archives of Medical Research* 2006; 37: 328 – 333.

Gehman JD, Luc F, Hall K, Lee TH, Boland MP, Pukala TL, Bowie JH, Aguilar MI, Separovic F. Effect of Antimicrobial peptides from Australian tree frogs on anionic phospholipid membranes. *Biochemistry* 2008; 47: 8557 – 8565.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) brasiliensis* to nitric oxide correlates with severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BioMed Central Infectious Disease* 2007; 77.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry* 1982; 126: 131 – 138.

Ghosh JK, Shaool D, Guillaud P, Cicéron L, Mazier D, Kustanovich I, Shai Y, Mor A. Selective Cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 31609 – 31616.

Griendlink KK, Ushio-Fukal M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1998; 132: 9 – 15.

Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene *Fall39* and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European Journal of Biochemistry* 1996; 238: 325 – 332.

Guerrero E, Saugar JM, Matsuzaki K, Rivas L. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 2980 – 2986.

Hancock REW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* 2001; 1: 156 – 164.

Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 2006; 24: 1551 – 1557.

Hancock REW, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 8856 – 8861.

Helmerhorst EJ, Reijnders IM, Van't Hof W, Veeman EC, Nieuw Amerongen AV. A critical evaluation of the lytic activity of cationic antimicrobial peptides against *Candida albicans* cells and human erythrocytes. *FEBS Letters* 1999; 449: 105 – 110.

Hucke C, Mackenzie CR, Adjogble KD, Takikawa O, Daubener W. Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and Immunity* 2004; 72: 2723 – 2730.

Ilgoutz SC, McConville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *International Journal of Parasitology* 2001; 31: 899 – 908.

Kaye P; Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature reviews, Microbiology* 2011; 9: 604 – 615.

Kückelhaus SAS; Leite JRSA; Junqueira MIM; Sampaio RN; Bloch Júnior C; Tosta CE. Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). *Experimental Parasitology* 2009; 123: 11 – 16.

Kückelhaus SAS. Toxicidade e atividade antiparasitária da filoseptina-1, um peptídeo de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia) [tese de doutorado]. Brasília, Distrito Federal, Brasil: Universidade de Brasília; 2007.

Kulkarni MM, Barbi J, McMaster WR, Gallo RL, Satoskar AR, McGwire BS. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous *Leishmania* infection. *Cellular Microbiology* 2011; 13: 913 – 923.

Lee DG, Hahn KS, Shin SY. Structure and fungicidal activity of a synthetic antimicrobial peptide, P18, and its truncated peptides. *Biotechnology Letters* 2004; 26: 337 – 341.

Leite JRSA; Silva LP, Rodrigues MIS, Prates MV, Brand GD, Lacava BM, Azevedo RB, Bocca AL, Albuquerque S, Bloch Júnior C. Phylloseptins: a novel

class of antibacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides* 2005; 26: 565 – 573.

Lillard JW, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, Mcghee JR. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 651 – 656.

Linde CMA, Hoffner SE, Refai E, Andersson M. In vitro activity of PR-39, a proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 2001; 47: 575 – 580.

Lima EB, Porto C, Motta JOC, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2007; 82: 111 – 124.

Lupi O, Bartlett BL, Haugen RN, Dy LC, Sethi A, Klaus SN, Pinto JM, Bravo F, Tyring SK. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2009; 60: 897 – 925.

Mansueto P, Vitale G, Seidita A, Guarneri FP, Pepe I, Rinollo C, Rosa S, Rini GB, Cillari E, Fede GD. Advances in Leishmaniasis Immunopathogenesis. *Acta Medica Mediterranea* 2011; 7 – 16.

Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006; 7: 373 – 378.

Martino CF, Castello PR. Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. *Public Library of Science* 2011; 6: 1 – 6.

Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1462: 1 – 10.

Mattson MP. Hormesis Defined. *Ageing Research Reviews* 2008; 7: 1 – 7.

Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature Protocols* 2013; 8: 1149 – 1154.

Melo MN, Ferreira, Castanho MARB. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology* 2009; 7: 245 – 250.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil 2007; 2: 7- 189.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7ªed. Brasília, Brasil: Caderno 11: 1- 63; 2010.

Ministério da Saúde, Brasil 2011. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/saudebrasil2011_parte1_ca p3.pdf>. Acesso em: Out/2013.

Montville TJ, Chen Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998; 50: 511 – 519.

Murphy RC. Free-radical-induced oxidation of arachidonoyl plasmalogen phospholipids: Antioxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanoids. *Chemical Research in Toxicology* 2001; 14: 463 – 472.

Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 1998; 47: 451 – 463.

Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *Journal Immunology* 2002; 169: 6498 – 6506.

Peder LD. Anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos lipídicos estágio-específicos de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Perez-Paya E, Houghten RA, Blondelle SE. Determination of the secondary structure of selected melittin analogs with different hemolytic activities. *The Biochemical Journal* 1994; 299: 587 – 591.

Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology* 2002; 10: 179 – 186.

Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of immunological methods* 1980; 38: 161 – 170.

Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, Côrte-Real S, Freire-de-Lima CG, DosReis GA. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes and Infection* 2009; 11: 181 – 190.

Pinto EG, Pimenta DC, Antoniazzi MM, Jared C, Tempone AG. Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* 2013; 135: 655 – 660.

Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipids membranes. *Biochemistry* 1992; 31: 12416 – 12423.

Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Pereira VRAP. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Patologia Tropical* 2006; 35: 103 – 115.

Rinaldi AC, Mangoni MI, Rufo A, Luzi C, Simmaco M, Barra D, Zhao H, Kinnuen PKJ, Bozzi A, Di Giulio A. Temporin L: antimicrobial, cytotoxic activities and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *The Biochemical Journal* 2002; 368: 91 – 100.

Sansom MS. Alamethicin and related peptaibols-model ion channels. *European Biophysics Journal* 1993; 22: 105 – 124.

Santos GM, Kückelhaus SA, Roselino AM, Chaer WK, Sampaio RNR. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the mais species causing cutaneous leishmaniasis in the Federal District of Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2012; 18: 340 – 343.

Shai Y. Mechanism of th binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1462: 55 – 70.

Simone SG, Souza ALA. Peptídeos microbianos. Uma alternativa viável para a terapia antimicrobiana. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* 2002; 24: 12 – 16.

Soares-Bezerra RJ, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2004; 40: 139 – 149.

Sorensen AL, Hey AS, Kharazmi A. *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 1994; 102: 265 – 271.

Spath GF, Garraway, Beverley SM. The role (s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 10: 9536 – 9541.

Teixeira MCA, Santos RJ, Sampaio RB, Carvalho LP, Santos WLC. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitology Research* 2002; 88: 963–968.

Tenenholz TC, Klenk KC, Matteson DR, Blaustein MP, Weber DJ. Structural determinants of scorpion toxin affinity: the charybdotoxin (-KTX) family of K⁺channel blocking peptides. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* 2000; 140: 135 – 185.

Van 't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AV. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biological Chemistry* 2001; 382: 597 – 619.

Velasco M, Díaz-Guerra MJ, Díaz-Achirica P, Andreu D, Rivas L, Boscá L. Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression. *Journal of Immunology* 1997; 158: 4434 – 4443.

WHO. World Health Organization, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: Out/2013.

Wieczorek M, Jensen H, Kindrachuk J, Scott WRP, Elliot M, Hilpert K, Cheng JTJ, Hancock REW, Straus SK. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimonial activity. *Chemistry & Biology Article* 2010; 17: 970 – 980.

Williamson P, Schlegel RA. Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells. *Molecular Membrane Biology* 1994; 11: 199 – 216.

Zhang R, Zhou M, Wang L, McGrath S, Chen T, Chen X, Shaw C. Phylloseptin-1 (PSN-1) from *Phyllomedusa sauvagei* skin secretion: a novel broad-spectrum antimicrobial peptide with antibiofilm activity 2010; 47: 2030 – 2037.

ANEXO I

(Parecer do Comitê de Ética)



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 07 de junho de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DO MECANISMO MICROBICIDA DA FILOSSEPTINA-1 E DERMASEPTINA-01 NAS FORMAS AMASTIGOTAS DE LEISHMANIA AMAZONENSIS.**", UnBDOC n.º 51002/2013, sob responsabilidade da Professora Selma Aparecida Souza Kuckelhaus foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof. José Raimundo Corrêa
Coordenador da CEUA

ANEXO II

(Soluções, Meios e Reagentes)

Líquido de Türk

Ácido acético glacial	1,5 mL
Violeta de genciana a 1%	1,0 mL
Água destilada	100 mL

Solução de nigrosina 0,05%

Nigrosina	0,05 g
Tampão fosfato	100 mL

Filtrar e colocar em frasco âmbar
Estocar a 4°C

Solução Salina Tamponada com fosfato (STF) pH 7,2, 153 M (1x)

Na ₂ HPO ₄ anidro (mm: 141,96 g/mol)	8,15 g
KH ₂ PO ₄ anidro (mm: 136,10 g/mol)	2,45 g
NaCl (mm: 58,44 g/mol)	4,50 g
Água destilada	1000 mL

Meio de cultura RPMI 1640, PH 7,2, 1640**a) Meio estoque**

Meio RPMI 1640, PH 7,2, (Sigma)	10,4 g
Tampão Hepes (Sigma, mm: g/mol)	5,96 g
Hipoxantina	2,50 mg
Gentamicina	25,0 mg
Água bidestilada	1000 mL

Filtrar em membrana de 0,22 µL Guardar a 4°C por um mês

b) Meio RPMI 1640, pH 7,2 (incompleto)

RPMI 1640, PH 7,2, 1640 (sol. Estoque)	97,36 mL
NaH ₂ CO ₃ 7,5%	2,64 µL

c) Meio RPMI 1640, pH 7,2, (completo)

RPMI 1640, PH 7,2, 1640 (sol. Estoque)	87,36 mL
NaH ₂ CO ₃ a 7,5%	2,64 mL
Soro fetal bovino	10,0 mL

Bicarbonato de sódio 7,5%

Pesar 7,5 g de bicarbonato de sódio
Dissolver em 100 mL de água bidestilada
Filtrar com filtro 0,02 µm

Solução de vermelho de fenol 0,028 M**a) Solução estoque:**

Vermelho de fenol (Merck)	9,92 g
Água bidestilada	1000 mL

b) Solução de uso:

Peroxidase (85unidades)	_____	200 µL
Vermelho de fenol	_____	200 µL
Tampão fosfato	_____	9,6 mL

Solução de Greiss

a) Solução estoque:

Solução estoque de sulfanilamida a 2% em H₃PO₄ a 5%

Sal sulfanilamida (Sigma) _____ 500 mg

H₃PO₄ a 5% _____ 25 mL

(2,5 mL H₃PO₄ + 47,5 mL de H₂O bidestilada)

NEED 0,2%

N-1-naphtylethylenediamine (Sigma) _____ 50 mg

Água bidestilada _____ 25 mL

b) Solução de uso:

Sulfanilamida 2% _____ 10 mL

NEED 0,2% _____ 10 mL

OBS: Preparar 1 hora antes do término do período de incubação

Óleo Vermelho (Oil Red O®)

a) Solução Estoque:

Dissolver 0,5g de óleo vermelho (Oil Red®) em 80mL de álcool isopropílico levemente aquecido em banho-maria 56°C (Overnight).

Completar o volume com 20mL de álcool isopropílico e homogeneizar levemente a solução.

Filtrar com filtro de papel número 1 e conservar em temperatura ambiente.

b) Uso:

Diluir 15 ml do estoque em 10mL de água destilada.

Deixar descansar por 10 minutos em temperatura ambiente.

Filtrar com filtro de 0,22µm

Paraformaldeído 40% (Estoque):

Paraformaldeído _____ 4g

H₂O destilada _____ 10ml

Misturar e aquecer a 65°C sem deixar ferver

Colocar algumas gotas de NaOH 40% até a solução ficar límpida

Deixar esfriar e guardar sob refrigeração a 4°C

Paraformaldeído 4% (Uso):

Diluir com STF 1x (7ml de PFA 40% + 63mL de STF1x)

Verificar o pH (Tem que estar entre 7,2 a 7,4)

Álcool Isopropílico a 60%:

Álcool isopropílico _____ 60 mL
Diluir em 40 mL de água destilada.

ANEXO III

(Tabelas)

Tabela 3. Efeito microbicida da PSN-1 nas formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (A, B e C).

A.

Índice de Infecção (II)				
Grupos				
	<i>Controle</i>	<i>2µg/mL</i>	<i>16 µg/mL</i>	<i>64 µg/mL</i>
Animal 1	38,48	54,45	8,96	5,49
Animal 2	101,97	21,46	5,5	0
Animal 3	84,82	63,22	15,93	2,49
Animal 4	44,22	28,49	20,93	5
Animal 5	85,84	44,89	4,5	2
Animal 6	131,1	43,35	22,41	4,48
Animal 7	89,3	33	18	4,48
Animal 8	71,36	22,95	25	20,48

B.

% de Macrófagos infectados				
Grupos				
	<i>Controle</i>	<i>2µg/mL</i>	<i>16 µg/mL</i>	<i>64 µg/mL</i>
Animal 1	26	22,5	8	4,5
Animal 2	49,5	18,5	5	0
Animal 3	43,5	29	9	1,5
Animal 4	33	18,5	11,5	4,5
Animal 5	37	20,5	2,5	1
Animal 6	46	25,5	13,5	4
Animal 7	38	20	12	3,5
Animal 8	32	13,5	10,5	8,5

C.

Média de Leishmanias por macrófago (X)				
Grupos				
	<i>Controle</i>	<i>2µg/mL</i>	<i>16 µg/mL</i>	<i>64 µg/mL</i>
Animal 1	1,48	2,42	1,12	1,22
Animal 2	2,06	1,16	1,1	0
Animal 3	1,95	2,18	1,77	1,66
Animal 4	1,34	1,54	1,82	1,11
Animal 5	2,32	2,19	1,8	2
Animal 6	2,85	1,7	1,66	1,12
Animal 7	2,35	1,65	1,5	1,28
Animal 8	2,23	1,7	2,38	2,41

Tabela 4. Efeito da PSN-1 sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos

Produção de óxido nítrico (μM)					
Grupos					
	<i>Basal</i>	<i>LPS</i>	<i>2$\mu\text{g/mL}$</i>	<i>16 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>64 $\mu\text{g/mL}$</i>
Animal 1	17,73	18,32	19,78	20,26	20,86
Animal 2	17,68	19,94	19,92	19,58	20,63
Animal 3	20,15	20,49	20,18	19,20	21,28
Animal 4	20,21	19,90	20,83	19,18	21,14
Animal 5	19,38	20,31	19,72	19,09	21,51
Animal 6	20,11	20,23	19,98	16,48	21,32
Animal 7	22,76	22,14	22,25	21,53	20,71
Animal 8	23,90	23,24	23,74	25,04	23,21

peritoneais não infectados de camundongos Swiss.

Tabela 5. Efeito da PSN-1 sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* de camundongos Swiss.

Produção de óxido nítrico (μM)				
Grupos				
	<i>Leishmania</i>	2 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$
Animal 1	21,58	21,76	20,89	20,45
Animal 2	20,27	21,91	20,57	20,06
Animal 3	20,93	21,55	20,83	19,83
Animal 4	20,52	20,40	21,14	19,98
Animal 5	20,58	21,06	21,24	20,21
Animal 6	21,24	20,76	21,12	20,58
Animal 7	23,14	23,96	23,25	21,50
Animal 8	24,38	23,96	24,48	23,42

Tabela 6. Efeito da PSN-1 sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais não infectados de camundongos Swiss.

Produção de peróxido de hidrogênio (μM)					
	Grupos				
	<i>Basal</i>	<i>PMA</i>	<i>2$\mu\text{g/mL}$</i>	<i>16 $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>64 $\mu\text{g/mL}$</i>
Animal 1	1,56	2,28	1,80	1,78	1,64
Animal 2	1,71	2,32	1,86	1,89	1,78
Animal 3	1,66	2,46	1,82	1,79	1,76
Animal 4	1,49	2,02	1,89	2,18	1,73
Animal 5	1,95	1,98	2,14	1,54	1,57
Animal 6	1,46	1,88	1,54	1,79	1,74
Animal 7	1,92	2,18	2,16	2,23	1,49
Animal 8	2,09	2,19	2,46	2,12	1,71

Tabela 7. Efeito da PSN-1 sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* de camundongos Swiss.

Produção de peróxido de hidrogênio (μM)				
	Grupos			
	<i>Leishmania</i>	2 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$
Animal 1	2,45	2,36	2,41	1,87
Animal 2	2,17	2,06	2,25	1,60
Animal 3	2,26	2,10	2,22	1,46
Animal 4	2,24	2,20	2,30	1,41
Animal 5	2,21	2,36	1,63	1,35
Animal 6	2,19	2,09	0,34	1,13
Animal 7	2,43	2,33	2,24	1,70
Animal 8	2,17	2,45	2,31	1,79