



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA E/OU ANTIFÚNGICA
DOS PEPTÍDEOS T₀AP3 E T₀AP4 OBTIDOS DE ESCORPIÃO E DOS PEPTÍDEOS
POLYBIA-MPII E AGELAIA-MPI OBTIDOS DE VESPA**

PAULO HENRIQUE DE HOLANDA VELOSO JÚNIOR

BRASÍLIA, DF
2019

PAULO HENRIQUE DE HOLANDA VELOSO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA E/OU ANTIFÚNGICA
DOS PEPTÍDEOS T₀AP3 E T₀AP4 OBTIDOS DE ESCORPIÃO E DOS PEPTÍDEOS
POLYBIA-MPII E AGELAIA-MPI OBTIDOS DE VESPA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

**BRASÍLIA, DF
2019**

PAULO HENRIQUE DE HOLANDA VELOSO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA E/OU ANTIFÚNGICA
DOS PEPTÍDEOS T₀AP3 E T₀AP4 OBTIDOS DE ESCORPIÃO E DOS PEPTÍDEOS
POLYBIA-MPII E AGELAIA-MPI OBTIDOS DE VESPA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília – UNB (Orientadora)

Prof^ª. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (Avaliadora)

Prof^ª. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau
Universidade de Brasília – UNB (Avaliadora)

Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior
Universidade de Brasília – UNB (Avaliador)

Prof^ª. Dra. Márcia Renata Mortari
Universidade de Brasília – UNB (Suplente)

À Deus, essência da minha vida, por ter me guiado até aqui e por ter permitido a concretização deste sonho.

*À todos meus familiares, especialmente minha filha **Isabella Holanda** e minha mulher **Dyandra Fernanda** os meus pais, **Paulo Henrique** e **Eva Holanda**, e minha irmã, **Ana Patricia**, pelo amor incondicional, constante carinho e incentivos aos meus estudos.*

Muito Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pelo dom da vida, por dar-me força de vontade e coragem nessa caminhada árdua até que eu pudesse atingir esse objetivo, mesmo após tantas dificuldades, que, de certa forma, me fizeram crescer e aprender bastante.

Agradeço muito a minha orientadora professora Anamélia Bocca, pela oportunidade concedida e a confiança depositada em mim. Além de sua paciência, grande amizade e ensinamentos, que me incentivaram ao longo desta difícil jornada, e, principalmente, pela enorme dedicação e força de vontade na orientação deste trabalho. Muito obrigado.

Aos professores, Aldo Tavares, Larissa Matos e Ildinete Silva, por todo suporte e conselhos.

À minha mulher, Dyandra Fernanda e a nossa filha Isabella Holanda, tudo não faria sentido sem vocês, obrigado por toda paciência que tiveram. Eu amo vocês.

Agradeço aos meus pais, Paulo Henrique e Eva Holanda por muitas vezes abdicaram dos seus sonhos para realizarem os meus sonhos e os sonhos da minha irmã. Todo o carinho, toda a saudade, todos os gestos de amor transmitidos a mim, tudo isso me deu forças para continuar firme.

À minha irmã Patricia Holanda, pelo carinho, apoio e companheirismo, e por muitas vezes pedir a Deus para que tudo desse certo.

Aos meus avós, Raimundo Moura e Maria Feitosa, por serem os pilares da nossa família e por todo carinho e orações dedicados.

Aos meus cunhados e irmãos Juderlânio Lima e José Neto, por sempre estarem presentes na minha vida em todos os momentos e por toda a torcida dedicada em prol dos meus objetivos.

À toda a minha família, cuja quantidade de membros é imensa, mas destaco aqui alguns que se mantiverem presentes durante os últimos anos. Meus tios; Ana Amélia, Maria de Jesus, Francisco Holanda, Adão Holanda, Evanilde Holanda e Francisco Júnior, Francisca Moura e José Macêdo, Antônio Holanda e Rosilene Caminha, Maria José (inmemoria), Deusenira Holanda e Francisco da Guia e ao meu afilhado Francisco Júnior. À Maria Goreth, Hermínia, Adelina, Elza, Ceixa, Aparecida, Marlane, Genilson, Laura, Geni. Obrigado pela torcida de sempre.

À minha sogra, Maria dos Reis, por todo apoio dedicado ao longo destes anos.

Aos meus primos por serem como meus irmãos; Francisca Maria, Chagas Macêdo, Marcos Holanda, Ravena Holanda, Gabriel Holanda, Aliny Ednayara, Alyanne Ednayra, João

Pedro, Raimundo Holanda, Fábio José, Francisco José, Francisco Holanda, Pedro Henrique, Heloisa, Thays e Tamirys. Obrigado.

Aos meus padrinhos, José Holanda e Maria do Carmo, vocês sempre torceram e me apoiaram nos momentos em que mais precisei de ajuda, obrigado.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA): Pedro Burgel, Stephan Oliveira, Karina Simon, Luisa Coutinho, Clara Luna, Marcio Jerônimo, Luciano Miranda, Angelina Basso, Samyra Caxito, Fabiana Brandão, Lucas La-Casas, Izaque Medeiros, Thais Bergmann, Pedro Lima, Guilherme Oliveira (in memoriam), por compartilharem momentos inesquecíveis e desafiadores, que certamente ficaram na memória. Agradecimento especial ao Raffael Castro e Jhones Dias por todo apoio e suporte que forneceram em Brasília.

Aos amigos Adolfo Carlos e Jaqueline Rodrigues pela paciência que tiveram ao longo dessa jornada, e pelos bons ensinamentos.

Aos que compartilharam comigo a mesma residência, carinhosamente chamada de República dos Piauienses ou, simplesmente, Kit 111. Ao chegar em casa e encontrar Américo Páscoa, Fabiano Campos, Gelson Alves e Eduardo Fontes, eu tinha certeza que estaria em um local leve e divertido.

Aos membros, Prof^ª. Dra. Jordana Graziela, Prof^ª. Dra. Izabela Marques, Prof. Dr. Osmindo Rodrigues e Prof^ª. Dra. Marcia Mortari por atenderem ao nosso convite para participar da banca examinadora, valorizando o nosso trabalho.

À Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, pela estrutura e parte dos subsídios indispensáveis à realização deste projeto.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim...

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que a realização desse trabalho saísse de maneira ordeira e com êxito.

Muito obrigado!!!

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”

Mahatman Gandhi

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são pequenas moléculas encontradas em todos os organismos pluricelulares, os quais podem ter atividades microbicidas e imunomodulatória. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade dos peptídeos ToAP3 e ToAP4 obtidos de escorpião e dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI obtidos de vespa, como potencial droga terapêutica nas infecções fúngicas. Para testar a atividade imunomodulatória dos PAMs ToAP3 e ToAP4, macrófagos derivados de medula óssea murina (BMDMs) ou células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) foram estimulados ou não com LPS na presença ou não dos PAMs ToAP3 ou ToAP4 para analisar sua capacidade de modular citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) e produção de óxido nítrico. Os níveis de microRNA e RNAm foram determinados por qRT-PCR e as proteínas dos genes que codificam as citocinas foram determinados por ELISA. Marcadores fenotípicos de ativação e diferenciação de BMDCs foram verificados por citometria de fluxo. Para análise antimicrobiana, avaliou-se a atividade dos PAMs contra o fungo *Cryptococcus neoformans*, verificando a concentração mínima inibitória (CMI), a possível associação entre os PAMs de vespas e escorpião por meio do ensaio de *checkerboard*, o mecanismo de ação dos PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI pela permeabilidade da membrana ao iodeto de propídio e microscopia de força atômica, assim como a curva de sobrevivência em modelo de *Galleria mellonella*. Além disso, os PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI foram encapsulados em nanopartículas de PMVE/MA e suas atividades avaliadas *in vitro*. Os resultados obtidos para os PAMs ToAP3 e ToAP4 mostraram que ambos possuem a capacidade de reduzir os níveis de transcritos de TNF- α e IL-1 β , bem como a secreção das proteínas quando as células foram estimuladas com LPS. Analisando as BMDCs, os PAMs reduziram a secreção de TNF- α antes e depois do estímulo com LPS, e esta redução estava associada à ligação com o receptor do tipo *Toll* 4 (TLR-4). ToAP4 aumentou os níveis de moléculas de MHC-II estimulados com LPS, e o ToAP3 reduziu os níveis de moléculas co-estimulatórias. Na análise antimicrobiana, somente os PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI foram capazes de atuar contra o fungo *Cryptococcus neoformans* e seu biofilme. Além disso, só os PAMs obtidos de vespa mostraram efeito aditivo na associação. O tratamento com estes PAMs causaram alterações na membrana e na morfologia fúngica. Estes resultados foram confirmados em ensaios *in vivo* utilizando a *Galleria mellonella* infectada com o *C. neoformans*. A análise da encapsulação mostrou que foi possível formular nanopartículas de PMVE/MA carregadas com o PAM Polybia-MPII ou Agelaia-MPI, sem alterar os efeitos dos PAMs frente ao fungo *C. neoformans*. No entanto, as concentrações de PAMs encapsuladas foram baixas. Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que os PAMs, aqui analisados, apresentaram potencial para o desenvolvimento de novas terapias, capazes de modular a resposta imunológica do hospedeiro e/ou atuar contra infecções causadas pelo *C. neoformans*.

Palavras chave: Peptídeos antimicrobianos, Atividade imunomodulatória, Atividade antifúngica.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are small molecules found in all pluricellular organisms, which may have microbicide and immunomodulatory activity. The aim of this present work is evaluate the peptides ToAP3 and ToAP4, obtained from scorpions, and Polybia-MPII and Agelaia-MPI, obtained from wasp, activities as potential therapeutic drugs in fungal infections. In order to evaluate the immunomodulatory potential of the AMPs ToAP3 and ToAP4, bone marrow-derived macrophages (BMDMs) or bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were stimulated or not with LPS, either in the presence or absence of the AMPs ToAP3 or ToAP4 to analyze its ability to modulate the cytokine and nitric oxide production. The levels of microRNA and mRNA were determined from qRT-PCR and ELISA accessed cytokine gene coding proteins. Phenotypical markers of activation and differentiation of BMDCs were verified by flow cytometry. For the antimicrobial analyses, it was evaluated the AMPs activity against the fungus *Cryptococcus neoformans*, verifying its minimal inhibitory concentration (MIC), the possible association between the wasp and scorpion AMPs by *checkboard* assay, the action mechanism of the AMPs Polybia-MPII and Agelaia-MPI by the membrane permeability to propidium iodide and atomic force microscopy, as well as the survival rate in the *Galleria mellonella* model. Furthermore, the AMPs Polybia-MPII and Agelaia-MPI were encapsulated in nanoparticles of PMVE/MA and their activity was accessed *in vitro*. The results obtained for ToAP3 and ToAP4 show that both AMPs have the capability to reduce the transcripts levels of TNF- α and IL-1 β , as well as the secretion of proteins when these cells were stimulated with LPS. Analyzing the BMDCs, the AMPs reduced the secretion levels of TNF- α before and after the LPS stimulus, and this reduction was associated with the interaction with Toll-like receptor 4 (TLR-4). ToAP4 increased the expression of MHC-II molecules stimulated with LPS, and ToAP3 reduced the levels of co-stimulatory molecules. In the antimicrobial analyses, only Polybia-MPII and Agelaia-MPI were capable of acting against *Cryptococcus neoformans* fungus and its biofilm. Besides that, only the AMPs obtained from wasp showed additive effect when combined. The treatment with this AMPs elicited changes in the fungal membrane and morphology. These results were confirmed in *in vivo* assays with *Galleria mellonella* infected with *C. neoformans*. The encapsulation analyses showed that it was possible to formulate the PMVE/MA nanoparticles carried with Polybia-MPII or Agelaia-MPI AMPs, without compromise their effect against *C. neoformans* fungus. However, the AMPs were encapsulated in low concentrations. Altogether, these results are promising for the development of new therapies, capable of modulate the host immune response and acting against fungal infections, such as criptococcosis.

Key words: Antimicrobial peptides, immunomodulatory activity, antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Levedura de <i>C. neoformans</i> corada com nanquim.....	28
Figura 1.2. Ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i>	29
Figura 1.3. Incidência anual de infecção criptocócica por país.....	30
Figura 2.1. Espectro de massa e sequenciamento do PAM ToAP3.	45
Figura 2.2. Espectro de massa e sequenciamento do PAM ToAP4.	46
Figura 2.3. Atividade hemolítica e efeitos citotóxicos dos PAMs em monócitos..	47
Figura 2.4. Efeitos dos PAMs ToAP3 e ToAP4 nos níveis de TNF- α em sobrenadante de células J774 estimuladas com LPS.....	48
Figura 2.5. ToAP3 e ToAP4 apresentam capacidade anti-inflamatória.....	49
Figura 2.6. Níveis de NO ₂ ⁻ em BMDMs e BMDCs	51
Figure 2.7. Integridade do RNA de BMDCs	51
Figura 2.8. Níveis de transcritos.....	54
Figura 2.9. Efeito dos PAMs ToAP3 e ToAP4 na transcrição dos miRNAs induzidos por LPS em células dendríticas (BMDCs).....	55
Figura 2.10. Efeito da adição dos PAMs ToAP3 e ToAP4 em momentos diferentes na produção de TNF- α induzida por LPS.....	56
Figura 2.11. Fenotipagem para marcadores de ativação e diferenciação de BMDCs estimuladas com os PAMs ou PAMs e LPS.....	59
Figura 3.1. Espectro de massa e sequenciamento do PAM Polybia-MPII.....	69
Figura 3.2. Espectro de massa e sequenciamento do PAM Agelaia-MPI.....	70
Figura 3.3. Atividade hemolítica e efeitos citotóxicos dos PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI em monócitos.....	71
Figura 3.4. Análise da integridade da membrana de <i>C. neoformans</i> tratados com Agelaia-MPI e Polybia-MPII	75
Figura 3.5. Imagens topográficas de MFA	76
Figura 3.6. Tamanho de <i>C. neoformans</i> sem tratamento, tratado com Polybia-MPII e tratado com Agelaia-MPI.	76
Figura 3.7. Imagens topográficas de <i>C. neoformans</i> por MFA	77
Figura 3.8. Rugosidade média da superfície celular de <i>C. neoformans</i> sem tratamento e tratados com Polybia-MPII e Agelia-MPI.....	78
Figura 3.9. Efeitos do Polybia-MPII Agelaia-MPI e Anfotericina B sobre o biofilme de <i>C. neoformans</i>	80

Figura 3.10. Toxicidade e atividade antifúngica do Polybia-MPII e Agelaia-MPI em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	82
Figura 4.1. Diferentes morfologias de nanopartículas poliméricas.....	85
Figura 4.2. Alterações observadas nos sistemas matriciais da nanopartícula de PMVE/MA carregadas com os fármacos.....	86
Figura 4.3. Teoria da formação de micro/nanopartículas.....	87
Figura 4.4. Comparação do tamanho (z-average) das partículas de PMVE/MA/PEG vazias e contendo o Polybia-MPII e Agelaia-MPI.....	92
Figura 4.5. Tamanho (z-average, d= nm) e carga de superfície (potencial zeta, ZP mV).....	93
Figura 4.6. Perfil cromatográfico do Polybia-MPII e Agelaia-MPI.....	94
Figura 4.7. Curva de calibração do Polybia-MPII e Agelaia-MPI.....	95
Figura 4.8. Perfil cromatográfico das nanopartículas Vazias A/O (A) e O/A (B), eixo y área de pico (mAU), eixo x tempo de retenção.....	96
Figura 4.9. Estrutura molecular do peptídeo Polybia-MPI, desenhado por meio do programa ACD/lab.....	97
Figura 4.10. Estrutura molecular do peptídeo Agelaia-MPI, desenhado por meio do programa ACD/labs.....	98
Figura 4.11. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm ⁻¹) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) dos peptídeos do Polybia-MPII (POLY) e Agelaia-MPI (AG) livres.....	98
Figura 4.12. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm ⁻¹) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da trealose, PEG 2000, PMVE/MA e da nanopartícula A/O Vazia.....	100
Figura 4.13. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm ⁻¹) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da trealose, PEG 2000, PMVE/MA e da nanopartícula Vazia O/A.....	102
Figura 4.14. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm ⁻¹) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) das nanopartículas Vazias A/O e O/A sobrepostos.....	103
Figura 4.15. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm ⁻¹) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da nanopartícula A/O Vazia (AO), Polybia-MPII livre (POLY) e da nanopartícula A/O contendo o Polybia-MPII (POLY AO).....	104
Figura 4.16. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm ⁻¹) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da nanopartícula Vazia O/A (OA), Polybia-MPII livre (POLY) e da nanopartícula contendo o Polybia-MPII O/A (POLY OA).....	105

Figura 4.17. Espectros vibracionais na região do infravermelho ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da nanopartícula Vazia O/A (OA), Agelaia-MPI livre (AG) e da nanopartícula contendo o Agelaia-MPI A/O (AG AO).....	106
Figura 4.18. Espectros vibracionais na região do infravermelho ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da nanopartícula Vazia O/A (OA), Agelaia-MPI livre (AG) e da nanopartícula contendo o Agelaia-MPI O/A (AG OA).....	107
Figura 4.19. Concentração mínima inibitória (CMI) dos PAMs nanoencapsulados em nanopartículas de PMVE/MA contra o fungo <i>C. neoformans</i>	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Atividade funcional das citocinas produzidas pelos macrófagos	25
Tabela 2.1. Sequência peptídica dos PAMs.....	36
Tabela 2.2. Grupos experimentais	40
Tabela 2.3. Sequência de oligonucleotídeos.....	42
Tabela 3.1. Concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos ToAP3, ToAP4, Polybia-MPII e Agelaia-MPI avaliados contra o fungo <i>C. neoformans</i>	72
Tabela 3.2. Avaliação da atividade combinada dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI com os peptídeos ToAP3 e ToAP4.....	74
Tabela 4.1. Tamanho (z-average), carga de superfície (potencial zeta) e índice de polidispersão de nanopartículas de PMVE/MA contendo o Agelaia-MPI.....	91
Tabela 4.2. Quantidade de peptídeos carregados nas diferentes formulações de nanopartículas	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Síndrome da imunodeficiência adquirida – AIDS

Células dendríticas derivadas da medula óssea – BMDCs

Dióxido de carbono – CO₂

Células dendríticas – DC

Complexo principal de histocompatibilidade de classe II – MHC II

Cryptococcus neoformans – *C. neoformans*

Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA

Fator de necrose tumoral alfa – TNF- α

Factor nuclear kappa B – NF-kB

Graus Celcius – °C

Interferon gama – IFN- γ

Interleucina 1 beta – IL-1 β

Interleucina 10 – IL-10

Interleucina 4 – IL-4

Lipopolisacarídeo – LPS

Macrófagos alternativos – M2

Macrófagos classicamente ativados – M1

Macrófagos derivados da medula óssea – BMDMs

Micrograma por mililitro – $\mu\text{g/mL}$

Nanopartículas – NP

Óxido nítrico – NO

Óxido nítrico sintase induzida– iNOS

Peptídeos antimicrobianos – PAMs

Poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico) – PMVE/MA

Rotações por minuto – RPM

Microlitros – μL

Micromolar – μM

Tampão fosfato-salino – PBS

SUMÁRIO

CAPITULO I.....	19
1.1. Novas abordagens terapêuticas para as infecções fúngicas	20
1.2. Peptídeos antimicrobianos.....	20
1.3. Peptídeos antimicrobianos produzidos pelas vespas sociais	22
1.4. Peptídeos antimicrobianos isolados de escorpião	23
1.5. Atividade imunomodulatória.....	24
1.6. Infecções fúngicas humanas.....	27
1.7. Cryptococcus neoformans	27
OBJETIVOS.....	32
CAPÍTULO II.....	33
Avaliação do potencial imunomodulatório dos peptídeos ToAP3 e ToAP4 obtidos de escorpião.....	33
2.1. Contextualização do problema	34
2.2. Material e métodos	35
2.2.2. Animais	36
2.2.3. Avaliação da viabilidade celular em células THP-1 tratadas com PAMs....	36
2.2.4. Hemólise.....	37
2.2.5. Determinação da atividade do ToAP3 ou ToAP4 em macrófagos estimuladas com LPS	38
2.2.6. Obtenção e cultivo de células derivadas da medula óssea <i>in vitro</i>	38
2.2.7. Interação entre ToAP3 ou ToAP4 e células diferenciadas de medula óssea	39
2.2.8. Dosagem de citocinas.....	40
2.2.9. Dosagem indireta de óxido nítrico	40
2.2.10. Determinação da influência do ToAP3 ou ToAP4 na ativação das BMDC ou BMDM pelo LPS	41
2.2.11. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	41

2.2.12.	Caracterização fenotípica das BMDCs	43
2.2.13.	Análise estatística.....	43
2.3.	Resultados e discussão	44
2.3.1.	Espectros de massa e sequenciamento do ToAP3 e ToAP4	44
2.3.2.	Potencial citotóxico e hemolítico do ToAP3 e ToAP4	44
2.3.3.	Atividade imunomodulatória do ToAP3 e ToAP4.....	47
2.3.4.	ToAP3 e ToAP4 podem modular diferencialmente a maturação e diferenciação da BMDC após estimulação com LPS.....	57
CAPÍTULO III		60
Avaliação da atividade microbicida dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI obtidos de vespas sociais.....		60
3.1.	Contextualização do problema.....	61
3.2.	Material e métodos	62
3.2.1.	Linhagem e condições de crescimento fúngico.....	62
3.2.2.	Análise de síntese e espectrometria de massa dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI.....	62
3.2.3.	Hemólise e a viabilidade celular do Polybia-MPII e Agelaia-MPI.....	62
3.2.4.	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos de escorpião e vespa.....	63
3.2.5.	Ensaio de <i>checkerboard</i>	64
3.2.6.	Avaliação da permeabilidade da membrana.....	65
3.2.7.	Microscopia de força atômica	65
3.2.8.	Biofilme.....	66
3.2.9.	Infecção e tratamento em <i>Galleria mellonella</i>	66
3.2.10.	Análise estatística.....	67
3.3.	Resultados e discussão	68
3.3.3.	Concentração mínima inibitória (CMI) e <i>Chekerboard</i>	71

3.3.4.	Avaliação da permeabilidade de membrana fúngica após tratamento com Polybia-MPII e Agelaia-MPI	74
3.3.5.	Microscopia de força atômica	75
3.3.6.	Efeito do Polybia-MPII e Agelaia-MPI no biofilme de <i>C. neoformans</i>	78
3.3.7.	Infecção e tratamento em <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>C. neoformans</i>	80
CAPÍTULO IV		83
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PMVE/MA carregadas com os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI obtidos de vespas		83
4.1.	Contextualização do problema	84
4.2.	Material e métodos	87
4.2.1.	Nanoestruturação dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI	87
4.2.2.	Caracterização das Nanopartículas.....	88
4.2.2.1.	Tamanho e carga da superfície (potencial zeta)	88
4.2.2.2.	Avaliação da alteração do tamanho das partículas na presença de água (intumescimento).....	88
4.2.2.3.	Determinação da quantidade de peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI carregado nas preparações de nanopartículas.....	89
4.2.2.4.	Curva padrão dos PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI.....	89
4.2.2.5.	Quantificação do peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI carregados nas nanopartículas.....	89
4.2.2.6.	Caracterização Físico-química, espectroscopia infravermelho transformada de fourier (FTIR).....	90
4.2.3.	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI nanoencapsulados em partículas de PMVE/MA	90
4.2.4.	Análise estatística	90
4.3.	Resultados e discussão	91
4.3.1.	Tamanho e carga de superfície.....	91

4.3.2.	Intumescimento	92
4.3.3.	Quantificação do peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI nas nanopartículas	94
4.3.4.	Caracterização Físico-química	97
4.3.5.	Concentração mínima inibitória (CMI) dos PAMs nanoencapsulados.	107
CONCLUSÃO.....		110
PERSPECTIVAS.....		111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		112
ANEXO I.....		128
APÊNDICE I.....		129

CAPITULO I

Introdução

1.1. Novas abordagens terapêuticas para as infecções fúngicas

Nos últimos anos têm sido registrado um aumento de casos de infecções fúngicas em humanos, tanto das formas mais brandas, como as superficiais, como da formas mais severas, como as infecções sistêmicas (SILVA et al., 2012; BITAR et al., 2014; PILMIS et al., 2016). Esse aumento se deve a diversos fatores, como o uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro e o tratamentos com drogas imunossupressoras (SILVA et al., 2012; NAGAO et al., 2014).

Em muitos países desenvolvidos, as infecções fúngicas invasivas apresentam alta morbidade e mortalidade. As infecções causadas por fungos primários não necessitam de um fator predisponente, no entanto, as infecções causadas por fungos oportunistas acometem mais indivíduos imunocomprometidos, tal como os portadores do vírus HIV (NAGAO et al., 2014; RAUTEMAA-RICHARDSON; RICHARDSON, 2017). Dentre os principais agentes etiológicos de infecções fúngicas invasivas estão *Cryptococcus spp.*, *Histoplasma spp.*, *Aspergillus spp.* e *Candida spp.* (ROMANI, 2011). As infecções causadas por *Cryptococcus neoformans* são as maiores causas de morte relacionada a fungos em pacientes com AIDS (ARMSTRONG-JAMES et al., 2014). Além disso, um importante agravante das infecções por *Cryptococcus neoformans* é a capacidade de formação de biofilmes. Nesta situação, a biodisponibilidade das drogas antifúngicas fica comprometida, contribuindo com o surgimento de isolados resistentes (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005).

Diante destes motivos, novas estratégias terapêuticas precisam ser investigadas, desde a proposição de novas drogas, novas abordagens para drogas já utilizadas, alterações nas vias de administração e doses bem como novas abordagens com terapias de combinação. Nesse sentido, a busca por novas moléculas com atividades antimicrobianas têm ganhado interesse (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; NICOLA et al., 2019). Dentre essas moléculas estão os peptídeos antimicrobianos (PAMs).

1.2. Peptídeos antimicrobianos

No início dos anos 80, estudos utilizando a mariposa *Hyalophora cecropia* mostraram que dois entre os vários componentes de sua hemolinfa eram estruturas peptídicas com atividade bactericida para diversas espécies de bactérias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas (STEINER et al., 1981). Devido à essa ação, essas sequências peptídicas ficaram conhecidas como peptídeos antimicrobianos. Atualmente, sabe-se que estas são moléculas

efetoras importantes da imunidade inata, especialmente na defesa dos organismos multicelulares. A ausência dos PAMs aumenta a susceptibilidade a infecções, enquanto a sua expressão aumentada ou a introdução de PAMs exógenos, confere proteção contra doenças (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007).

Os PAMs de mamíferos são produzidos por uma variedade de células do sistema imunológico, tanto de origem hematopoiética como epitelial (HILCHIE; WUERTH; HANCOCK, 2013). Em humanos, os PAMs são geralmente agrupados em duas famílias denominadas defencinas e catalecidinas. As defencinas de mamíferos são agrupadas ainda em duas classes, denominadas α e β -defensinas, sendo que diferem com base em seus padrões de ligação dissulfeto (AMID et al., 2009). As α -defensinas possuem três ligações dissulfeto entre os resíduos 1-6, 2-4, 3-5 de cisteína e são produzidas pelos leucócitos, células do trato gastrointestinal e no trato urogenital. As β -defensinas são cadeias de aminoácidos com seis motivos de cisteína, ligadas por três ligações dissulfeto, alinhadas da seguinte forma: 1-5, 2-4 e 3-6 e são produzidos constitutivamente por células epiteliais (RADEK; GALLO, 2007). As catalecidinas são caracterizadas por possuírem um domínio catalina de 98 a 114 resíduos de aminoácidos na sua forma inativa, sendo que a função deste domínio não está claramente definida, mas assume-se que é responsável por proteger o tecido hospedeiro contra a proteólise. As catalecidinas são produzidos por neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos, macrófagos, mastócitos, células NK, células dendríticas e os linfócitos (KOŚCIUCZUK et., 2012).

De modo geral, as defensinas e as catelicidinas são as moléculas multifuncionais de defesa do hospedeiro, e são essenciais para a resposta imune à infecção. Nos últimos anos, foi demonstrado que apresentam a função de antimicrobianos naturais de amplo espectro, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus e fungos. Esses pequenos peptídeos auxiliam na eliminação dos patógenos invasores, causando danos às membranas celulares e neutralizando as atividades biológicas de endotoxinas. Além de exercer efeitos antimicrobianos diretos, as catelicidinas e defensinas também podem desencadear respostas de defesa inatas e adaptativas no hospedeiro. As atividades, já descritas, destes peptídeos incluem a função quimioatrativa, inibição da apoptose de neutrófilos e produção de ROS. Esses peptídeos ativam diretamente as células inflamatórias para produção e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios e imunorregulatórios, citocinas e quimiocinas. No entanto, as catelicidinas e as defensinas também podem mediar a geração de citocinas anti-inflamatórias (AGIER; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, 2016).

Nos mamíferos, a expressão de PAMs é regulada positivamente no início das infecções, em resposta aos estímulos gerados pelos mediadores endógenos e exógenos da inflamação (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007). Embora esses PAMs sejam suficientemente potentes na sua ação microbicida, eles não mostram citotoxicidade relevante para as células que os produzem (LAI; GALLO, 2009). Sendo assim, é possível que a concentração necessária para que essas moléculas possam causar danos às células do hospedeiro não ocorra *in vivo* (SØRENSEN; BORREGAARD; COLE, 2008).

Uma vez que são produzidos como mecanismo efetor da imunidade inata de organismos pluricelulares, os PAMs, que contribuem para a manutenção de sua homeostase, podem ser encontrados em diversos tecidos, como nas peçonhas de diversos animais, incluindo vespas e escorpiões (ZOCCAL et al., 2011).

1.3. Peptídeos antimicrobianos produzidos pelas vespas sociais

A peçonha das vespas sociais contém um coquetel de substâncias farmacologicamente ativas, incluindo aminas biogênicas, poliamina toxinas e proteínas de alta e baixa massa molecular, como enzimas, alérgenos e os PAMs bioativos (MONTEIRO; ROMÃO; SOARES, 2009). Em vespas sociais, os PAMs bioativos formam 70% do peso seco da peçonha bruta (MOURELLE et al., 2014). Estes podem ser classificados de acordo com a sua atividade biológica em mastoparanos, quimiotáticos ou neuroativos.

Os mastoparanos recebem esta denominação devido ao seu primeiro alvo reconhecido, os mastócitos (HIRAI et al., 1979). Esta classe é a mais abundante na peçonha de vespas, sendo formada por PAMs anfífilos, policatiônicos, com conformação em α -hélice contendo de 10 a 14 resíduos de aminoácidos, apresentam a porção C-terminal amidada e uma cadeia rica em lisina (NAKAJIMA et al., 1986; SOUZA et al., 2005). Os resíduos de lisina em suas cadeias confere carga positiva ao PAM, aumentando assim sua interação com as membranas biológicas, além de auxiliar na liberação de histaminas por mastócitos (HIGASHIMA; SAWADA, 1990; LI et al., 2000). PAMs mastoparanos apresentam inúmeras atividades biológicas como a ativação de fosfolipase A2 e fosfolipase C (RIVERS; ROCCO; FRAYHA, 2002), estimular (WHEELER-JONES et al., 1992) ou suprimir (JOYCE-BRADY et al., 1991; NAKAHATA et al., 1990) a atividade da adenilato ciclase, via interação com a calmodulina e apresentam uma potente atividade antimicrobiana (KONNO et al., 2001).

Os PAMs quimiotáticos induzem a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (YASUHARA et al., 1987). Estas moléculas compartilham as características

estruturais dos PAMs mastoparanos, como a presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e amidação do resíduo C-terminal (NAKAJIMA, 1986). Estes PAMs foram isolados na peçonha de diversas espécies de vespas, tais como, *Agelaia pallipes pallipes*, *Protonectina silveirae* e *Polybia paulista* (BAPTISTA-SAIDEMBERG et al., 2010; SOUZA et al., 2005). Entre os PAMs mais estudados está a protonectina, isolada primeiramente na peçonha da vespa *Protonectarina sylveirae* (DOHTSU et al., 1993), este PAM apresenta efeito quimiotático e antimicrobiano (MENDES et al., 2004).

Os PAMs neuroativos são outra classe bastante representativa na peçonha de vespas, sendo que sua atuação está relacionada à atividades do sistema nervoso central de mamíferos e insetos. Esses PAMs podem atuar como agonistas ou antagonistas de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos e podem interagir com canais iônicos para sódio, potássio e cálcio (MELLOR; USHERWOOD, 2004; MORTARI; OLIMPIO; CUNHA, 2007; PIMENTA; LIMA, 2005). Alguns estudos mostram que a utilização desses PAMs reduziu o quadro de crises epiléticas em pacientes (MORTARI et al., 2007; CUNHA et al., 2005).

1.4. Peptídeos antimicrobianos isolados de escorpião

As peçonhas dos escorpiões são misturas complexas de origem apócrina, caracterizadas por apresentarem substâncias farmacologicamente ativas, incluindo os PAMS, sendo que estas substâncias podem ser tóxicas para vários organismos, tais como insetos, crustáceos e mamíferos (DE LA VEGA et al., 2010). Estudos recentes tem mostrado que estes compostos apresentam várias atividades, tais como, antimicrobiana e anticonvulsivante (GATI; MORTARI; SCHWARTZ, 2012; GUILHELMELLI et al., 2016). Estes PAMs podem ser classificados em PAMs que apresentam ligação dissulfeto (*Disulfide-bridged peptides* – DBPs) e PAMs que não possuem ligações dissulfeto (*Non-disulfidebridged peptides* – NDBPs) (ZENG; CORZO; HAHIN, 2005).

A maioria dos DBPs, descritos até o momento, atuam em canais iônicos presentes nas membranas celulares, tais como, canais de K^+ , Na^+ , Ca_2^+ e Cl^- (DEBIN et al., 1993; POSSANI et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2013). Entretanto, outras atividades já foram descritas como atividade anti-malária e anti-fosfolipásica (CONDE et al., 2000; ZENG; WANG; LI, 2002). Já o grupo dos NDBPs eram poucos estudados, apesar de representar mais de um terço dos peptídeos de peçonha de escorpião. Recentemente as pesquisas se voltaram para essa classe, devido a descobertas de que estes também apresentam várias atividades biológicas que incluem: atividade antimicrobiana, imunomodulatória, citolítica e anti-tumoral

(ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014; ORTIZ et al., 2015; ZENG et al., 2013). Sendo a formação de poros o mecanismo de ação mais descrito para atividade antimicrobiana desta classe de peptídeos (BELOKONEVA et al., 2004).

1.5. Atividade imunomodulatória

Terapias imunomodulatórias são dirigidas às células específicas ou às citocinas que contribuem para a resposta imunológica e ficaram conhecidas como “modificadores da resposta biológica” (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Dentre todas as funções dos PAMs, já é descrita a capacidade que alguns PAMs têm de regular o sistema imunológico (LEE et al., 2010). De fato, esses PAMs são capazes de conferir proteção ao hospedeiro por mecanismos de atividade indireta contra os patógenos. Após a quebra da homeostase por diferentes patógenos, os PAMs estimulam a secreção de mediadores inflamatórios e são, além de tudo, capazes de atenuar as respostas inflamatórias quando estão exacerbadas (AUVYNET; ROSENSTEIN, 2009; GANZ, 2003).

Quando ocorre quebra da homeostase de um organismo, pela entrada de um patógeno ou não, as primeiras células que participam desta resposta são as da imunidade inata. Elas são responsáveis pelo início do processo inflamatório e participam ativamente na manutenção do mesmo. Dentre essas células estão os macrófagos, que são células residentes, estes têm como função primordial reconhecer, internalizar e eliminar os agentes invasores. Além disso, os macrófagos interagem com as demais células do SI por meio de citocinas e apresentação antigênica. Estas atividades lhes confere um papel de extrema importância no orquestramento da imunidade inata, pois, além da atividade fagocítica, produzem mediadores que atuam tanto na inflamação quanto na cicatrização e remodelagem de tecidos, bem como na sinalização para as células da imunidade adquirida (CRUVINEL et al., 2010). Estas atividades descritas dependem da forma de ativação dessas células, que pode possuir um perfil pró-inflamatório, denominados macrófagos do tipo M1, ou anti-inflamatório, denominados macrófagos do tipo M2 (BROWN et al., 2012a). Os primeiros são produtores eficientes de moléculas efetoras, tais como, as espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e óxido nítrico. Os macrófagos M1 participam como indutores e efetores da resposta celular do tipo Th1 mediando a resistência contra uma variedade de bactérias, protozoários, vírus e tumores (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2007). Os macrófagos do tipo M2 são um grupo heterogêneo de células que, muitas vezes, participam da resposta do tipo Th2, promovendo a

morte de parasitas, remodelamento dos tecidos e apresentam um papel imunossupressor (MURRAY; WYNN, 2011).

Como descrito anteriormente, uma das formas de atuação dos macrófagos é por meio da produção de citocinas. Estas proteínas de sinalização celular são secretadas por diversos tipos de células, e podem exercer atividade autócrina ou parácrina. Além disso, podem atuar umas sobre as outras regulando a produção e atividade, dessa forma aumentam (pró-inflamatórias) ou diminuem (anti-inflamatória) a resposta imune (OLIVEIRA et al., 2011). A tabela 1.1 apresenta algumas das principais citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e seus efeitos.

Tabela 1.1. Atividade funcional das citocinas produzidas pelos macrófagos.

Citocinas	Função/Efeito
TNF- α	Ativa a coagulação, estimula a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE2, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanóides, e influencia a apoptose celular (CURFS et al., 1997; RAEBURN et al., 2002).
IL-1 β	Induz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2, com a formação de PGE2 no hipotálamo anterior, causando febre. Também produz substância-P (SP), óxido nítrico (ativando a enzima óxido nítrico sintase) e moléculas de adesão endotelial (LIN et al., 2000; ZHANG; AN, 2007).
IL-6	Citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células matadoras naturais (LIN et al 2000; CURFS et al., 1997).
IL-10	Inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α , IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (ZHANG; AN, 2007; CURFS et al., 1997).
IL-4	Induz a diferenciação de linfócitos-B para produzir IgG e IgE, que são imunoglobulinas importantes nas respostas alérgicas e anti-helmínticas. Atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8, e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio. (RAEBURN et al., 2002; CURFS et al., 1997)

TNF-a: Fator de necrose tumoral alfa; IL: Interleucina.

Outro tipo celular envolvido na resposta imune inata são as células dendríticas (DCs). Estas células constituem as principais células apresentadoras de antígeno (APCs),

sendo consideradas sentinelas naturais responsáveis pela transição entre a resposta imune inata e adaptativa (BANCHEREAU et al., 2000).

As DCs apresentam-se normalmente imaturas no tecido periférico, sendo caracterizadas por uma elevada capacidade de internalização e processamento de antígenos, e uma baixa expressão de moléculas de MHC-II à superfície e outras moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD83), além disso sua capacidade de secretar citocinas é limitada (GUERMONPREZ et al., 2002). Na presença de estímulos inflamatórios, como IL-1 β e TNF- α , as DCs diferenciam-se em DCs maduras, que podem iniciar respostas imunes de modo eficiente. Os antígenos capturados são processados dentro da célula e apresentados em sua superfície, inseridos em moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). DCs maduras perdem a capacidade de captura de antígenos, mas tornam-se extremamente eficientes na apresentação de antígenos e ativação das células T, apresentando altos níveis de MHC-II e moléculas co-estimulatórias (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002).

A apresentação antigênica envolve três sinais, o primeiro sinal consiste no reconhecimento do peptídeo antigênico, que está ligado à molécula de MHC pelo receptor dos linfócitos T (TCR) (GERMAIN, 1994). O segundo baseia-se na interação de membros da família de moléculas co-estimulatórias, como CD80 e CD86, antígenos de diferenciação presentes na superfície das DCs, com receptores CD28 ou CTLA-4 na superfície dos linfócitos T. Sinais adicionais, como citocinas provenientes de células da resposta inata e das DCs são também essenciais (CURTSINGER; MESCHER, 2010). Quando interagem com DCs, linfócitos T *náive* CD4⁺ ou CD8⁺ podem diferenciar-se em células efetoras com diferentes funções, originando linfócitos T citotóxicos efetores (CTLs, CD8⁺), células T *helper* 1 (Th1), T *helper* 2 (Th2), T *helper* 17 (Th17) ou ainda células T reguladoras (Treg), que regulam a função de outros linfócitos e mesmo das DCs (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Assim, estas células determinam o balanço entre as respostas Th1, Th2, Th17 e o desenvolvimento de linfócitos T reguladores (DE JONG; SMITS; KAPSENBERG, 2005). Dessa forma, desempenham um papel fundamental de interação entre a imunidade inata e adaptativa (STEINMAN; HEMMI, 2006).

Considerando a capacidade dos PAMs de influenciar as funções celulares do hospedeiro, estes podem ser utilizados devido sua atividade antimicrobiana, regulatória ou como agentes terapêuticos. Tais atividades já foram descritos tanto em plantas (STOTZ; THOMSON; WANG, 2009) como em animais invertebrados e vertebrados (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007), e abre grandes perspectivas no tratamento dos pacientes com acentuada

supressão da imunidade celular e que não respondem ao tratamento convencional com os antifúngicos. Considerando que a incidência de doenças fúngicas sistêmicas em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos é um problema de saúde mundial, cursando com altas taxas de mortalidade e morbidade, esta área de pesquisas possui um grande relevância médica.

1.6. Infecções fúngicas humanas

As infecções fúngicas são descritas como oportunistas ou primárias, e podem ser do tipo localizado, afetando apenas uma área do corpo, ou sistêmica, afetando muitas áreas do corpo (RAUTEMAA-RICHARDSON; RICHARDSON, 2017). Nos últimos anos tem sido registrado um aumento da incidência de infecções fúngicas sistêmicas (PILMIS et al., 2016). Este aumento está relacionado com o crescimento do número de indivíduos imunossuprimidos, principalmente nos portadores do vírus HIV, pacientes com câncer ou pacientes em terapia imunossupressora (NAGAO et al., 2014; ROMANI, 2011). Por acometer esta classe de pacientes, as infecções fúngicas sistêmicas têm se tornado um problema de saúde global. Dentre as espécies envolvidas nestes tipos de infecção estão as do gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocytis* ou *Cryptococcus* (BROWN et al., 2012b; PARAMYTHIOTOU et al., 2014).

1.7. *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans é um fungo basidiomiceto, que foi descrito primeiramente por pesquisadores alemães e italianos em 1894 (WALTON et al., 2005; BARNETT; BARNETT, 2011). A principal característica desta levedura é a presença de uma cápsula mucopolissacarídica que envolve toda a célula (LIN, 2009) (Figura 1.1). A classificação taxonômica é baseada nas diferenças imunogênicas relacionadas a esta cápsula. O *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A, D e AD) apresenta duas variedades, sendo o *C. neoformans* variedade *grubii* (Sorotipo A) (BENNETT et al., 1978; FRANZOT et al., 1999), encontrado amplamente por todo o mundo (MARTINEZ et al., 2001) e o *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo D e AD) (BENNETT et al., 1978) encontrado principalmente em zonas temperadas (MARTINEZ et al., 2001). Outra variedade é o *Cryptococcus gatii*, com os sorotipos B e C (KWON-CHUNG et al., 1976), é restritos nas zonas tropicais e subtropicais (LIN; HEITMAN, 2006).

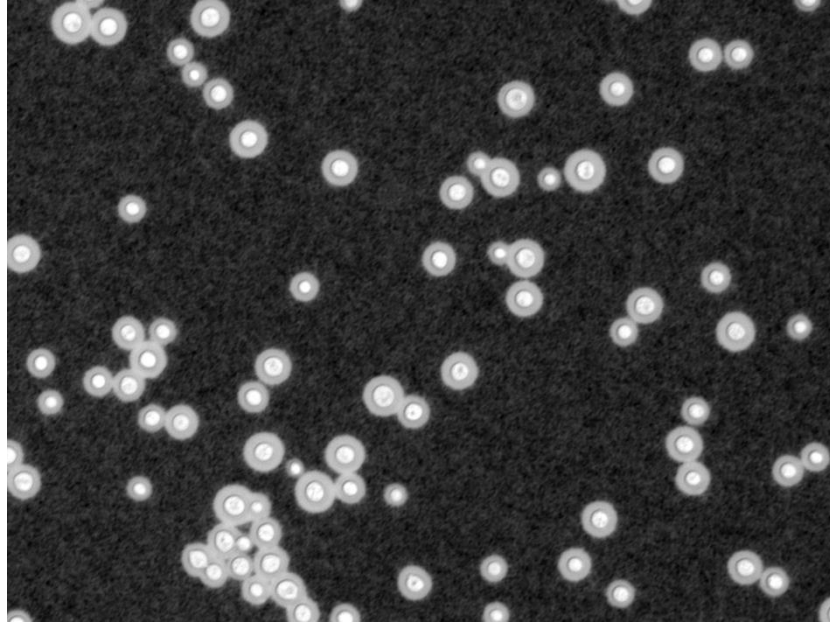


Figura 1.1. Levedura de *C. neoformans* corada com nanquim, com ênfase na cápsula exterior a parede celular fúngica (arquivo pessoal).

C. neoformans é o agente etiológico da criptococose e da meningite criptocócica que acomete especialmente indivíduos imunocomprometidos (BÉKONDI, et al., 2006). A infecção ocorre pela via respiratória, como mostrado na Figura 1.2. Propágulos fúngicos disseminados no ambiente são inalados e se instalam nos alvéolos pulmonares, onde se diferenciam em leveduras, sua forma patogênica (IDNURM et al., 2005). Uma vez nos pulmões, as leveduras interagem com as células do sistema imune, especialmente os macrófagos pulmonares, que são as primeiras células imunes ativadas (FELDMESSER et al., 1998). O desfecho dessa interação dependerá de fatores que envolvem a capacidade da resposta imunológica do hospedeiro e fatores de virulência do fungo.

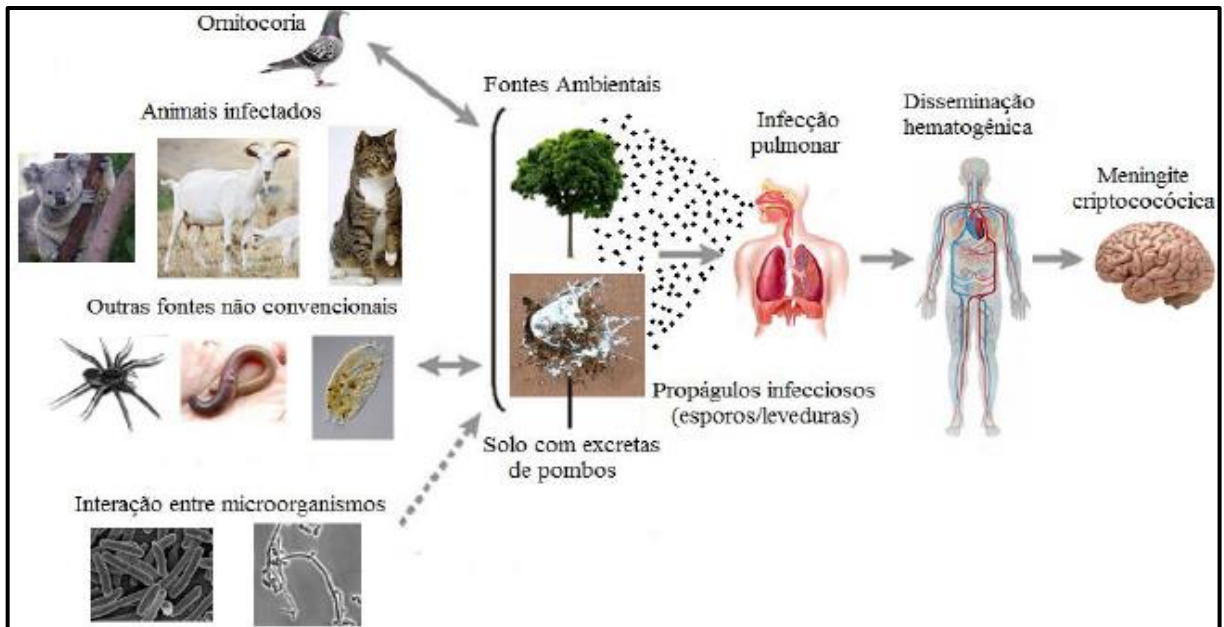


Figura 1.2. Ciclo de infecção de *Cryptococcus*. O fungo sobrevive no meio ambiente, presente no solo contaminado com excretas de aves (principalmente pombos) ou em árvores. O fungo pode interagir com diferentes hospedeiros animais, tais como, gatos, cabras e coalas. Além disso, é capaz de sobreviver em associação a outros organismos (insetos, amebas e minhocas), podendo interagir com bactérias e outros fungos bem como outros microrganismos. Uma vez estabelecido o imunocomprometimento do hospedeiro, o fungo é capaz de tornar-se reativo, dispersando-se via hematogênica e atingindo o sistema nervoso central. Adaptado de Lin e Heiman (2006).

Em hospedeiros imunocompetentes geralmente a infecção é assintomática e as células do fungo podem ser eliminadas ou permanecer em estado de latência. Nos hospedeiros imunocomprometidos, a infecção é sintomática e o fungo, oriundo da infecção primária ou latente, prolifera no pulmão e pode se disseminar via hematogênica. O fungo apresenta tropismo para o sistema nervoso central, levando aos quadros mais graves da doença como a meningite e a meningoencefalites (MITCHELL; PERFECT, 1995; LIN; HEITMAN, 2006). No ano de 2014 a meningite criptocócica foi responsável por 181.100 mortes em todo o mundo (Figura 1.3), sendo que 75% dos casos ocorreram na África Subsaariana. Nos pacientes portadores de HIV/AIDS, esta doença é a terceira mais comum complicação neurológica, causando 15% das mortes relacionada à AIDS. Estima-se que mais de 223 mil casos de meningite criptocócica ocorram a cada ano no mundo (RAJASINGHAM et al., 2017).

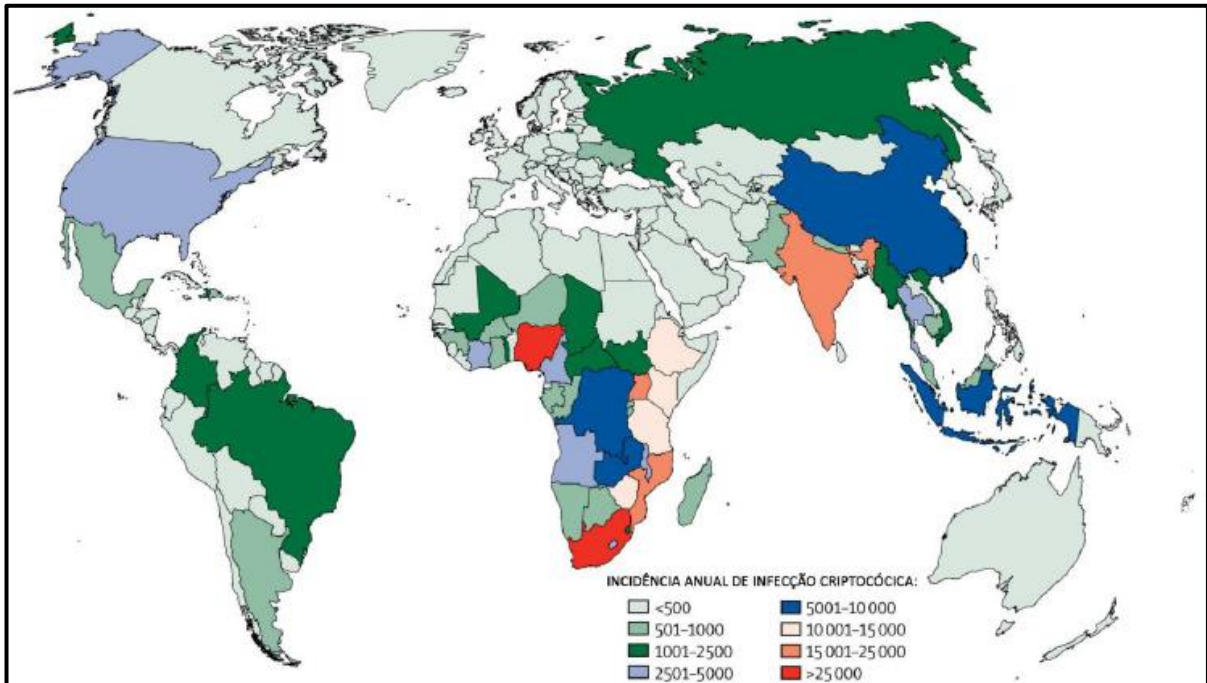


Figura 1.3. Incidência anual de infecção criptocócica por país. No mundo, estimou-se um total de 278.000 pessoas positivas para antigenemia criptocócica em 2014. Fonte: adaptado de RAJASINGHAM et al., 2017

C. neoformans é um fungo que apresenta alta plasticidade fenotípica como o resultado de expressão diferencial de fatores de virulência, tais como, capacidade de sintetizar melanina devido a presença de compostos fenólicos, tolerância e crescimento a 37 C°, produção de fosfolipases, proteases, uréases e cápsula polissacarídica (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015; DJORDJEVIC, 2010; ROBERT; CASADEVALL, 2009; ZARAGOZA et al., 2006). Esses fatores são importantes para que o fungo consiga sobreviver à resposta imune do hospedeiro, garantindo assim evasão do reconhecimento da resposta imune, resistência contra estresse oxidativo, capacidade de crescimento no interior de macrófagos entre outras vantagens (BROWN, 2011; ROMANI, 2011).

O tratamento por sua vez apresenta eficácia limitada, uma vez que os fármacos utilizados atualmente possui pequeno espectro de atuação e elevada toxicidade. *C. neoformans* apresenta resistências aos azóis, que tem como seu principal alvo a síntese do ergosterol, resiste as equinocandinas, que tem como alvo a síntese de glicanas. Apresenta baixa resistência aos polienos cujo alvo é o ergosterol da membrana, entretanto este antifúngico apresenta alta toxicidade aos pacientes (KANAFANI; PERFECT, 2008; ODDS, 2003; SABLE; SHENG; ZHANG, 2011). Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e menos tóxicos.

A atividade antifúngica dos peptídeos contra o *C. neoformans* tem sido descrita, como o peptídeo Cbf-14, derivado da família das catelecidinas (YU et al., 2018). Atualmente diversas pesquisas tem focado nesse objetivo (RAJASEKARAN et al., 2018; CODOGNOTO et al., 2019). Sharma et al. (2017), mostrou que o peptídeo 12f derivado da modificação do aminoácido histidina apresentou uma potente ação contra o *C. neoformans*, por meio de ataques a membrana do fungo, este também exibiu efeitos sinérgicos quando combinado com o fluconazol ou a anfotericina B. VG16KRKP um peptídeo produzido por desenho racional a partir de bibliotecas de cDNA de peptídeos que apresentavam atividade de permeabilidade celular, foi outro que demonstrou um efeito antifúngico potente contra *C. neoformans* (DATTA et al., 2016).

Nessa linha de pensamento, dados do grupo demonstraram que os PAMs sintetizados a partir da biblioteca de cDNA do escorpião *Tityus obscurus* (ToAP2 e ToAP1) e da vespa *Pseudopolybia vespiceps* (Polybia-MPII) apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (GUILHELMELLI et al., 2016). Ademais, o Polybia-MPII exibiu atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium abscessus* (SILVA et al., 2017).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a atividade dos peptídeos ToAP3 e ToAP4 obtidos de escorpião e dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI obtidos de vespa, como potencial droga terapêutica nas infecções fúngicas.

Objetivos específicos

- Avaliar o potencial modulador dos peptídeos ToAP3 e ToAP4 na ativação das células do sistema imune;
- Avaliar a capacidade fungicida dos ToAP3 e ToAP4 e suas associações frente ao fungo *C. neoformans*;
- Verificar o mecanismo de ação dos ToAP3 e ToAP4;
- Estudar a capacidade dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI de atuarem na redução da proliferação do *C. neoformans in vitro*;
- Verificar a ação antifúngica dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI em modelo de criptococose experimental utilizando a *Galleria mellonella*;
- Propor uma opção de tratamento utilizando os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI na criptococose experimental.

CAPÍTULO II

Avaliação do potencial imunomodulatório dos peptídeos ToAP3 e ToAP4 obtidos de escorpião

2.1. Contextualização do problema

O sistema imunológico (SI) possui importante papel no reconhecimento do que é próprio e não próprio. Dentre as estruturas que são reconhecidas como não próprio, estão os agentes infecciosos. A ativação do SI é de suma importância para conter as infecções disseminadas, que são, muitas vezes, associadas a altos índices de mortalidades (MACHADO et al 2004). Dentre as atividades de restabelecimento da homeostase, as células do SI exercem função reguladora, o que assegura que as respostas sejam apropriadas tanto quantitativamente quanto qualitativamente. Entretanto em algumas situações esse mecanismo de regulação pode estar alterado, o que pode acarretar danos ao hospedeiro (TIZARD, 1998; HOLLAND; VIZI, 2002).

Com a descoberta dos imunomoduladores tornou-se possível a manipulação do sistema imune a favor do restabelecimento da homeostase (DUTTA, 2002). A imunomodulação pode ser exercida mediante a supressão ou potencialização da ativação do SI (KIRKLEY, 1999). Neste sentido, a busca de moléculas capazes de auxiliar o SI no combate aos agentes patogênicos, ou a doenças de diferentes etiologias, tais como câncer e doenças auto-imunes, têm sido investigada (LABRO et al., 2000).

Pesquisas envolvendo PAMs têm despertado cada vez mais o interesse da comunidade científica, uma vez que apresentam amplo espectro de atuação, com inúmeras aplicações terapêuticas. Inicialmente as pesquisas envolvendo os PAMs foram concentradas em identificar aqueles que apresentavam potencial atividade microbicida, elucidando seus prováveis mecanismos de ação e avaliando seus efeitos citotóxicos em células eucarióticas e hemácias (HANCOCK; SAHL, 2006; FJELL et al., 2012).

Recentemente, a capacidade de PAMs em atuar como moduladores da resposta imune, bem como seu papel na modulação da imunidade inata e adaptativa têm sido amplamente estudados (MANSOUR; PENA; HANCOCK, 2014). Pena et al. (2013) investigando o IDR-1018, um pequeno peptídeo sintético derivado de uma bactericina bovina Bac2a, mostrou que o perfil de citocinas produzido pelos macrófagos M2 foi aumentado na presença deste peptídeo. A ghrelina, outro peptídeo com atividade anti-inflamatória produzido no estômago, inibiu a produção de IL-1 β e TNF- α , diminuindo a ativação de NF κ B induzida por LPS além de aumentar a produção de IL-10 e a resposta anti-inflamatória (WASEEN et al., 2008). Neste contexto, a busca e a investigação de novos PAMs, tais como, os presentes na peçonha de escorpião, é bastante relevante. Em estudo anterior, utilizando a predição in silico de 11 NBDCs da biblioteca de peptídeos da peçonha do escorpião *Titus obscurus*,

observou-se que 3 peptídeos, ToAP1, ToAP3 e ToAP4, apresentaram similaridade com PAM pertencentes à subfamília 4 dos NDBP (GUILHELMELLI et al., 2016). O ToAP1 apresentou atividade hemolítica muito alta e não foi testado para outras atividades. O ToAP3 apresentou atividade anti-*C. albicans* e *C. neoformans* enquanto o ToAP4 não apresentou atividade antifúngica alguma. Considerando que o ToAP4 apresenta similaridade ao Stigmurin, um peptídeo do *Tityus stigmurinus*, que apresenta atividade antibacteriana e imunomoduladora (DANIELE-SILVA et al., 2016). Outros peptídeos também já foram descritos como moduladores da resposta imune, como o LL37 e a clavanina, cujos mecanismos envolvem a redução de citocinas pro-inflamatórias (SEIL et al., 2010; SILVA et al., 2016).

Neste capítulo, foi avaliado o potencial imunodulatório dos ToAP3 e ToAP4 obtido da peçonha do escorpião *Titus obscurus*, em ensaios *in vitro* analisando as interações destes PAMs com células primárias diferenciadas de medula óssea e estimuladas com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS).

2.2. Material e métodos

2.2.1. Análise de síntese e espectrometria de massa de PAMs

As sequências preditas correspondentes aos PAMs utilizados neste capítulo e nos demais, foram todas traduzidas *in silico* obtidos a partir de bibliotecas de cDNA de glândulas de peçonha da espécie *Tityus obscurus* (ToAP3 e ToAP4), *Pseudopolybia vespiceps* (Polybia-MPII) e *Parachartergus fraternus* (Agelaia-MP). As sequências peptídicas dos PAMs utilizados estão listadas na tabela 2.1. Os PAMs foram sintetizados pela empresa FastBio Ltda (Ribeirão Preto, SP, Brasil) utilizando a estratégia de fase sólida F-MOC (N-9-fluorofenilmetoxi-carbonila).

Os espectros de massa (MS e MS/MS) foram verificados utilizando o espectrômetro MALDI-TOF/TOF (Autoflex Speed, Bruker Daltonics) operado em modo reflexivo positivo. Um kit de calibração foi utilizado na calibração externa do espectrômetro (*Peptide Calibration Standard IV*, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O equipamento foi manuseado usando o *software FlexControl* versão 3.4 e as análises foram realizadas usando o *software FlexAnalysis* (versão 3.4 Build 76, Bruker Daltonics). As massas teóricas foram calculadas usando o *software Isotope Parttern* (versão 3.4 Build 76, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas a partir de 1 µL do PAM purificado, com molaridade de 30 pM (em solução contendo 5% de acetonitrila em água), misturados com 3 µL de uma solução

ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). A mistura foi adicionada em duplicata diretamente na placa alvo de aço (*ground steel*) para MALDI (modelo MTP 384, Bruker Daltonics®). Espectros de fragmentação (MS/MS) foram adquiridos para o sequenciamento do PAM. A fragmentação dos íons precursores foi realizada por LIFT com pressão de célula de colisão mantida em $3,0 \times 10^{-6}$ torr.

Soluções estoques dos PAMs foram preparadas, com a solubilização dos mesmos em água, na concentração de 10 mg/mL e mantidos a -20°C . Para os ensaios, as alíquotas foram diluídas para a concentração de 500 μM .

Tabela 2.1. Sequência peptídica dos PAMs.

PAMs	Sequência Peptídica
ToAP3	FIGMIPGLIGGLISAIK-NH ₂
ToAP4	FFSLIPSLIGGLVSAIK-NH ₂
Polybia-MPII	INWLKLGKMVIDAL-NH ₂
Agelaia-MPI	INWLKLGKAIIDAL-NH ₂

2.2.2. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (*Mus musculus*) com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos com acesso livre à alimentação e à água *ad libitum*, no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Todos os tratamentos e procedimentos experimentais foram realizados após a aprovação no Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília – UNB (UnBDoC n.º 66704/2016, ANEXO I) e de acordo com as diretrizes apresentadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

2.2.3. Avaliação da viabilidade celular em células THP-1 tratadas com PAMs

A capacidade dos PAMs de induzir citotoxicidade em células THP-1 foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de viabilidade com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) segundo (MOSMANN, 1983). Em células viáveis, enzimas mitocondriais, reduzem o MTT, formando cristais de formazan, estes cristais possui coloração roxa e são insolúveis necessitando serem solubilizados com solventes, tal como o DMSO, para que as medidas de absorbâncias sejam tomadas. Por meio dessa quantificação da

produção desses cristais, e possível verificar a viabilidade de células que foram submetidas a determinados tratamentos. PAMs foram diluídos com água estéril em placas de 96 poços de tal forma que cada poço continha 50 μL de uma solução de PAM 2X da concentração final desejada. A concentração final de cada PAM variou de 0,78 a 100 μM . As linhagens pró-monocíticas humanas THP-1, derivada de leucemia monocítica aguda, foram cultivadas em meio RPMI-1640 acrescentado de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). A suspensão contendo 1×10^5 células/mL, em meio RPMI 2X no volume de 50 μL , foi adicionado aos poços da placa já contendo os PAMs previamente diluídos, totalizando um volume final de 100 μL em cada poço. Como controle positivo, foi utilizado células em meio de cultura, e o controle negativo células tratadas com solução de lise (Promega). Após 24 h de incubação em estufa a 37 °C com 5% CO_2 , acrescentou-se 10 μL de reagente de MTT (5 mg/mL) e incubou-se novamente na estufa por 4 horas ao abrigo da luz. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e acrescentou-se 100 μL de DMSO (100%) em cada poço. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância em uma leitora de placa, utilizando um comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação: % células vivas = $(100 \times A_V) / A_{\text{RPMI}}$, onde A_V é a absorbância da amostra e A_{RPMI} é a média das absorbâncias das amostras tratadas com RPMI.

2.2.4. Hemólise

Foi utilizada uma suspensão de glóbulos vermelhos humanos para avaliar a capacidade hemolítica de PAMs, segundo Nahar et al. (2008) com adaptações. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado em um tubo Vacutainer® contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os glóbulos vermelhos foram separados por centrifugação (800 g, 5 minutos, a 4 °C) e lavados com PBS (3 vezes). Os PAMs foram diluídos com PBS em placas de 96 poços, sendo que cada poço continha 50 μL de uma solução de PAM 2X da concentração final desejada. A concentração final de cada PAM variou de 0,78 a 100 μM . Controles positivos e negativos foram preparados com PBS estéril e água destilada, respectivamente. Em seguida, foi adicionado 50 μL da suspensão eritrocitária (3%). A placa foi deixada em repouso durante 1 h à temperatura ambiente, a seguir centrifugada a 800 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outra placa de 96 poços, e a leitura da absorbância foi realizada na leitora de placas utilizando o comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a equação %Hemólise = $(\text{DOs} - \text{DO}_0) / (\text{DO}_{100} - \text{DO}_0) \times 100$, sendo “DOs” a densidade óptica da amostra, “DO₀” o

controle negativo de hemólise e “DO₁₀₀” a densidade óptica do controle positivo. O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) aprovou os procedimentos e o termo de consentimento livre e esclarecido.

2.2.5. Determinação da atividade do ToAP3 ou ToAP4 em macrófagos estimulados com LPS

Células de linhagem J774 de macrófagos murinos foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% SBF a 37°C e 5% de CO₂. As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/poço em placas de culturas de 96 poços, uma para cada peptídeo. As células foram tratadas por 24 h simultaneamente com LPS (500 ng/mL, Sigma-Aldrich) e diferentes concentrações dos peptídeos ToAP3 ou ToAP4 (0,78 - 100 µM) para verificar a secreção de TNF- α . Células tratadas com LPS sem tratamento com peptídeos foram consideradas o controle positivo. Os níveis de TNF- α foram analisados por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, eBioscience) seguindo as recomendações do fabricante.

2.2.6. Obtenção e cultivo de células derivadas da medula óssea *in vitro*

Foram utilizadas no decorrer deste estudo culturas de células primárias de macrófagos e células dendríticas, derivados de medula óssea (BMDMs e BMDCs, respectivamente). A geração das BMDMs e BMDCs foi realizada a partir da diferenciação das células tronco hematopoiéticas murinas segundo protocolo preconizado por Lutz et al. (1999).

Resumidamente, camundongos C57BL/6 foram eutanasiados por exposição prolongada ao CO₂ em câmara fechada, tiveram suas tíbias e fíbulas retiradas e colocadas em etanol 70% por 5 minutos para desinfecção e seguiram novamente para o meio RPMI-1640 (Sigma-Aldric®) por igual período a fim de se retirar o excesso de álcool. Posteriormente as epífises do fêmur e tíbia foram cortadas, e foi realizado um lavado do interior destes utilizando-se uma seringa de 1 mL e agulha de 0,45 mm contendo 1 mL de meio RPMI-1640. A solução de células passou por um processo de filtragem em peneira de nylons (cell streiner-BD®) com rede de 45 µm, posteriormente foi centrifugada a 300 x g durante 5 minutos e, após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular submetido à ação de uma solução de lise de hemácias (8,3 g/L de cloreto de amônio em 0,01 M de tampão Tris-HCl) (Sigma-

Aldrich). Após a remoção da solução por centrifugação, 2×10^6 células foram ressuspensas em 10 ml de meio para diferenciação composto por RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, além de 20 ng/mL do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos GM-CSF (ImmunoTools), 50 μ M de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e gentamicina (2,5%). A suspensão foi colocada em placas de petri com 100 mm de diâmetro e acondicionada em estufa à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. No terceiro dia de cultivo foi adicionado mais 10 ml do meio para diferenciação. No sexto dia, metade do volume da placa foi retirado e centrifugado a 300 x g durante 5 minutos, o precipitado formado foi ressuspendido em 10 ml de meio fresco para diferenciação e as células devolvidas à placa de origem. Após oito dias de cultura celular, o sobrenadante, composto de células não aderidas sendo majoritariamente de BMDCs, foi coletado. A monocamada de células aderidas à superfície da placa, preferencialmente BMDMs, foi recoberta com uma solução enzimática denominada “Tryple Express” (*Life Technologies*), durante 20 minutos em estufa a 37°C, para promover o desprendimento celular da superfície da placa. Após contagem das células utilizando corante de exclusão azul de tripan, as BMDMs e BMDCs foram ressuspendidas em meio de experimentação (RPMI-1640 acrescentado de 5% de SFB) e colocadas em placas de cultura para serem utilizadas nos experimentos posteriores.

2.2.7. Interação entre ToAP3 ou ToAP4 e células diferenciadas de medula óssea

Para verificação da interação entre os peptídeos ToAP3 ou ToAP4 e BMDMs ou BMDCs, as células foram distribuídas em placa de cultura, de 24 poços, na concentração de 1×10^6 , em 0,5 mL de meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB. Posteriormente, parte das foram estimuladas com LPS (500 ng/mL). Logo após a adição de LPS, as células foram tratadas com os ToAP3 e ToAP4 todos na concentração de 25 μ M, e foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. Foi utilizado como controle negativo as células que não receberam nenhum estímulo bem como as células estimuladas apenas com os peptídeos. Após 24 horas de cultura, alguns poços foram incubados com nigericina (NG) (20 μ M, Invivogen) por 40 minutos, como o segundo sinal para a ativação do inflamassoma. Os grupos experimentais estão representados na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Grupos experimentais.

BMDMs	BMDCs
BMDMs	BMDCs
BMDMs + ToAP3	BMDCs + ToAP3
BMDMs + ToAP4	BMDCs + ToAP4
BMDMs + LPS	BMDCs + LPS
BMDMs + LPS + ToAP3	BMDCs + LPS + ToAP3
BMDMs + LPS + ToAP4	BMDCs + LPS + ToAP4
BMDMs + LPS + NG	BMDCs + LPS + NG
BMDMs + LPS + NG + ToAP3	BMDCs + LPS + NG + ToAP3
BMDMs + LPS + NG + ToAP4	BMDCs + LPS + NG + ToAP4

BMDMs: Macrófagos derivados da medula óssea; BMDCs: Células dendríticas derivadas de medula óssea; LPS: Lipopolissacarídeo; NG: Nigericina.

2.2.8. Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes obtidos dos ensaios de interação entre os peptídeos e as célula diferenciada de medula óssea foram submetidos à técnica de ELISA a fim de se avaliar os níveis de citocinas secretadas após as estimulações, demonstrados em valores absolutos (pg/mL). Foram utilizados kits comerciais (eBioscience; BD Bioscience), seguindo-se as recomendações dos fabricantes, para a dosagem de TNF- α , IL-1 β e IL-10.

2.2.9. Dosagem indireta de óxido nítrico

A concentração de nitrito (NO_2^-) presente no sobrenadante de cultura provenientes da interação entre PAM e célula diferenciada foi determinado por meio da reação colorimétrica de Griess e utilizado como indicador da produção de óxido nítrico (NO) (GREEN et al., 1982). Resumidamente, 50 μL das amostras foram incubadas com 50 μL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida diluída em ácido orto-fosfórico e 0,1% de cloridrato de naftiletilenodiamino, Sigma-Aldrich). A absorbância do cromóforo formado foi medida por espectrofotometria a 540 nm utilizando um espectrofotômetro de placa “*Multiskan™ FC Microplate Photometer*” (Thermo Scientific). A concentração molar de nitrito (produto da degradação do óxido nítrico liberado no sobrenadante) nas amostras foi determinada em comparação a uma curva padrão (com uma faixa de concentração de 100-1,56 μM) obtida da diluição seriada de NaNO_2 em meio de experimentação. Os resultados são expressos como micromols de nitrito (μmol).

2.2.10. Determinação da influência do ToAP3 ou ToAP4 na ativação das BMDC ou BMDM pelo LPS

Para avaliar a capacidade dos peptídeos em interferir na estimulação das células com LPS, BMDMs e BMDCs foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços (1×10^5 cél/poço, 100 μ l de meio RPMI-1640 com 10% de SBF) e estimuladas com o ToAP3 ou ToAP4 (25 μ M) por 6 horas antes ou após a adição de LPS (500 ng/mL). Adicionalmente, foi realizado este ensaio com macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para o receptor do tipo *Toll-like 4* (TLR4^{-/-}). Além disso, como controle utilizou-se o LPS (500 ng/mL), que se liga ao receptor TLR2 e TLR4, LPS ultrapuro (500 ng/mL, Invivogen) que se liga especificamente ao receptor TLR4, e Zymosan (20 μ g/mL, Invivogen), um ligante TLR4-independente. Controles de células estimuladas somente com os peptídeos também foram utilizados. Após 12 horas de interação os sobrenadantes foram colhidos e submetidos à técnica de ELISA para a dosagem de TNF- α conforme descrito anteriormente.

2.2.11. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A avaliação da expressão de alguns genes importantes, para o estabelecimento do processo inflamatórios, foi realizada por RT-qPCR. Para o ensaio, BMDCs foram cultivadas em placa de cultura de 6 poços, na concentração de 1×10^6 em meio RPMI-1640 acrescentado de 10% de SFB. Posteriormente foram estimuladas respeitando os grupos experimentais apresentados na tabela 2.2, e incubadas em estufa à 37°C, 5% CO₂ por 6 horas. Utilizando as concentrações de 25 μ M para PAMs e 500 ng/mL para o LPS. Em seguida, o RNA total das células foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme protocolo descrito pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016). O RNA foi quantificado e armazenado a -80°C. A concentração e a pureza do RNA extraído foi avaliada por espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), aferindo a absorbância em 260 nm e a razão de A260/A280. As amostras de RNA foram aplicadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) para avaliar a integridade e qualidade do RNA. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 μ g de RNA total de cada amostra, utilizando o kit RT2 First Strand Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Para a RT-qPCR, o kit GoTAQ® qPCR Master Mix (Promega, A6001) foi utilizado, observando as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 1/5 da reação de cDNA foi inserida em reação de amplificação de RT-qPCR, em um volume final de 10 μ L (5 μ L de GoTAQ® qPCR Master Mix (Promega),

2,0 µL de cDNA, 2,6 µL de água deionizada e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo específico, *forward* e *reverse*, apresentados na tabela 2.3. Todos os oligonucleotídeos foram validados previamente. Os genes avaliados foram *Tnfa*, *Il1b*, *iNOS*, *Arginase-1*, *Il10* e *Nfkb*. Os resultados foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) normalizado para a expressão do gene *Rps9* e expressos como “*Fold change*”. A $FC \geq 5.0$ foi utilizada como o *cut-off* da expressão diferencial de RNAm.

Para a análise os microRNAs, o RNA total foi extraído usando o kit de isolamento o *mirVana™ miR Isolation Kit*, de acordo com as especificações do fabricante (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Os níveis de *miRNA-155* e *miRNA-125b* foram determinados usando sondas *TaqMan® MicroRNA Assays* (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystem). Para a síntese de cDNA, o RNA total foi transcrito inversamente a partir de 50 ng de RNA total utilizando o *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem, Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µL, utilizando-se *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems). Como controle endógeno foi utilizado o U6 snRNA *TaqMan® MicroRNA Control Assay* (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystem). O *fold-change* das amostras estimuladas foi comparado com o grupo controle não estimulado, usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Um valor de $FC \geq 2.0$ foi usado como o *cut-off* da expressão diferencial de miRNA. Todas as amplificações foram realizadas no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Tabela 2.3. Sequência de oligonucleotídeos.

GENES	FORWARD	REVERSE
<i>Rps9</i>	CGCCAGAAGCTGGGTTTGT	CGAGACGCGACTTCTCGAA
<i>Arginase 1</i>	GTTCCCAGATGTACCAGGATTC	CGATGTCTTTGGCAGATATGC
<i>iNOS</i>	CGAAACGCTTCACTTCAA	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
<i>Nfkb</i>	AGCCAGCTTCCGTGTTTGT	AGGGTTTCGGTTCAGTATTCC
<i>Tnfa</i>	GTACCTTGCTACTCCAGGTTCTCT	GTGGGTGAGGAGCACGTAGTC
<i>Il1b</i>	GTGTGTGACGTTCCATTAGACA	CAGCACGAGGCTTTTTTGTG
<i>Il10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG

2.2.12. Caracterização fenotípica das BMDCs

A caracterização imunofenotípica de BMDCs estimuladas com o ToAP3 e ToAP4 na presença ou ausência de LPS foi realizada por citometria de fluxo. Primeiramente, as células foram plaqueadas em placa de petri de 50 mm de diâmetro, na concentração de 2×10^6 em 2 mL de meio RPMI-1640 acrescentado de 5% de SFB. Posteriormente, as células foram estimuladas ou não com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Logo após a adição de LPS, as células foram estimuladas ou não com os PAMs ToAP3 e ToAP4 na concentração de 25 μM . Após 24 horas de interação, as células foram desaderidas utilizando *TrypLE Express* (GIBCO), durante 20 minutos em estufa a 37°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão de marcação (PBS suplementado com 2% de SFB) e incubadas separadamente com anticorpos anti-MHC-II (conjugado ao fluoróforo FITC; Abcam), anti-CD80 (FITC; Abcam) e anti-CD86 (FITC; Abcam). Simultaneamente, a suspensão de BMDCs foi adicionada de anticorpos anti-CD11c (conjugado ao fluoróforo APC; eBioscience). Controles utilizando os mesmos isotípicos marcados com FITC ou APC foram utilizados. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences), e os dados analisados no programa FlowJo (versão X).

2.2.13. Análise estatística

Os experimentos foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de *Tukey*, sendo os dados obtidos nesses experimentos expressos como a média \pm SEM de um experimento representativo de três experimentos conduzidos em triplicatas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0. Dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Espectros de massa e sequenciamento do ToAP3 e ToAP4

Para corroborar a sequência dos PAMs utilizados neste trabalho, realizamos a análise do espectro de massa dos peptídeos ToAP3 e ToAP4 sintetizados. O espectro de fragmentação (MS/MS) obtido a partir da massa monoisotópica $[M + H]^+ = 1699,3$ Da e $[M + H]^+ = 1761,2$ Da são apresentados na figura 2.1A e 2.2A, respectivamente. A interpretação deste espectro permitiu identificar os íons correspondentes às séries do tipo b e y relacionadas com a seguinte estrutura de PAMs: FIGMIPGLIGGLISAIK-NH₂ (ToAP3) e FFSLIPSLIGGLVSAIK-NH₂ (ToAP4). Íons de baixa massa (íons) corroboram a presença da maioria dos aminoácidos presentes na estrutura do PAM. Os íons m/z 1684.1 (ToAP3) e 1744.9 (ToAP4), sugerem que os PAMs são amidados na posição C-terminal (Figura 2.1B e 2.2B, respectivamente). Estes dados confirmam que os peptídeos foram sintetizados corretamente.

2.3.2. Potencial citotóxico e hemolítico do ToAP3 e ToAP4

A avaliação do potencial hemolítico e citotóxico de novas moléculas é uma etapa necessária no estudo de moléculas com possíveis aplicações terapêuticas, uma vez que, fornece as concentrações que poderão ser utilizadas para estudos que envolvem células (RISS et al., 2016).

De um modo geral, os PAMs utilizados se mostraram tóxicos em concentrações iguais ou superiores a 50 μ M. Dessa forma, neste estudo foi utilizado a concentração de 25 μ M para os PAMs ToAP3 e ToAP4 (Figura 2.3).

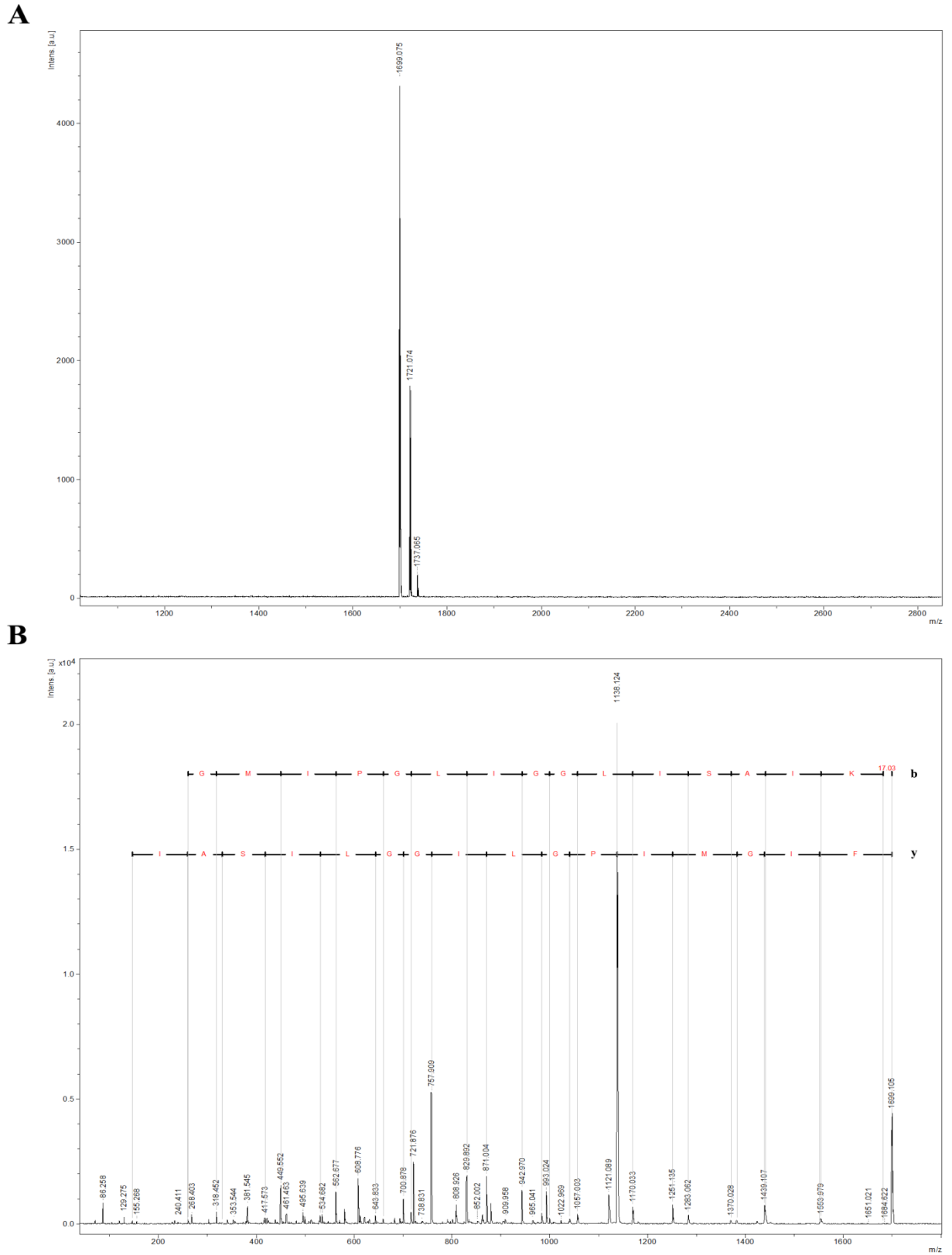


Figura 2.1. Espectro de massa e sequenciamento do PAM ToAP3. Espectro de massa monoisotópico (A). Espectro de fragmentação no modo LIFT (MS/MS) obtido a partir do íon $[M + H]^+ = 1699,3$ Da (B). As séries de íons b e y são escritas acima com os resíduos representado por letras.

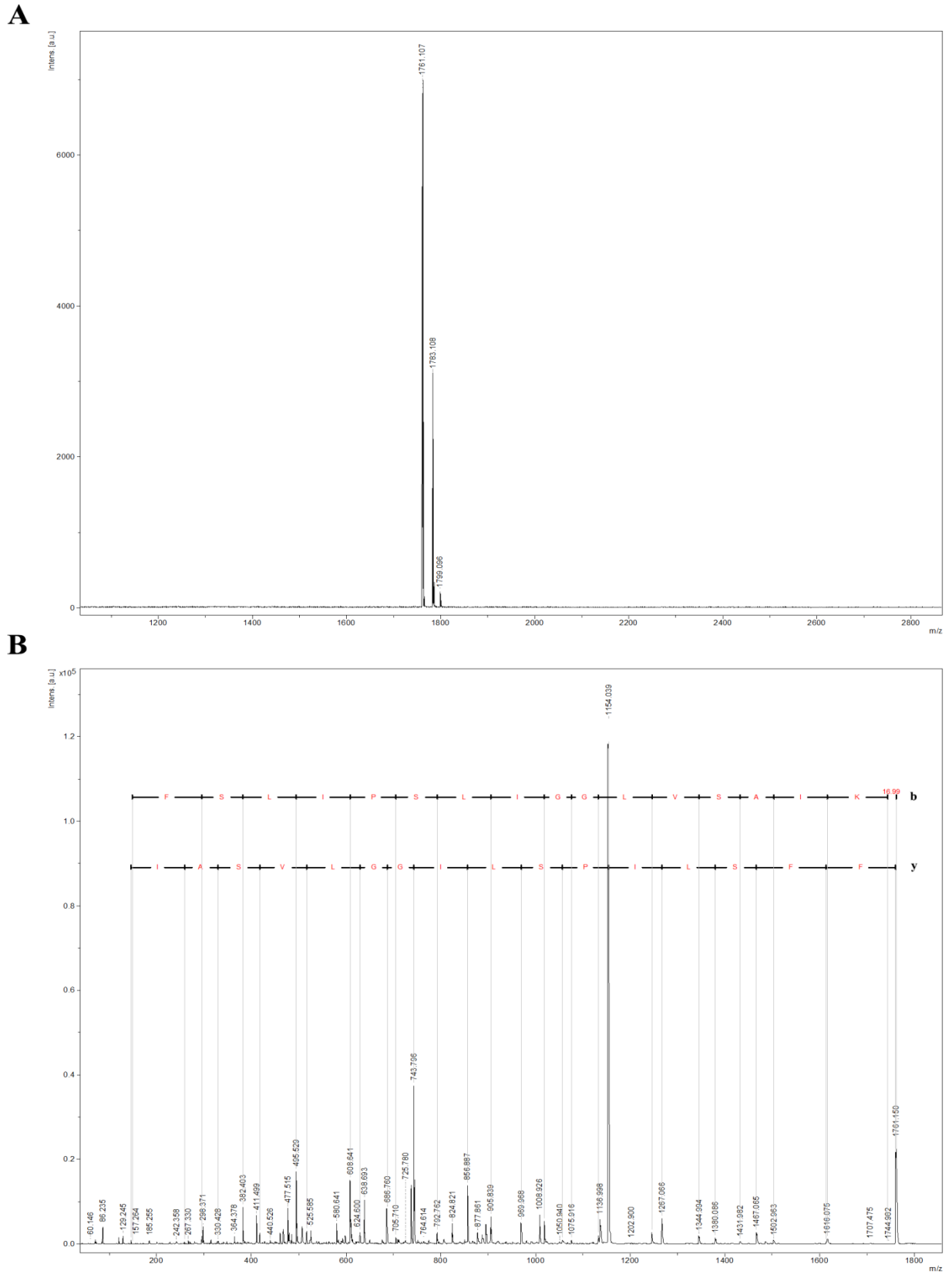


Figura 2.2. Espectro de massa e sequenciamento do PAM ToAP4. Espectro de massa monoisotópico (A). Espectro de fragmentação no modo LIFT (MS/MS) obtido a partir do íon $[M + H]^+ = 1761,2$ Da (B). As séries de íons b e y são escritas acima com os resíduos representados por letras.

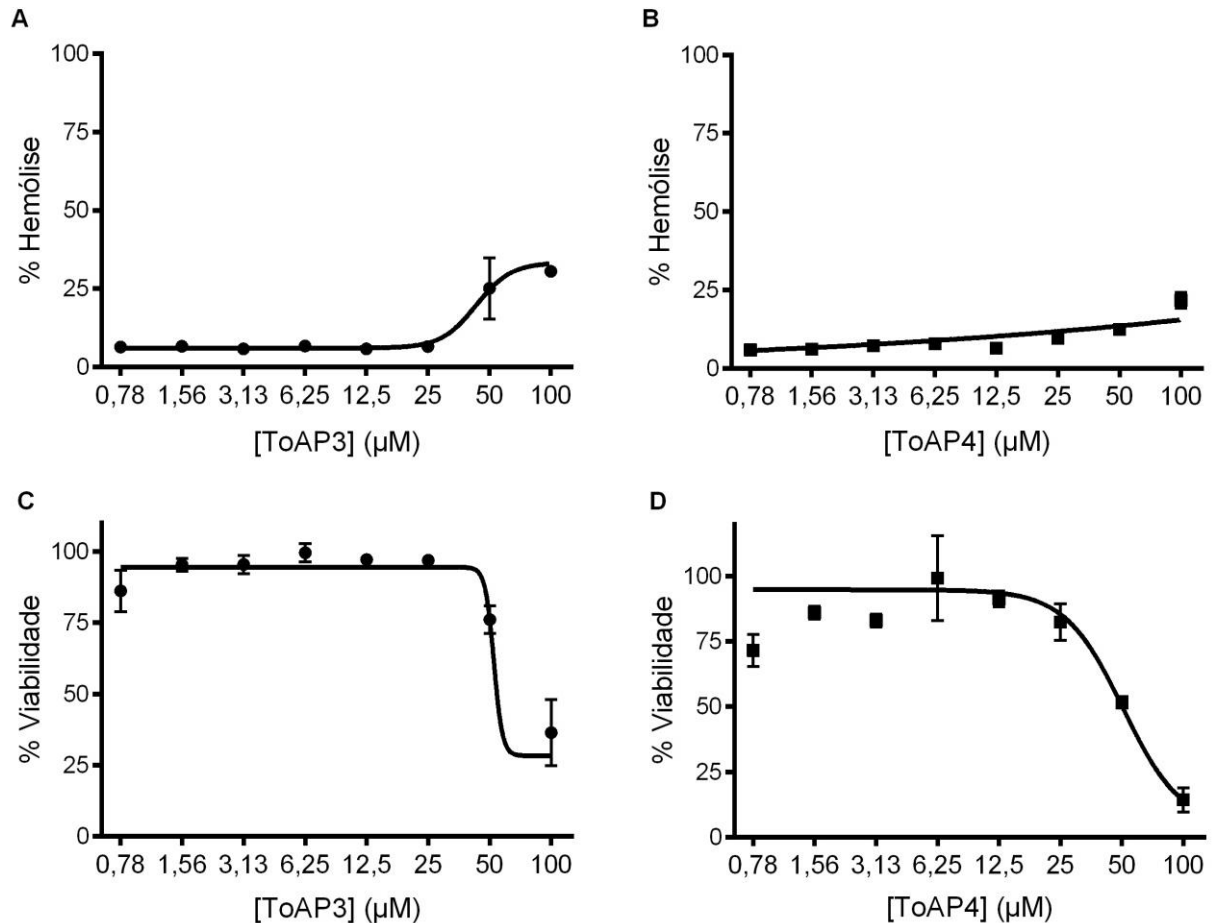


Figura 2.3. Atividade hemolítica e efeitos citotóxicos dos PAMs em monócitos. Porcentagem de lise de eritrócitos humanos tratados por 1 h com os PAMs ToAP3 (A) e ToAP4 (B) (0,78–100 μM). Os monócitos THP1 foram expostos a concentrações dos PAMs ToAP3 (C) e ToAP4 (D) (0,78–100 μM) por 24 h. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

2.3.3. Atividade imunomodulatória do ToAP3 e ToAP4

As peçonhas são uma mistura de muitos peptídeos. Como descrito anteriormente, os PAMs da peçonha de escorpião podem ser separados em dois grupos, DBPs e NDBPs. O foco nos NDBPs é muito recente, e eles foram identificados e funcionalmente caracterizados apenas durante a última década. Esse interesse pelos NDBPs se deve às suas diversas atividades biológicas, que incluem ação antimicrobiana, anticâncer, hemolítica, anti-inflamatória e imunomodulatória (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014). O *T. obscurus* é uma espécie de escorpião endêmico do norte do Brasil, que possui 5% de sua peçonha bruta composta por NDBPs (DIAS et al., 2018). Entre todos os NDBPs detectados, apenas alguns PAMs foram estrutural e funcionalmente caracterizados. Recentemente, Pucca et al. (2016) relataram três novos NDBPs da peçonha de *Tityus serrulatus*: RIRSKGKK, RIRSKG e

KIWRs. Estes peptídeos foram capazes de modular as respostas dos macrófagos, aumentando a produção de IL-6 e inibindo a atividade da enzima conversora de angiotensina.

Neste sentido, foi proposto investigar as atividades apresentadas pelos PAMs ToAP3 e ToAP4, visto que estes PAMs estavam sendo investigados pelo grupo, e já se tinha demonstrado que os mesmos apresentavam atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (GUILHELMELLI et al., 2016). Inicialmente células J774 foram co-estimuladas com LPS e ToAP3 ou ToAP4 em diferentes concentrações. Ambos os peptídeos foram capazes de reduzir a secreção de TNF- α . Para ToAP3, foi observado um efeito dependente da dose (Figura 2.4A), e para ToAP4 foi observada uma diminuição em todas as concentrações testadas, mas o efeito dependente da dose foi observado apenas após 25 μ M (Figura 2.4B). Considerando as concentrações que não foram citotóxicas e que foram capazes de reduzir a produção de TNF- α , a concentração de 25 μ M foi usada nos experimentos seguintes.

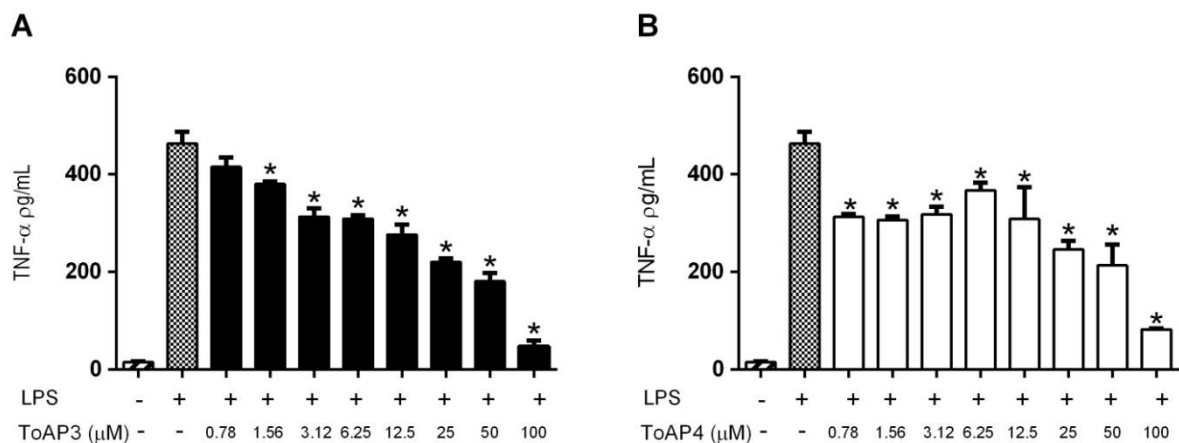


Figura 2.4. Efeitos dos PAMs ToAP3 e ToAP4 nos níveis de TNF- α em sobrenadante de células J774 estimuladas com LPS. Os níveis de secreção de TNF- α pelas células J774 foram medidos 24 horas após a interação com LPS (500 ng/mL) e/ou diferentes concentrações dos PAMs ToAP3 (A) ou ToAP4 (B) (0,78-100 mM). Os dados são expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ versus grupo LPS, *one-way* ANOVA e teste de *Tukey*.

Para ampliar as atividades imunomodulatórias desses PAMs, foi analisada a produção de outras citocinas produzidas por macrófagos (BMDMs) e células dendríticas (BMDCs) quando estimulados por LPS. O tratamento concomitante de BMDMs e BMDCs com ToAP3 ou ToAP4 com LPS ou LPS mais nigericina resultou em níveis reduzidos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Figura 2.5A e B, respectivamente) e IL-1 β (Figura 2.5C e D, respectivamente) no sobrenadante de cultura das células. Por outro lado, ToAP4 aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, especialmente para BMDM (Figura 2.5E e F,

respectivamente). Não foi observado nenhum aumento nos níveis destas citocinas quando ambas as células foram tratadas apenas com ToAP3 ou ToAP4, comparadas com células não tratadas.

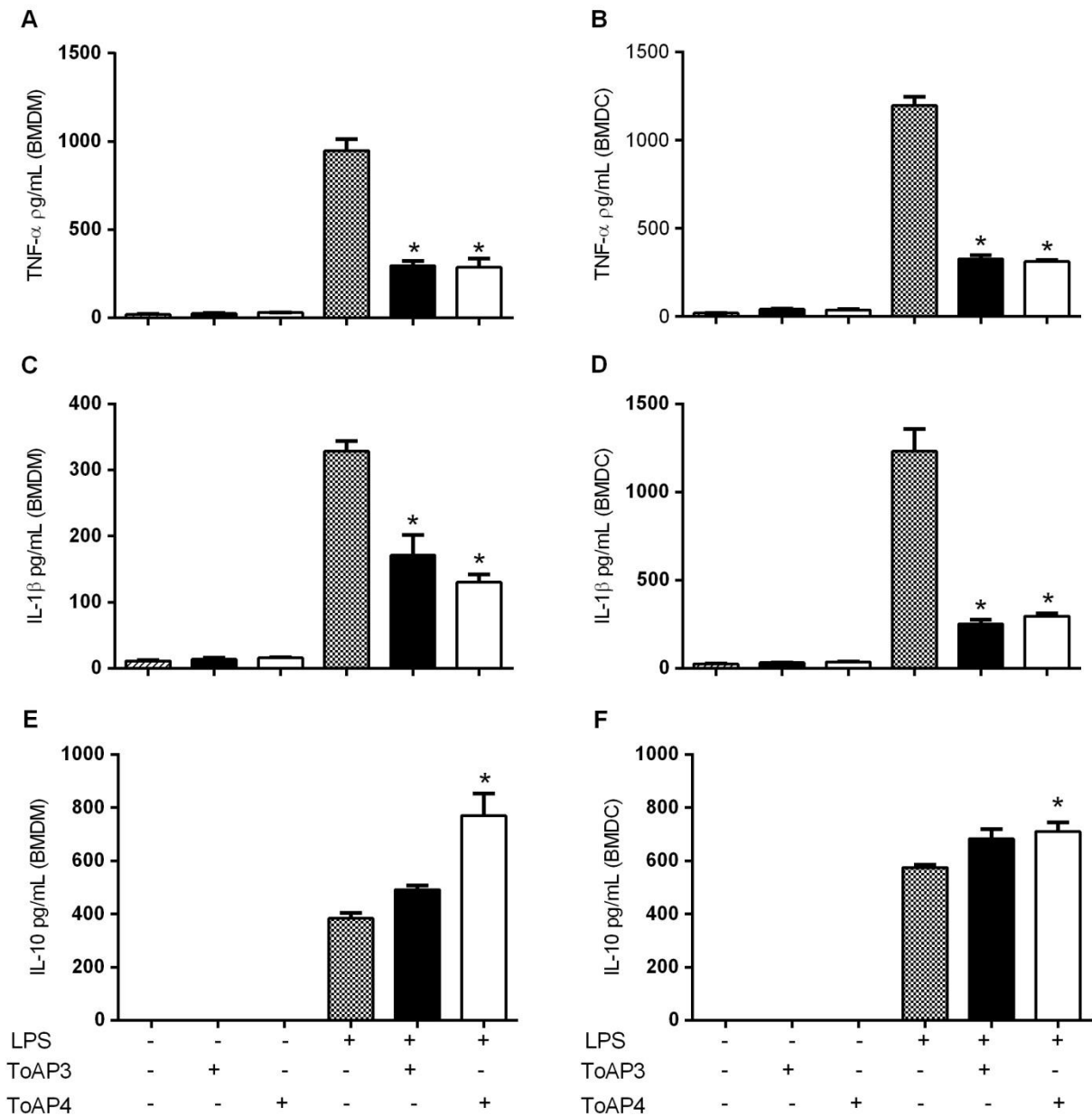


Figura 2.5. ToAP3 e ToAP4 apresentam capacidade anti-inflamatória. Níveis de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 em BMDMs (A, C e E, respectivamente), e BMDCs (B, D e F, respectivamente), após 24 horas de interação com os PAMs ToAP3 e ToAP4 na concentração de 25 μ M ou com LPS (500 ng/mL) e PAMs. Para a dosagem de IL-1 β foi utilizado um co-estimulo de LPS e nigericina (20 μ M). Os dados são expressos como a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ versus grupo LPS ou LPS e nigericina, *one-way* ANOVA e teste de *Tukey*.

A análise da produção de óxido nítrico mostrou que o ToAP3 ou ToAP4 não conseguiram reduzir os níveis de NO tanto em BMDMs (Figura 2.6A) como em BMDCs (Figura 2.6B). O óxido nítrico (NO) é um mediador gasoso produzido por vários tipos de células em diversos tecidos, este possui papel importante na regulação de várias funções celulares nos sistemas cardiovascular, neuronal, bem como no sistema imune, onde atua no controle de infecções, regulação de cascatas de sinalização, respostas vasculares e na migração de leucócitos (MONCADA et al., 1991; CLANCY; AMLN; ABRAMSON, 1998; CROSS; WILSON, 2003).

Esta molécula é produzida pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), a partir de um precursor, a L-arginina, as quais existem em três diferentes isoformas, duas constitutivamente expressas: NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), e uma que não é constitutivamente expressa a NOS induzida (iNOS), mas que pode ser ativada por estímulos do sistema imunológico, tais como, citocinas e LPS. Alguns estudos descrevem o seu envolvimento na patogênese de desordens inflamatórias (LOPEZ-BELMONTE; WHITTLE; MONCADA, 1993; MOURELLE et al., 1996).

Alguns estudos já demonstraram a capacidade de PAMs em regular o processo inflamatório. BROWN et al. (2011) e HU et al. (2016) demonstraram que o PAM LL-37 apresentam propriedades imunomoduladoras, atuando na redução de citocinas pró-inflamatórias, em macrófagos M1 estimulados com LPS e como agente anti-sepsia protegendo os camundongos da endotoxemia, provocada pelo desafio com LPS. Além disso, Scott et al. (2002), mostrou que a LL-37 aumentou a produção de MCP-1, IL-8, mas não de TNF- α , e levou ao recrutamento de neutrófilos para o local da infecção.

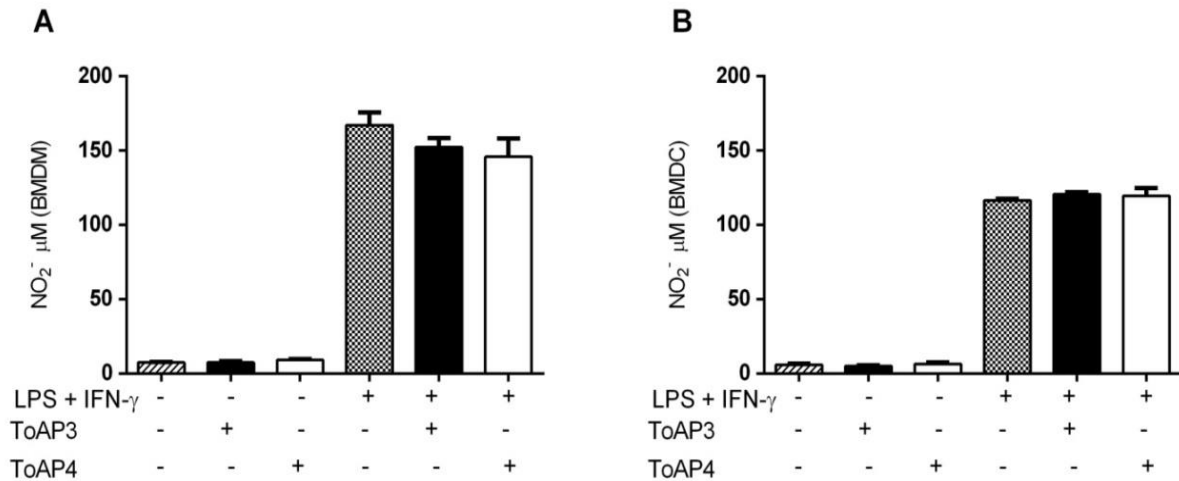


Figura 2.6. Níveis de NO₂⁻ em BMDMs (A) e BMDCs (B), após 24 horas de interação com os PAMs ToAP3, ToAP4 na concentração de 25 μM ou com LPS (500 ng/mL), IFN-γ (20 ng/ml) e PAMs. Os dados são expressos como a média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. *P < 0,05 versus grupo LPS, one-way ANOVA e teste de Tukey.

Com o intuito de averiguar se a influência dos peptídeos na liberação de citocinas era pré ou pós-transcricional, foi realizado uma qRT-PCR dos genes *Tnfa*, *Il1b*, *iNOS*, *Arginase-1*, *Il10* e *Nfkb* de BMDCs, considerando a similaridade da secreção de TNF-α entre BMDM e BMDC. Antes de realizar a análise de RT-qPCR foi verificado a integridade do RNA extraído de BMDCs, e constatou-se que o mesmo não apresentava degradação (Figura 2.7).

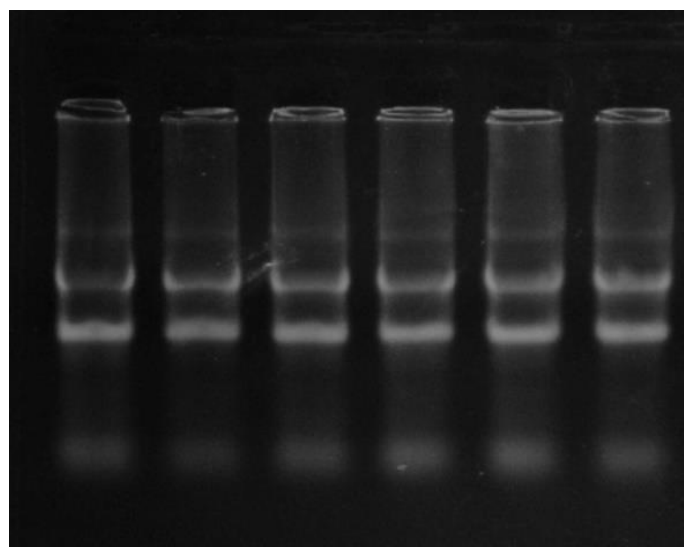


Figura 2.7. Integridade do RNA de BMDCs, após 6 horas de interação com os PAMs ToAP3 e ToAP4 e na concentração de 25 μM ou com LPS (500 ng/mL) e PAMs.

Quando as BMDCs foram estimuladas com ToAP3 ou ToAP4 mais LPS, houve reduções no nível de transcrito de *Tnfa* e *Il1b* (Figura 2.8A e B, respectivamente), evidenciando que os peptídeos poderiam estar modulando a secreção de TNF- α em eventos pré-transcricionais. Apenas ToAP4 induziu uma pequena redução nos níveis de transcrito da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Figura 2.8C). No entanto, nenhuma alteração no nível dos transcritos de *Arginase-1* e *Il10* foram observadas (Figura 2.8D e E, respectivamente). A Arginase-1 compete com a iNOS pela L-arginina, reduzindo assim a disponibilidade dessa como substrato para a iNOS. A diminuição da produção de óxido nítrico por iNOS e a produção de ornitina por Arginase-1 afetam as respostas imunes, induzindo um perfil anti-inflamatório (ZEA et al., 2004; JACOBSEN et al., 2007). De uma forma geral, os resultados corroboram com os encontrados nos testes de liberação de citocinas e óxido nítrico, onde houve redução das citocinas inflamatórias e os níveis de óxido nítrico não sofreram alterações. É digno de nota que, embora os PAMs exerçam atividade reguladora negativa sobre a maioria dos genes induzidos por LPS, o ToAP3 isoladamente foi capaz de induzir um leve aumento nos níveis de transcritos de *Tnfa*, *Il1b* e *Il10* quando comparado com as células não tratadas. Entretanto, esse aumento não refletiu na tradução de proteínas.

A redução dos níveis de transcritos de *Tnfa* e *Il1b* após as BMDCs serem tratadas com os peptídeos e LPS pode ser resultado da diminuição dos níveis de transcritos de *Nfkb* (Figura 2.8F), pois o mesmo está envolvido na transcrição de diversos genes ligados à resposta inflamatória, tais como, citocinas, fatores de crescimento, receptores de citocinas, proteínas de estresse, moléculas de adesão e proteínas de resposta imune (GHOSH; MAY; KOPP, 1998). Tongaonkar et al. (2015) investigando o PAM RTD-1 de Macaco *Rhesus* mostrou que este reduziu a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-8 em monócitos humanos e macrófagos THP-1 estimulados com LPS, e isso foi acompanhado por inibição da ativação de *Nfkb* e da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).

Outra possível explicação é que os níveis destes RNAm podem ser modulados por meio de mecanismos pós-transcricionais, como a estabilidade do RNAm. Esta estabilidade pode ser regulada pelo proteassoma, exossomo, microRNAs e o processamento do RNA (DELEAULT; SKINNER; BROOKS, 2008). MicroRNAs (miRNAs ou miR) são pequenas moléculas reguladoras de RNA, de aproximadamente 22 nucleotídeos e atuam em uma infinidade de processos biológicos, incluindo a regulação da resposta imune do hospedeiro tanto da resposta imune inata como adaptativa (VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006). Eles atuam como importantes reguladores da resposta imune, modulando a intensidade das respostas inflamatórias e sendo modulados em células imunes do hospedeiro submetidas a

diferentes estímulos. Dentre os microRNAs, alguns atuam na via de produção do TNF- α , modulando a intensidade da resposta imune, como o miR-146, o miR-155, o miR-125b e o miR-181 (DAN et al., 2015; NAHID; SATOH; CHAN, 2011). Normalmente, os miRNAs atuam no controle citoplasmático da expressão gênica, geralmente reprimindo a tradução ou promovendo a degradação de RNAm como, por exemplo, RNAm que codificam mediadores inflamatórios (por exemplo, TNF- α).

A expressão do miR-155 é aumentada na inflamação e diminui em situações anti-inflamatórias. Esta menor expressão é um aspecto importante do *feedback* negativo na regulação da resposta imune (O'CONNELL et al., 2007). Os níveis de miR-155 são modulados por vários ligantes do tipo Toll-like (TLR) dentro das vias dependentes do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), TRIF e JNK. Macrófagos estimulados com LPS induz uma regulação positiva do miR-155 e uma regulação negativa do miR-125b (TILI et al., 2007). Os resultados encontrados no estudo mostram que o tratamento com os PAMs ToAP3 ou ToAP4 reduziram os níveis de miR-155 em BMDCs quando foram estimuladas concomitantemente com LPS (Figura 2.9A). Entretanto não alteraram os dos níveis do miR-125b (Figura 2.9B). A diminuição nos níveis de miR-155 pode ser correlacionada com a menor ativação da via de sinalização do receptor TLR4. Coletivamente, esses dados sugerem um papel anti-inflamatório de ToAP3 e ToAP4, que provavelmente agem evitando a exacerbação da resposta inflamatória, por uma menor transcrição de genes associados à inflamação, que foi refletida na menor transcrição do miRNA-155.

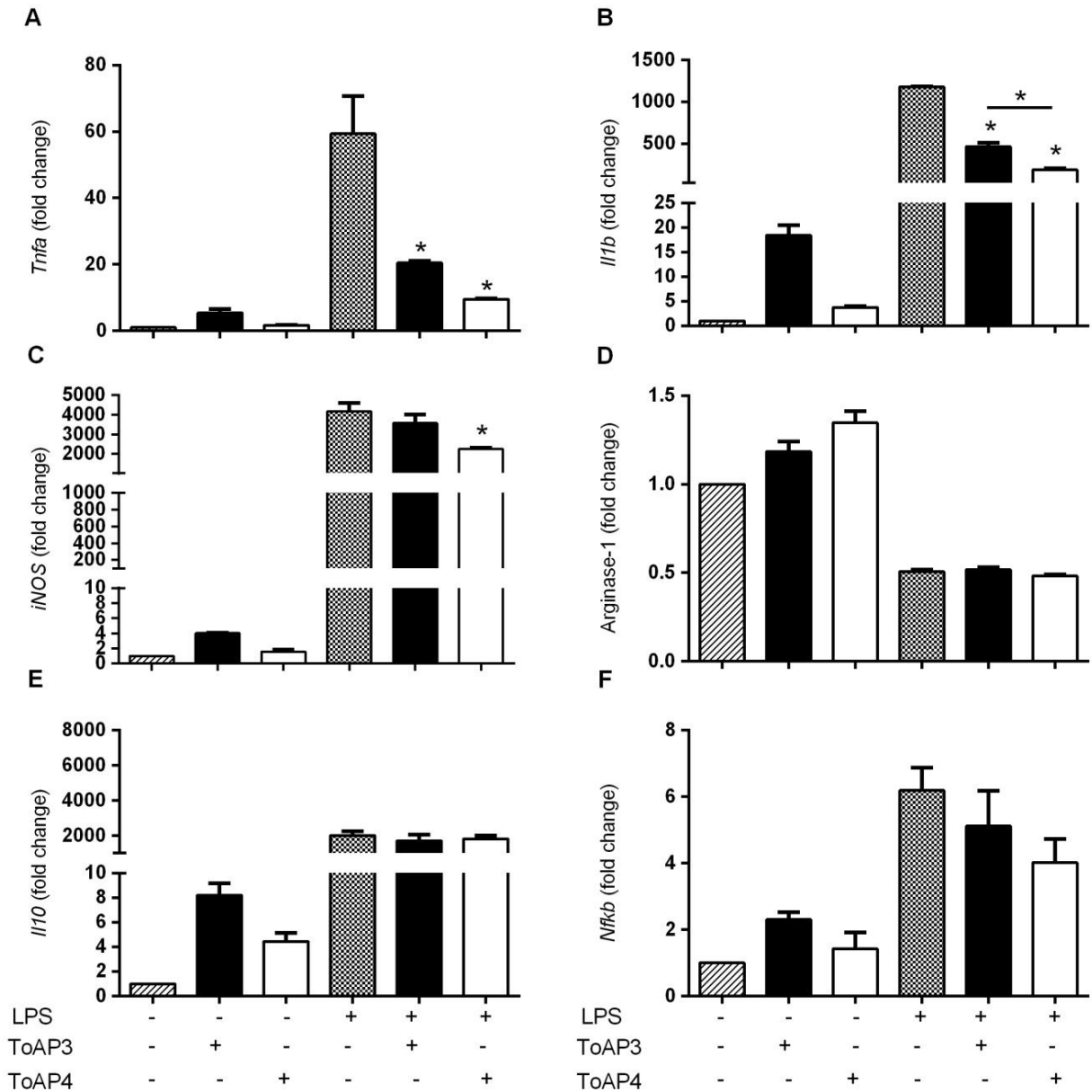


Figura 2.8. Níveis de transcritos dos genes *Tnfa* (A), *Il1b* (B), *iNOS* (C), *Arginase-1* (D), *Il10* (E) e *Nfkb* (F), em BMDCs, após 6 horas de interação com os PAMs ToAP3 e ToAP4 na concentração de 25 μ M ou com LPS (500 ng/mL) e PAMs. Os dados são expressos como a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. $^{\circ}$ P < 0,05 versus grupo de não tratado, *P < 0,05 versus grupo LPS, #P < 0,05 versus grupo de PAMs, one-way ANOVA e teste de Tukey.

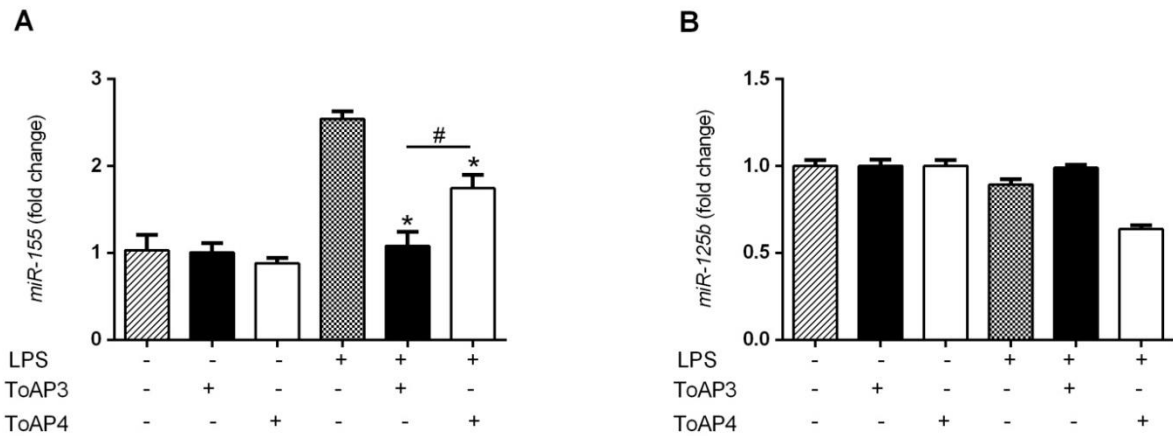


Figura 2.9. Efeito dos PAMs ToAP3 e ToAP4 na transcrição dos miRNAs induzidos por LPS em células dendríticas (BMDCs) derivadas de medula óssea murina. Os níveis de *miR-155* (A) e *miR-125b* (B) em BMDCs foram medidos 6 horas após a interação com LPS (500 ng / mL) e ToAP3 ou ToAP4 (25 μ M). Os dados são expressos como média \pm SEM de três experiências independentes realizadas em triplicado. * $p < 0,05$ versus grupo LPS, one-way ANOVA e teste de Tukey.

Para entender melhor se a modulação de TNF- α por estes PAMs ocorre antes ou depois da ativação de células por LPS, BMDMs e BMDCs foram tratadas com ToAP3 ou ToAP4 seis horas antes ou depois da adição de LPS. Quando estas células foram previamente tratadas com os ToAP3 ou ToAP4 à estimulação com LPS, os níveis de TNF- α foram reduzidos mais eficientemente (Figura 2.10A). No entanto, quando as células foram tratadas previamente com o LPS, somente as BMDCs foram capazes de reduzir os níveis das citocinas (Figura 2.10B). A explicação para esses resultados pode ser a interação entre os PAMs e o receptor TLR4.

Diante dessa possibilidade, investigou-se a participação desse receptor. Os resultados mostraram que macrófagos de camundongos deficientes para o receptor TLR4 previamente tratados com os PAMs ToAP3 ou ToAP4 não produziram TNF- α após estimulação com LPS ultrapuro, no entanto, eles liberaram baixos níveis dessa citocina quando estimulados com LPS, que pode interagir tanto com o receptor TLR4 quanto com TLR2 (Figura 2.10D), quando comparados com camundongos selvagens nas mesmas condições (Figura 2.10C). Os níveis do TNF- α nesta condição não foi alterado quando as células foram estimuladas ou não com os peptídeos. Esses resultados corroboram com a hipótese de que esses PAMs podem interagir com o receptor de LPS, induzindo baixos níveis de transcrição e pequena liberação proteica de TNF- α . Alguns estudos já demonstraram que os PAMs podem interagir diretamente com o LPS, interferindo na sua ligação aos receptores. Em camundongos, a β -defensina 2 murina (mDF2 β), um pequeno PAM produzido em resposta a infecções bacterianas do tecido da mucosa e da pele, também demonstrou ativar diretamente as células

dendríticas imaturas como um ligante endógeno para o receptor TLR4, resultando na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (BIRAGYN et al., 2002). Além disso, alguns PAMs (incluindo NDBPs) podem interagir com proteínas de membrana, tornando o LPS incapaz de se ligar ao seu receptor e, portanto, suprimindo a produção subsequente de citocinas (PUCCA et al., 2015; PUCCA et al., 2016).

Apesar dos resultados terem mostrado a possibilidade de interação com o receptor TLR4, a adição de ToAP3 e ToAP4 na cultura de BMDC após estimulação com LPS reduziu os níveis de TNF- α , embora em níveis diferentes, sugerindo que esses PAMs podem ter mais de um mecanismo de ação nas BMDCs.

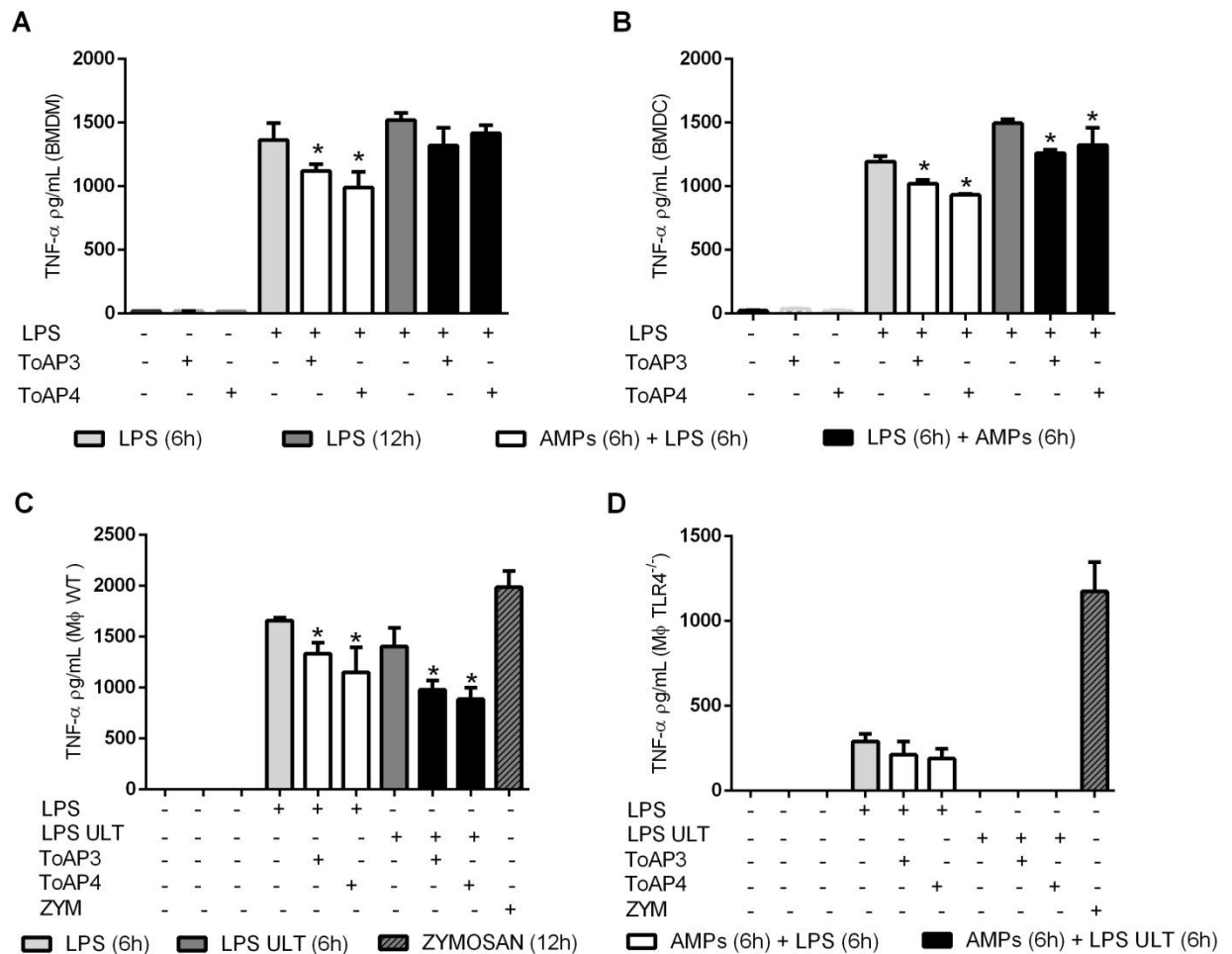


Figura 2.10. Efeito da adição dos PAMs ToAP3 e ToAP4 em momentos diferentes na produção de TNF- α induzida por LPS. Níveis de secreção de TNF- α em BMDMs (A) e BMDCs (B) na presença ou ausência dos PAMs ToAP3 ou ToAP4 (25 μ M) antes ou após 6 horas de interação com LPS (500 ng/mL). Níveis de secreção de TNF- α em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos WT (C) ou TLR4^{-/-} (D) na presença ou ausência dos PAMs ToAP3 ou ToAP4 (25 μ M) 6 horas antes da adição de LPS ou LPS ultrapuro ligante específico de TLR4 (LPS ULT) (ambos a 500 ng/mL). Além disso, o Zymosan (20 μ g/mL) foi usado como um estímulo independente de TLR4. Também foram obtidos dados de células cultivadas na presença de ToAP3 ou ToAP4, sem estimulação com LPS. Os dados são expressos como média \pm SEM de três experiências independentes realizadas em triplicata. * $p < 0,05$ versus aos grupos LPS ou LPS ULT, one-way ANOVA e teste de Tukey.

2.3.4. ToAP3 e ToAP4 podem modular diferencialmente a maturação e diferenciação da BMDC após estimulação com LPS

Uma etapa importante na transição da resposta imune inata para a adaptativa, e que depende da secreção das citocinas inflamatórias, é a maturação e diferenciação das células dendríticas. Neste processo, o fenótipo das DCs altera-se bastante, sendo que as células imaturas apresentam altos níveis de receptores para quimiocinas e baixos níveis de moléculas co-estimulatórias, tais como, CD80, CD86 e CD40 e as células maduras apresentam grande expressão de moléculas de MHC II e moléculas co-estimulatórias (CAUX et al., 1996).

O principal aspecto da maturação da BMDC é a expressão de proteínas de membrana associadas à apresentação de antígeno. Eles fornecem a sinalização de ativação completa para os linfócitos T. O primeiro sinal consiste na apresentação de antígeno do complexo MHC-peptídeo, o segundo sinal é a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86, e o terceiro sinal é por meio de citocinas secretadas pelas BMDC que irão modular a resposta das células T (SCHÜLKE, 2018). Neste contexto, foi avaliado se o ToAP3 e ToAP4 poderiam intervir no processo de maturação do BMDC e conseqüentemente na apresentação de antígenos. Para este ensaio, as BMDCs foram estimuladas com LPS concomitantemente com ToAP3 ou ToAP4 e, após 24 horas de interação, analisou-se a expressão de marcadores de maturação para células dendríticas (MHC-II, CD80) e diferenciação (CD86). O ToAP3 ou ToAP4 isolados não induziram aumento tanto da expressão de MHC-II como das moléculas co-estimulatórias. No entanto, ToAP4 potencializou o aumento da expressão de MHC-II induzida por LPS (Figura 2.11A) sem alterar os níveis de expressão de CD80 e CD86 (Figura 2.11B e C, respectivamente), o que sugere que o ToAP4 pode potencializar o processo de maturação das BMDCs. Além disso, o ToAP4 aumentou a secreção de IL-10 e, nesse contexto, a função das BMDCs pode mudar de fenótipo imunogênico para tolerogênico (LI; FLAVELL, 2008). As BMDCs tolerogênicas podem atuar induzindo apoptose ou anergia na ausência de sinais co-estimulatórios e induzem a diferenciação das células T regulatórias (MAHNKE; BEDKE; KARAKHANOVA, 2008), entre outras funções.

Por outro lado, o ToAP3 inibiu a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, após a estimulação com LPS, sem alterar os níveis de expressão de MHC-II e a produção de IL-10. Uma apresentação antigênica bem sucedida requer a expressão de ambos os membros da família B7, CD80 e CD86, que são os principais ligantes para o receptor de células T CD28, juntamente com o MHC-II, que estabilizam a sinapse imune e facilitam a apresentação antigênica. Na ausência dessas moléculas co-estimulatórias, a apresentação do

antígeno é frustrada e pode levar à anergia de células T e possivelmente à tolerância imunológica. Nesse contexto, a regulação do eixo CD80/86-CD28 tem sido extensamente explorada em terapias para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas (autoimunes) (SCHEINECKER, 2015). Tomados estes resultados em conjunto, pode-se sugerir que o ToAP4 é capaz de modular a maturação e a função de apresentação de antígenos das BMDCs, provavelmente aumentando as células T reguladoras, enquanto o ToAP3 é capaz de modular as BMDCs, aumentando as células T anérgicas.

Assim, o presente estudo mostrou que ToAP3 e ToAP4 poderiam inibir as respostas inflamatórias, diminuindo a produção de vários mediadores inflamatórios e modulando a ativação e maturação das células dendríticas. Essas observações mostram que estes PAMs são reguladores do processo inflamatório agudo, diminuindo a resposta imune adaptativa.

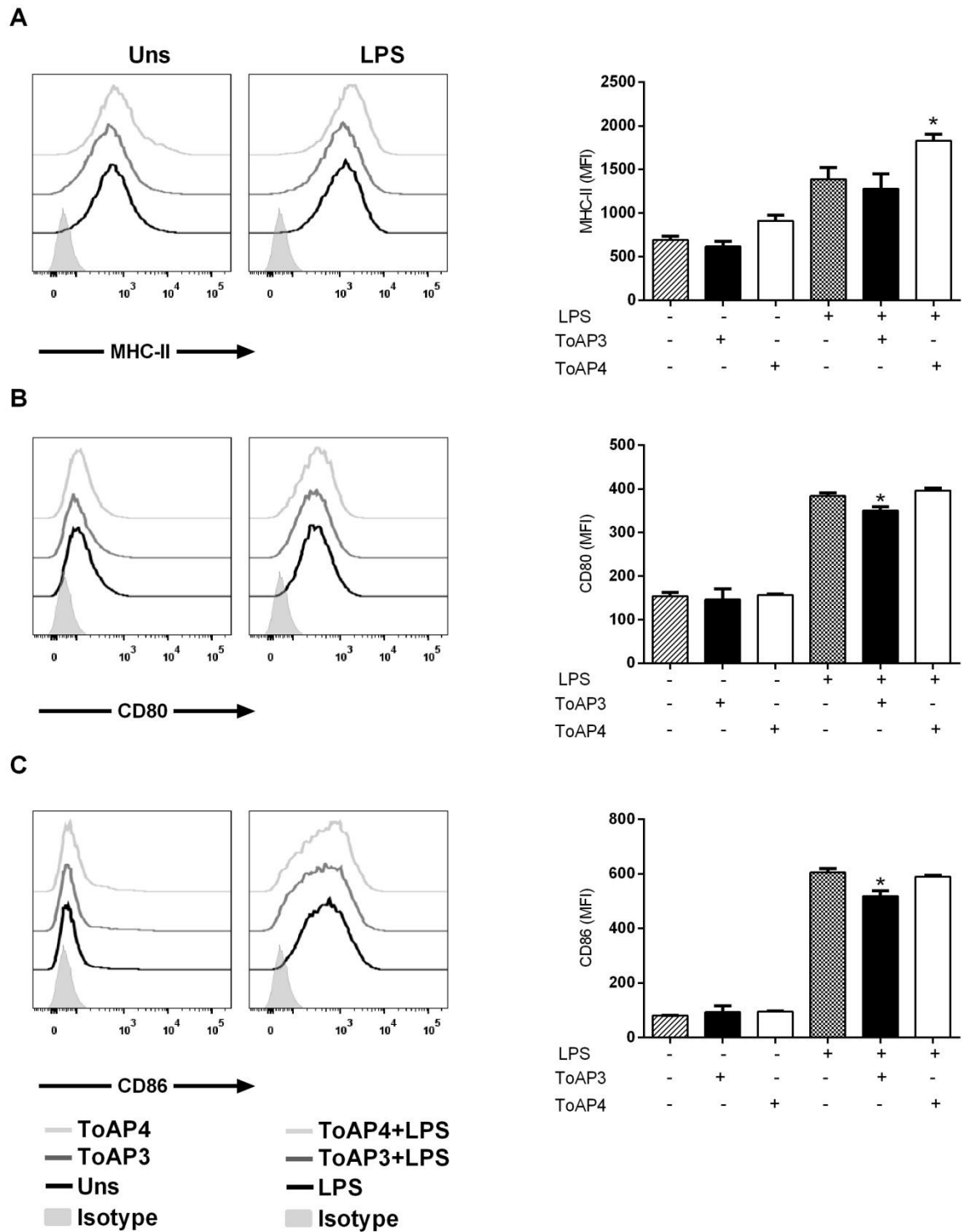


Figura 2.11. Fenotipagem para marcadores de ativação e diferenciação de BMDCs estimuladas com os PAMs ou PAMs e LPS. BMDCs foram estimuladas durante 24 horas com os PAMs (25 μ M) ou PAMs e LPS (1 μ g/mL). Posteriormente, foram marcadas com anticorpos para a avaliação dos marcadores MHC II, CD80 e CD86. A expressão de MHC-II (A), CD80 (B) e CD86 (C) está representada na forma de histograma (painéis) e como mediana de intensidade de fluorescência (MFI) (gráfico de barras). Os dados são expressos como a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ versus grupo LPS, one-way ANOVA e teste de Tukey.

CAPÍTULO III

Avaliação da atividade microbica dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI obtidos de vespas sociais

3.1. Contextualização do problema

Como descrito no capítulo I, a incidência de infecções fúngicas vem aumentando nas últimas décadas, enquanto o número de classes de drogas antifúngicas disponíveis no mercado permanece o mesmo. A resistência de algumas espécies de fungos às terapias disponíveis, associada à alta toxicidade desses fármacos, torna a busca de novas escolhas terapêuticas imprescindível, dando ênfase nas drogas cuja atividade farmacológica sejam mais eficientes e menos tóxicas (HANCOCK; LEHRER, 1998; HANCOCK; PATRZYKAT, 2002; LEVY; MARSHALL, 2004).

Nesse cenário, existe uma necessidade concreta por novos antifúngicos, e os PAMs têm se mostrado promissores (HANCOCK; SAHL, 2006), considerando suas baixas massas moleculares e menor potencial de induzir resistência (CHEN et al., 2019). Os PAMs são uma classe potencial de drogas antimicrobianas consistindo de moléculas multifuncionais evolutivamente conservadas, com propriedades microbicidas e imunomoduladoras sendo parte da resposta imune inata de diversos organismos (SILVA et al., 2016). Esses peptídeos são encontrados em diversos organismos animais, tais como a vespa social *Polybia paulista* (Vespoidea, Vespidae, Polistinae), sendo que o peptídeo Polybia-MPII o principal constituinte dos mastoparanos da peçonha desta. Outra vespa social, a *Agelaia pallipes pallipes* também possui um importante peptídeo mastoparano na composição da sua peçonha, o Agelaia-MPI. Existe uma alta similaridade entre o Agelaia-MPI e o Polybia-MPII (MENDES et al., 2004). Ambos os peptídeos, Agelaia-MPI e Polybia-MPII, foram eficientes em inibir a formação de biofilme pelas bactérias *A. baumannii* degradando a sua parede celular (DAS NEVES et al., 2019). Das Neves et al. (2016) mostraram que o Polydim-I, isolado da vespa *Polybia dimorpha*, teve ação contra o *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense* reduzindo a carga bacteriana entre 40 a 50%. Neste sentido, o uso de PAMs, obtidas de vespas e que apresentam atividades microbicidas, acabam por ser uma ótima ferramenta para o desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas (NARAYANA; CHEN, 2015). O peptídeo Agelaia-MPI não teve sua atividade antifúngica testada até o momento e o peptídeo Polybia-MPII apresentou atividade direta, *in vitro*, tanto para a *C. albicans* como para o *C. neoformans* (Silva et al., 2017).

Este capítulo teve como objetivo verificar a atividade antifúngica dos peptídeos obtidos da peçonha de vespas sociais Agelaia-MPI e Polybia-MPII contra o fungo *C. neoformans*, por meio de ensaios *in vitro*, que verificaram as concentrações eficazes, o

possível sinergismo, o mecanismo de ação e sua ação na formação de biofilme. Para os ensaios *in vivo* foi utilizado o modelo de cryptococose em *Galleria mellonella*.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Linhagem e condições de crescimento fúngico

Neste estudo foram utilizadas leveduras do fungo patogênico humano *C. neoformans* (*var. grubii* sorotipo A, H99). As leveduras foram mantidas em estoque de glicerol 35% a -80 °C e descongeladas antes da realização de cada ensaio. Utilizando uma alça de inoculação estéril, foi realizado o isolamento de colônias em placas em meio ágar Sabouraud por 48 horas em estufa a 30 °C. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de caldo Sabouraud por 24 horas a 37 °C, sob agitação a 120 rpm. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos e lavadas 3 vezes em tampão fosfato salina (PBS-1x). A contagem do número de leveduras foi realizada utilizando câmara de Neubauer, ajustando a concentração de cada inóculo (células/mL) de acordo com cada condição experimental.

3.2.2. Análise de síntese e espectrometria de massa dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI

A análise de síntese e espectrometria de massa dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI foi realizada conforme a metodologia descrita no item 2.2.1.

3.2.3. Hemólise e a viabilidade celular do Polybia-MPII e Agelaia-MPI

A avaliação da hemólise e da viabilidade celular em células THP-1 tratadas com os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI foi determinada conforme a metodologia descrita nos itens 2.2.3 e 2.2.4.

3.2.4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos de escorpião e vespa

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços estéreis utilizando a técnica de microdiluição seriada em razão de 2, conforme descrito no protocolo M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com modificações.

A Agelaia-MPI e a Polybia-MPII foram diluídos com água estéril em placas de 96 poços de uma forma que cada poço continha 50 μL de uma solução de PAM 2X da concentração final desejada. A concentração final de cada PAM variou de 0,78 a 100 μM . Após o crescimento fúngico, uma concentração de 2×10^4 céls/mL foi ajustada em meio RPMI 2X (RPMI-1640 suplementado com MOPS 0,165 M) e 50 μL desse inóculo foi adicionado aos poços da placa já contendo os PAMs previamente diluídos, totalizando um volume final de 100 μL em cada poço. Foram utilizados como controle positivo a anfotericina B, na qual a concentração variou de 17 a 0,005 μM , controles negativo o meio de cultura sem a presença dos peptídeos e fungos e controle de crescimento contendo o meio de cultura sem os peptídeos mais com o inóculo fúngico.

As placas foram seladas e incubadas no aparelho EPOCH2 (Biotek) com agitação a 200 rpm a 37 °C durante 48 h medindo, a cada 30 min, a densidade óptica (DO) a 600 nm. Após a incubação, 10 μL do reagente de viabilidade celular AlamarBlue foi adicionado a cada poço e incubado sob as mesmas condições durante 24 horas. O Reagente AlamarBlue é uma solução baseada em resazurina pronta para uso, que funciona como um indicador de viabilidade celular, usando o poder redutor de células vivas para medir quantitativamente a viabilidade. A resazurina, o ingrediente ativo do reagente AlamarBlue, é um composto permeável às células, não tóxico, de cor azul e praticamente não fluorescente. Ao entrar nas células vivas, a resazurina é reduzida a resorufina, um composto que é vermelho e altamente fluorescente (REPP; MENOR; PETTIT, 2007). Em seguida foi realizada a leitura de fluorescência a 585 nm em leitor de placas SpectraMax® M2 (comprimento de onda de excitação: 555 nm; comprimento de onda de emissão: 585 nm). A CMI foi definida como a concentração mais baixa de PAM que inibiu completamente o crescimento fúngico no final do período de incubação.

3.2.5. Ensaio de *checkerboard*

A avaliação da possível ação sinérgica entre PAMs foi determinada a partir da técnica de tabuleiro de xadrez (*checkerboard*), em que diferentes combinações de concentrações de fármacos são combinadas e suas atividades testadas na viabilidade de um micro-organismo (RIBEIRO; BAQUIR; HANCOCK, 2015). As concentrações utilizadas para cada PAM foi previamente determinadas pela CMI.

Inicialmente, a Agelaia-MPI ou a Polybia-MPII foram distribuídas em uma placa de 96 poços para que em cada poço houvesse diferentes combinações de concentrações. As maiores concentrações foram as obtidas na determinação da CMI e, a partir delas, concentrações menores foram realizadas. Para isso, uma diluição seriada da Agelaia-MPI foi realizada em uma direção da placa de 96 poços (Colunas 1 a 6) de forma que em cada poço havia um volume de 50 µL com 4X da concentração final desejada. Uma segunda diluição seriada foi realizada com a Polybia-MPII na mesma placa, mas em uma direção diferente (Linhas A a F) com uma concentração necessária para que, após essa diluição, a concentração seja 2X da desejada com um volume de 50 µL em cada poço. Após as duas diluições, em cada poço continham os dois PAMs com concentração 2X e diferentes combinações de concentração.

Após a diluição dos PAMs na placa, 50 µL de uma suspensão de *C. neoformans* na concentração de 2×10^4 foi adicionado a cada poço e a placa incubada no aparelho EPOCH2 (Biotek) por 48 horas a 37 °C com agitação a 200 rpm medindo a cada 30 min a densidade óptica (DO) a 600 nm. Após o ensaio, 10 µL do reagente de viabilidade celular AlamarBlue foi adicionado e incubado sob as mesmas condições durante 24 horas, em seguida foi realizada a leitura de fluorescência a 585 nm em leitor de placas SpectraMax® M2 (comprimento de onda de excitação: 555 nm; comprimento de onda de emissão: 585 nm).

As interações observadas foram avaliadas pela equação do índice de concentração inibitória fracionária (FIC, do inglês *Fractional Inhibitory Concentration*) $FIC = \sum FIC = FICa + FICb$, onde $FICa = CMIa \text{ combinado} / CMIa \text{ isolado}$ e $FICb = CMIb \text{ combinado} / CMIb \text{ isolado}$. O significado dos valores de FIC obtidos com as diferentes combinações de fármacos são $FIC \leq 0,5$: ação sinérgica; $0,5 < FIC < 1,0$: ação aditiva, $1,0 < FIC \leq 2,0$: ação indiferente; $FIC > 2,0$: ação antagonista.

3.2.6. Avaliação da permeabilidade da membrana

A concentração de fungos de 2×10^6 céls/mL foi ajustada, conforme descrito anteriormente, e 100 μ L desse inóculo foi adicionado a 100 μ L de PAMs, totalizando um volume final de 200 μ L em cada tubo. A Agelaia-MPI e a Polybia-MPII foram previamente diluídos com água estéril de forma que cada eppendorfs continha 100 μ L de uma solução de PAM 2X da concentração final desejada. As concentrações finais utilizadas para o Polybia-MPII foram de 100 e 50 μ M, e para o Agelaia-MPI de 50 e 25 μ M, sendo que estas concentrações foram previamente definidas como a CMI para este inóculo fúngico (1×10^6 céls/mL). Como controle negativo foi utilizado o fungo viável e, como controle positivo, o fungo fixado com etanol a 70% durante 30 minutos.

As amostras foram incubadas em um shaker sob agitação 150 rpm por 2 h a 37 °C. Após 90 minutos de incubação, foi adicionado o iodeto de propídio (IP) na concentração final de 1 μ g/mL, ao abrigo da luz. Após o tratamento, as amostras foram adquiridas em citometro de fluxo BDFACSVerse. A análise (mínimo de 20.000 eventos) foi realizada utilizando o software FlowJo X, após a seleção de células de *C. neoformans* (e exclusão de restos celulares) com base nos parâmetros de tamanho e granulosidade, e posterior seleção de células solitárias (os grumos celulares foram excluídos) com base em um gráfico FSC-W vs FSC-H.

3.2.7. Microscopia de força atômica

Para a análise dos mecanismos de interação dos PAM com as células, a microscopia de força atômica (MFA) foi utilizada na Universidade Federal do Piauí (UFPI). A CMI do Polybia-MPII, e Agelaia-MPI, para o inóculo de 1×10^4 cél/mL, foi determinada como descrito anteriormente (item 3.2.4). Em seguida, 20 μ l de amostras de leveduras tratadas ou não foram depositadas em vidro limpo e incubadas a 35 ± 2 °C por 20 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram então suavemente enxaguadas com água deionizada contendo tween 20 (0,05%) e a seguir secas sob as mesmas condições descritas anteriormente. As duas amostras foram preparadas ao mesmo tempo e expostas às mesmas condições. O efeito dos PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI em células de *C. neoformans* foi verificado com o microscópio TT-AFM da AFM Workshop (EUA) em modo de vibração usando cantilevers de silício (AppNano, EUA) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 353 kHz. As imagens foram analisadas usando o software Gwyddion 2.40.

Para a análise da nanorugosidade foram utilizados os parâmetros de rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rms). Como o Ra é um valor médio as vezes pode não dar indicação direta do estado da superfície, necessitando do Rms que leva em consideração o desvio dos picos. Dessa forma, representam parâmetros que se completam e são necessários para a análise (SCHIAVONE et al., 2016). O tamanho dos microrganismos e a nanorugosidade média foi aferido por meio das imagens obtidas e a diferença entre as médias de tamanho foi analisada por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de *Tukey*, com auxílio do programa *GraphPad Prism*® 6.0.

3.2.8. Biofilme

C. neoformans cultivados em meio mínimo (glicose (15 mM - Vetec), sulfato de magnésio (10 mM - Isofar), fosfato monopotássico (29.4 mM - Biotec), glicina (13 mM - Invitrogen) e tiamina (3 µM - Vetec), ajustado com hidróxido de potássio (2N) para o pH 5,5), na concentração de 1×10^7 células/mL foi adicionado a cada poço de uma placa de 96 poços, em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 48 h. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS (1x), para remoção de células não aderidas. Posteriormente, com o biofilme formado, foram adicionados apenas meio mínimo, Anfotericina B (17,3 a 1,0 µM), e os PAMs Polybia-MPII (400 a 12,5 µM), e Agelaia-MPI (200 a 6,2 µM). A placa foi incubada novamente a 37 °C por 24 h, e após este período foi adicionado 10 µL do reagente de viabilidade celular AlamarBlue. A placa foi incubada novamente sob as mesmas condições durante 24 horas adicionais, e em seguida foi realizada a leitura de fluorescência a 585 nm em leitor de placas SpectraMax® M2.

3.2.9. Infecção e tratamento em *Galleria mellonella*

A *Galleria mellonella* foi mantida e cultivada no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília - UnB a 30 °C. Larvas entre 250 a 300 mg foram selecionadas aleatoriamente para compor os grupos. Antes de cada ensaio, a região pró-perna foi limpa com etanol a 70% e para a inoculação uma seringa Hamilton foi usada para injetar 10 µL de inóculo ou solução de tratamento por meio da última proleg inferior esquerda de cada larva (IGNASIAK; MAXWELL, 2017). O grupo controles recebeu a inoculação de tampão PBS. As larvas foram incubadas a 37 °C e a morte foi monitorada diariamente por 7 dias por inspeção visual com base na falta de movimentação quando estimuladas ao toque. Cada grupo

foi avaliado pelo menos três vezes com 16 larvas para cada condição e as curvas de sobrevivência foram geradas usando o software Graphpad Prism 6.0. Inicialmente foi aplicado a Anfotericina-B (2 mg/kg), Polybia-MPII ou Agelaia-MPI (5 e 10 mg/kg) diluídos em tampão PBS para avaliar a toxicidade. A seguir foi realizado os ensaios para definir a concentração do inóculo fúngico de *C. neoformans* capaz de matar as larvas dentro de 7 dias (5×10^6 , 1×10^6 e 5×10^5 células/larvas) a 37 °C. O inóculo fúngico definido foi de 1×10^6 foi, e a seguir foi realizada a infecção fúngica e 1 hora depois as larvas foram tratadas com: Anfotericina B (2 mg/kg) e Polybia-MPII ou Agelaia-MPI em duas concentrações diferentes (5 e 10 mg/kg).

3.2.10. Análise estatística

Os experimentos *in vitro* foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de *Tukey*, sendo os dados obtidos nesses experimentos expressos como a média \pm SEM de um experimento representativo de três experimentos conduzidos em triplicatas. Para o experimento *in vivo* os dados obtidos são expressos como a média \pm SEM de um experimento, analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste *Log-Rank*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0. Dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

3.3. Resultados e discussão

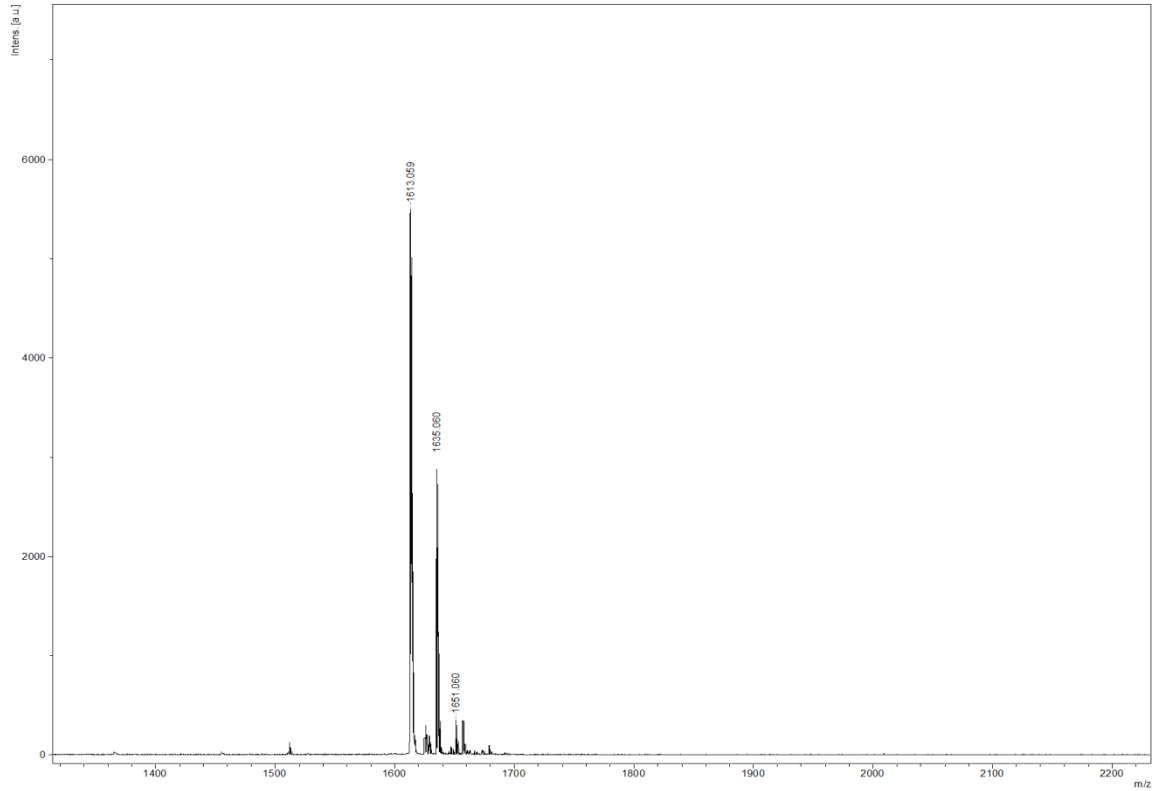
3.3.1. Espectros de massa e sequenciamento dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI

O espectro de fragmentação (MS/MS) dos peptídeos Agelaia-MPI e Polybia-MPII foi obtido a partir da massa monoisotópica $[M + H]^+ = 1613,0$ Da e $[M + H]^+ = 1566,9$ Da e estão apresentados na figura 3.1A e 3.2A, respectivamente. A interpretação deste espectro permitiu identificar os íons correspondentes às séries do tipo b e y relacionadas com a seguinte estrutura INWLKLGKVIDAL-NH₂ (Polybia-MPII) e INWLKLGKAIIDAL-NH₂ (Agelaia-MPI). Íons de baixa massa (íons) corroboram a presença da maioria dos aminoácidos presentes na estrutura do PAM. Os íons 1596.7 (Polybia-MPII) e 1529.9 (Agelaia-MPI) sugerem que os PAMs são amidados na posição C-terminal (Figura 3.1B e 3.2B, respectivamente).

3.3.2. Potencial citotóxico e hemolítico dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI

Nossos dados demonstraram que os PAMs aqui avaliados são tóxicos em concentrações iguais ou superiores a 50 μ M. Dessa forma, neste estudo foi utilizado a concentração de 25 μ M para o Polybia-MPII e 12,5 μ M para o Agelaia-MPI (Figura 3.3).

A



B

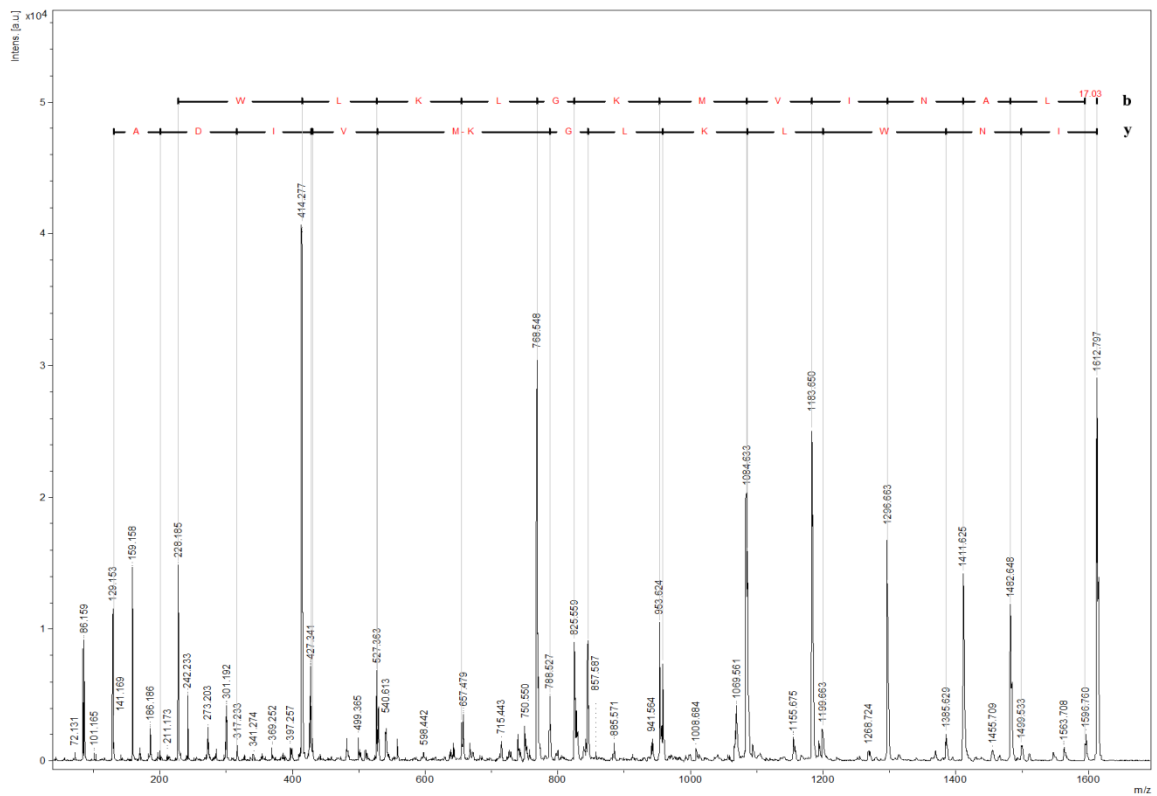
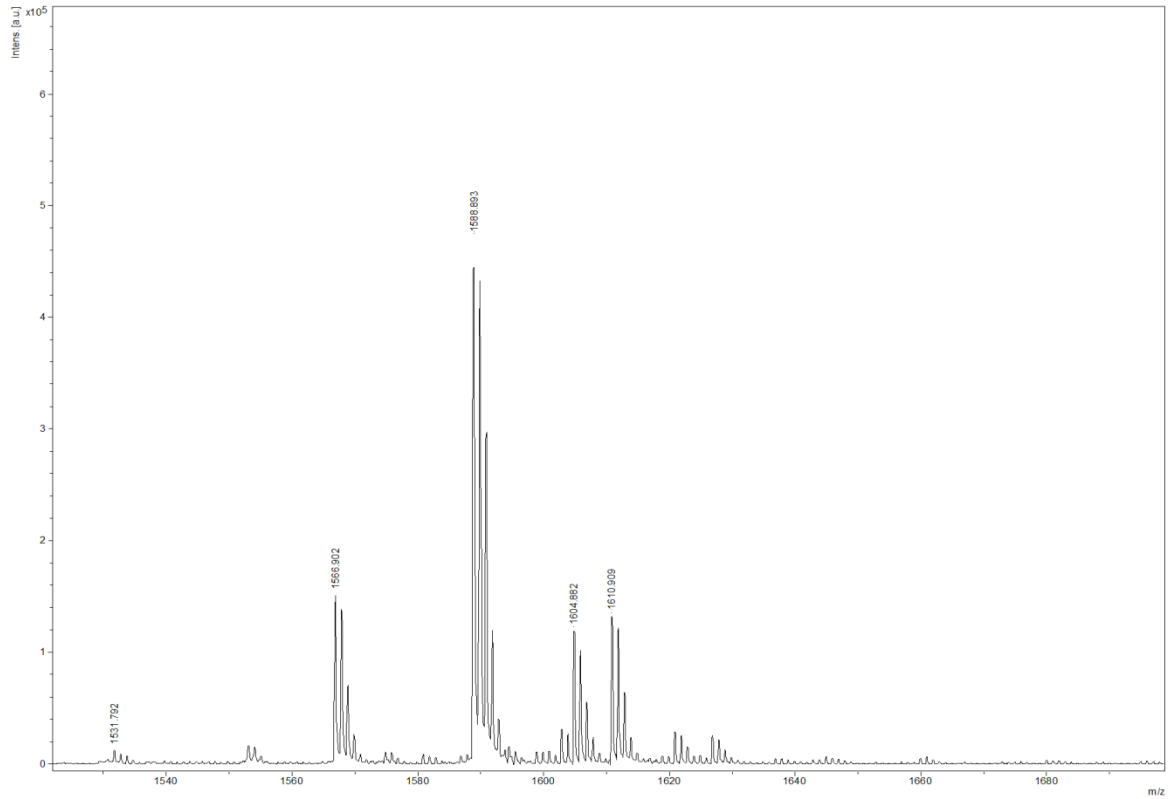


Figura 3.1. Espectro de massa e sequenciamento do PAM Polybia-MPII. Espectro de massa monoisotópico (A). Espectro de fragmentação no modo LIFT (MS/MS) obtido a partir do íon $[M + H]^+ = 1613,0$ Da (B). As séries de íons b e y são escritas acima com os resíduos representados por letras.

A



B

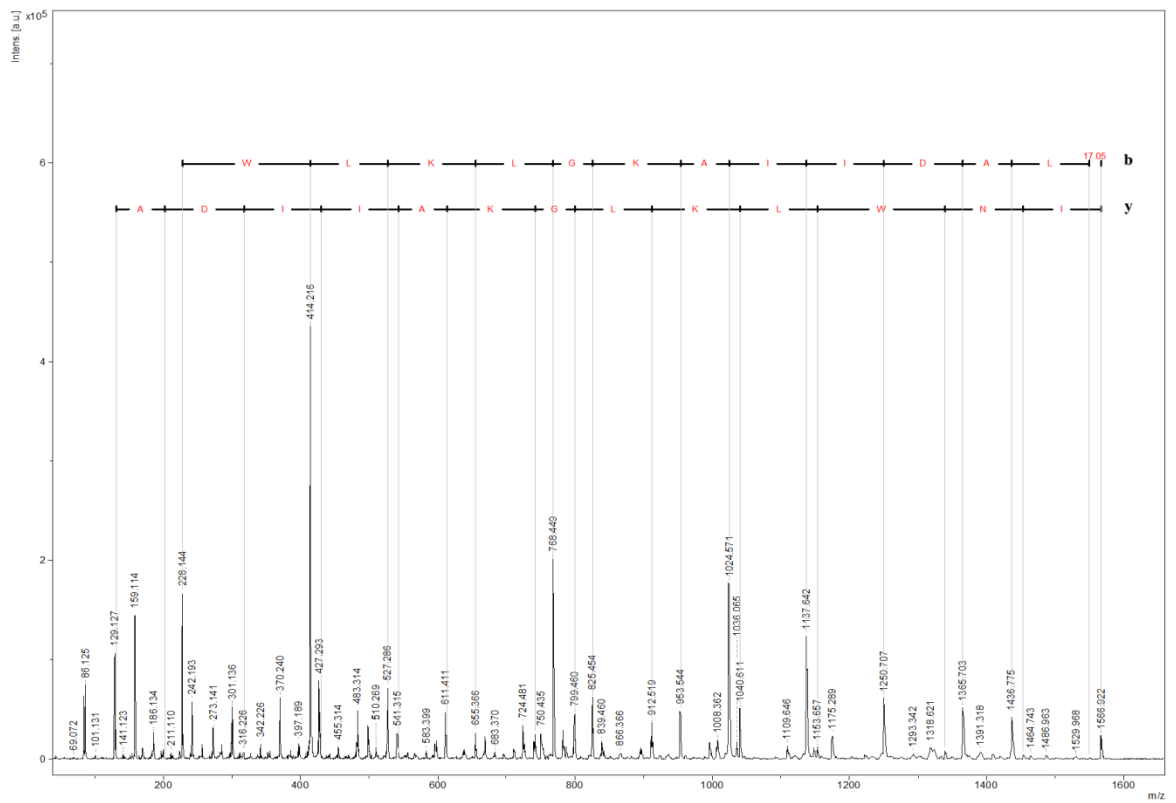


Figura 3.2. Espectro de massa e sequenciamento do PAM Agelaila-MPI. Espectro de massa monoisotópico (A). Espectro de fragmentação no modo LIFT (MS/MS) obtido a partir do íon $[M + H]^+ = 1566,9$ Da (B). As séries de íons b e y são escritas acima com os resíduos representados por letras.

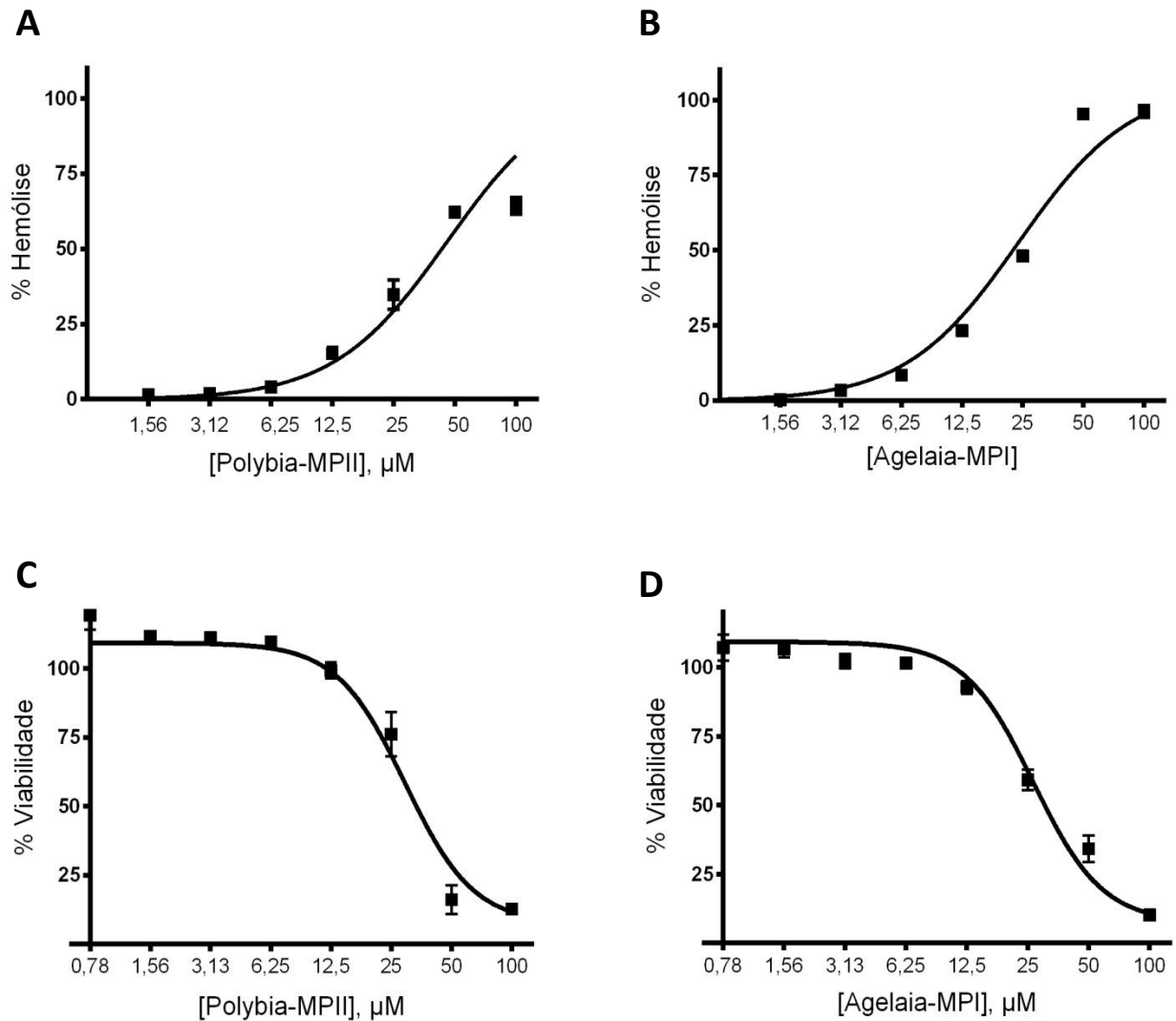


Figura 3.3. Atividade hemolítica e efeitos citotóxicos dos PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI em monócitos. Porcentagem de lise de eritrócitos humanos tratados por 1 h com os PAMs Polybia-MPII (A) e Agelaia-MPI (B) (0,78–100 μM). Os monócitos THP1 foram expostos a concentrações dos PAMs Polybia-MPII (C) e Agelaia-MPI (D) (0,78–100 μM) por 24 h. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

3.3.3. Concentração mínima inibitória (CMI) e *Chekerboard*

Apesar dos muitos avanços na terapêutica antifúngica, as infecções por fungos continuam a afetar muitos indivíduos e, portanto, respondem por uma parcela de gastos significativo no sistema de saúde e na economia (BROWN et al., 2012b). Meningites e meningoencefalites, causadas por *C. neoformans*, apresentam alta morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, especialmente em pacientes com AIDS (PARK et al., 2009). Este prognóstico tão ruim é, em parte, devido ao número extremamente limitado de agentes antifúngicos clinicamente disponíveis. Atualmente, o tratamento clínico da criptococose depende da anfotericina B e dos antifúngicos azólicos. Como terapia de primeira

linha para o tratamento da meningite criptocócica, as diretrizes atuais recomendam duas semanas de anfotericina B por via intravenosa em combinação com flucitosina (PERFECT et al., 2013). No entanto, esse regime permanece amplamente indisponível na maior parte do mundo devido ao alto custo da flucitosina (RAJASINGHAM et al., 2017). Além disso, os fármacos azóis não são tão eficazes quanto a anfotericina B, porém, está não é bem tolerada, apresentando efeitos colaterais graves quando administrada a longo prazo (LANIADO-LABORIN; CABRALES-VARGAS, 2009). Diante deste cenário, a busca por novas moléculas como os peptídeos antimicrobianos é de fundamental importância para tentar superar esse quadro.

Neste contexto, os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI foram avaliados quando a sua capacidade antifúngica frente ao fungo *C. neoformans*. Também foram incluídos os ToAP3 e ToAP4, cuja concentração já havia sido determinada anteriormente em outro estudo (GUILHERMINE et al., 2016). Foi observado que somente o Polybia-MPII e Agelaia-MPI se mostraram eficazes na inibição do crescimento fúngico (Tabela 3.1). Os dados obtidos para o ToAP3 e ToAP4 confirmaram os dados da literatura. O Agelaia-MPI apresentou uma concentração menor (CMI de 12,5 μM), quando comparado com o Polybia-MPII (CMI de 25 μM) para a mesma atividade. Estes resultados corroboram com os encontrados por Silva et al. (2017), que obteve um EC_{90} de 22.7 μM (15.36–33.53) quando a atividade do Polybia-MPII foi avaliado contra o *C. neoformans*. A melhor atividade antimicrobiana do Agelaia-MPI quando comparado com o Polybia-MPII também foi descrita para a bactéria *Actinobacter baumannii* (DAS NEVES et al., 2019). O peptídeo Protonectina, isolada do veneno da vespa social *Agelaia pallipes*, também apresentou atividade antifúngica contra *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* com os CMI de 32 μM , 32 μM , 128 μM , 8 μM e 32 μM , respectivamente, confirmando a atividade antifúngica dos peptídeos obtidos de vespas sociais (WANG et al. 2015).

Tabela 3.1. Concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos ToAP3, ToAP4, Polybia-MPII e Agelaia-MPI avaliados contra o fungo *C. neoformans*.

PAMs	CMI (μM)
ToAP3	< 100
ToAP4	< 100
Polybia-MPII	25
Agelaia-MPI	12,5
Anfotericina B	2,16

* Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Uma das formas para aumentar a atividade antimicrobiana dos peptídeos, sem aumentar necessariamente sua concentração, é o seu uso combinado. Está é uma alternativa terapêutica frente ao surgimento de patógenos cada vez mais resistentes, capazes de sobreviverem em ambientes com altas concentrações de antimicrobianos. Além disso, com a diminuição da concentração dos antimicrobianos, estes podem reduzir seus efeitos tóxicos (KOPPEN et al., 2018).

Outra vantagem observada com o uso dessa metodologia é a possibilidade de combinar peptídeos que apresentam atividade imunomodulatória com os antifúngicos. Neste sentido, os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI foram avaliados quando a sua capacidade em exercer efeitos antifúngicos quando combinados com os peptídeos ToAP3 e ToAP4 pelo método de *checkerboard*. Os resultados encontrados mostraram que apenas a combinação entre o Polybia-MPII e Agelaia-MP mostrou efeito aditivo contra o fungo *C. neoformans* (Tabela 3.2). Estes dados demonstram que, a combinação gerou uma soma dos efeitos antifúngicos dos peptídeos. A maioria dos estudos descrevem efeitos aditivos ou sinérgicos entre peptídeos e fármacos disponíveis no mercado, avaliando sua atividade bactericida. Lin et al. (2012) verificou que a combinação do Mastoparan-AF, um peptídeo isolado do veneno vespa *affinis*, com diferentes fármacos (ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina, neomicina e tetraciclina) apresentou atividades sinérgicas e aditivas frente as diferentes linhagens da *Escherichia coli* (*E. coli*). Quando combinado o Mastoparan-AF com o cloranfenicol observou-se um efeito sinérgico com um FIC de 0.313 frente a linhagem de *E. coli* ATCC 25922. Liu et al., (2017) mostrou que os peptídeos sintéticos J-AA e J-AR, baseados no peptídeos Anoplin da vespa *Anoplius samariensis*, quando combinado com a penicilina apresentou um efeito aditivo contra a bactéria *Staphylococcus aureus* 725, apresentando um FIC de 0,625 e 0,75, respectivamente.

Tabela 3.2. Avaliação da atividade combinada dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI com os peptídeos ToAP3 e ToAP4.

PAM A	PAM B	FICa	FICb	Σ FIC	Ação
Polybia-MPII	ToAP3	0,5	0,5	1,0	Indiferente
Polybia-MPII	ToAP4	0,5	0,5	1,0	Indiferente
Polybia-MPII	Agelaia-MP	0,5	0,12	0,62	Aditivo
Agelaia-MP	ToAP3	0,5	0,5	1,0	Indiferente
Agelaia-MP	ToAP4	0,5	0,5	1,0	Indiferente

* Valores de FIC: <0,5= sinergismo; 0,5 < FIC <1,0 = aditivo; 1,0 < FIC \leq 2,0 = indiferente; >2 = antagonismo

**FIC calculados com médias de triplicatas independentes

3.3.4. Avaliação da permeabilidade de membrana fúngica após tratamento com Polybia-MPII e Agelaia-MPI

Para avaliar o possível mecanismo de ação dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI contra o fungo *C. neoformans*, foi realizado o teste de permeabilidade de membrana. Os resultados mostram que o tratamento do *C. neoformans* com o Agelaia-MPI, nas concentrações de 50 e 25 μ M, aumentou o percentual de células permeáveis ao iodeto de propídeo em 54% e 36%, respectivamente. O Polybia-MPII, nas concentrações de 100 e 50 μ M, apresentou um aumento de 66% e 36%, respectivamente. Estes dados indicam que houve dano na membrana do fungo, e esse dano varia com a dose dos peptídeos (Figura 3.4). Os resultados encontrados corroboram com a literatura, uma vez que maioria dos peptídeos descritos apresentou como mecanismo efetor o ataque à membranas dos microrganismo (YANG et al., 2001). Lyu et al. (2016), também demonstrou que o tratamento de *C. albicans* com o peptídeo RI18, um derivados do peptídeo mieloide antibacteriano porcino (PMAP-36), resultou no aumento do percentual de células permeáveis ao iodeto de propídeo de 9,5% (8 μ M), 93,5% (16 μ M) e 99,0% (32 μ M), indicando que o RI18 foi capaz de danificar a membrana celular também de maneira dose dependente.

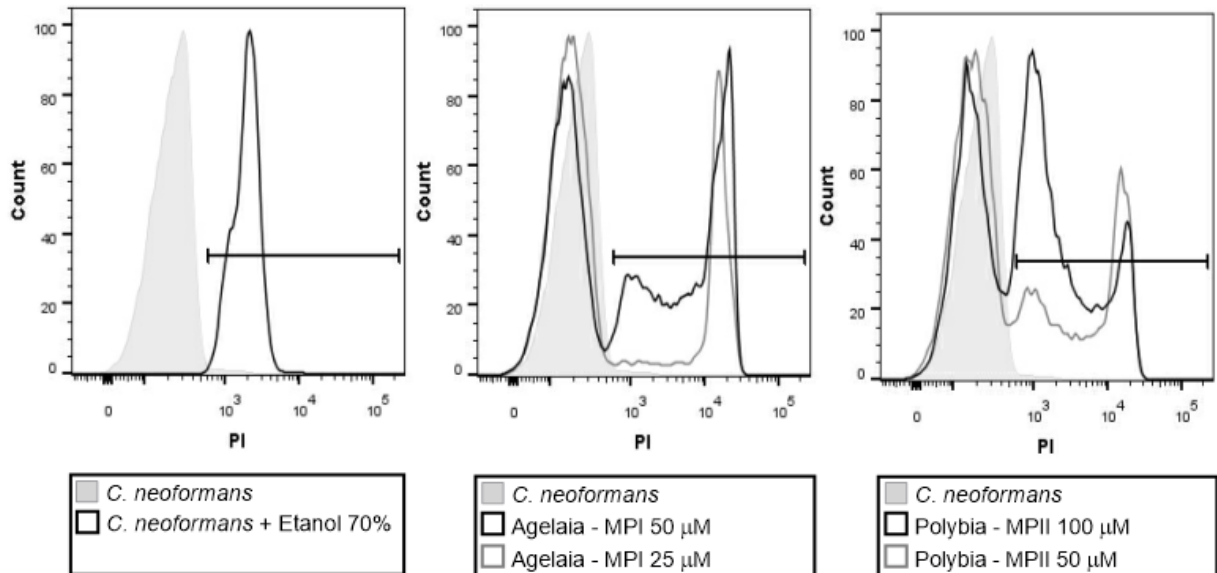


Figura 3.4. Análise da integridade da membrana de *C. neoformans* tratados com Agelaia-MPI (50 e 25 μM) e Polybia-MPII (100 e 50 μM) por 1 h e 30 min sob agitação, seguida da adição de iodeto de propídio (PI, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos. Foram utilizados como controle, fungo viável e não viável (tratado com etanol 70%). A intensidade de fluorescência celular do PI após os tratamento foi analisada por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

3.3.5. Microscopia de força atômica

Os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI alteraram a permeabilidade da membrana de *C. neoformans*, e a seguir foi verificado se esses peptídeos alteravam a morfologia da célula fúngica, por meio da microscopia de força atômica (MFA). Ao analisar as imagens de MFA, em modo contato intermitente, verificou-se que os microrganismos tratados com os peptídeos analisados apresentaram poucas alterações morfológicas (Figura 3.5). Entretanto, houve uma diminuição de tamanho ou perda de volume celular após o tratamento (Figura 3.6), sendo que o Polybia-MPII teve uma redução mais significativa do que o Agelaia-MPI, em relação ao controle. Nas imagens topográficas das leveduras dos fungos tratados, ainda é possível observar a presença da cápsula do *C. neoformans* (Figura 3.7).

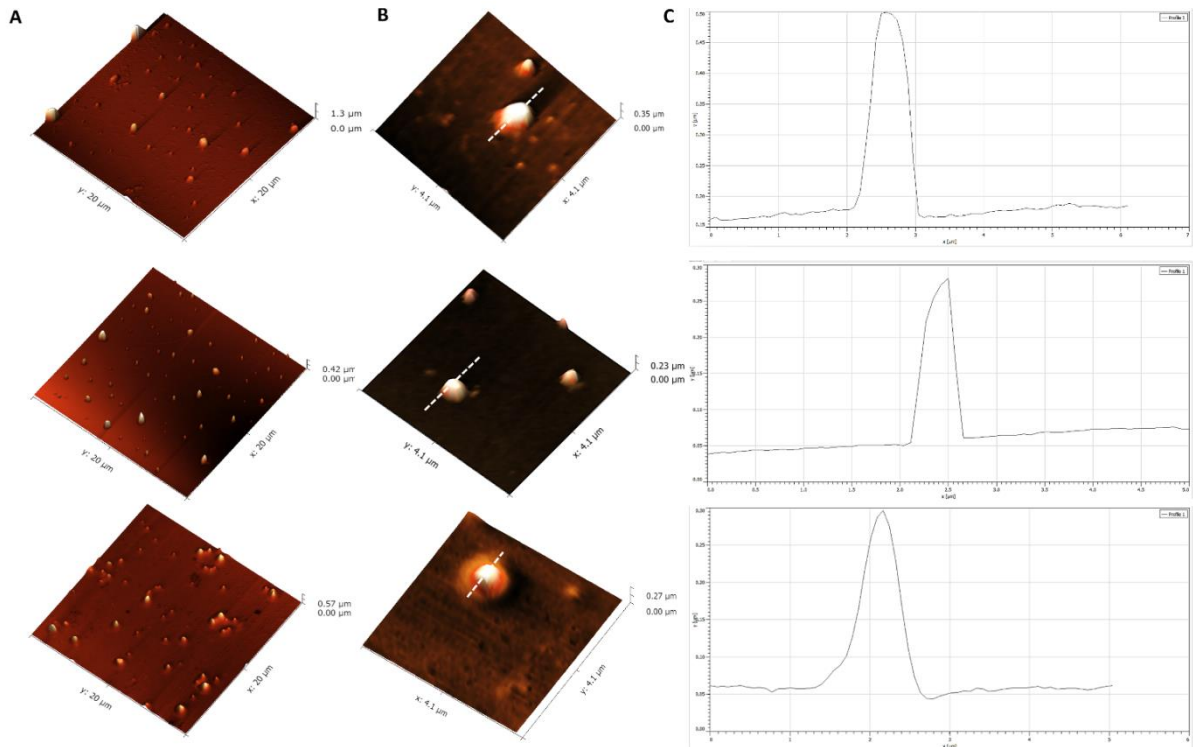


Figura 3.5. Imagens topográficas de MFA (20 μm x 20 μm). (Coluna A) Imagens em 3D de *C. neoformans* sem tratamento, tratado com Polybia-MPII e tratado com Agelaia-MPI (de cima para baixo); (Coluna B) Imagem ampliada de *C. neoformans* sem tratamento, tratado com Polybia-MPII e tratado com Agelaia-MPI (de cima para baixo); (Coluna C) Perfil de tamanho de *C. neoformans* a partir das imagens da coluna B (linha pontilhada), os resultados são representativos de três experimentos independentes.

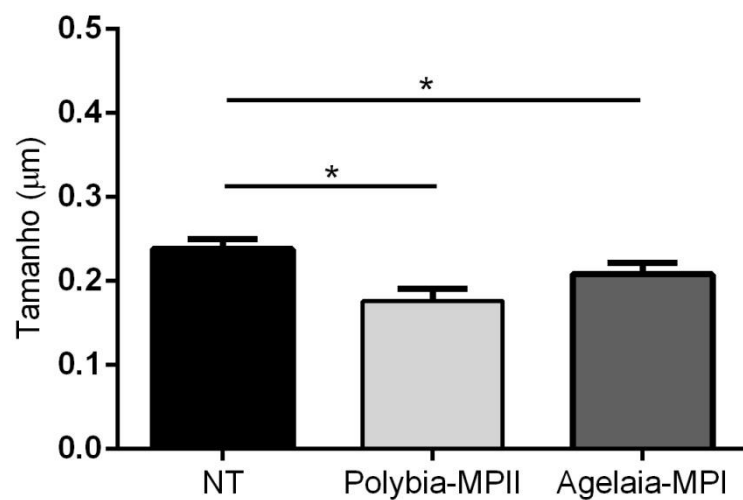


Figura 3.6. Tamanho de *C. neoformans* sem tratamento, tratado com Polybia-MPII e tratado com Agelaia-MPI. * $P < 0,05$ versus grupo não tratado (NT), (n=50 leveduras), one-way ANOVA e teste de Tukey.

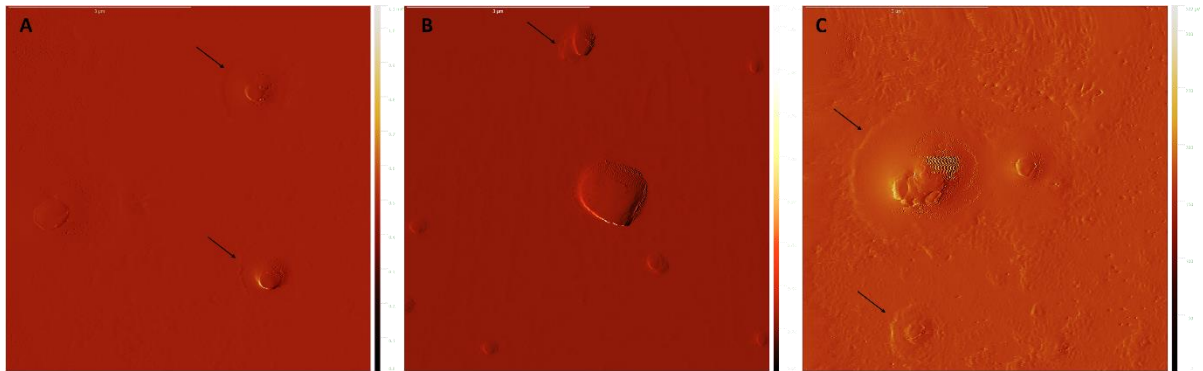


Figura 3.7. Imagens topográficas de *C. neoformans* por MFA (20 μm x 20 μm), mostrando detalhe da cápsula do microrganismo (setas pretas). (A) Controle não-tratado; (B) Tratado com Polybia-MPII; (C) Tratado com Agelaia-MPI.

Ao analisar a rugosidade média da superfície celular de *C. neoformans* sem tratamento e tratadas com Polybia-MPII e Agelaia-MPI foi verificado um aumento significativo da rugosidade da membrana após os tratamentos tanto com o Polybia-MPII quanto com o Agelaia-MPI, comprovando que o tratamento foi capaz de causar danos na membrana do *C. neoformans*. Outros estudos também relataram alterações na membrana fúngica utilizando MFA. Durnás et al. (2016), investigando a atividade antifúngica contra *Cândidas albicans* das cerageninas, CSA-13, CSA-131 e CSA-192 derivados anfifílicas de ácidos biliares que mimetizam as propriedades de PAMs endógenos, mostrou que as células tratadas com a CSA-13 aumentaram a rugosidade da membrana fúngica. Alterações na morfologia celular de *Cândidas albicans* também foram observadas no tratamento com a fração aquosa do extrato etanólico de *Tillandsia filifolia* (DE ARAÚJO et al., 2019).

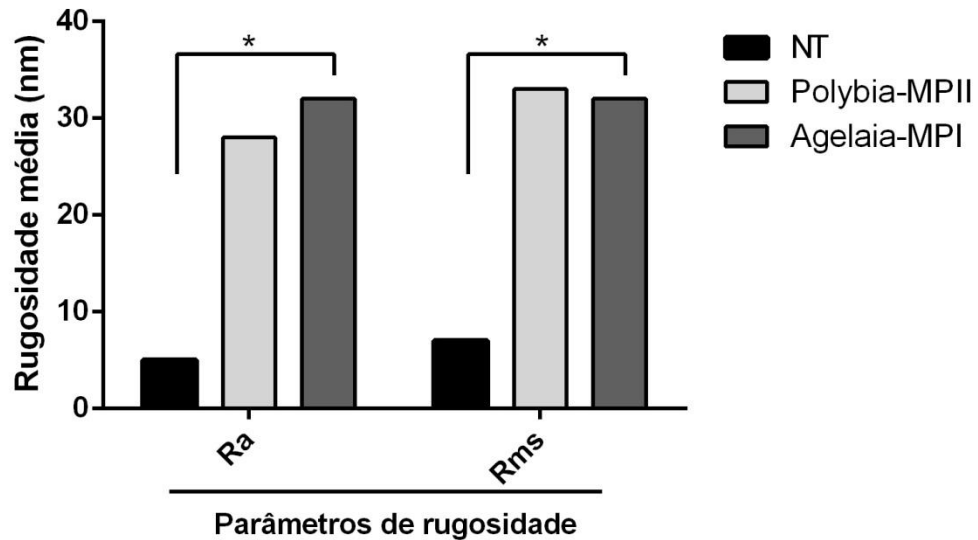


Figura 3.8. Rugosidade média da superfície celular de *C. neoformans* sem tratamento e tratados com Polybia-MPII e Agelaia-MPI, Ra representa a rugosidade média e Rms a rugosidade média quadrática. *P < 0,05 versus grupo não tratado (NT), one-way ANOVA e teste de Tukey.

3.3.6. Efeito do Polybia-MPII e Agelaia-MPI no biofilme de *C. neoformans*

Para confirmar a atividade antifúngica destes peptídeos, biofilme, formado pelo *C. neoformans*, foi produzido *in vitro* e a seguir incubados com os peptídeos. Os biofilmes são comunidades de microrganismos ligados a uma superfície sólida contida em uma matriz exopolimérica (DONLAN, 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). O biofilme criptocócico consiste em uma rede complexa de células de levedura envolvidas em uma quantidade substancial de matriz polissacarídica. O desenvolvimento dessas comunidades microbianas por *C. neoformans* é bastante similar àquele observado para *C. albicans*, sendo que inicialmente ocorre a adesão de células fúngicas, seguida pela formação de microcolônias e produção da matriz extracelular (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005).

A formação de biofilmes está associada à infecção persistente, uma vez que os biofilmes aumentam a resistência aos mecanismos efetores da resposta imunes do hospedeiro e a terapia antimicrobiana. Os biofilmes constituem uma barreira física que impede a penetração eficiente dos antifúngicos, o que confere aos microrganismos um ambiente propício ao seu crescimento onde a concentração das drogas antifúngicas estão em níveis mais baixos. (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004; CHANDRA et al., 2001). Vários mecanismos de resistência do biofilme a agentes antimicrobianos têm sido propostos, incluindo a presença de barreiras físicas que impedem a penetração dos compostos antimicrobianos no seu interior, crescimento lento do biofilme devido à limitação de nutrientes, ativação da resposta geral ao

estresse e a existência de uma subpopulação de células dentro do biofilme conhecido como persistentes, que são preservada pela pressão antimicrobiana (MAH; TOOLE, 2001; RAMAGE et al., 2001; SANGLARD, 2003).

Tendo em vista as dificuldades no tratamento de infecções que cursam com a formação de biofilmes, nota-se a necessidade no desenvolvimento de novos fármacos que atuem inibindo a formação dessas comunidades microbianas ou que desempenhem atividade microbicida em patógenos associados a biofilmes. Nesse contexto, Polybia-MPII e o Agelaia-MPI foram avaliados como moléculas inibidoras do biofilme de *C. neoformans*. Foi observado que o Polybia-MPII, na concentração de 400 μM , conseguiu reduzir em 40% a massa de biofilme. Já o Agelaia-MPI, nas concentrações de 200 μM e 100 μM , conseguiu reduzir em 87% e 19%, respectivamente. A Anfotericina B foi capaz de eliminar totalmente o biofilme, na concentração de 2,1 μM (Figura 3.9). Estes resultados demonstram a capacidade desses peptídeos de atuar contra um importante mecanismo de resistência desse patógeno ao tratamento. Resultados semelhantes foram observados por de Das Neves et al (2019), onde tanto o Polybia-MII como o Agelaia-MPI foram capazes de reduzir o biofilme formado pela bactéria multiressistente *Acinetobacter baumannii* e também impedir a formação do biofilme em cateter impregnado com estes peptídeos. Outros estudos também demonstraram a capacidade dos PAMs em atuar contra biofilmes. Lin et al. (2016), mostrou que os peptídeos P-113, P-113Du e P-113Tri, derivados da histamina 5 salivar (Hst 5) humana, foram capazes de reduzir em 50% a massa de biofilme formado pela *Cândida albicans.*, nas concentrações de >300 , 53 e 45 μM , respectivamente.

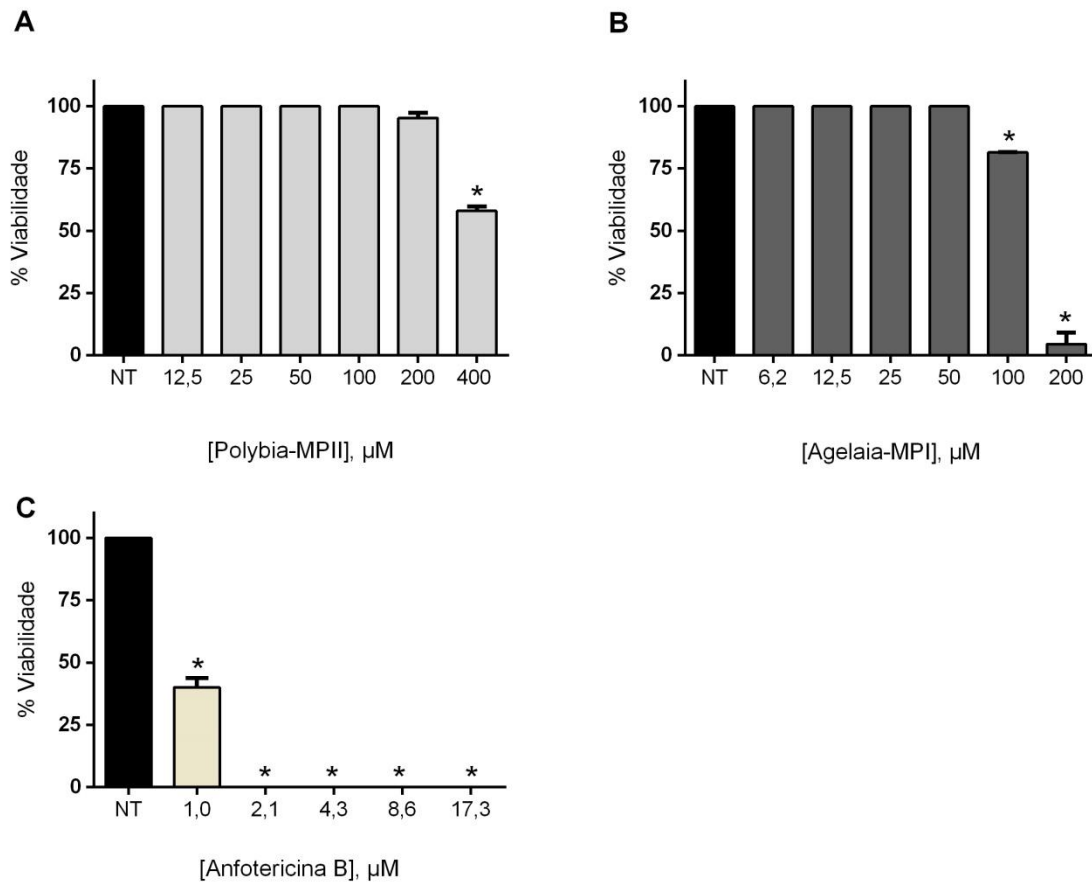


Figura 3.9. Efeitos do Polybia-MPII (A) Agelaia-MPI (B) e Anfotericina B (C) sobre o biofilme de *C. neoformans*. Os dados são expressos como a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.05$ grupo tratado *versus* grupo não tratado (NT), *one-way* ANOVA e teste de Tukey.

3.3.7. Infecção e tratamento em *Galleria mellonella* infectadas com *C. neoformans*

Ao verificar as atividades antifúngicas demonstradas pelos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI contra o fungo *C. neoformans*, foi analisado se estes PAMs poderiam ser eficientes no tratamento *in vivo*. Para está análise foi utilizado o modelo de *Galleria mellonella*. O uso de larvas de *Galleria mellonella*, um inseto pertencente à ordem Lepidoptera, surgiu como um excelente modelo para estudar a virulência de patógenos humanos. Este apresenta várias vantagens como o fácil manuseio, baixo custo e toleram uma ampla faixa de temperaturas, incluindo a temperatura humana de 37°C. A *G. mellonella* apresenta uma resposta imune inata e é dividida em um componente celular (hemócitos) e componente humoral (peptídeos antimicrobianos, enzimas líticas, peptídeos e melanina) que trabalham em conjunto contra diferentes patógenos (TREVIANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2019). O crescimento do *C. neoformans* em *G. mellonella* é semelhante ao observado em camundongos, sendo observado crescimento da cápsula e até mesmo a

formação de células titãs, Além disso, as células do *C. neoformans* são fagocitadas pelos hemócitos de *G. mellonella* e, curiosamente, este patógeno fúngico pode sobreviver e replicar após a internalização, indicando que também pode se comportar como um patógeno fúngico intracelular em hemócitos de *G. mellonella* (TREVJANO-CONTADOR, 2015). Inicialmente foi determinado a atividade citotóxica dos peptídeos no modelo na ausência da infecção, e o tratamento com o Polybia-MPII, Agelaia-MPI (5 e 10 mg/kg) e Anfotericina B (2 mg/kg) mostrou não ser tóxico nas concentrações utilizadas. A partir desses resultados foi realizado a infecção das *Galleria mellonella* com o *C. neoformans*. Os resultados mostraram que o tratamento com ambos os PAMs gerou um leve aumento na sobrevivência das larvas. Entretanto, só foi observada diferença significativa com o tratamento de Agelaia-MPI (10 mg/kg) e Anfotericina B (2 mg/kg) (Figura 3.10). Sangalli-Leite et al. (2016), mostrou que o tratamento com a pedalitina (PED), uma substância natural obtida de *Pterogyne nitens*, contra o fungo *C. neoformans* em modelo de *G. mellonella* apresentou aumento da sobrevivência das larvas de maneira dose dependente, onde as concentrações de PED variaram de 6,25 a 40 mg/kg. Um ponto a ser considerado é que a utilização de peptídeos antimicrobianos, em experimentos *in vivo*, é dificultada pela rápida degradação proteolítica o que diminui o seu tempo de meia-vida. Uma alternativa promissora para garantir a aplicabilidade destes compostos, preservando suas características químicas, é sua encapsulação em sistemas micro/nanoméricos de liberação controlada (ROY et al., 2013).

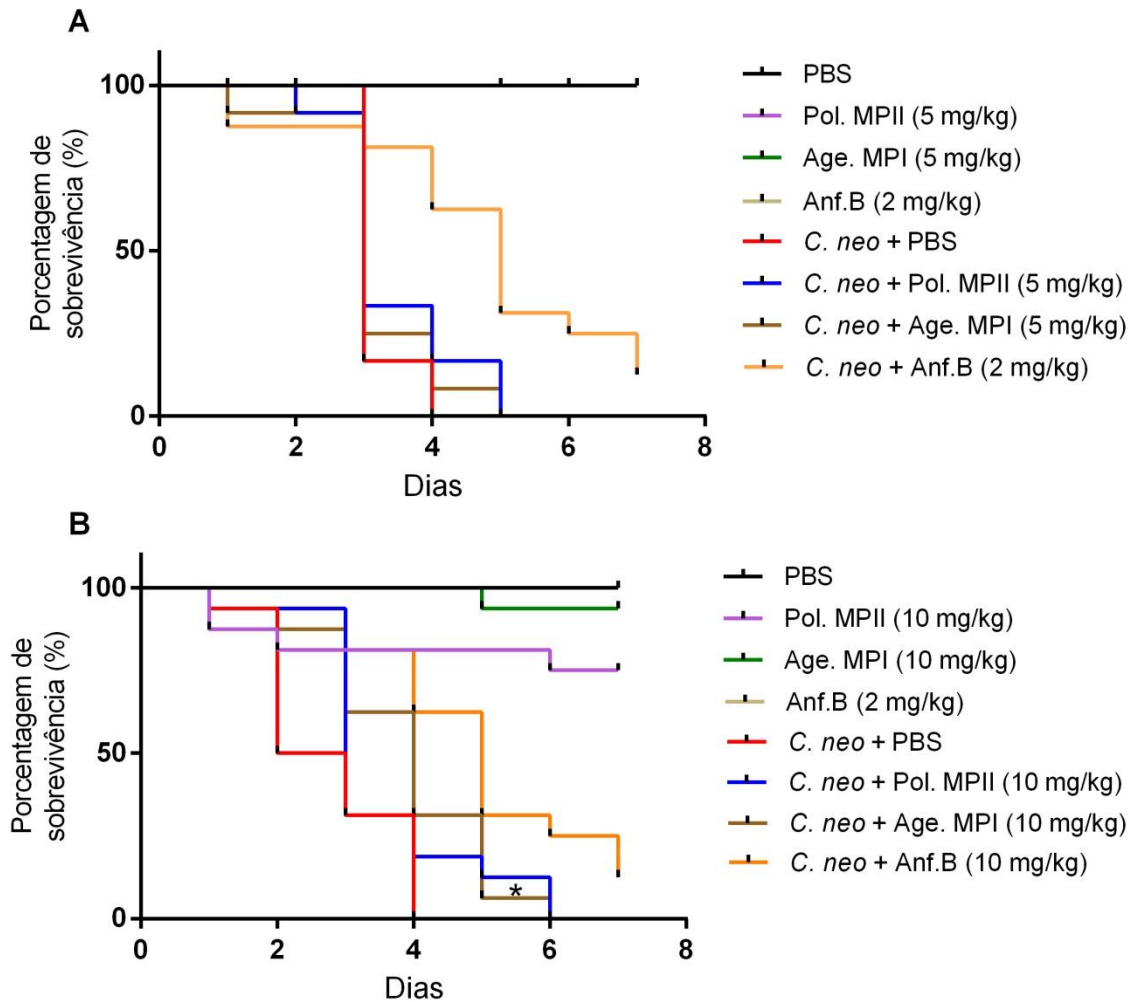


Figura 3.10. Toxicidade e atividade antifúngica do Polybia-MPII e Agelaia-MPI em modelo de *Galleria mellonella*. Toxicidade: larvas (n=16) foram tratadas com os PAMs nas concentrações de 5 mg/kg (A) e 10 mg/kg (B). Atividade antifúngica: larvas (n=16) foram infectadas com leveduras de *C. neoformans* (1×10^6) e após 1 hora foram tratadas com 5 mg/kg (A) e 10 mg/kg (B) de PAMs. Como controle negativo foi utilizado o tratamento com PBS e o controle positivo Anfotericina B (2 mg/kg). * $P < 0,05$ versus grupo *C. neoformans* + PBS, Testes Log-Rank (Mantel-Cox).

Dessa forma, os resultados mostraram que o Polybia-MPII e Agelaia-MPI possuem atividade antifúngica e esta atividade pode ser somada com a combinação de ambos. O ataque a membrana fúngica observada pelo aumento da permeabilidade ao iodeto de propídio e a alteração da morfologia fúngica é um dos mecanismos no qual os peptídeos exercem a atividade fúngica. Além disso, ambos os peptídeos conseguiram reduzir a massa de biofilme. No entanto, os peptídeos não se mostraram tão eficientes no tratamento das *Galleria mellonella*. Essas observações mostram que estes PAMs embora sejam promissores nos ensaio *in vitro*, a parte *in vivo* requer maiores estudos quanto a biodisponibilidade da molécula. .

CAPÍTULO IV

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PMVE/MA carregadas com os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI obtidos de vespas

4.1. Contextualização do problema

O processo de encapsulamento de moléculas é importante para atingir dois objetivos principais, o primeiro refere-se à própria molécula, protegendo-as dos efeitos adversos das condições ambientais, tais como, efeitos indesejáveis da luz, mistura com outros compostos, incluindo enzimas e proteases, contato com o oxigênio, entre outros. O segundo objetivo refere-se à modulação da eficiência terapêutica, promovendo uma maior manutenção temporal da sua atividade biológica com liberação controlada do material encapsulado e entrega das moléculas diretamente no alvo tecidual apropriado no organismo, mantém a sua concentração terapêutica além do período desejado de tempo (FANG, 2010, GIRI et al., 2013).

De fato o uso dos sistemas de liberação controlada apresenta varias vantagens como entrega para alvos teciduais específicos, de uma maneira controlada e sustentada (GUIMARÃES et al., 2018; MONGE-FUENTES et al., 2017). Entretanto um aspecto importante das abordagens terapêuticas para a cryptococose é a via de administração. Diferentemente da administração oral, que promove a metabolização dos fármacos por ação enzimática no intestino e fígado, a via pulmonar é mais eficiente na entrega de pequenas moléculas no corpo sem a produção de metabólitos (PATTON; FISHBURN; WEERS, 2004). No entanto, é um grande desafio o desenvolvimento de um sistema carregador inalatório, com propriedades aerodinâmicas adequadas, liberação controlada de fármacos, baixa biodegradação e evasão da eliminação por macrófagos (AHSAN et al., 2002; PATIL; SARASIJA, 2012)

No contexto de nanoencapsulação de PAMs, o uso de nanopartículas poliméricas como sistema de liberação controlada tem se mostrado eficiente. Casciaro et al. (2018) mostrou que a encapsulação do peptídeo Esc derivado da pele da rã *Pelophylax kl. esculentus* em nanopartículas poliméricas de PLGA promoveu a entrega do peptídeo no pulmão, e estes inibiram o crescimento de *P. aeruginosa* tanto *in vitro* como *in vivo*, por um maior período de tempo. As nanopartículas poliméricas são visualmente sólidas, apresentam estruturas coloidais, possuem tamanho de 10 a 1000 nm e podem ser classificadas de acordo com a sua organização estrutural em nanocápsulas e nanoesfera. As nanoesferas são sistemas matriciais, formadas pela massa polimérica. As nanocápsulas são denominados sistemas do tipo reservatório, em que é possível identificar um núcleo diferenciado pela presença de óleo. Nas duas estruturas os fármacos podem estar adsorvidos na superfície, aprisionados ou dissolvidos na matriz polimérica ou no núcleo oleoso (Figura 4.1) (RAO; GECKELER, 2011; SOPPIMATH et al., 2001; KUMAR, 2000; BRIGGER et al., 2002; KUMARI et al., 2010).

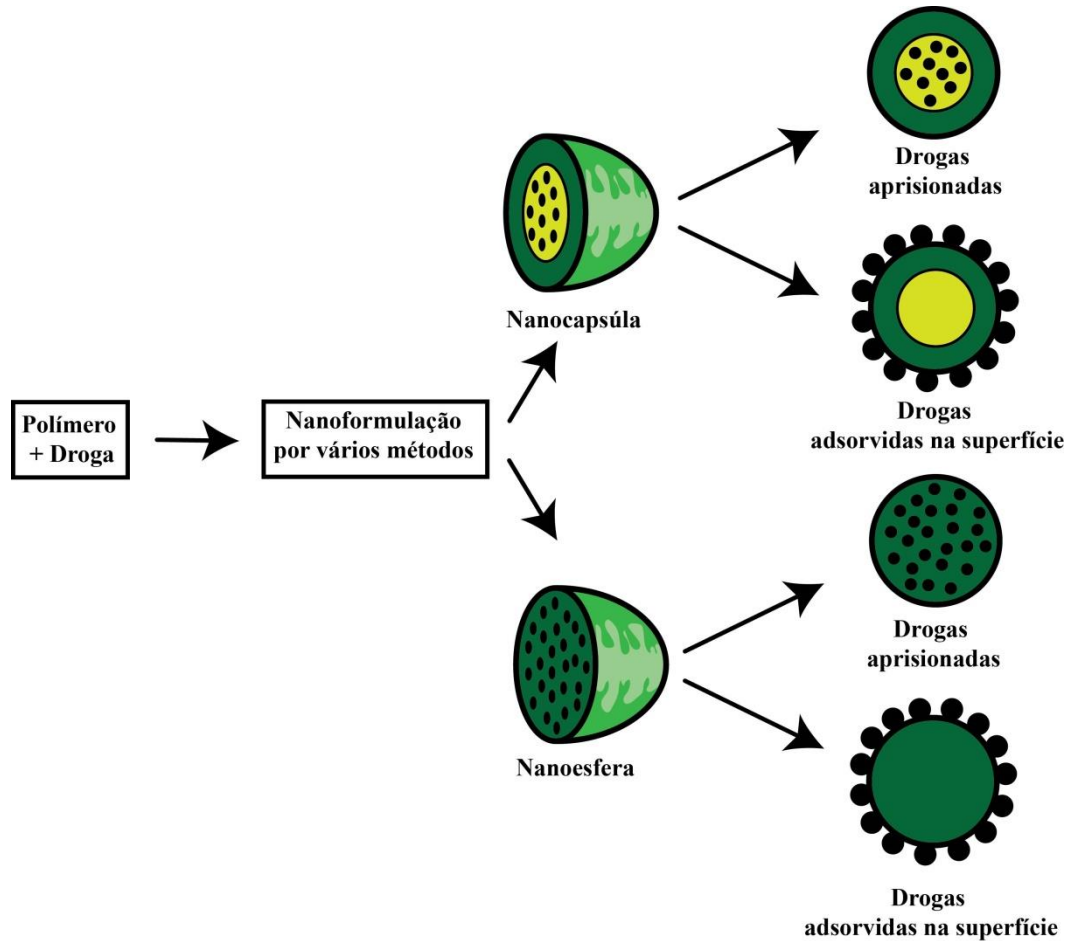


Figura 4.1. Diferentes morfologias de nanopartículas poliméricas: nanocápsula (sistema reservatório) e nanoesfera (sistema matricial), adaptado de KUMARI et al., 2010.

Em 2010, El-Sherbiny e Smyth, descreveram a importância do desenvolvimento de um sistema efetivo de liberação sustentada de fármacos para os pulmões, que tivesse um *clearance* terapêutico eficiente, bem como uma estratégia que envolvesse micro/nanopartículas com capacidade de intumescer (hidrogéis) e que apresentassem tamanho respiráveis quando secas. Estas características permitiriam um sistema capaz de evadir de macrófagos e ao mesmo tempo conferir um sistema de liberação sustentada do fármaco por meio da estrutura formada pelo polímero de escolha (EL-SHERBINY; SMYTH, 2010).

Os mecanismos de liberação do fármaco desses sistemas, quando em contato com a água, envolvem seis fases, conforme mostrada na figura 4.2. Na primeira a presença de poros matriciais promove a absorção da água pela matriz polimérica, hidratando o sistema e liberando a molécula carregada. Com o tempo de permanência na água observamos a segunda fase pela presença do intumescimento/relaxamento das cadeias poliméricas. Nas fases 3 e 4, que ocorrem simultaneamente, a penetração da água na matriz leva a hidratação do núcleo seco e erosão da camada externa. O aumento da água no sistema leva a uma maior interação

com o polímero levando a uma separação das cadeias poliméricas onde ocorre a difusão da molécula carregada, é a chamada fase 5, continuando com a dispersão das cadeias poliméricas, ocorre o maior aumento da distância entre as cadeias poliméricas e conseqüentemente a desintegração total do sistema (fase 6) (LOPES et al., 2005).

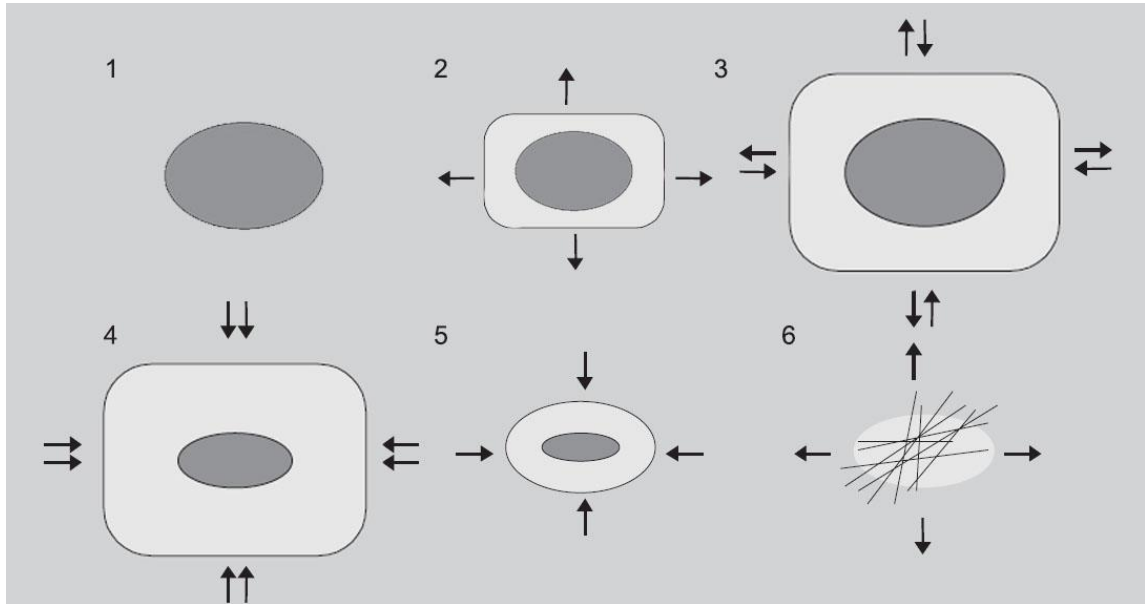


Figura 4.2. Alterações observadas nos sistemas matriciais de nanopartículas poliméricas carregadas com os fármacos que intumescem e sofrem erosão: 1) matriz no estado seco; 2) início da hidratação e intumescimento da matriz; 3 e 4) aumento da hidratação e intumescimento da matriz, diminuição do núcleo seco e início da erosão das cadeias poliméricas; 5) aumento da erosão das cadeias poliméricas; 6) separação das cadeias poliméricas com liberação rápida do peptídeo restante, adaptado de LOPES et al., 2005.

O poli(metil vinil-éter co-anidrido maléico) (PMVE/MA) é um polímero biocompatível, geralmente utilizado como excipiente na indústria farmacêutica e alimentícia (ZHANG et al., 2015), com capacidade adesiva ao sistema gastrointestinal, sendo descrito por Irache et al. (2005) no desenvolvimento e preparações de nanopartículas bioadesivas para carregamento de antígenos ou fármacos. É também utilizado para facilitar a funcionalização de microesferas de PLGA com o objetivo de avaliar a liberação de proteínas e ativação de macrófagos (LEÓN-RODRIGUEZ et al., 2010).

As modificações na estrutura dos polímeros e sua associação com outros polímeros, como a dextrana, o polietileno glicol e o ácido poli(lático) (CHEN et al., 2012), podem produzir sistemas bioadesivos com boa permeabilidade, por meio do muco (SUK et al., 2009; TANG et al., 2009), favorecendo a entrega de fármacos no local de ação por inalação como a

rifampicina, a isoniazida e a pirazinamida no local de ação por inalação (PANDEY et al., 2003).

Neste capítulo, foram desenvolvidas e caracterizadas as nanopartículas de PMVE/MA carregadas com os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI, com o propósito de melhorar a sua biodisponibilidade e entrega dos mesmos. Além disso, estas nanopartículas foram avaliadas quanto a sua função antifúngica em modelo *in vitro*.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Nanoestruturação dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI

Os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI foram nanoestruturados em partículas poliméricas de PMVE/MA (Sigma-Aldrich) utilizando a técnica de evaporação de solvente (IRACHE et al., 2005) (Figura 4.3), seguindo as quatro etapas descritas a baixo, com algumas modificações:

1. Mistura de uma fase orgânica (polímero + solvente) e uma fase aquosa (água);
2. Emulsificação de uma fase orgânica na fase aquosa (água:etanol);
3. Evaporação do solvente orgânico;
4. Liofilização.

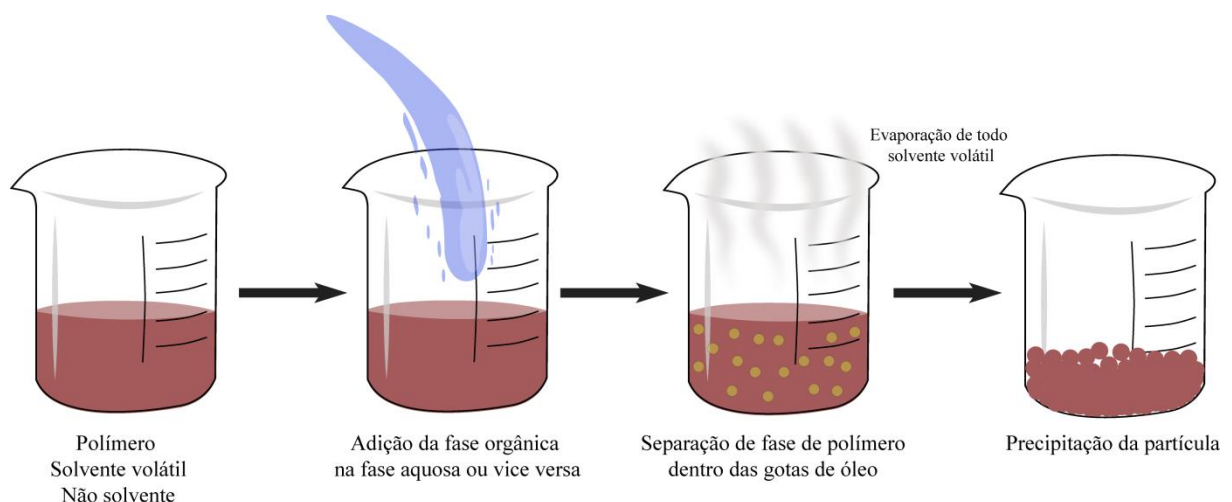


Figura 4.3. Teoria da formação de micro/nanopartículas, adaptado de (ALIABADI et al., 2007).

As nanopartículas foram preparadas de duas formas: (1) Emulsão água em óleo (A/O), onde a fase orgânica foi formada pela dissolução do PMVE/MA em acetona (10 mg/mL), misturado com uma solução de PEG2000 (2 mg/mL, Sigma-Aldrich), adicionado a

esta mistura o PAM de escolha (Polybia-MPII ou Agelaia-MPI) (0,2 mg/mL) dissolvido em uma solução de água e acetona (1:1) e mantidas sob agitação magnética. A emulsão é formada pela adição de fase aquosa composta de água:metanol (1:1) (JTBarker) sob vigorosa agitação. A mistura é levada ao evaporador rotativo da BUCHI-R11, equipado com um *recirculating chiller* B-740 e um *vacuum controller* V850, para evaporação do solvente e redução do volume. (2) Emulsão Óleo em Água (O/A), onde neste sistema a diferença foi a adição da fase orgânica na fase aquosa. Após a evaporação dos solventes uma solução de trealose a 3% (crioprotetor, Millipore) foi adicionada a cada formulação, congelada (-80°C) e levada ao liofilizador para secagem das partículas. Após liofilização das preparações as mesmas foram pesadas para determinação do rendimento de cada uma, e mantida na geladeira (-4°C).

4.2.2. Caracterização das Nanopartículas

4.2.2.1. Tamanho e carga da superfície (potencial zeta)

O tamanho e carga de superfície das partículas em suspensão foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética utilizando o Zetasizer®/Nano-ZS90 (Malven). Para as análises, cada preparação foi ressuspensa em água ultrapura, diluída vinte vezes e realizada três leituras de cada.

4.2.2.2. Avaliação da alteração do tamanho das partículas na presença de água (intumescimento)

Para verificar a capacidade de aumento de tamanho das nanopartículas de PMVE/MA, na presença da água, foi realizado o teste de intumescimento, que avalia a capacidade de absorção de água (ROSINA et al., 2004). Nesta análise, 1 mg de cada formulação foi ressuspensa em 1 mL de água ultrapura e em tempos pré determinados de 0, 1, 2, 4 e 24 h foram medidos o tamanho e carga, utilizando o zeta sizer como descrito anteriormente.

4.2.2.3. Determinação da quantidade de peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI carregado nas preparações de nanopartículas.

Para a quantificação do peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI carregado nas nanopartículas foi utilizando a cromatografia de alta eficiência (CLAE). Inicialmente foi realizada uma curva padrão de cada peptídeo dissolvido em água ultrapura.

4.2.2.4. Curva padrão dos PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI

Primeiramente foram preparados estoques dos PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI (1 mg/mL, diluído em H₂O:Acetonitrila, 1:1), e realizada uma curva analítica com concentrações que variaram entre 500 a 15,62 µg/mL. Destas soluções foram injetadas 200 µL no equipamento (Shimadzu LC-20AT), utilizado uma coluna analítica C18 (Phenomenex, Synergi 4u, Fusion-RP 80A, 250 x 4.69 mm) na temperatura de 25°C, com fluxo de 1,0 mL/min e o detector UV-DAD detector SPD-20A monitorou a absorbância no comprimento de onda de 216 nm. A fase móvel utilizada foi composta pelos solventes A [solução aquosa de ácido trifluoroacético - TFA 0,12% (v/v)] e B [Acetonitrila contendo ácido trifluoroacético - TFA 0,12% (v/v)]. Para todas as corridas utilizou-se o modo gradiente, com a concentração de acetonitrila acrescida em 2% por minuto. Assim, uma curva de calibração foi realizada nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 µg/mL para o Polybia-MPII e 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 µg/mL para o Agelaia-MPI sendo feitas triplicatas para cada concentração e determinada a equação da reta.

4.2.2.5. Quantificação do peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI carregados nas nanopartículas

Para determinação da quantidade de peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI, carregado pelas nanopartículas, foram pesados 3 mg de cada formulação Polybia-MPII (A/O e O/A) e Agelaia-MPI (A/O e O/A), diluídas em 1 mL da solução de H₂O:Acetonitrila (1:1-v/v). O volume de 200 µL destas formulações foram injetados no equipamento (Shimadzu LC-20AT) para análise por CLAE, conforme descrito no item anterior. Com o objetivo de

determinar se os constituintes da formulação interferiam na quantificação, o mesmo procedimento foi realizado com as nanopartículas Vazias (A/O e O/A).

4.2.2.6. Caracterização Físico-química, espectroscopia infravermelho transformada de fourier (FTIR)

Nesse estudo, utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho para determinar a interação no nível de grupos funcionais dos materiais ativos (PAMs: Polybia-MPII e Agelaia-MPI) e os sistemas carreadores. Com o objetivo de estimar qualquer possibilidade de interação química entre os peptídeos e os carreadores (A/O ou O/A), foram estudados os espectros de FTIR dos constituintes: PEG2000, PMVE/MA e da trealose utilizada na liofilização das amostras e das formulações: Polybia-MPII A/O, Polybia-MPII O/A, Agelaia-MPI A/O e Agelaia-MPI O/A. As análises das estruturas moleculares foram obtidas baseadas na sequência de aminoácidos fornecidas pela FastBio e desenhadas no Programa ACD/labs, enquanto os espectros de FTIR foram analisados pelo Origin 6.0.

4.2.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI nanoencapsulados em partículas de PMVE/MA

A metodologia utilizada foi a descrita no item 3.1.2. As concentrações das nanopartículas variaram de 12,5 a 400 μM .

4.2.4. Análise estatística

Para análise dos experimentos foram utilizados os seguintes programas: tamanho e carga (Zetasizer®/Nano-ZS90), cromatografia de alta eficiência (*LC solution*), curva de calibração (Excel versão 2010), comparação de tamanha e carga (*GraphPad Prism* versão 6.0.), desenho da estrutura dos peptídeos (ACD/labs), espectroscopia (Origin 6.0). Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos como média e desvio-padrão.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Tamanho e carga de superfície

Sistemas nanoparticulados de fármacos são estudados para carregamento e entrega de diferentes moléculas, desde fármacos já bem estabelecidos na clínica até macromoléculas como proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos entre outros. Os fármacos e biomoléculas podem ser carregados pelo aprisionamento destes no interior e/ou pela adsorção deles na superfície externa dos nanosistemas (SIQUEIRA et al., 2015; CUNHA-AZEVEDO et al., 2011; CELLS; ELIAZ; SZOKA, 2001; JUNG et al., 2000; LIU et al., 2008). As nanopartículas podem ser preparadas por diversos métodos, incluindo emulsão com evaporação do solvente, spray-drying, gelação, coacervação, suspensão e polimerização. Dentre estas, as emulsões tem se mostrado mais adequadas, tanto para encapsulação de fármacos convencionais como para proteínas e peptídeos terapêuticos (GIRI et al., 2013). Neste sentido, o método de emulsificação foi adotado para preparação das nanopartículas utilizadas nesta etapa do trabalho. Inicialmente foram preparadas duas formulações, uma vazia e outra contendo o Agelaia-MPI (A/O), que nanopartículas apresentaram nanopartículas com tamanhos na faixa de 450 nm (Tabela 4.1), tendo a formulação vazia um tamanho superior.

Tabela 4.1. Tamanho (z-average), carga de superfície (potencial zeta) e índice de polidispersão de nanopartículas de PMVE/MA contendo o Agelaia-MPI.

Formulação	Z-average (d-nm) ± SD	Potencial zeta (mV) ± SD	Índice de polidispersão ± SD
NP Agelaia-MPI	393 ± 37.5	-52.7 ± 0.91	0.278 ± 0.073
NP Vazia	594.2 ± 55	-55 ± 2.34	0.594 ± 0.92

NP: Nanopartícula; SD: Desvio padrão.

O tamanho das partículas utilizadas como carregador inalatório, para serem respiráveis é na faixa de 0.5 a 5 µM, no entanto com este tamanho podem ser rapidamente captadas por macrófagos alveolares. Alguns autores acreditam que aumentando o tamanho das micro/nanopartículas pode-se reduzir esse efeito, porém afetaria a entrega do fármaco no pulmão, pela diminuição da fração inalada (EL-SHERBINY; SMYTH, 2010). Assim, novas formulações foram preparadas com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas, considerando as características de hidrogel do PMVE/MA. A adição de mais energia ao

sistema, pelo aumento do tempo de agitação magnética, resultou em nanopartículas com tamanhos menores, que podem ser observados na figura 4.4. Vale destacar que, apesar das mudanças no método de emulsificação, não ocorreu grandes alterações no tamanho, apresentando uma variação de 150 a 250 nm, sendo menores que o valor inicial obtido na tabela 4.1.

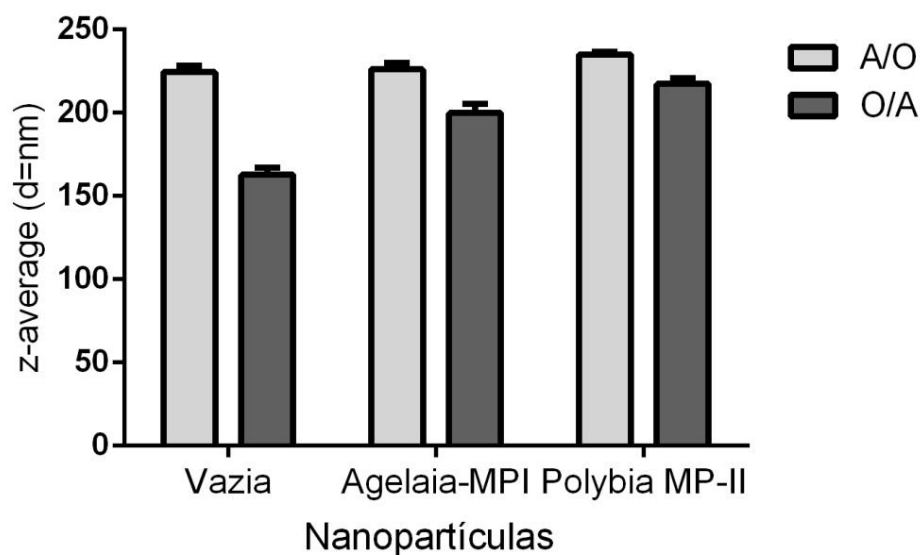


Figura 4.4. Comparação do tamanho (z-average) das partículas de PMVE/MA/PEG vazias e contendo o Polybia-MPII e Agelaia-MPI. A/O (emulsão água /óleo) e O/A (emulsão óleo/água). Os dados são da análise de três amostras independentes e foram analisados pelo programa *GraphPad Prism* versão 6.0.

4.3.2. Intumescimento

Conforme o método utilizado no estudo, foram desenvolvidas nanopartículas do tipo nanoesfera, as quais aumentam de tamanho ao longo do tempo, independente da presença do peptídeo e do método de emulsificação. Após 24h, as nanopartículas vazias tiveram um aumento de tamanho (z-average) acima de 100% quando comparadas com as formulações contendo os peptídeos (Figura 4.5A). No entanto, apesar dessas alterações de tamanho, a carga de superfície não sofreu grandes alterações, indicando a baixa hidrólise ao longo do tempo (Figura 4.5B).

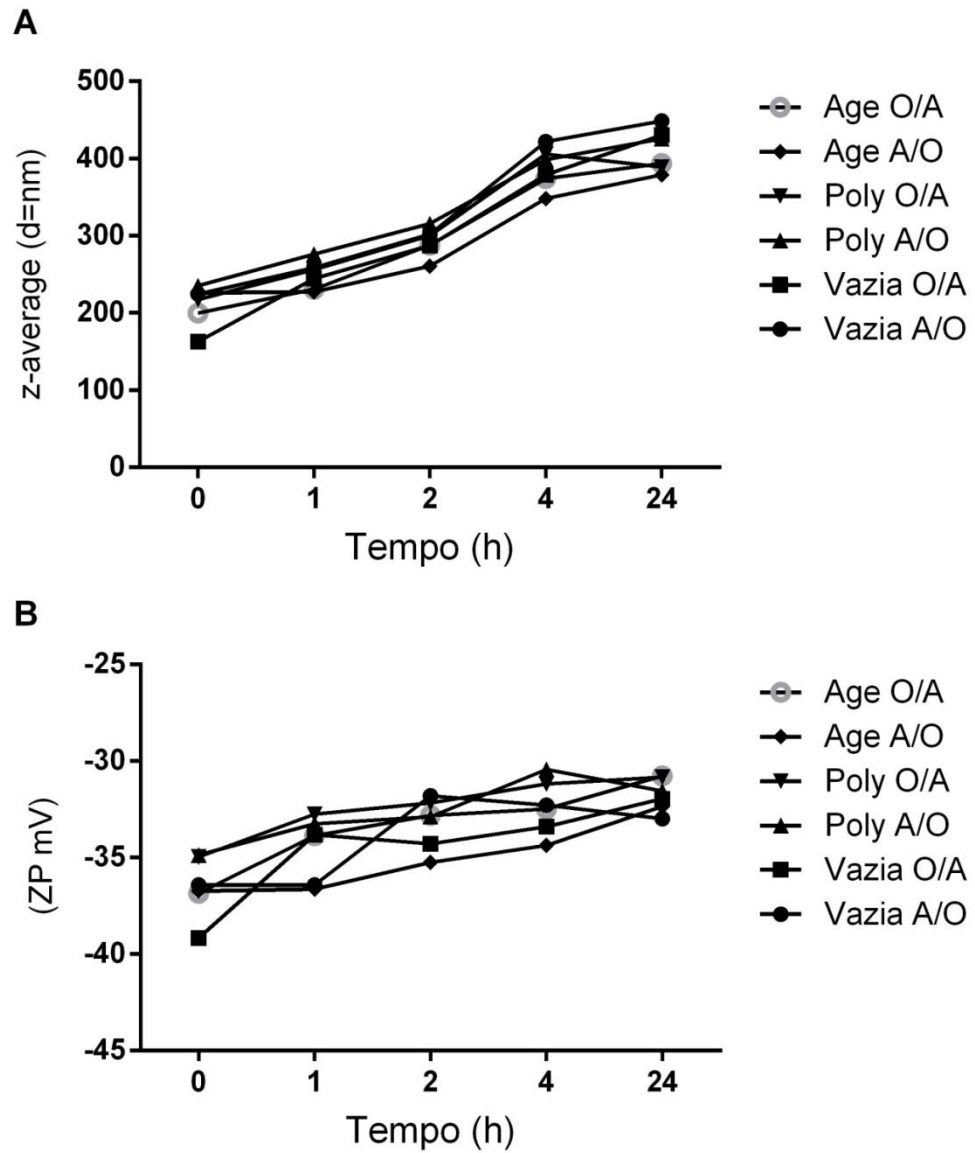


Figura 4.5. Tamanho (z-average, d= nm) (A) e carga de superfície (potencial zeta, ZP mV) (B) das nanopartículas contendo PAMs na presença de água durante 0, 1, 2, 4 e 24h. Os dados são representativos de três ensaios independentes e foram analisados pelo programa *GraphPad Prism* versão 6.0.

4.3.3. Quantificação do peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI nas nanopartículas

Os resultados mostraram que os PAMs Polybia-MPII e Agelaia-MPI saíram nos tempos de retenção de 29.7 e 30.5 minutos, respectivamente (Figura 4.6A e B, respectivamente). A partir desse método foi realizada uma curva de calibração para cada peptídeo e determinada a equação da reta (Figura 4.7). Estes resultados demonstra que o método de quantificação pode ser usado para as dosagens destes peptídeos.

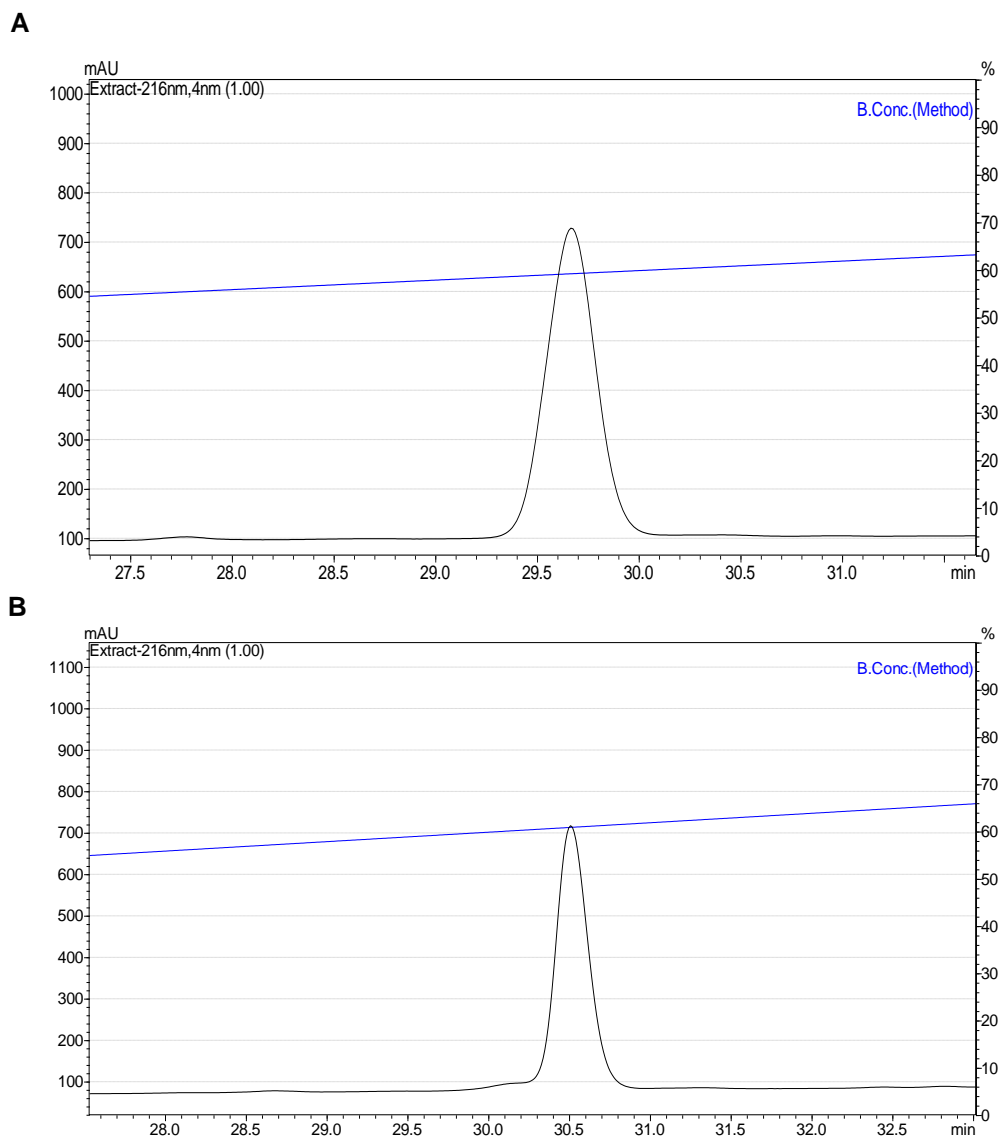


Figura 4.6. Perfil cromatográfico do Polybia-MPII (A) e Agelaia-MPI (B), eixo y área de pico (mAU), eixo x tempo de retenção.

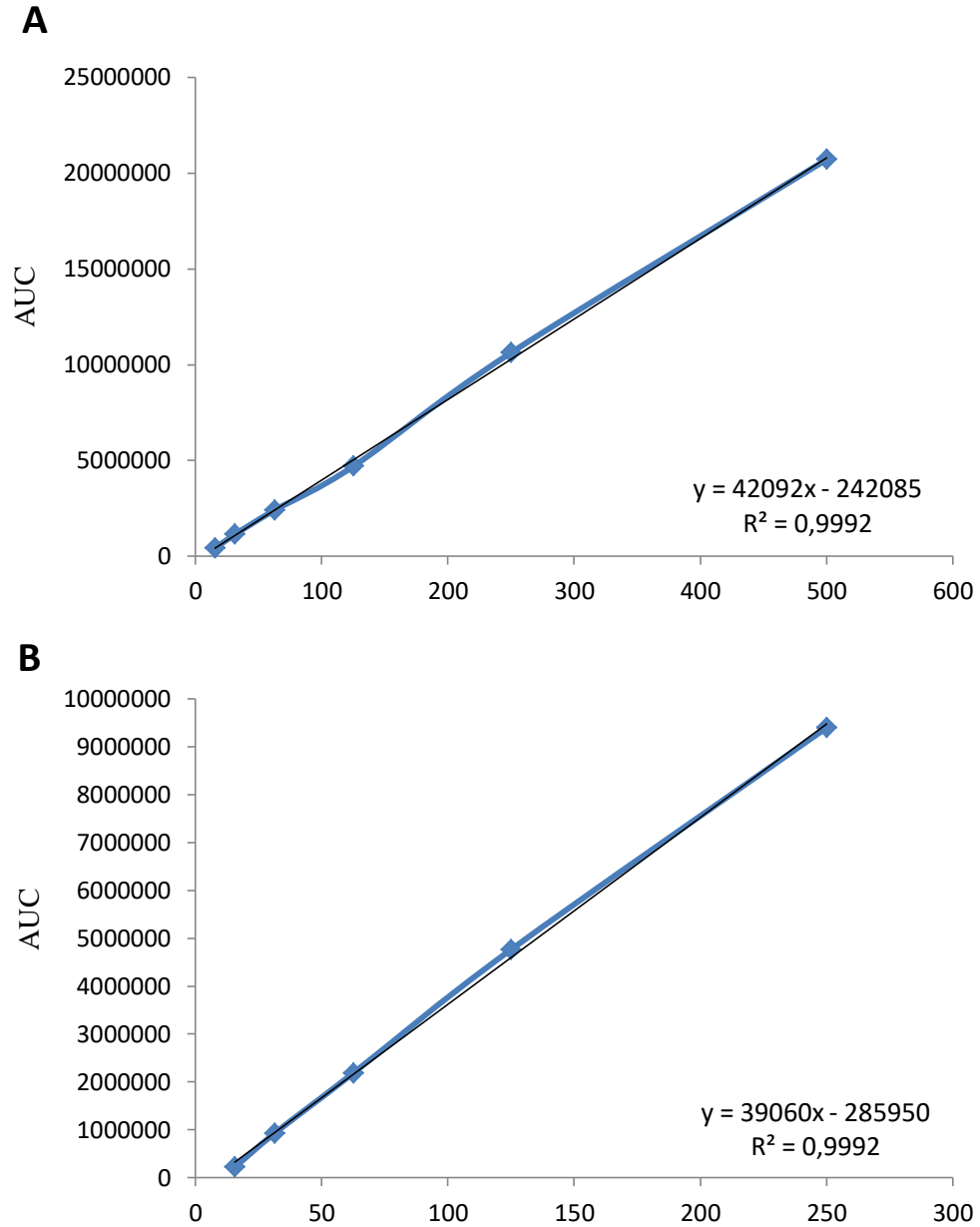


Figura 4.7. Curva de calibração do Polybia-MPII (A) e Agelaia-MPI (B), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eixo y AUC (área sobre a curva), eixo x (concentração em $\mu\text{g/mL}$). Foram realizadas triplicatas para cada ponto. Análise pelo programa Excel versão 2010.

De acordo com os cromatogramas das nanopartículas Vazias A/O e O/A mostrados na figura 4.8A e B, respectivamente, foram observados que os constituintes da formulação não interferem no método de dosagem.

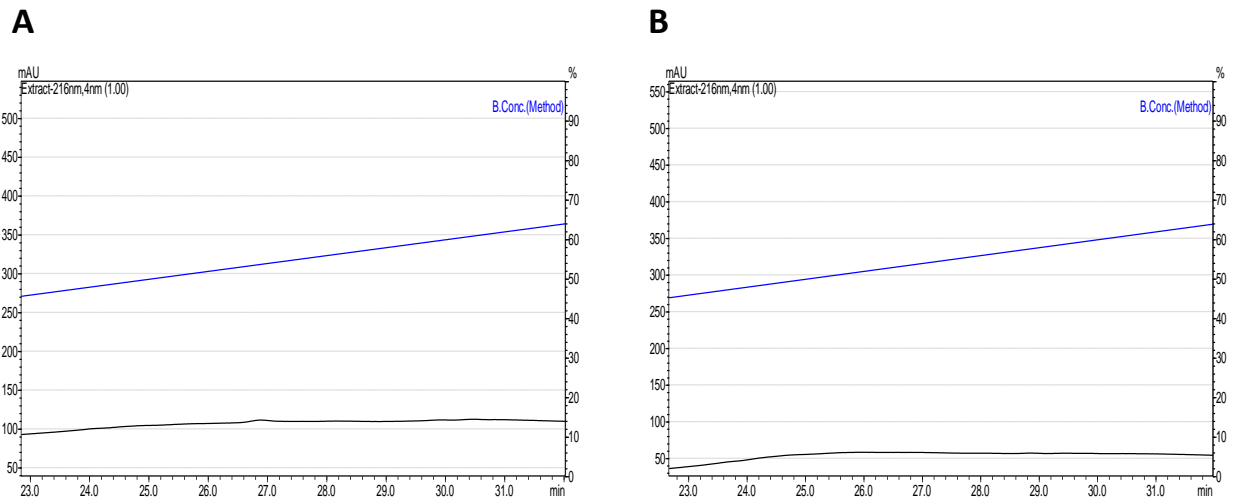


Figura 4.8. Perfil cromatográfico das nanopartículas Vazias A/O (A) e O/A (B), eixo y área de pico (mAU), eixo x tempo de retenção.

Utilizando a equação da reta da curva de calibração de cada PAM, foram determinados os valores do Polybia-MPII e do Agelaia-MPI carregados nas nanopartículas de PMVE/MA. Os dados de cada formulação foram obtidos da triplicata de três dosagens independentes (Tabela 4.2), os quais demonstram que a alteração no protocolo (inversão da fase oleosa e aquosa) promoveu diferença na quantificação apenas na nanopartícula Polybia-MPII A/O, mas que nas análises realizadas não foi possível identificar o que promoveu essa diferença.

A razão entre a massa de nanopartículas produzidas e a massa de cada PAM quantificada na partícula, é considerada a quantidade de fármaco carregada pelo nanossistema produzido (% de *Drug Loaded*) (GOVENDER et al., 1999), assim após o processo de liofilização cada preparação foi pesada e calculado a quantidade de cada PAM carregado, mostrando, valores abaixo de 3%, resultado esperado devido à baixa quantidade de PAM utilizado nas formulações (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Quantidade de peptídeos carregados nas diferentes formulações de nanopartículas.

	Formulações			
	NP Poly A/O	NP Poly O/A	NP Age A/O	NP Age O/A
Polybia-MPII ($\mu\text{g/mL}$)	53.64 \pm 13.76	74.07 \pm 14.11	-	-
Agelaia-MPI ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	70.83 \pm 4.68	61.98 \pm 5.02
% PAM carregado nas NPs	1.79	2.47	2.36	2.07

A/O – emulsão água/óleo; O/A – emulsão óleo/água; NP- nanopartícula.

4.3.4. Caracterização Físico-química

As figuras 4.9 e 4.10 mostram as estruturas moleculares propostas para os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI, respectivamente, as mesmas foram obtidas baseadas na sequência de aminoácidos fornecidas pela FastBio e desenhadas no Programa ACD/labs, enquanto os espectros de FTIR estão ilustrados na figura 4.11.

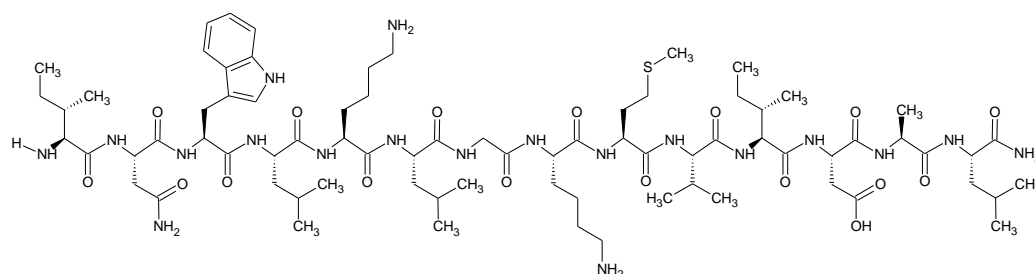


Figura 4.9. Estrutura molecular do peptídeo Polybia-MPII.

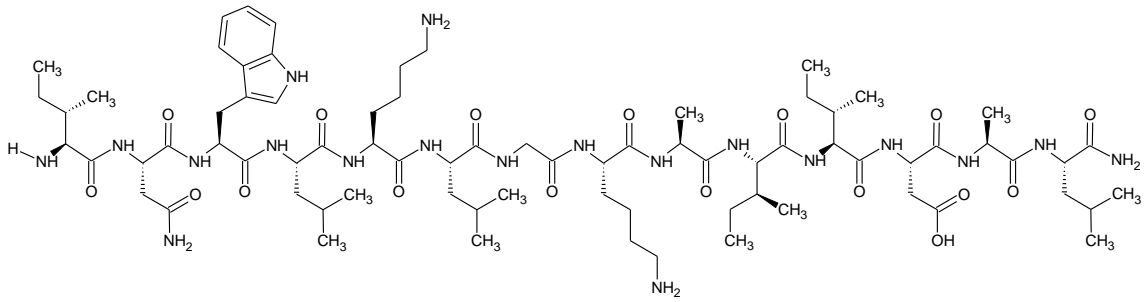


Figura 4.10. Estrutura molecular do peptídeo Agelaia-MPI.

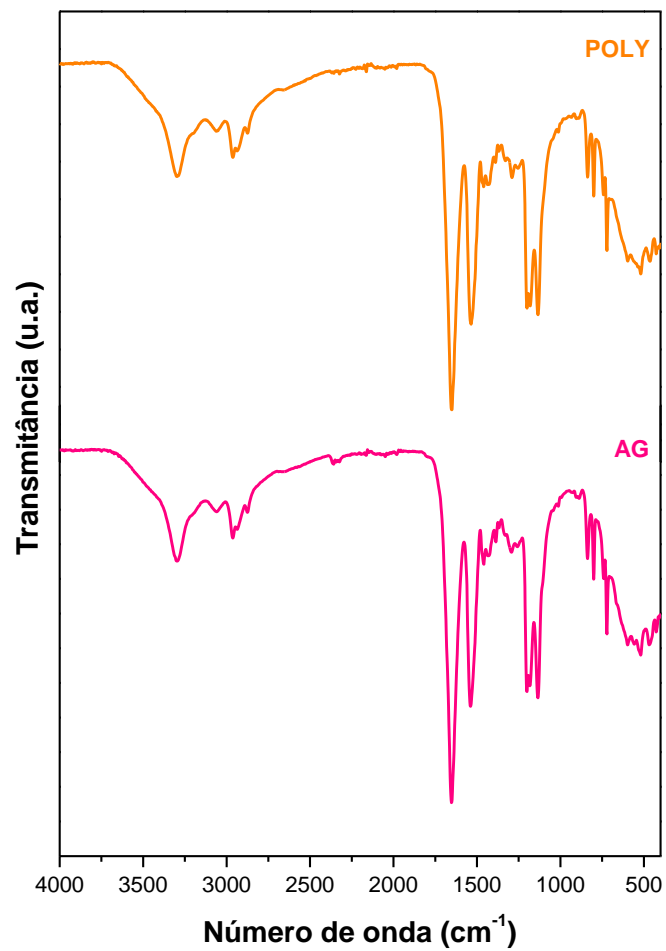


Figura 4.11. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm^{-1}) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) dos peptídeos do Polybia-MPII (POLY) e Agelaia-MPI (AG) livres.

Ao analisar a estrutura do Polybia-MPII e Agelaia-MPI livres, observa-se a presença dos mesmos grupos funcionais em ambos os PAMs, com exceção da presença de um aminoácido sulfurado (S) na cadeia do Polybia-MPII.

Os peptídeos têm uma cadeia contínua de aminoácidos conectados via ligações amidas, cujas as vibrações na região do infravermelho desse tipo de ligação envolvem os grupos C=O, C-N e N-H, que resultam em características espectrais de peptídeos. As amidas apresentam uma banda forte atribuída ao grupo C=O ($\nu\text{C=O}$) que é visualizada na região de 1680 a 1630 cm^{-1} . O νNH é observado na região de 3475-3150 cm^{-1} e como uma única banda para as amidas secundárias, R-CO-NH-R. A presença de mais uma banda N-H, abaixo da banda atribuída ao C=O sugere a presença de um grupo funcional amida também (PAVIA et al., 2010).

Nos espectros vibracionais na região do infravermelho (Figura 4.11) de ambos peptídeos pode-se identificar as bandas características dos mesmos. A banda referente ao νNH é observada em 3298 e 3296 cm^{-1} para o Polybia-MPII e Agelaia-MPI, respectivamente. As bandas alargadas em 1651 cm^{-1} e 1653 cm^{-1} para o Polybia-MPII e Agelaia-MPI, respectivamente, são atribuídas ao $\nu\text{C=O}$ com sobreposição da banda atribuída a δNH . A atribuição $\delta\text{C=C}$ de aromático é observado em 1535 cm^{-1} e 1539 cm^{-1} para o Polybia-MPII e Agelaia-MPI, respectivamente. Observa-se ainda no intervalo de 1460-1427 cm^{-1} para o Polybia-MPII e de 1458-1428 cm^{-1} para Agelaia-MPI as bandas referente à $\delta\text{C-N}$ de amins e amidas. As bandas no intervalo de 1200-1134 cm^{-1} para o Polybia-MPII e Agelaia-MPI são atribuídas ao $\nu\text{C-N}$ de amins. A absorção referente à deformação N-H fora do plano é observada próximo de 800 cm^{-1} para os peptídeos (PAVIA et al., 2010). No espectro do Polybia-MPII não foi possível observar as bandas na região de 750 cm^{-1} e 680 cm^{-1} , ambas atribuídas ao $\nu\text{C-S-C}$ do aminoácido metionina presente no peptídeo (WAGNER; BARAN, 2002).

A figura 4.12 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho da trealose, PEG2000, do polímero PMVE/MA e da nanopartícula A/O Vazia.

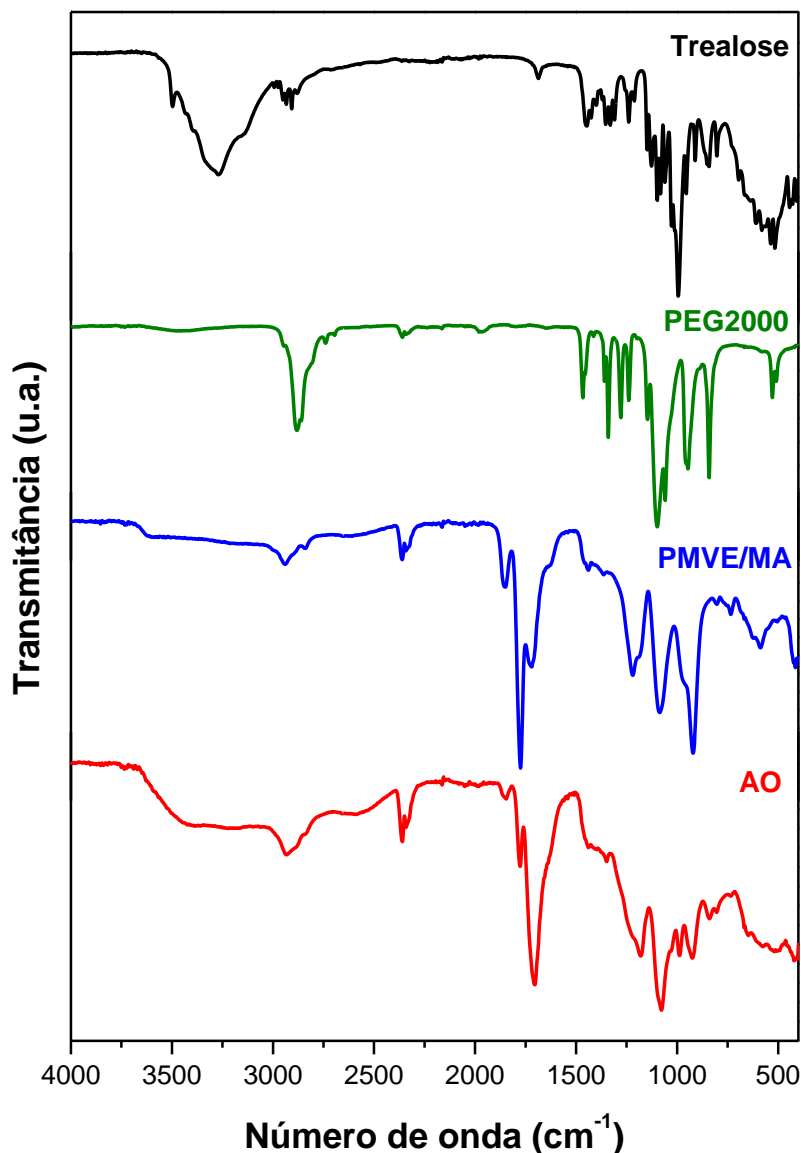


Figura 4.12. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm^{-1}) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da trealose, PEG 2000, PMVE/MA e da nanopartícula A/O Vazia.

A trealose é um dissacarídeo com ligação alfa natural formado por uma ligação α,α -1,1-glicosídeo entre duas unidades de α -glicose. No espectro no FTIR da trealose é possível observar as seguintes bandas com as respectivas atribuições: 3271 cm^{-1} (νOH de H_2O), 2993-2880 cm^{-1} (νCH), 1686 cm^{-1} ($\delta\text{H-OH}$), 1500-1000 cm^{-1} ($\delta\text{OCH} + \delta\text{CCH} + \delta\text{COH}$, $\nu\text{CO} + \nu\text{CC}$), 995, 955 e 906 cm^{-1} ($\nu\text{CO} + \nu\text{CCH} + \rho\text{CH}$ da α -(1 \rightarrow 1) ligação glicosídica) de acordo como descrito por HSIEH et al., (2018). Na análise do espectro na região do infravermelho do PEG2000, observa-se uma banda de baixa intensidade alargada em 3460 cm^{-1} atribuída ao νOH do grupo hidroxila. As absorções em 2950 e 2882 cm^{-1} são atribuídas ao $\nu_{\text{as}}\text{C-H}$ e $\nu_{\text{s}}\text{C-H}$. As bandas em 1466 cm^{-1} e 1360 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais de deformação fora do plano (*scissoring*) e deformação no plano (δ) do C-H, respectivamente. As bandas em

1340 e 1278 cm^{-1} são atribuídas à deformação no plano de O-H. As bandas do PEG2000 referentes ao estiramento assimétrico C-O-C são observadas em 1240 e 1097 cm^{-1} . Em 1059 cm^{-1} observa-se a banda referente ao estiramento C-OH e as vibrações esqueléticas do tipo C-C são observadas em 947 e 840 cm^{-1} (SARAVANAN; SUBRAMANIAN, 2005).

No espectro de FTIR do PMVE/MA observa-se duas bandas em 2939 e 2841 cm^{-1} referente aos $\nu_{\text{as}}\text{C-H}$ e $\nu_{\text{s}}\text{C-H}$ de alifáticos, respectivamente. Anidridos apresentam duas bandas intensas atribuídas aos grupos C=O que são observadas em 1850 e 1774 cm^{-1} , a segunda pode ser usada para identificar o polímero (CHEN et al., 2012). A deformação angular do CH_2 é observada em 1439 cm^{-1} . As bandas em 1221 cm^{-1} , 1086 cm^{-1} e 922 cm^{-1} são atribuídas ao $\nu\text{C-O}$, $\nu\text{C-O-C}$ e νOH , respectivamente (PAVIA et al., 2010).

Ao analisar o espectro na região do infravermelho da nanopartícula Vazia A/O (Figura 4.12) e Vazia O/A (Figura 4.13) observa-se uma banda de baixa intensidade e alargada em 3411 cm^{-1} e de 3367 cm^{-1} , respectivamente, atribuída ao νOH do PEG2000, as bandas características do PEG2000 e do polímero PMVE/MA, entretanto, pode-se notar um grande aumento da intensidade do pico comparada ao espectro do PEG2000; Esse aumento pode ser atribuído aos grupamentos hidroxil (-OH) derivados da abertura de anéis anidridos presentes no polímero devido uma reação de hidrólise (ATODIRESEI; SCHIFFERS; BOLM, 2007). As bandas referentes às atribuições $\nu_{\text{as}}\text{C-H}$ e $\nu_{\text{s}}\text{C-H}$ do PEG2000 e do polímero PMVE/MA são observadas como uma única banda alargada centrada em 2932 cm^{-1} . A banda de identificação do PMVE/MA é observada em 1776 cm^{-1} , sendo essa atribuída ao $\nu\text{C=O}$ do anidrido. Observa-se ainda uma banda intensa em 1703 cm^{-1} também atribuída ao $\nu\text{C=O}$, entretanto, não do anidrido e sim de grupos carboxílicos que foram gerados da abertura de anéis do PMVE/MA, e estes também podem promover a formação de ligações de hidrogênio. As bandas em 1439 cm^{-1} , 1180 cm^{-1} e 1078 cm^{-1} no espectro da nanopartícula Vazia A/O e O/A são atribuídas à deformação angular do CH_2 , $\nu\text{C-O}$ e $\nu\text{C-O-C}$, respectivamente, do polímero PMVE/MA, mas, também sobrepondo bandas características do PEG2000 como, por exemplo, a de 1059 cm^{-1} que é atribuída ao $\nu\text{C-OH}$. O espectro de FTIR da nanopartícula Vazia A/O e O/A é muito semelhante ao espectro do polímero PMVE/MA A/O e O/A.

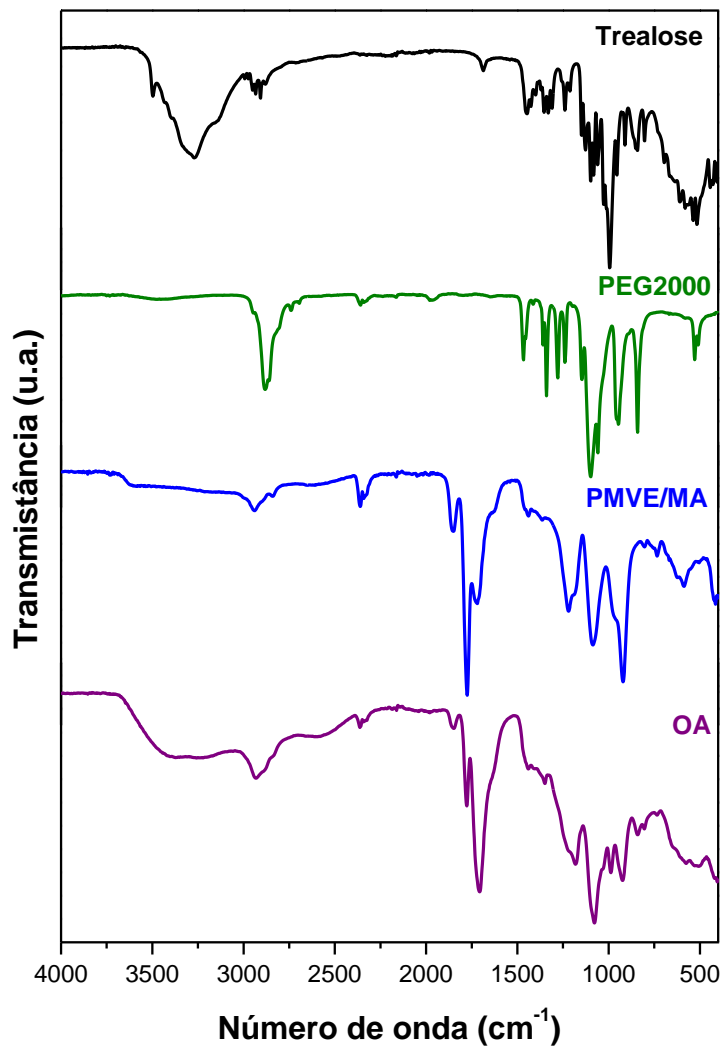


Figura 4.13. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm⁻¹) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da trealose, PEG 2000, PMVE/MA e da nanopartícula Vazia O/A.

A figura 4.14 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho dos nanopartículas Vazias A/O e O/A.

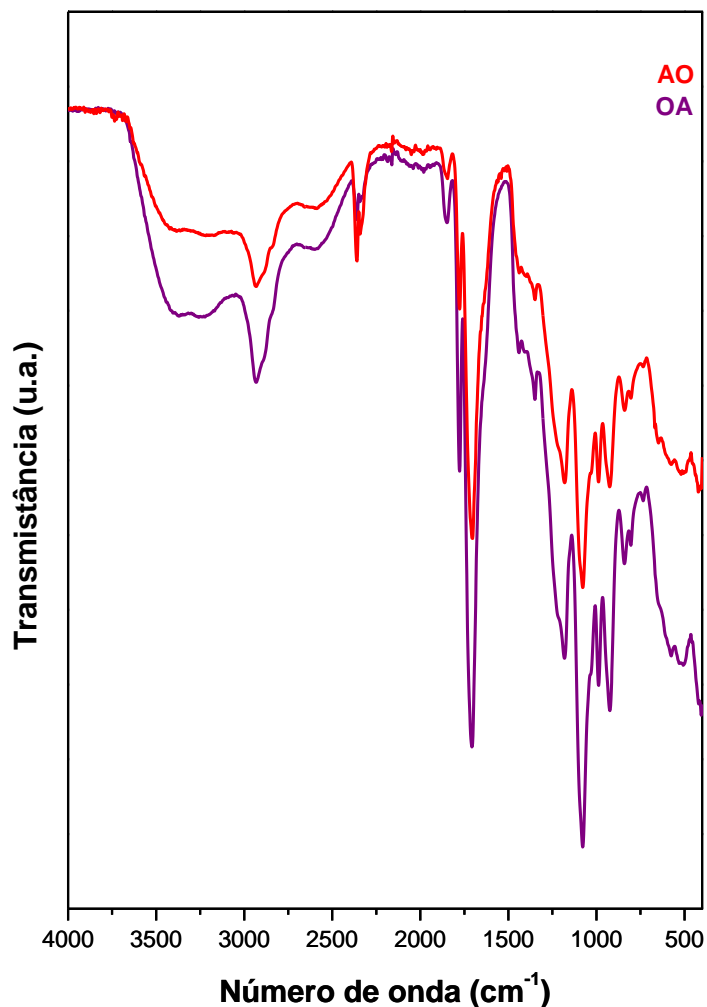


Figura 4.14. Espectros vibracionais na região do infravermelho ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) das nanopartículas Vazias A/O e O/A sobrepostos.

Na análise dos espectros vibracionais na região do infravermelho das nanopartículas vazias sobrepostos, é possível observar que os espectros de ambas as partículas são semelhantes, as bandas estão localizadas nas mesmas regiões com as mesmas atribuições, sem deslocamentos significativos ou o aparecimento de novas bandas na região estudada para as duas amostras, isso permite inferir que independente do tipo de nanoemulsão formada A/O ou O/A nesse estudo, os espectros no FTIR são semelhantes.

Ao analisar os espectros no FTIR da nanopartícula Polybia-MPII A/O (POLY AO) e compara-los aos espectros das nanopartículas Vazia A/O (AO) e Polybia-MPII livre (POLY) (Figura 4.15) pode-se observar que não houve formação de bandas de absorção adicionais ou deslocamentos significativos comparados aos dos constituintes, mostrando que não há interação covalente entre o PAM e o nanossistema. O mesmo pode ser observado na figura 4.16, quando foi comparado os espectros no FTIR da nanopartícula Polybia-MPII O/A (POLY OA) aos espectros das nanopartículas Vazia O/A (OA) e Polybia-MPII livre (POLY).

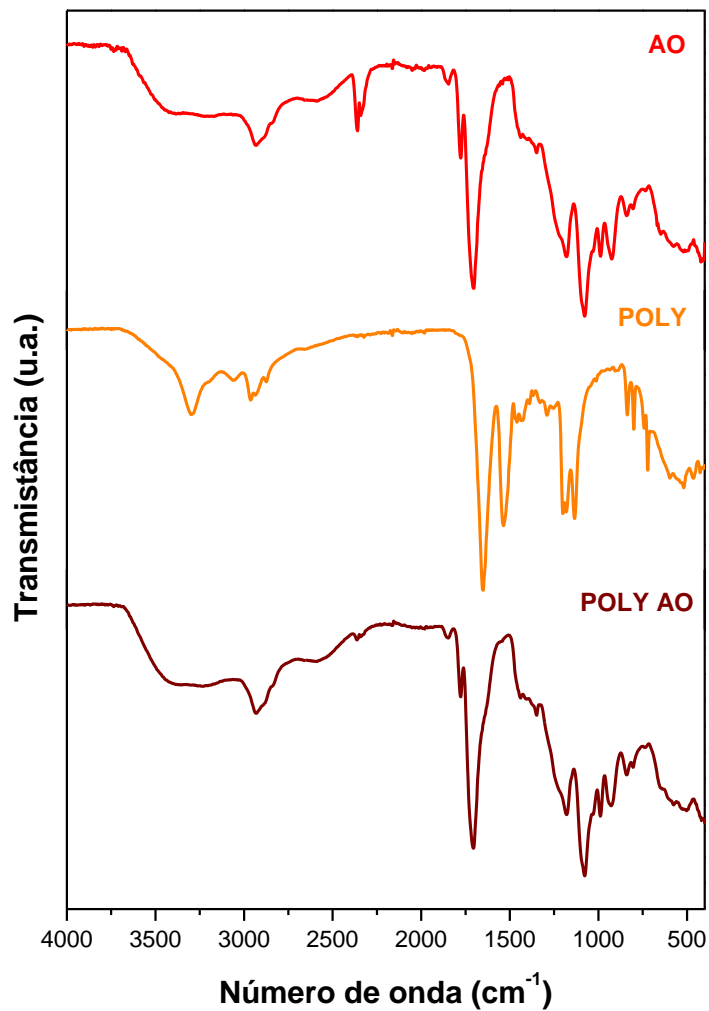


Figura 4.15. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm⁻¹) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da nanopartícula A/O Vazia (AO), Polybia-MPII livre (POLY) e da nanopartícula A/O contendo o Polybia-MPII (POLY AO).

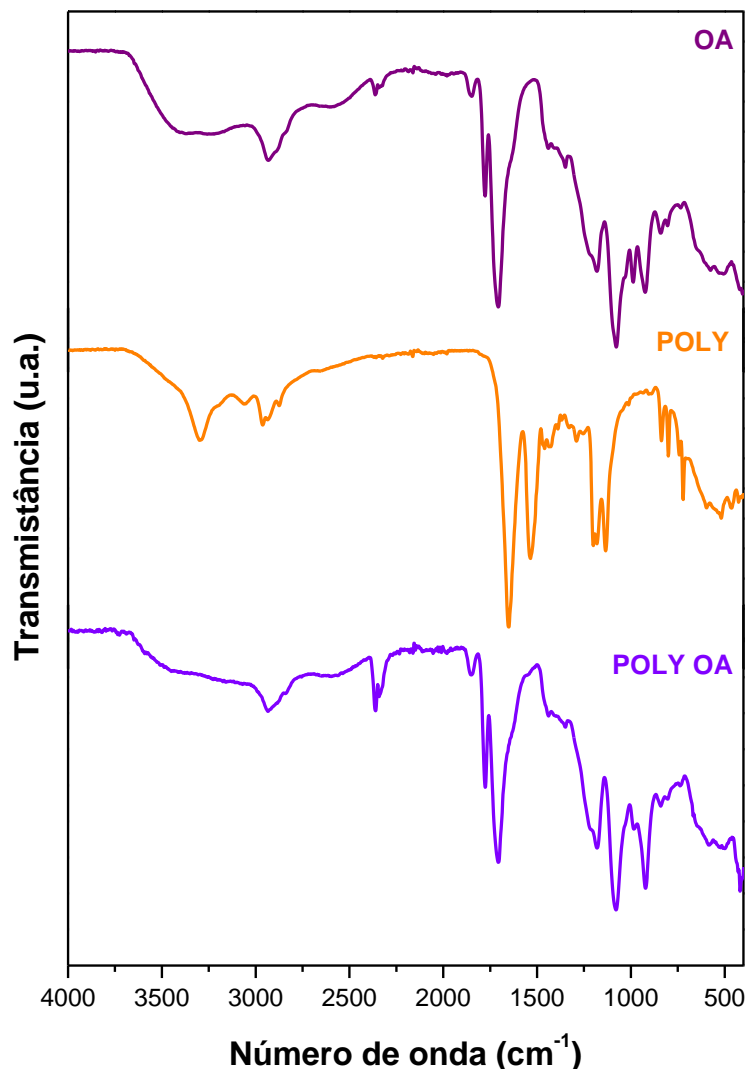


Figura 4.16. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm^{-1}) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da nanopartícula Vazia O/A (OA), Polybia-MPII livre (POLY) e da nanopartícula contendo o Polybia-MPII O/A (POLY OA).

Comparando os espectros vibracionais da nanopartícula Vazia A/O com a nanopartícula Agelaia-MPI A/O (AG AO) (Figura 4.17) é possível observar que são praticamente idênticos. As bandas do AG AO não apresentam deslocamentos significativos em relação a nanopartícula vazia. Observou-se também que há ausência de novas bandas de absorção e que as bandas atribuídas ao Agelaia-MPI livre foram encobertas pelas do nanosistema. Essas análises dos espectros permite inferir que o PAM não formou ligações covalentes com o sistema, e sim uma mistura física. O mesmo pode ser observado na figura 4.18, quando foi comparado os espectros no FTIR da nanopartícula Agelaia-MPI O/A (AG OA) aos espectros das nanopartículas Vazia O/A (AO) e Agelaia-MPI livre (AG).

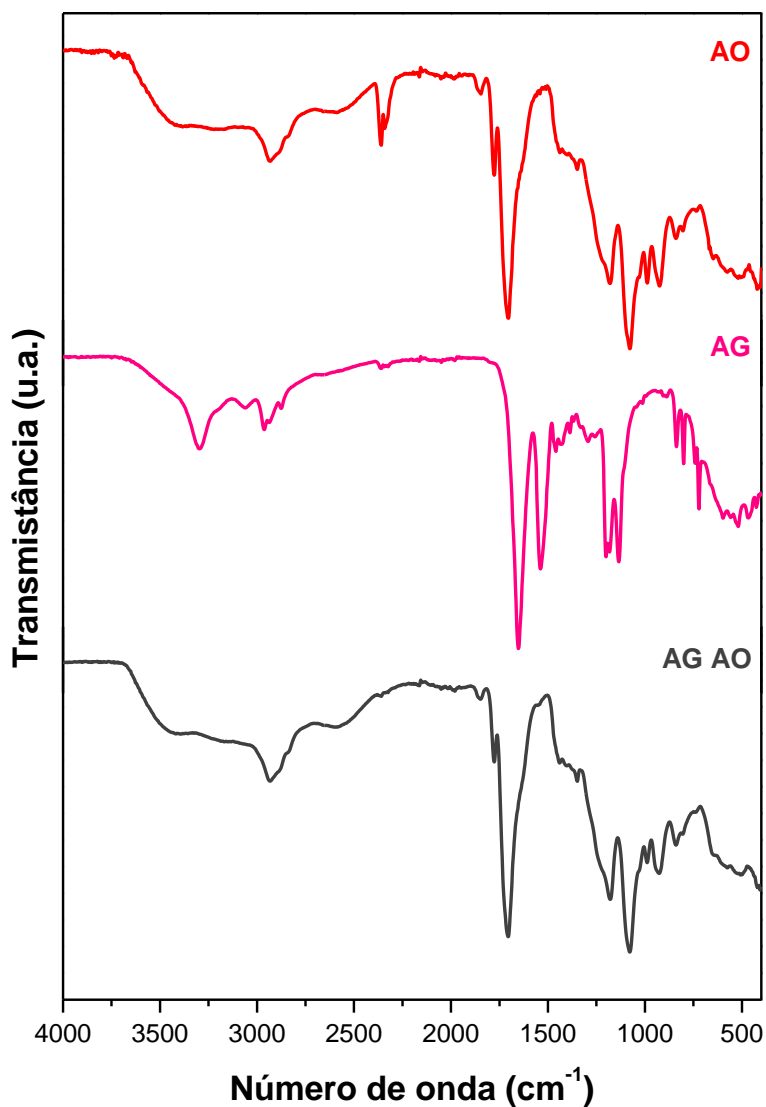


Figura 4.17. Espectros vibracionais na região do infravermelho (4000-400 cm^{-1}) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da nanopartícula Vazia O/A (OA), Agelaia-MPI livre (AG) e da nanopartícula contendo o Agelaia-MPI A/O (AG AO).

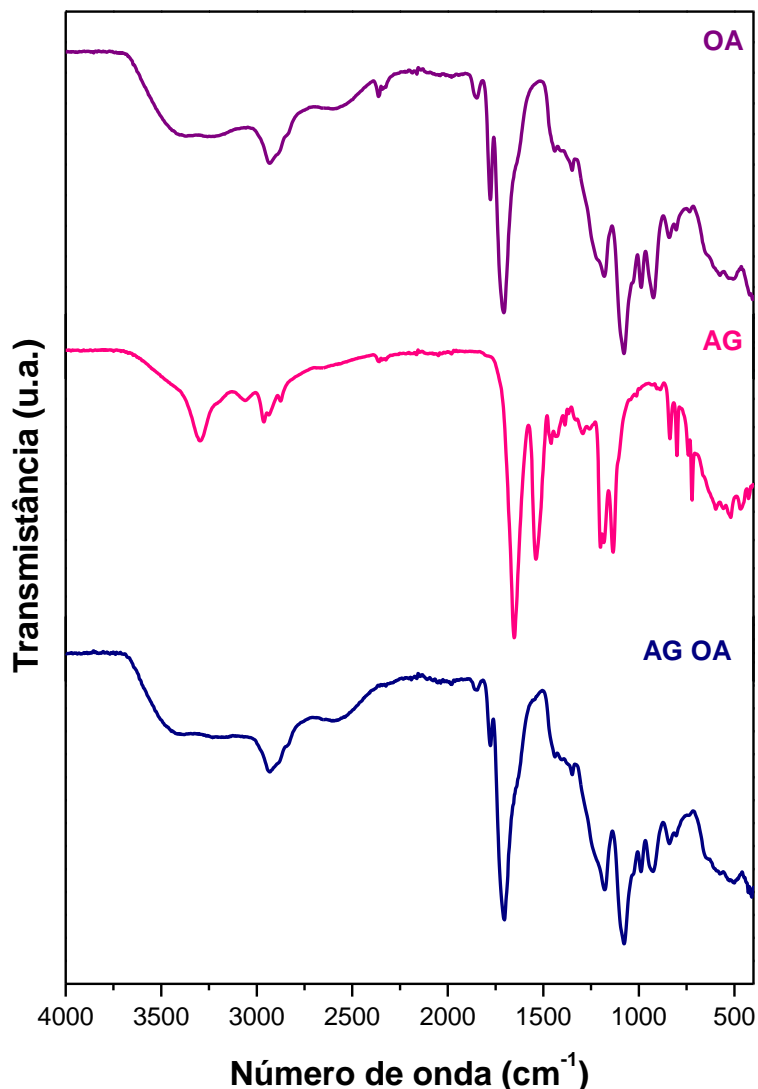


Figura 4.18. Espectros vibracionais na região do infravermelho ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) obtidos por reflexão total atenuada (ATR) da nanopartícula Vazia O/A (OA), Agelaia-MPI livre (AG) e da nanopartícula contendo o Agelaia-MPI O/A (AG OA).

4.3.5. Concentração mínima inibitória (CMI) dos PAMs nanoencapsulados.

Foi avaliada a CMI das nanopartículas Vazia (A/O e O/A), Polybia-MPII (A/O e O/A) e Agelaia-MPI (A/O e O/A) contra o fungo *C. neoformans* (Figura 4.19). A única concentração que foi capaz de reduzir o crescimento fúngico, para ambos os peptídeo, foi de $100\text{ }\mu\text{M}$ (Figura 4.19 C, D, E e F). Os resultados mostraram que é necessário uma concentração maior de PAMs carregados nas nanopartículas, para que estes tenham a capacidade de eliminar o fungo, podendo estar relacionada a liberação do peptídeo pela nanopartícula.

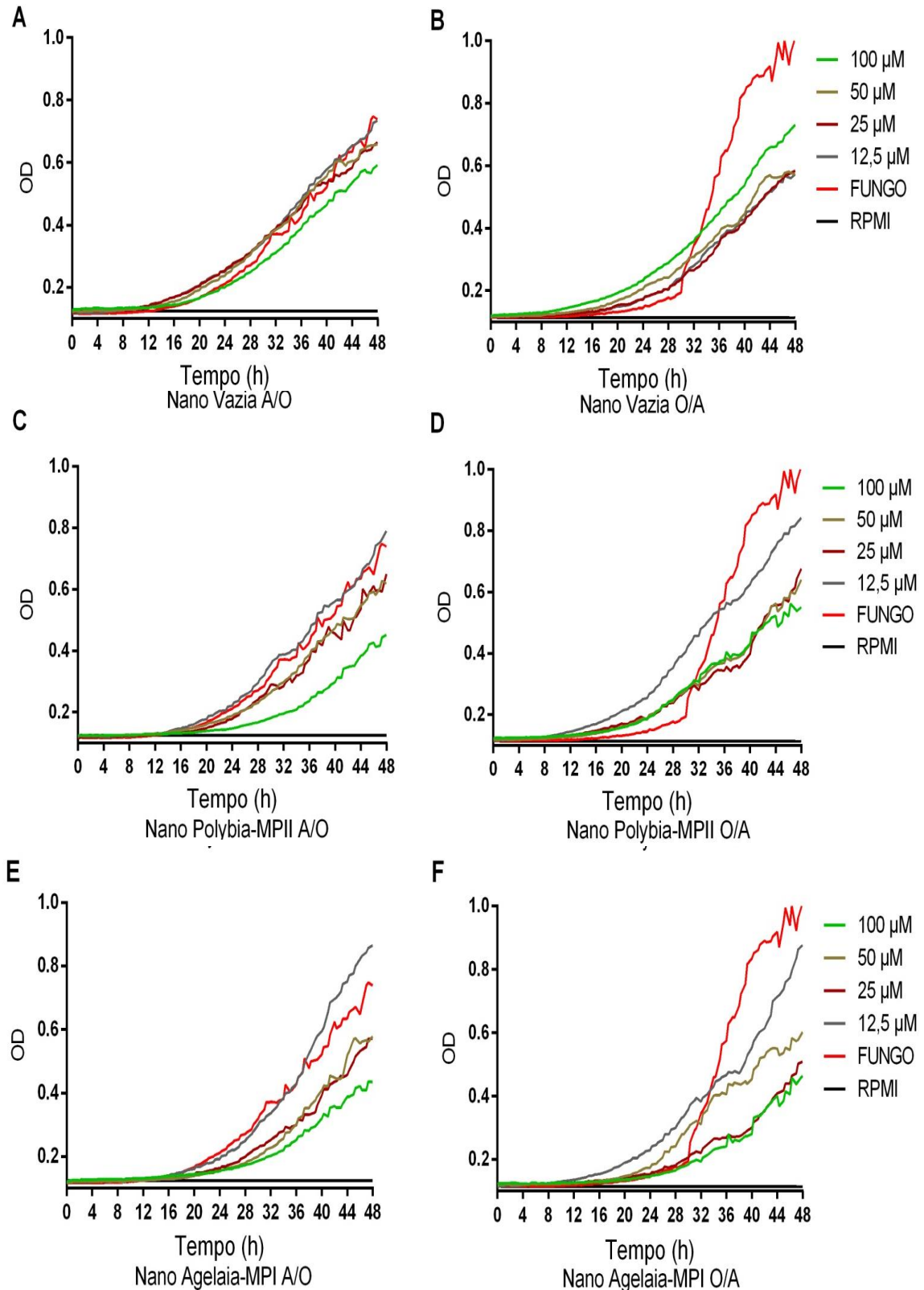


Figura 4.19. Concentração mínima inibitória (CMI) dos PAMs nanoencapsulados em nanopartículas de PMVE/MA contra o fungo *C. neoformans*. Nanopartículas Vazia A/O (A), Vazia O/A (B), Polybia-MPII A/O (C), Polybia-MPII O/A (D), Agelaia-MPI A/O (E) e Agelaia-MPI O/A (F). As concentrações dos PAMs variaram de 12,5 a 400 μM. Como controle de esterilidade (meio) e controle negativo (meio + fungo), dados analisados pelo programa *GraphPad Prism* versão 6.0.

Tomados os resultados em conjunto, o presente estudo mostrou ser possível produzir nanopartículas de PMVE/MA recoberta com PEG vazias ou carregadas com o peptídeo Polybia-MPII ou Agelaia-MPI, com tamanhos hidrodinâmicos na faixa de 200 nm. As nanopartículas carregadas apresentaram uma baixa taxa de carregamento, resultado já esperado devido a pouca massa de cada peptídeo utilizado nas formulações. Além disso, foi constatado que independentemente do tipo de nanoemulsão preparada A/O (Água/Óleo) ou O/A (óleo/Água), os espectros no FTIR são semelhantes indicando que não formaram ligações covalentes com o sistema, e sim uma mistura física, o que pode indicar a formação de um sistema matricial com os peptídeos inseridos na matriz polimérica. Ademais, o peptídeo Polybia-MPII e Agelaia-MPI carregados nas nanopartículas de PMVE/MA mostraram possuir as características antifúngicas, como as descritas no capítulo III.

CONCLUSÃO

No presente estudo, os resultados mostraram que os peptídeos ToAP3 e ToAP4, obtidos de escorpião, são peptídeos promissores para o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias, como foi demonstrado com a redução de mediadores do processo inflamatório agudo. Por sua vez, os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI, obtidos de vespas sócias, apresentaram atividade antifúngica contra o *C. neoformans*. Foi possível o encapsulamento desses últimos peptídeos em nanopartículas de PMVE/MA, mantendo ainda sua atividade antifúngica.

Assim, o presente trabalho contribuiu para uma melhor compreensão da atividade dos peptídeos ToAP3, ToAP4, Polybia-MPII e Agelaia-MPI, fornecendo elementos relevantes que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas terapias, capazes de modular a resposta imunológica do hospedeiro e atuar contra infecções fúngicas como a cryptococose.

PERSPECTIVAS

No presente trabalho foi apresentado quatro peptídeos como moléculas de interesse clínico. Contudo, algumas perguntas ainda precisam ser respondidas em relação a esses candidatos a fármaco. Apesar do potencial anti-inflamatório promissor dos peptídeos ToAP3 e ToAP4, experimentos adicionais são necessários para a confirmação do seu mecanismo de ação, incluindo a utilização desse peptídeos no tratamento da sepse murina induzida por LPS. Considerando o tratamento antifúngico com os peptídeos Polybia-MPII e Agelaia-MPI, os efeitos aditivos demonstrados nos testes de *checkerboard* poderiam ser mais explorados, utilizando estes nos ensaios de biofilmes, bem como no tratamento da criptococose murina, visto que a terapia combinada de fármacos hoje é uma realidade no tratamento clínico. O uso dos peptídeos nanoencapsulados em nanopartículas de PMVE/MA deve ser considerado como uma nova alternativa terapêutica após uma análise mais aprofundada das nanopartículas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIER, Justyna; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. Cathelicidins and defensins regulate mast cell antimicrobial activity. **Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, v. 70, p. 618-636, 2016.

AHSAN, Fakhrul et al. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. **Journal of controlled release**, v. 79, n. 1-3, p. 29-40, 2002.

AL-FATTANI, Mohammed A.; DOUGLAS, L. Julia. Penetration of Candida biofilms by antifungal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3291-3297, 2004.

ALIABADI, Hamidreza Montazeri et al. Encapsulation of hydrophobic drugs in polymeric micelles through co-solvent evaporation: the effect of solvent composition on micellar properties and drug loading. **International journal of pharmaceuticals**, v. 329, n. 1-2, p. 158-165, 2007.

ALMAAYTAH, Ammar; ALBALAS, Qosay. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. **Peptides**, v. 51, p. 35-45, 2014.

ALMEIDA, Fausto; WOLF, Julie M.; CASADEVALL, Arturo. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-1185, 2015.

AMID, Clara et al. Manual annotation and analysis of the defensin gene cluster in the C57BL/6J mouse reference genome. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 606, 2009.

ARMSTRONG-JAMES, Darius; MEINTJES, Graeme; BROWN, Gordon D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 3, p. 120-127, 2014.

ATODIRESEI, Iuliana; SCHIFFERS, Ingo; BOLM, Carsten. Stereoselective anhydride openings. **Chemical reviews**, v. 107, n. 12, p. 5683-5712, 2007.

AUVYNET, Constance; ROSENSTEIN, Yvonne. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. **The FEBS journal**, v. 276, n. 22, p. 6497-6508, 2009.

BANCHEREAU, Jacques et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

BANCHEREAU, Jacques; STEINMAN, Ralph M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245, 1998.

BAPTISTA-SAIDEMBERG, Nicoli B. et al. Protonectin (1–6): A novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaisia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 880-889, 2010.

BARNETT, James A.; BARNETT, Linda. **Yeast research: a historical overview**. American Society for Microbiology Press, 2011.

BÉKONDI, Claudine et al. Primary and opportunistic pathogens associated with meningitis in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus. **International journal of infectious diseases**, v. 10, n. 5, p. 387-395, 2006.

BELOKONEVA, Olga S. et al. Pore formation of phospholipid membranes by the action of two hemolytic arachnid peptides of different size. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1664, n. 2, p. 182-188, 2004.

BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; THEODORE, T. S. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 16, n. 3, p. 167-174, 1978.

BIRAGYN, Arya et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin 2. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 1025-1029, 2002.

BITAR, Dounia et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 7, p. 1149, 2014.

BRIGGER, Irene; DUBERNET, Catherine; COUVREUR, Patrick. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 24-36, 2012.

BROWN, Bryan N. et al. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 33, n. 15, p. 3792-3802, 2012.

BROWN, Gordon D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BROWN, Gordon D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 1-21, 2011.

BROWN, K. L. et al. Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses. **The Journal of Immunology**, v. 86, n. 9, p. 5497-5505, 2011.

CASCIARO, Bruno et al. Esculentin-1a derived antipseudomonal peptides: limited induction of resistance and synergy with aztreonam. **Protein and peptide letters**, v. 25, n. 12, p. 1155-1162, 2018.

CAUX, Christophe et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+ TNF alpha. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 695-706, 1996.

CHANDRA, Jyotsna et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CHEN, Ai-Zheng et al. Preparation of poly-(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles by solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. **Materials**, v. 5, n. 10, p. 1841-1852, 2012.

CHEN, Y. F et al. TRAIL encapsulated to polypeptide-crosslinked nanogel exhibits increased anti-inflammatory activities in *Klebsiella pneumoniae*-induced sepsis treatment. **Materials Science and Engineering**, v. 102, n. 1, p. 85-95, 2019.

CLANCY, Robert M.; AMIN, Ashok R.; ABRAMSON, Steven B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 41, n. 7, p. 1141-1151, 1998.

CODOGNOTO, Luciane da Cunha et al. Silage of the agro-industrial co-product of babassu palm heart processing in sheep feed. **Ciência Rural**, v. 49, n. 4, 2019.

CONDE, Renaud et al. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. **FEBS letters**, v. 471, n. 2-3, p. 165-168, 2000.

CROSS, Raymond K.; WILSON, Keith T. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 9, n. 3, p. 179-189, 2003.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

CUNHA, Alexandra Olimpio Siqueira et al. Anticonvulsant effects of the wasp *Polybia ignobilis* venom on chemically induced seizures and action on GABA and glutamate receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 50-57, 2005.

CUNHA-AZEVEDO, Elaine P. et al. In vitro antifungal activity and toxicity of itraconazole in DMSA-PLGA nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, n. 3, p. 2308-2314, 2011.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 742-780, 1997.

CURTSINGER, Julie M.; MESCHER, Matthew F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 3, p. 333-340, 2010.

DAN, Cao et al. Modulation of TNF- α mRNA stability by human antigen R and miR181s in sepsis-induced immunoparalysis. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 2, p. 140-157, 2015.

DANIELE-SILVA, Alessandra et al. Stigmurin and TsAP-2 from *Tityus stigmurus* scorpion venom: Assessment of structure and therapeutic potential in experimental sepsis. **Toxicon**, v. 121, p. 10-21, 2016.

DAS NEVES, Rogério Coutinho et al. Antimicrobial and antibiofilm effects of peptides from venom of social Wasp and scorpion on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Toxins**, v. 11, n. 4, p. 216, 2019.

DAS NEVES et al. Antimycobacterial Activity of a New Peptide Polydim-I Isolated from Neotropical Social Wasp *Polybia dimorpha*, **PLoS One**, v. 11, n. 3, e0149729, 2016.

DATTA, Aritreyee et al. Mode of action of a designed antimicrobial peptide: high potency against *Cryptococcus neoformans*. **Biophysical journal**, v. 111, n. 8, p. 1724-1737, 2016.

DE ARAÚJO, Alyne Rodrigues et al. Antifungal and anti-inflammatory potential of eschweilenol C-rich fraction derived from *Terminalia fagifolia* Mart. **Journal of ethnopharmacology**, p. 111941, 2019.

DE JONG, Esther C.; SMITS, Hermelijn H.; KAPSENBERG, Martien L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. In: **Springer seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2005. p. 289-307.

DE LA VEGA, Ricardo C. Rodríguez; SCHWARTZ, Elisabeth F.; POSSANI, Lourival D. Mining on scorpion venom biodiversity. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1155-1161, 2010.

DE SOUSA, F. C. F. et al. Central nervous system activity of yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 19, n. 4, p. 282-286, 2005.

DEBIN, John A.; MAGGIO, John E.; STRICHARTZ, Gary R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 264, n. 2, p. C361-C369, 1993.

DEBIN, John A.; MAGGIO, John E.; STRICHARTZ, Gary R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 264, n. 2, p. C361-C369, 1993.

DELEAULT, Kristen M.; SKINNER, Stephen J.; BROOKS, Seth A. Tristetraprolin regulates TNF TNF- α mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. **Molecular immunology**, v. 45, n. 1, p. 13-24, 2008.

DIAS, N. B et al. Profiling the short, linear, non-disulfide bond-containing peptidome from the venom of the scorpion *Tityus obscurus*. **Journal of Proteomics**, v. 170, n. 6, p. 70-79, 2018.

DJORDJEVIC, Julianne. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development—lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 125, 2010.

DOHTSU, Kunihiro et al. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (hymenoptera-vespidae). **Natural toxins**, v. 1, n. 5, p. 271-276, 1993.

DONLAN, Rodney M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DURNAŚ, Bonita et al. Candidacidal activity of selected ceragenins and human cathelicidin LL-37 in experimental settings mimicking infection sites. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157242, 2016.

DUTTA, Ranjna C. Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. **Immunology letters**, v. 83, n. 3, p. 153-161, 2002.

ELIAZ, Rom E.; SZOKA, Francis C. Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells. **Cancer research**, v. 61, n. 6, p. 2592-2601, 2001.

EL-SHERBINY, Ibrahim M.; SMYTH, Hugh DC. Biodegradable nano-micro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery:(I) self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable/swellable semi-IPN microspheres. **International journal of pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 132-141, 2010.

FANG, Zhongxiang; BHANDARI, Bhesh. Encapsulation of polyphenols—a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.

FELDMESSER, Marta; KRESS, Yvonne; CASADEVALL, Arturo. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 2355-2365, 2001.

FJELL, Christopher D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 1, p. 37, 2012.

FRANZOT, Sarah P.; SALKIN, Ira F.; CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838-840, 1999.

GANZ, Tomas. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature reviews immunology**, v. 3, n. 9, p. 710, 2003.

GATI, Christiano DC; MORTARI, Márcia R.; SCHWARTZ, Elisabeth F. Towards therapeutic applications of arthropod venom K. **Journal of Toxicology**, v. 2012, 2012.

GERMAIN, Ronald N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 287-299, 1994.

GHOSH, Sankar; MAY, Michael J.; KOPP, Elizabeth B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual review of immunology**, v. 16, n. 1, p. 225-260, 1998.

GIRI, Tapan Kumar et al. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 125-141, 2013.

GOVENDER, Thirumala et al. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 2, p. 171-185, 1999.

GREEN, Laura C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUERMONPREZ, Pierre et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 621-667, 2002.

GUILHELMELLI, Fernanda et al. Activity of scorpion venom-derived antifungal peptides against planktonic cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* biofilms. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1844, 2016.

GUIMARÃES, Paulo C. Leventi et al. Fabrication and characterization of glycine-loaded PEG nanoparticles for drug delivering: A comprehensive SERS study. **Applied Surface Science**, v. 450, p. 396-403, 2018.

HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95, 2004.

HANCOCK, R. E. W.; PATRZYKAT, A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. **Current drug targets-Infectious disorders**, v. 2, n. 1, p. 79-83, 2002.

HANCOCK, Robert EW; LEHRER, Robert. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 82-88, 1998.

HANCOCK, Robert EW; SAHL, Hans-Georg. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551, 2006.

HE, Yawen et al. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. **Journal of proteomics**, v. 89, p. 1-14, 2013.

HIGASHIMA, Masato; SAWADA, Satsuki; YAMAMOTO, Chosaburo. Applicability of Pascal distribution to quantal analysis for non-stationary release of neurotransmitter. **Neuroscience letters**, v. 115, n. 2-3, p. 231-236, 1990.

HILCHIE, Ashley L.; WUERTH, Kelli; HANCOCK, Robert EW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Nature chemical biology**, v. 9, n. 12, p. 761, 2013.

HIRAI, Yuko et al. A new mast cell degranulating peptide" mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1942-1944, 1979.

HOLLAND, Steven M.; VIZI, E. Sylvester. Immunomodulation. **Current opinion in pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 425-427, 2002.

HSIEH, W. H. et al. Non-isothermal Dehydration Kinetics of Glucose Monohydrate, Maltose Monohydrate and Trehalose Dihydrate by Thermal Analysis and DSC-FTIR Study. **J. Biomed. Pharm. Sci.**, v. 1, p. 101, 2018.

HU, Z et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. **International Immunology**, v. 28, n. 5, p. 245-253, 2016.

HUANG, Yibing; HUANG, Jinfeng; CHEN, Yuxin. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein & cell**, v. 1, n. 2, p. 143-152, 2010.

IDNURM, Alexander et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753, 2005.

IGNASIAK, Katarzyna; MAXWELL, Anthony. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC research notes**, v. 10, n. 1, p. 428, 2017.

IRACHE, Juan et al. Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 126-145, 2005.

JACOBSEN, Lars C. et al. Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 3084-3087, 2007.

JOYCE-BRADY, Martin et al. Mechanisms of mastoparan-stimulated surfactant secretion from isolated pulmonary alveolar type 2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 11, p. 6859-6865, 1991.

JUNG, T. et al. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 147-160, 2000.

KANAFANI, Zeina A.; PERFECT, John R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KIRKLEY, Scott A. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, n. 5, p. 652-657, 1999.

KONNO, Katsuhiro et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1550, n. 1, p. 70-80, 2001.

KONNO, Katsuhiro et al. Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 250, n. 3, p. 612-616, 1998.

KOPPEN, B. C. et al. PT US CR. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018

KOŚCIUCZUK, Ewa M. et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 12, p. 10957-10970, 2012.

KUMARI, A. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.1, n. 75p. 1-8, 2010.

KWON-CHUNG, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia**, v. 68, n. 4, p. 942-946, 1976.

LABRO, Marie-Thérèse. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”?. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 615-650, 2000.

LAI, Yuping; GALLO, Richard L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in immunology**, v. 30, n. 3, p. 131-141, 2009.

LANIADO-LABORÍN, Rafael; CABRALES-VARGAS, Maria Noemí. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

- LEE, Jerry C. et al. Modulation of the local neutrophil response by a novel hyaluronic acid-binding peptide reduces bacterial burden during staphylococcal wound infection. **Infection and immunity**, v. 78, n. 10, p. 4176-4186, 2010.
- LEÓN-RODRIGUEZ, Laura et al. Incorporation of PVMMA to PLGA MS enhances lectin grafting and their in vitro activity in macrophages. **International journal of pharmaceutics**, v. 402, n. 1-2, p. 165-174, 2010.
- LEVY, Stuart B.; MARSHALL, Bonnie. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v. 10, n. 12s, p. S122, 2004.
- LI, Ming O.; FLAVELL, Richard A. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- β and interleukin-10. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 468-476, 2008.
- LI, Ming-Liang et al. Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan M. **International journal of antimicrobial agents**, v. 13, n. 3, p. 203-208, 2000.
- LIN, Chun-Hsien et al. In vitro activity of mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli isolates from animals. **Peptides**, v. 36, n. 1, p. 114-120, 2012.
- LIN, Edward; CALVANO, Steve E.; LOWRY, Stephen F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.
- LIN, Guan-Yu et al. The antimicrobial peptides P-113Du and P-113Tri function against Candida albicans. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6369-6373, 2016.
- LIN, Xiaorong. Cryptococcus neoformans: morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 401-416, 2009.
- LIN, Xiaorong; HEITMAN, Joseph. The biology of the Cryptococcus neoformans species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIN, Xiaorong; HEITMAN, Joseph. The biology of the Cryptococcus neoformans species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIU, Beijun et al. Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial activity in vitro and in vivo by intermolecular triazole bridge strategy. **Peptides**, v. 88, p. 115-125, 2017.
- LIU, Zonghua et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650-1662, 2008.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LOPEZ-BELMONTE, J.; WHITTLE, B. JR ; MONCADA, S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. **British journal of pharmacology**, v. 108, n. 1, p. 73-78, 1993.

LUTZ, Manfred B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of immunological methods**, v. 223, n. 1, p. 77-92, 1999.

LYU, Yinfeng et al. Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and Candida. **Scientific reports**, v. 6, p. 27258, 2016.

NAHAR, M et al. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 4, n. 3, p. 252-61, 2008.

MACHADO, Paulo RL et al. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-662, 2004.

MAH, Thien-Fah C.; O'TOOLE, George A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAHNKE, Karsten et al. Interaction of regulatory T cells with antigen-presenting cells in health and disease. In: **T Cell Regulation in Allergy, Asthma and Atopic Skin Diseases**. Karger Publishers, 2008. p. 29-39.

MANSOUR, Sarah C.; PENA, Olga M.; HANCOCK, Robert EW. Host defense peptides: front-line immunomodulators. **Trends in immunology**, v. 35, n. 9, p. 443-450, 2014.

MANTOVANI, Alberto; SICA, Antonio; LOCATI, Massimo. New vistas on macrophage differentiation and activation. **European journal of immunology**, v. 37, n. 1, p. 14-16, 2007.

MARTINEZ, Luis R.; CASADEVALL, Arturo. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infection and immunity**, v. 73, n. 10, p. 6350-6362, 2005.

MARTINEZ, Luis R.; GARCIA-RIVERA, Javier; CASADEVALL, Arturo. Cryptococcus neoformans var. neoformans (serotype D) strains are more susceptible to heat than C. neoformans var. grubii (serotype A) strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3365-3367, 2001.

MELLOR, Ian R.; USHERWOOD, Peter NR. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins ☆. **Toxicon**, v. 43, n. 5, p. 493-508, 2004.

MENDES, Maria Anita et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 67-74, 2004.

MITCHELL, Thomas G.; PERFECT, John R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.

MONCADA, S. R. M. J. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol rev**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONGE-FUENTES, Victoria et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 166, p. 301-310, 2017.

MONTEIRO, Marta C.; ROMÃO, Pedro RT; SOARES, Andreimar M. Pharmacological perspectives of wasp venom. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 8, p. 944-952, 2009.

MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 7-8, p. 922, 2007.

MORTARI, Márcia Renata et al. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 97, n. 5, p. 289-295, 2005.

MORTARI, Márcia Renata et al. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacology & therapeutics**, v. 114, n. 2, p. 171-183, 2007.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURELLE, D. et al. Hyperalgesic and edematogenic effects of Secapin-2, a peptide isolated from Africanized honeybee (*Apis mellifera*) venom. **Peptides**, v. 59, p. 42-52, 2014.

MOURELLE, MARISABEL et al. Toxic dilatation of colon in a rat model of colitis is linked to an inducible form of nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 270, n. 3, p. G425-G430, 1996.

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 723, 2011.

NAGAO, Miki et al. Predictors of *Candida* spp. as causative agents of catheter-related bloodstream infections. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 80, n. 3, p. 200-203, 2014.

NAHID, Md A.; SATOH, Minoru; CHAN, Edward KL. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. **Cellular & molecular immunology**, v. 8, n. 5, p. 388, 2011.

NAKAHATA, Norimichi et al. Mastoparan inhibits phosphoinositide hydrolysis via pertussis toxin-intensive G-protein in human astrocytoma cells. **FEBS letters**, v. 260, n. 1, p. 91-94, 1990.

NAKAJIMA, TERUMI. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. **Venoms of the Hymenoptera**, p. 309-327, 1986.

NARAYANA, Jayaram Lakshmaiah; CHEN, Jyh-Yih. Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents. **Peptides**, v. 72, p. 88-94, 2015.

NICOLA, André Moraes et al. Antifungal drugs: new insights in research & development. **Pharmacology & therapeutics**, 2018.

O'CONNELL, Ryan M. et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1604-1609, 2007.

ODDS, Frank C. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. **Mycologist**, v. 17, n. 2, p. 51-55, 2003.

OLIVEIRA, Caio Marcio Barros de et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

ORTIZ, Ernesto et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125-135, 2015.

PANDEY, Rajesh et al. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 981-986, 2003.

PARAMYTHIOTOU, Elisabeth et al. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1085-1119, 2014.

PARK, Benjamin J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.

PATIL, J. S.; SARASIJA, S. Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review. **Lung India: Official Organ of Indian Chest Society**, v. 29, n. 1, p. 44, 2012.

PATTON, John S.; FISHBURN, C. Simone; WEERS, Jeffry G. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, n. 4, p. 338-344, 2004.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R.; 2010. **Introdução à Espectroscopia**, 4th ed. Washington, D.C.

PENA, Olga M. et al. Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e52449, 2013.

PERFECT, John R. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better?. **Current medical research and opinion**, v. 29, n. sup4, p. 3-11, 2013.

PIEK, T. et al. Smooth muscle contracting compounds in the venom of *Megascolia flavifrons* (Hym: Scoliidae) with notes on the stinging behaviour. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 75, n. 1, p. 145-152, 1983.

PILMIS, B. et al. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 681-687, 2016.

PIMENTA, Adriano MC; DE LIMA, Maria Elena. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society**, v. 11, n. 11, p. 670-676, 2005.

POSSANI, Lourival D. et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 287-300, 1999.

PUCCA, Manuela B. et al. Electrophysiological characterization of the first Tityus serrulatus alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages. **Biochimie**, v. 115, p. 8-16, 2015.

PUCCA, Manuela Berto et al. Non-disulfide-bridged peptides from Tityus serrulatus venom: evidence for proline-free ACE-inhibitors. **Peptides**, v. 82, p. 44-51, 2016.

RADEK, Katherine; GALLO, Richard. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2007. p. 27-43.

RAEBURN, C.D et al. Cytokines for surgeons. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n. 3, p. 268-273.

RAJASEKARAN, G. et al. PT Republic of Korea. **BBA - Biomembranes**, p. 2018

RAJASINGHAM, Radha et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

RAMAGE, Gordon et al. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2475-2479, 2001.

RAO, J. Prasad; GECKELER, Kurt E. Cyclodextrin supramacromolecules: unexpected formation in aqueous phase under ambient conditions. **Macromolecular rapid communications**, v. 32, n. 5, p. 426-430, 2011.

RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; RICHARDSON, Malcolm D. Systemic fungal infections. **Medicine**, v. 45, n. 12, p. 757-762, 2017.

REPP, Kimberly K.; MENOR, Scott A.; PETTIT, Robin K. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of Candida albicans biofilms. **Medical mycology**, v. 45, n. 7, p. 603-607, 2007.

RIBEIRO, Suzana Meira et al. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolates to β -lactam antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3906-3912, 2015.

RISS, Terry L. et al. Cell viability assays. 2016.

RIVERS, David B.; ROCCO, Mary M.; FRAYHA, Anis R. Venom from the ectoparasitic wasp Nasonia vitripennis increases Na⁺ influx and activates phospholipase C and phospholipase A2 dependent signal transduction pathways in cultured insect cells. **Toxicon**, v. 40, n. 1, p. 9-21, 2002.

ROBERT, Vincent A.; CASADEVALL, Arturo. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 10, p. 1623-1626, 2009.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275, 2011.

ROSINA, Claudia Renata; BARONI, Silmara; CAVALCANTI, Osvaldo Albuquerque. Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade de filmes isolados de polimetacrilato contendo polissacarídeo da raiz de Lótus (*Nelumbo nucifera*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 425-431, 2004.

ROY, Anupam; L FRANCO, Octavio; M MANDAL, Santi. Biomedical exploitation of self assembled peptide based nanostructures. **Current Protein and Peptide Science**, v. 14, n. 7, p. 580-587, 2013.

SABLE, Carole A.; STROHMAIER, Kim M.; CHODAKEWITZ, Jeffrey A. Advances in antifungal therapy. **Annu. Rev. Med.**, v. 59, p. 361-379, 2008.

SANGALLI-LEITE, F et al. Synergistic effect of pedalitin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by in vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 5, p. 504-511, 2016.

SANGLARD, Dominique. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v. 17, n. 2, p. 74-78, 2003.

SARAVANAN, L.; SUBRAMANIAN, S. Surface chemical studies on the competitive adsorption of poly (ethylene glycol) and ammonium poly (methacrylate) onto alumina. **Journal of colloid and interface science**, v. 284, n. 2, p. 363-377, 2005.

SCHEINECKER, Clemens. Blockade of co-stimulation in chronic inflammatory diseases. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 165, n. 1-2, p. 23-27, 2015.

SCHIAVONE, Marion et al. Evidence for a role for the plasma membrane in the nanomechanical properties of the cell wall as revealed by an atomic force microscopy study of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol stress. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 82, n. 15, p. 4789-4801, 2016.

SCHÜLKE, S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 455, 2018.

SCHWARTZ, Elisabeth F. et al. OcyKTx2, a new K⁺-channel toxin characterized from the venom of the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Peptides**, v. 46, p. 40-46, 2013.

SCOTT, Monisha G. et al. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **The journal of immunology**, v. 169, n. 7, p. 3883-3891, 2002.

SEIL, Michèle et al. Spotlight on human LL-37, an immunomodulatory peptide with promising cell-penetrating properties. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 11, p. 3435-3460, 2010.

SHARMA, Krishna K. et al. Discovery of a membrane-active, ring-modified histidine containing ultrashort amphiphilic peptide that exhibits potent inhibition of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 15, p. 6607-6621, 2017.

SHENG, Chunquan; ZHANG, Wannian. New lead structures in antifungal drug discovery. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 5, p. 733-766, 2011.

- SILVA, Juliana C. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of the mastoparan Polybia-MPII isolated from venom of the social wasp *Pseudopolybia vespaceps testacea* (Vespidae, hymenoptera). **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 2, p. 167-175, 2017.
- SILVA, O. N. et al. An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. **Scientific reports**, v. 6, p. 35465, 2016.
- SILVA, Sónia et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.
- SOPPIMATH, Kumares S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.
- SØRENSEN, Ole E.; BORREGAARD, Niels; COLE, Alexander M. Antimicrobial peptides in innate immune responses. In: **Trends in innate immunity**. Karger Publishers, 2008. p. 61-77.
- SOUZA, A. C. O. et al. Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. **European journal of medicinal chemistry**, v. 95, p. 267-276, 2015.
- SOUZA, Bibiana M. et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, n. 11, p. 2157-2164, 2005.
- SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Darío. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- STEINER, H. et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246, 1981.
- STEINMAN, Ralph M.; HEMMI, Hau. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. In: **From Innate Immunity to Immunological Memory**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 17-58.
- STOTZ, Henrik U.; THOMSON, James; WANG, Yueju. Plant defensins: defense, development and application. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 11, p. 1010-1012, 2009.
- SUK, Jung Soo et al. The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, n. 13, p. 2591-2597, 2009.
- TANG, Benjamin C. et al. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 46, p. 19268-19273, 2009.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. TRIzol Reagent User Guide - Pub. no. MAN0001271 - Rev. A.0. **User Guide**, v. 15596018, n. 15596026, p. 1-6, 2016.
- TILI, Esmerina et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5082-5089, 2007.

TIYABOONCHAI, Waree. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2013.

TIZARD, I.R. **Imunologia básica – uma introdução**. Roca Ltda, São Paulo, 5^o edição, 147-159. 1998.

TONGAONKAR, Prasad et al. Rhesus macaque θ -defensin RTD-1 inhibits proinflammatory cytokine secretion and gene expression by inhibiting the activation of NF- κ B and MAPK pathways. **Journal of leukocyte biology**, v. 98, n. 6, p. 1061-1070, 2015.

TREVIJANO-CONTADOR, Nuria et al. Cryptococcus neoformans induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model Galleria mellonella. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 66-74, 2015.

TREVIJANO-CONTADOR, Nuria; ZARAGOZA, Oscar. Immune Response of Galleria mellonella against Human Fungal Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 3, 2019.

UHRICH, Kathryn E. et al. Polymeric systems for controlled drug release. **Chemical reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181-3198, 1999.

VALENCIA-SANCHEZ, Marco Antonio et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes & development**, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2006.

WAGNER, Claudia C.; BARAN, Enrique J. Vibrational spectra of bis (L-methioninato) copper (II). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 287-290, 2002.

WALTON, Felicia J.; IDNURM, Alexander; HEITMAN, Joseph. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen Cryptococcus neoformans. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1381-1396, 2005.

WANG, Kairong et al. Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2365-2373, 2015.

WASEEM, T et al. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. **Surgery**, v. 143, n. 3, p. 334-342. 2008.

WHEELER-JONES, C. P. D. et al. Mastoparan promotes exocytosis and increases intracellular cyclic AMP in human platelets. Evidence for the existence of a Ge-like mechanism of secretion. **Biochemical Journal**, v. 281, n. 2, p. 465-472, 1992.

YANG, Lin et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical journal**, v. 81, n. 3, p. 1475-1485, 2001.

YASUHARA, Tadashi et al. Two kinins isolated from an extract of the venom reservoirs of the solitary wasp Megascolia flavifrons. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 527-535, 1987.

YU, Changzhong et al. Effective inhibition of Cbf-14 against Cryptococcus neoformans infection in mice and its related anti-inflammatory activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 110, p. 38-47, 2018.

ZARAGOZA, Oscar et al. The polysaccharide capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* enlarges by distal growth and is rearranged during budding. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 1, p. 67-83, 2006.

ZEA, Arnold H. et al. l-Arginine modulates CD3 ζ expression and T cell function in activated human T lymphocytes. **Cellular immunology**, v. 232, n. 1-2, p. 21-31, 2004.

ZENG, Xian-Chun et al. Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. **Peptides**, v. 45, p. 28-34, 2013.

ZENG, Xian-Chun; CORZO, Gerardo; HAHIN, Richard. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. **IUBMB life**, v. 57, n. 1, p. 13-21, 2005.

ZENG, Xian-Chun; WANG, San-Xia; LI, Wen-Xin. Identification of BmKAPi, a novel type of scorpion venom peptide with peculiar disulfide bridge pattern from *Buthus martensii* Karsch. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1719-1722, 2002.

ZHANG, Dong et al. Multifunctional poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)-graft-hydroxypropyl- β -cyclodextrin amphiphilic copolymer as an oral high-performance delivery carrier of tacrolimus. **Molecular pharmaceutics**, v. 12, n. 7, p. 2337-2351, 2015.

ZHANG, Jun-Ming; AN, Jianxiong. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27, 2007.

ZOCCAL, Karina Furlani et al. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, n. 7-8, p. 1101-1108, 2011.

ANEXO I



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 27 de outubro de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE ESCORPIÃO E DE VESPA E SUA APLICAÇÃO EM MODELO DE INFECÇÃO FÚNGICA PULMONAR.", UnBDoC n.º 66704/2016, sob responsabilidade da Professora Anamélia Lorenzetti Bocca foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (117 machos). A presente aprovação é válida pelo período de 1º/09/2016 a 31/08/2018.



Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

APÊNDICE I

Artigo publicado

Paulo Henrique de Holanda Veloso Júnior, Karina Smidt Simon, Raffael Júnio Araújo de Castro, Luísa Coutinho Coelho, Fabián Andres Hurtado Erazo, Adolfo Carlos Barros de Souza, Rogério Coutinho das Neves, Viviane Furlan Lozano, Elizabeth Ferroni Schwartz, Aldo Henrique Tavares, Márcia Renata Mortari, Ana Paula Junqueira-Kipnis, Ildinete Silva-Pereira, Anamelia Lorenzetti Bocca. Peptides ToAP3 and ToAP4 decrease release of inflammatory cytokines through TLR-4 blocking. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2019.