

**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Núcleo de Medicina Tropical**

ANA CAROLINA LARAIA CIARLINI

**Estudo do efeito da dermaseptina-01 sobre monócitos estimulados por
hemácias infectadas por *P. falciparum***

Brasília, DF

2025

ANA CAROLINA LARAIA CIARLINI

**Estudo do efeito da dermaseptina-01 sobre monócitos estimulados por
hemácias infectadas por *P. falciparum***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Medicina Tropical, área de Concentração Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Karla dos Santos Borges



Brasília, DF

2025

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Ana Carolina Laraia Ciarlini

**Estudo do efeito da dermaseptina-01 sobre monócitos estimulados por
hemácias infectadas por *P. falciparum***

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias

DATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

26 de março de 2025

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Tatiana Karla dos Santos Borges – Universidade de Brasília
(Orientadora)

Profª Drª Selma Aparecida Souza Kückelhaus – Universidade de Brasília
(Titular)

Profª Drª Rafaella Albuquerque e Silva – Ministério da Saúde
(Titular)

Profª Drª Mariana Machado Hecht – Universidade de Brasília (Suplente)

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

LC566e Laraia Ciarlini, Ana Carolina
 Estudo do efeito da dermaseptina-01 sobre monócitos
 estimulados por hemácias infectadas por *P. falciparum* / Ana
 Carolina Laraia Ciarlini; orientador Tatiana Karla dos
 Santos Borges. Brasília, 2025.
 123 p.

 Dissertação(Mestrado em Medicina Tropical) Universidade
 de Brasília, 2025.

 1. Plasmodium falciparum. 2. Dermaseptina. 3. Monócitos.
 4. Estresse oxidativo. 5. Citocinas inflamatórias. I. dos
 Santos Borges, Tatiana Karla, orient. II. Título.

Ao meu avô Roque Laraia, o melhor pesquisador do mundo, que me presenteou com o seu livro aos 8 anos e acreditou que um dia escreveria o meu, este trabalho é para você.

AGRADECIMENTOS

Durante o período do mestrado, tive o privilégio de ser orientada pela Professora Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges, uma mulher tão especial e inteligente, que me acolheu tão bem em seu laboratório. Logo eu, uma médica veterinária que se encantou pela imunologia e há tempos sonhava com essa oportunidade, sabendo que ela transformaria minha vida por completo. Agradeço por aceitar me orientar, por toda paciência, diálogo, e por não desistir de mim. Você é uma mulher inspiradora e sempre a levarei no meu coração!

Agradeço também as técnicas do Laboratório de Imunologia Celular (LIC), Shirley Claudino, Mariângela Souza e Viviane Medeiros, por todo carinho e disposição em me ensinar, pelas palavras amigas e que pelas incontáveis vezes que estiveram dispostas a me ajudar. Deixo aqui meu total respeito e admiração, vocês são incríveis.

As amigas que criei no laboratório, Vanessa Eschmith e Ariane Nogueira, pelos momentos de descontração e suporte que me proporcionaram chegar até aqui. Vocês foram peças chave nesse processo e nossa amizade tornaram os dias de laboratório muito mais leves. Agradeço também a doutoranda Andreia Cascaes, que se tornou uma parceira indispensável e peça fundamental na minha jornada, com quem tive o imenso prazer de conviver. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, incentivo e companheirismo. Você é uma pessoa incrível e serei eternamente grata pela sua ajuda!

Estendo meus agradecimentos a todos os membros do grupo NuPMIA, por todo o suporte, parceria e dicas. Em especial ao Prof. Dr. José Roberto Leite que disponibilizou o peptídeo utilizado neste trabalho, e ao doutorando Miguel Cardos, vindo diretamente de Portugal para o Brasil, com quem pude contar inúmeras vezes para sanar dúvidas. Também agradeço o Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, do Instituto de Ciências Biológicas, por ceder a cepa 3D7 do *Plasmodium falciparum*.

Ao Núcleo de Medicina Tropical, todos os seus professores e colaboradores, que diretamente ou indiretamente contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos!

Também agradeço aos meus amigos do Ministério da Saúde e do Programa Nacional de Prevenção, Controle e Eliminação da Malária. Obrigada por tornarem meus dias mais felizes, pelas palavras de conforto e pela compreensão nos momentos difíceis. Vocês são pessoas extraordinárias com quem tenho o privilégio de compartilhar minha jornada profissional.

Obrigada por todo o incentivo, direcionamento e oportunidades.
#eliminamalariabrasil!

Com muito carinho, agradeço meus amigos de longa data, que compartilharam comigo essa jornada desde a graduação, sempre me apoiando nas fases mais difíceis e motivando a sempre seguir em frente. Obrigada por todo o companheirismo de sempre: Kalyda Santana, Carolina Cardoso, Leonardo Rubinger e Gabriel Dourado.

A minha família, especialmente aos meus pais, Andrea e André, aos meus avós, Lúcia e Roque Laraia, Olga e Ronald Ciarlini (*in memoriam*) e a minha irmã, agradeço pelo amor incondicional, pelo carinho e acolhimento nessa jornada. Vocês são meu alicerce e meu amor por vocês é indescritível. Sem vocês, nada disso seria possível!

Por fim, agradeço meu noivo Gabriel Alflen, por todo companheirismo, incentivo e paciência. Obrigada ser a força necessária nos momentos de fraqueza. Seu amor incondicional me deu forças para enfrentar os desafios, e seus abraços foram minha casa nos momentos que eu precisava.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi parcialmente financiado pela bolsa de estudos da CAPES e pelo recurso PROAP (Edital nº 003/2023 - PPGMT/UnB).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Epidemiologia	2
1.2. Ciclo parasitário	3
1.3. Resposta imune contra a malária	5
1.4. Fisiopatologia	10
1.5. Terapia antimalárica e resistência	13
HIPÓTESES	15
OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo principal	18
3.2. Objetivos específicos	18
METODOLOGIA	19
4.1. Delineamento experimental	20
4.2. Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	22
4.3. Cultivo de monócitos THP1.....	23
4.4. Avaliação da parasitemia	24
4.5. Dosagem de hemoglobina	24
4.6. Tratamento com DRS-01 e estímulo com hemácias parasitadas	25

4.7. Ensaio de MTT	26
4.8. Ensaio de DHL	26
4.9. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	27
4.10. Ensaio de RelA e RelB	28
4.11. Ensaio de quantificação de citocinas	30
4.12. Estratégia de aquisição na citometria de fluxo	30
4.13. Análise estatística.....	31
RESULTADOS.....	33
5.1. A DRS-01 reduz a viabilidade das células THP1	34
5.2. A DRS-01 não interfere na lise das hemácias promovida pelo <i>Plasmodium falciparum</i> após 24 horas	36
5.3. A DRS-01 reverte o efeito citotóxico de hemácias saudáveis após 48 e 72 horas de estimulação.....	39
5.4. A DRS-01 melhora parcialmente e tardiamente o efeito negativo promovido pelas hemácias parasitadas no metabolismo celular dos monócitos	41
5.5. A DRS-01 aumenta a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) pelos monócitos.....	43
5.6. A DRS-01 é eficaz na diminuição da produção de ERO pelos monócitos estimulados por hemácias parasitadas.....	45
5.7. A DRS-01 interfere na produção de algumas citocinas inflamatórias, mas não é capaz de modificar a resposta de monócitos estimulados com hemácias.....	46
5.8. Efeito do tratamento com DRS-01 sobre a expressão dos promotores gênicos RelA e RelB da via do NF- κ B, em monócitos estimulados ou não com hemácias parasitadas.....	51
5.9. Resumo dos resultados obtidos.....	53
DISCUSSÃO	56
6.1. A DRS-01 é capaz de causar citotoxicidade em monócitos, independente da presença de plasmódio.	57

6.2. Ciclo parasitário e citotoxicidade provocada pelas hemácias parasitadas e não parasitadas.....	59
6.3. DRS-01 melhora a viabilidade de monócitos estimulados por hemácias parasitadas.....	61
6.4. DRS-01 é capaz de alterar a produção de ERO e ERN em monócitos estimulados ou não por <i>P. falciparum</i>	63
6.5. A DRS-01 interfere na produção de algumas citocinas inflamatórias, mas não é capaz de modificar a resposta de monócitos estimulados com hemácias.....	66
6.6. A DRS-01 pouco afeta a ativação da via NF-κB em monócitos estimulados por hemácias parasitadas.....	68
REFERÊNCIAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Delineamento experimental do estudo.	21
Figura 2.	Percentual de células THP1 viáveis incubadas ou não com 0,25 µL/mL, 0,5 µL/mL, 1 µL/mL e 2 µL/mL DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas.	35
Figura 3.	Absorvância de DHL em células THP1 incubadas ou não com 0,25 µL/mL, 0,5 µL/mL, 1 µL/mL e 2 µL/mL DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas.	36
Figura 4.	Hemoglobina liberada (g/dL) no sobrenadante de hemácias incubadas com 0,25 µL/mL, 0,5 µL/mL, 1 µL/mL e 2 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	37
Figura 5.	Absorvância de LDH em células THP1 incubadas com hemácias não parasitadas (HN) ou hemácias parasitadas (HP) durante 24, 48 e 72 horas.	38
Figura 6.	Percentual de células THP1 viáveis incubadas com hemácias não parasitadas (HN) ou hemácias parasitadas (HP) durante 24, 48 e 72 horas.	39
Figura 7.	Percentual de células THP1 viáveis incubadas com hemácias não parasitadas (HN) e 0,25 µL/mL, 0,5 µL/mL, 1 µL/mL e 2 µL/mL DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas.	40
Figura 8.	Absorvância de DHL em células THP1 incubadas com hemácias não parasitadas (HN) durante 24, 48 e 72 horas.	41
Figura 9.	Percentual de células THP1 viáveis incubadas com hemácias parasitadas (HP) e 0,25 µL/mL, 0,5 µL/mL, 1 µL/mL e 2 µL/mL DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas.	42
Figura 10.	Absorvância de DHL em células THP1 viáveis incubadas com hemácias parasitadas (HP) durante 24, 48 e 72 horas.	43
Figura 11.	Produção de ERNS apresentada por intensidade média de fluorescência (MFI) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	44
Figura 12.	Produção de EROS apresentada por intensidade média de fluorescência (MFI) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	46

Figura 13.	Produção de IL-8 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	48
Figura 14.	Produção de IL-12p70 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	48
Figura 15.	Produção de IL-6 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	49
Figura 16.	Produção de TNF (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	50
Figura 17.	Produção de IL-10 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	50
Figura 18.	Produção de IL-1β (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas	51
Figura 19.	Produção de A) RelA (p65) e B) RelB apresentada por intensidade média de fluorescência (MFI) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas.	52

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Testes estatísticos utilizados para a análise de dados.	32
Tabela 1.	Resumo de resultados das avaliações em relação ao grupo basal em 24 horas.	53
Tabela 2.	Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias normais em 24 horas.	53
Tabela 3.	Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias parasitadas em 24 horas.	54
Tabela 4.	Resumo de resultados das avaliações em relação ao grupo basal em 48 horas.	54
Tabela 5.	Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias normais em 48 horas.	54
Tabela 6.	Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias parasitadas em 48 horas.	55
Tabela 7.	Resumo de resultados das avaliações em relação ao grupo basal em 72 horas.	55
Tabela 8.	Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias normais em 72 horas.	55
Tabela 9.	Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias parasitadas em 72 horas.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Derivados de Artemisinina
AMA-1	Antígeno de Membrana Apical 1
AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
CCDA	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
CO	Monóxido de Carbono
COX	Citocromo C oxidase
CR1	Receptor de Complemento 1
CSA	Sulfato de Condroitina A
CSP	Proteína Circunsporozoítica
DAF-FM	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein diacetate
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetate
DLH	Desidrogenase Láctica
DMSO	Sulfóxido de Dimetilo
DRS	Dermaseptinas
DRS-01	Dermaseptina 01
EBL	Proteínas Homólogas de Ligação aos Eritrócitos
eNOS	Óxido Nítrico Endotelial
EPCR	Receptor da Proteína C Endotelial
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
G6PD	Glicose-6-fosfato Desidrogenase
GPI	Proteína Âncora Glicosil Fosfato de Inositol
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HO-1	Heme Oxigenase-1
HS	Sulfato de Heparina
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IKK	Complexo ikb quinase
IKK	Ikb quinase

IL-10	Interleucina-10
IL-12p70	Interleucina-12p70
IL-1 β	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido Nítrico Induzível
INT	Tetrazólio cloreto de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fenil
LPS	Lipopolissacarídeo
met-Hb	Metemoglobina
MFI	Média de Intensidade de Fluorescência
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MO	Monócitos
mtROS	Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondrial
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NK	<i>Natural Killers</i>
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NOX	NADPH oxidase
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OH	Hidroxila
OH•	Radicais Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO-	Peroxinitrito
oxi-Hb	Oxi-hemoglobina
PBS	Solução Tampão Fosfato Potássio
PfEMP1	Proteína de Membrana do Eritrócito 1 de <i>P. falciparum</i>
PfHRP	Proteínas Derivadas da Histidina
PfRh	Proteínas Homólogas de Ligação aos Reticulócitos
PKC	Proteína C quinase
PMAPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PS	Fosfatidilserina
RON	Rhoptry Neck Proteins
RRPs	Receptores de Reconhecimento Padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
TLR	Receptores Toll-like
TNF	Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

Introdução: A malária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, continua sendo uma das doenças infecciosas mais importantes no mundo. Entre as espécies, a *P. falciparum* se destaca pela maior gravidade clínica e capacidade de promover complicações severas. Diante da crescente resistência aos antimaláricos, é crucial explorar novos compostos terapêuticos igualmente eficazes. As dermaseptinas são peptídeos antimicrobianos capazes de formar α -hélices quando associadas a bicamadas lipídicas, sendo capazes de permear e romper a membrana celular, possuindo atividade tripanocida e leishmanicida descrita. Diante disso, buscou-se avaliar os efeitos da dermaseptina 01 sobre monócitos estimulados com hemácias infectadas pelo *P. falciparum*. **Metodologia:** Para tal, os monócitos da linhagem THP1 foram estimulados *in vitro* com hemácias infectadas com a cepa selvagem 3D7, sendo 5% delas parasitadas, e com hemácias normais não parasitadas. A viabilidade foi avaliada através dos métodos de MTT e DHL. A atividade hemolítica foi medida pela dosagem de hemoglobina e a capacidade antioxidativa foi averiguada pela produção de ERO e ERN. Também foi estudada a resposta anti-inflamatória por meio da avaliação das moléculas da via do NF- κ B, bem como analisadas as citocinas envolvidas no perfil inflamatório por meio de citometria de fluxo. **Resultados:** Ensaio de viabilidade celular mostraram que a dermaseptina 01 reduziu significativamente a viabilidade celular, mas sem induzir lise celular. Em monócitos expostos às hemácias parasitadas ou normais, o peptídeo apresentou efeito protetor parcial, aumentando a viabilidade em relação aos controles sem tratamento. Além disso, a dermaseptina 01 aumentou a produção de espécies reativas de nitrogênio e diminuiu as de oxigênio, indicando uma possível interferência no estresse oxidativo associado à resposta inflamatória. A análise dos fatores RelA/RelB revelou que nenhuma molécula do NF- κ B foi significativamente ativada. Ainda, houve um aumento na produção de IL-8 no grupo de monócitos incubados somente com o peptídeo; porém, diminuição das citocinas IL-6 e IL-12. **Considerações finais:** Os resultados sugerem que a dermaseptina 01 pode atuar como moduladora da resposta imune em monócitos expostos a *P. falciparum*, principalmente no que diz respeito à atividade antioxidante e anti-inflamatória; porém, apresenta certo grau de toxicidade. Esses achados indicam que a DRS-01 possui características que a torna uma molécula com potencial de aplicação em uma futura terapia antimalárica, desde que seja modificada para não exibir efeito citotóxico.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*, dermaseptina, monócitos, estresse oxidativo e citocinas inflamatórias.

ABSTRACT

Introduction: Malaria, caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, continues to be one of the most important infectious diseases in the world. Among the species, *P. falciparum* stands out for its greater clinical severity and ability to cause severe complications. Faced with growing resistance to antimalarials, it is crucial to explore new therapeutic compounds that are equally effective. Dermaseptins are antimicrobial peptides capable of forming α -helices when associated with lipid bilayers, being able to permeate and rupture the cell membrane, with described trypanocidal and leishmanicidal activity. We therefore sought to evaluate the effects of dermaseptin 01 on monocytes stimulated with red blood cells infected with *P. falciparum*.

Methodology: To this end, THP1 monocytes were stimulated in vitro with RBCs infected with the wild-type 3D7 strain, 5% of which were parasitized, and with normal, non-parasitized RBCs. Viability was assessed using the MTT and DHL methods. Hemolytic activity was measured by hemoglobin and antioxidative capacity by ROS and ERN production. The anti-inflammatory response was also studied by evaluating the molecules of the NF- κ B pathway, and the cytokines involved in the inflammatory profile were analyzed using flow cytometry. **Results:** Cell viability tests showed that dermaseptin 01 significantly reduced cell viability, but without inducing cell lysis. In monocytes exposed to parasitized or normal red blood cells, the peptide showed a partial protective effect, increasing viability compared to untreated controls. In addition, dermaseptin 01 increased the production of reactive nitrogen species and decreased oxygen species, indicating a possible interference in the oxidative stress associated with the inflammatory response. Analysis of the RelA/RelB factors revealed that no NF- κ B molecules were significantly activated. In addition, there was an increase in IL-8 production in the group of monocytes incubated only with the peptide, but a decrease in the cytokines IL-6 and IL-12. **Final considerations:** The results indicate that dermaseptin 01 can act as a modulator of the immune response in monocytes exposed to *P. falciparum*, especially with regard to antioxidant and anti-inflammatory activity; however, it does present a certain degree of toxicity. These findings indicate that DRS-01 has characteristics that make it a molecule with potential application in future antimalarial therapy, provided it is modified so that it does not exhibit a cytotoxic effect.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, dermaseptin, monocytes, oxidative stress and inflammatory cytokines.

INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

A malária é uma doença febril causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. É uma das principais doenças infecciosas que acometem países tropicais, sendo considerada um sério problema de saúde pública (GOMES et al., 2011; WHO, 2024). Em 2023, ocorreram cerca de 263 milhões de casos e 597 mil óbitos de malária no mundo, sobretudo em países do continente Africano e em menor proporção na região amazônica da América do Sul e no sudeste Asiático. No mesmo ano, 83 países foram considerados endêmicos (WHO, 2024). O *Plasmodium* possui mais de 200 espécies descritas capazes de infectar diversos tipos de animais vertebrados, entre répteis, aves e mamíferos. No entanto, 4 espécies principais são capazes de infectar e adoecer humanos: o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e o *P. malariae* (DZIKOWSKI; TEMPLETON; DEITSCH, 2006; FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008; GOZALO et al., 2024). A malária provocada em primatas não humanos, como a *P. knowlesi* e *P. simium*, também se mostraram capazes de gerar doenças humanas, apesar da sustentação da sua transmissão ser improvável (FORNACE et al., 2023).

No Brasil, cerca de 99,9% dos casos se concentram na região amazônica, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. A espécie parasitária predominante é a *P. vivax*, que provocou mais de 101 mil casos em 2023. No entanto, a espécie *P. falciparum*, que ainda provoca cerca de 21 mil casos anuais, preocupa pela sua maior gravidade e rapidez de expansão (BRASIL, 2024) e afeta principalmente crianças, grávidas, primo-infectados e pessoas imunossuprimidas (BEESON; BROWN, 2002; FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Em 2022, o Programa Nacional de Prevenção, Controle e Eliminação da Malária (PNCEM), do Ministério da Saúde do Brasil, ratificou seu compromisso com o desafio global de eliminar a doença, e lançou o então “Plano Nacional de Eliminação da Malária: Elimina Malária Brasil”, no qual

define as metas de: (a) menos de 68 mil casos de malária até 2025, (b) ausência de transmissão de malária por *Plasmodium falciparum*, menos de 14 mil casos autóctones de malária (total) e zero óbitos até 2030; e (c) eliminação da doença até 2035 (BRASIL, 2022).

A doença é transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo a espécie *An. darlingi*, considerada o vetor primário no Brasil. Os complexos *An. albitarsis* e *An. oswaldoi* são considerados vetores secundários, uma vez que são menos susceptíveis ao *Plasmodium* e possuem comportamentos menos associativos com humanos, ao contrário da principal espécie vetora. Em áreas endêmicas, a fêmea do mosquito *Anopheles* (também conhecido popularmente como mosquito-prego, muriçoca, carapanã) se infecta ao se alimentar do sangue de uma pessoa infectada (ZÚÑIGA; RUBIO-PALIS; BROCHERO, 2021; BASTOS et al., 2023).

1.2. Ciclo parasitário

Os gametócitos femininos (macrogametócito) e masculino (microgametócito) são ingeridos durante o repasto sanguíneo. Várias etapas do ciclo biológico do protozoário ocorrem no mosquito até que um novo repasto sanguíneo perpetua o ciclo da doença, quando ocorre a invasão de esporozoítos na corrente sanguínea de um novo hospedeiro suscetível. Os esporozoítos são organismos alongados e um pouco arqueados que, rapidamente, migram da derme para os vasos sanguíneos. Na circulação sanguínea, os esporozoítos alcançam o sinusóide hepático, onde atravessam uma série de células residentes, como as células Kupffer, até encontrar um hepatócito adequado para a invasão, onde irão se multiplicar até formar estruturas chamadas de esquizontes. Os esquizontes, rompem as células hepáticas e liberam novos merozoítos, que voltam para a corrente sanguínea e invadem novas hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico (VALENCIANO et al., 2022).

As formas invasivas são chamadas de “zoítos” e podem atravessar ou circundar as células por um movimento chamado *gliding motility* (motilidade de deslizamento, traduzido para o português) semelhante a um saca-rolhas, através de uma vigorosa motilidade provocada pela proteína circunsporozoítica (CSP). Geralmente, os merozoítos de *P. falciparum* (~85%) invadem a primeira célula que encontrarem (YAHATA et al., 2021), diferente da espécie *P. vivax*, capazes de invadir somente hemácias jovens, chamadas de reticulócitos (~1–2% das hemácias circulantes) (FERREIRA et al., 2023). Nas hemácias, os trofozoítos se auto encapsulam na membrana do vacúolo parasitóforo, se multiplicam e amadurecem em esquizontes até levar à sua ruptura, liberando merozoítos na corrente sanguínea que invadem novos eritrócitos. Esse ciclo se repete várias vezes e é chamado de esquizogonia eritrocítica. Ao final de cada ciclo, cada esporozoíto desenvolve dezenas de milhares de formas de merozoítos (MOLINA-FRANKY et al., 2022).

Mais à frente, uma minoria de merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, que amadurecem principalmente na medula óssea e no baço, até que sejam liberados entre 8-12 dias na circulação periférica. Estes ficam disponíveis para que um novo mosquito, ao se alimentar, se infecte e perpetue o ciclo da doença (ANDOLINA et al., 2023). É importante notar que não há um consenso sobre os fatores que influenciam na produção de gametócitos, mas alguns componentes como fatores hematológicos, genéticos e imunitários são considerados (BLANKEN et al., 2024). Detalhes do ciclo parasitário do *P. falciparum* podem ser observados na Figura 1.

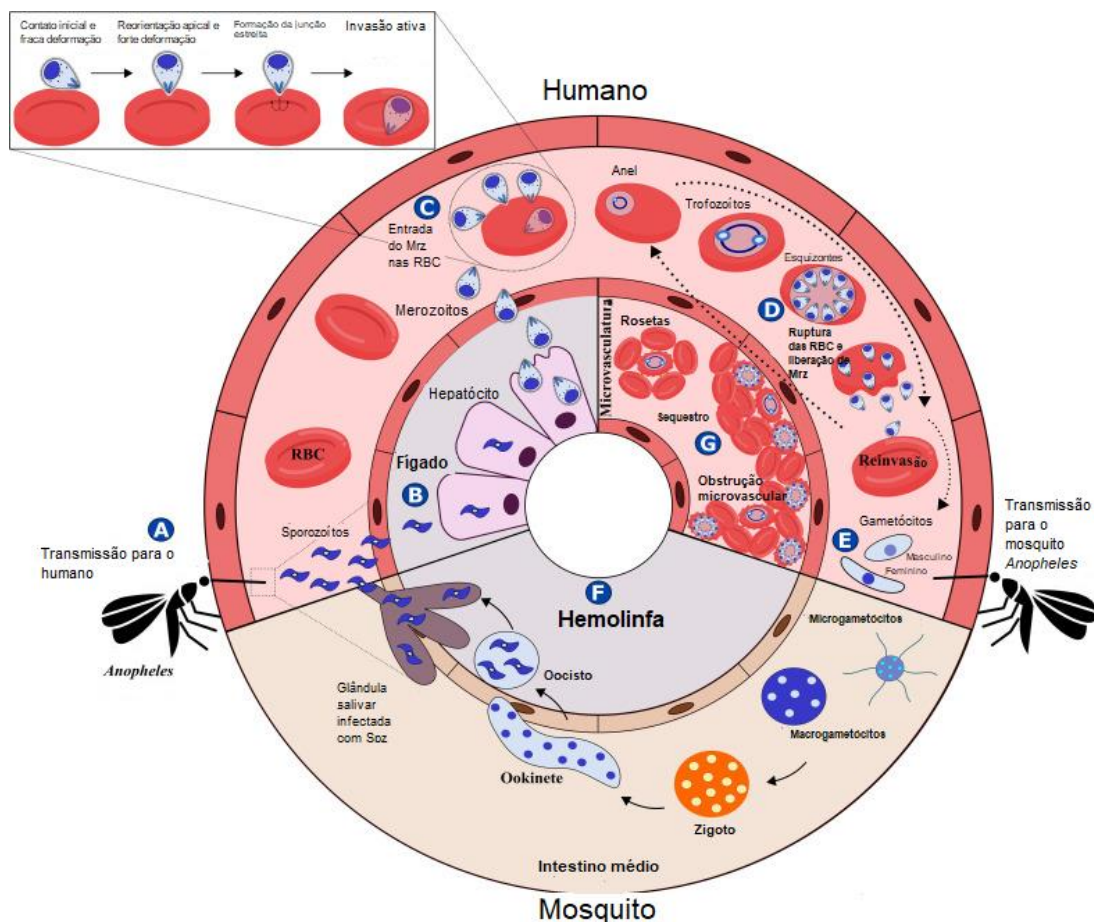


Figura 1. (A) Inoculação dos esporozoítos (Spz) *P. falciparum* em um hospedeiro humano por uma fêmea do mosquito *Anopheles*. (B) Entrada do Spz nos hepatócitos, maturação do Spz em esquizontes e liberação dos merozoítos (Mrz). (C) Entrada do Mrz das hemácias (RBC). (D) Multiplicação assexuada dentro das hemácias. (E) Alguns parasitas se diferenciam em estágios sexuais; os gametócitos são ingeridos por um mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. (F) Ciclo esporogônico. (G) "Rosetas", sequestro e obstrução vascular. Fonte: traduzido de Molina-Franky et al. 2022.

1.3. Resposta imune contra a malária

Patógenos intracelulares geralmente alertam o sistema imunológico por Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PMAPs). Embora, ocorra resposta imune contra antígenos das formas esporozoíticas e formas hepáticas, é justamente no ciclo eritrocítico que são desencadeadas as respostas mais robustas contra os plasmódios, durante o qual irão se estabelecer as principais alterações fisiopatológicas da malária.

Ao sair dos hepatócitos, uma parte dos merozoítos que circulam no sangue periférico podem entrar em contato com células imunitárias, como

monócitos e neutrófilos, ou invadir novas hemácias. Durante a invasão das hemácias, o *P. falciparum* se insere na membrana através de uma série de etapas bem orquestradas. A ligação inicial envolve interações não específicas, reversíveis e de pouca afinidade, que são mediadas pelas proteínas de superfície de merozoítos (MSP-1 a MSP-10). Já a reorientação apical estabelece interações específicas e com alta afinidade por ligantes de proteínas homólogas de ligação aos eritrócitos (EBL) ou aos reticulócitos (*PfRh*), induzindo uma intensa deformação da membrana eritrocitária. A junção estreita torna-se a ligação irreversível, suportado por uma série complexa de interações que envolvem Rhoptry neck proteins (RON-2, -4 and -5) e o antígeno de membrana apical 1 (AMA-1) do parasito. E por fim, a invasão ativa ocorre quando o parasito invade efetivamente a célula, isolando-se no vacúolo parasitóforo, um ambiente propício para seu desenvolvimento (MOLINA-FRANKY et al., 2022).

Algumas hemácias infectadas podem ser alvo de opsonização, o que facilita o seu reconhecimento, possibilita a ativação do sistema complemento e promove a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (CCDA), além de propiciar o *clearance* de hemácias infectadas no baço (MUNIZ-JUNQUEIRA; TOSTA, 2009; ZHOU et al., 2012; SEKAR et al., 2023). A produção de IgG específico para merozoítos e hemácias infectadas, por exemplo, são capazes de bloquear a invasão de eritrócitos, ativar componentes do sistema complemento e utilizar receptores Fcγ para induzir a fagocitose, além de desencadear a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpos (CCDA) por células *Natural Killers* (NK) através do receptor CD16. Esses mecanismos estão relacionados à diminuição da parasitemia e imunidade clínica (infecção assintomática ou oligossintomática) de pessoas expostas cronicamente à infecção (SEKAR et al., 2023).

As hemácias, por serem células anucleadas e desprovidas de muitas funções celulares, como a expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), não conseguem mostrar os antígenos intracelulares dos plasmódios. Isso permite que o parasito permaneça oculto do reconhecimento pelo sistema imunológico, contribuindo para sua evasão

imune (FRASER; MATUSCHEWSKI; MAIER, 2021; MOLINA-FRANKY et al., 2022). Apesar disso, as alterações provocadas pela inserção da proteína de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum* (PfEMP1) nas hemácias, além de aumentar sua rigidez, promove o reconhecimento imunológico, particularmente através da exposição da aminofosfolípidios fosfatidilserina (PS) de membrana e outros antígenos durante a infecção, o que permite o reconhecimento pelo receptor scavenger CD36 dos fagócitos, atuando como um sinal de “coma-me” (FRASER; MATUSCHEWSKI; MAIER, 2021), além, do próprio reconhecimento de antígenos plasmodiais na membrana da hemácia.

Ainda, durante o desenvolvimento do estágio sanguíneo, o parasito digere a maior parte da hemoglobina disponível, o que resulta em uma grande liberação de heme, altamente tóxica em certas condições, sendo capazes de danificar proteínas e lipídios por meio de vários mecanismos, incluindo a formação de radicais livres. Isso desafia os parasitos da malária a lidar com uma grande quantidade de heme, na qual eles as sequestram em cristais conhecidos como hemozoínas em seus vacúolos alimentares (CORONADO; NADOVICH; SPADAFORA, 2014; MATZ et al., 2020).

Com o aumento da parasitemia, os monócitos (MO) e outras células presentes no sangue podem identificar os antígenos do patógeno e desencadear diversos mecanismos de defesa (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019). O reconhecimento dos PAMPs por essas células ocorre através de Receptores de Reconhecimento Padrão (RRPs). Alguns dos principais antígenos plasmodiais, como glicosilfosfatidilinositol plasmodial (GPI) podem ser reconhecidos pelos receptores de membrana pelos heterodímeros de receptores *Toll-like* (TLR) TLR2-TLR6 ou TLR1-TLR2 e, em menor extensão, pelos homodímeros TLR4, enquanto a hemozoína e o DNA plasmodial são reconhecidos principalmente por TLR9 (KALANTARI, 2018). Adicionalmente, estudos mostram que os inflamassomos, complexos multiproteicos citoplasmáticos, também são capazes de auxiliar no reconhecimento imunológico de PAMPs (BORGES, 2013; KALANTARI, 2018; WANG et al., 2024).

Após o reconhecimento do plasmódio, segue-se sinais intracelulares decorrentes dos RRs que podem ativar vias intracelulares como a do NF- κ B para a produção de citocinas. As vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- κ B resultam na regulação gênica de diversos mediadores pró-inflamatórios na malária, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12(p70), IFN- γ e TNF (SAMPALIO; ERIKSSON; SCHOFIELD, 2017; DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019). Na malária, a alteração nestas vias foi descrita por Borges (2013), estudando modelos murinos de malária cerebral. Ainda, altos níveis de IFN- γ , produzidos como parte da resposta Th1, estão relacionados ao desenvolvimento de uma progressão favorável da doença (em modelos murinos para a malária), e esse fator é atribuído a capacidade dessa citocina em ativar macrófagos e monócitos, que rapidamente matam o parasito através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (TORRE et al., 2002).

A família do fator de transcrição do NF- κ B é composto por cinco proteínas, RelA (p65), RelB, RelC, p105/p50 (NF- κ B1) e p100/52 (NF- κ B2), capazes de formar complexos homo e heterodiméricos. Em células em repouso, o NF- κ B fica retido no citoplasma por proteínas I κ B. Quando a célula é estimulada por sinais por sinais advindos dos RRs e de receptores de citocinas inflamatórias, o I κ B é fosforilado pelo complexo I κ B quinase (IKK), permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo e possibilitando a transcrição de genes alvos (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009; MSWELI; PAKALA; SYED, 2024).

Além da ativação da via do NF- κ B, o reconhecimento dos antígenos plasmodiais dá início ao mecanismo de fagocitose. A fagocitose tem início pela internalização do patógeno pelos fagócitos, o qual, então, é internalizado em vesículas chamadas fagossomos. No citoplasma celular, os fagossomos unem-se aos lisossomos, resultando na formação do fagolisossomo, cujo conteúdo é rico em espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de oxigênio (ERO), capazes de matar os patógenos fagocitados (CRUVINEL et al., 2010). Semelhante aos macrófagos, os MO são células fagocíticas essenciais para a regulação da resposta imune inata, sendo uma das

principais fontes de citocinas na infecção por malária, uma vez que os plasmódios circulam no sangue periférico (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019).

Estudos mostram a importância das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na gravidade da malária, seja contribuindo com a regulação das respostas inflamatórias por meio da ativação da via do NF-κB e produção de citocinas inflamatórias, como também atuando como primeiro sinal para ativação do inflamossomos e provocando a explosão respiratória durante o processo de fagocitose, caracterizando a malária como uma doença altamente inflamatória e oxidativa (CRUVINEL et al., 2010; VASQUEZ; ZUNIGA; RODRIGUEZ, 2021).

Os monócitos, além de serem importantes na resposta inata contra o plasmódio, também são células apresentadoras de antígenos para a resposta adaptativa. No entanto, a rapidez com que os merozoítos invadem novas hemácias, prejudica o desenvolvimento de uma resposta adaptativa adequada (CAO; VICKERS, 2021), tornando a resposta inata responsável por grande parte da solução ou progressão da doença (POHL; COCKBURN, 2022).

Para o desenvolvimento da resposta adaptativa, a ativação de células T e B é mediada pela expressão do MHC II e da molécula coestimuladora CD86 de células apresentadoras de antígenos. Algumas moléculas, como a CSP, RON2L e AMA-1, são amplamente estudadas em relação à imunidade adaptativa. Tanto que as duas vacinas atualmente aprovadas pela OMS são projetadas a partir de epítomos conservados da CSP e são capazes de fornecer uma proteção parcial à malária (SU et al., 2025).

As células T CD4 são de extrema importância na resposta imune na fase de esquizogonia eritrocítica, enquanto a T CD8 mostra-se citolítica aos estágios hepáticos (TORRE et al., 2002). Acredita-se que o desenvolvimento da imunidade adquirida seja regulado para priorizar a aptidão do hospedeiro, ao invés da eliminação do patógeno. Explorando infecções provocadas pelo *Plasmodium chabaudi*, uma espécie de malária murina, foi observado o desenvolvimento de tolerância imunológica após um único episódio de malária

(NAHRENDORF; IVENS; SPENCE, 2021). De fato, em áreas de alta transmissão, pessoas infectadas com frequência podem permanecer por meses ou anos com parasitemia em baixas densidades, causando pouco ou nenhum sintoma (WHITE, 2017).

Como descrito, o reconhecimento dos antígenos plasmodiais pela resposta imune requer vários mecanismos inatos e adaptativos. A exacerbação desta resposta promove a malária com seus diversos aspectos fisiopatológicos a serem descritos na próxima sessão.

1.4. Fisiopatologia

A malária é uma doença que cursa de forma assintomática até casos graves. No Brasil, estimou-se que em algumas áreas endêmicas, as infecções assintomáticas podem ser 4-5 vezes mais prevalentes que as infecções sintomáticas (ALVES et al., 2002). Segundo Andrade et al. (2020), a presença de indivíduos assintomáticos em estações secas na África Ocidental, está relacionado com alterações nos padrões de transcrição do plasmódio, que reduzem sua aderência às células endoteliais, permitindo a maior depuração esplênica e mantendo a parasitemia abaixo do radar clínico e imunológico.

Os principais sintomas da malária iniciam durante ciclo eritrocítico, produzindo sintomas como febre, calafrios, cefaléia e astenia, enquanto sua multiplicação anterior no fígado é normalmente assintomática (GOMES et al., 2011; SCHEINER; BURDA; INGMUNDSON, 2024). Como descrito anteriormente, a resposta imune ao *P. falciparum* é complexa, e inclui tanto mecanismos celulares quanto humorais. Dessa forma, se por um lado a resposta imune confere proteção contra as formas graves, o exacerbamento desse mecanismo está envolvido na gravidade das infecções (GOMES et al., 2011).

Por trás das formas graves, está a resposta exacerbada do sistema imune aos antígenos plasmodiais e a capacidade do *P. falciparum* de fazer citoaderência na microvasculatura de órgãos vitais, levando à obstrução e

oxigenação prejudicada dos tecidos, afetando, particularmente, o cérebro, rins, intestinos e pulmões (MER et al., 2020).

Esse processo envolve a expressão de proteínas plasmodiais na superfície do parasita, sendo a proteína 1 da membrana eritrocitária do *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) o principal mediador apontado desse processo. Ele é incorporado em protrusões eletrodensas, formadas na superfície das hemácias parasitadas, e chamadas de knobs, atuando como locais de citoaderência ao endotélio (WISER, 2023). Apesar dessa proteína em particular, outras inúmeras proteínas de superfície são expressas pelo plasmódio e sustentam a citoaderência por meio de mecanismos moleculares ainda pouco compreendidos (KÜSTER et al., 2025). A adesão às células endoteliais é mediada por receptores como o CD36, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e o receptor da proteína C endotelial (EPCR), (JABBARZARE et al., 2020).

O PfEMP1 também é apontado como mediador na formação de “rosetas”, um fenômeno onde as hemácias infectadas e não infectadas se aderem umas às outras, formando um aglomerado de células capazes de obstruir os vasos sanguíneos. Esse é um dos principais eventos patológicos na malária *falciparum* grave e diversas moléculas presentes em eritrócitos não infectados, como açúcares dos grupos sanguíneos A e B, moléculas semelhantes ao sulfato de heparina (HS) e o receptor de complemento 1 (CR1) são sugeridos como receptores, apesar de serem necessárias mais pesquisas (MCQUAID; ROWE, 2020).

A obstrução microvascular leva a danos na integridade endotelial e induz vias pró-inflamatórias, pró-adesivas e de coagulação. Ainda, a hemozoína liberada na corrente sanguínea após a lise das hemácias parasitadas, é capaz de ativar respostas imunes inatas por macrófagos teciduais, além de parte ser lentamente degradadas pela heme oxidase do hospedeiro. Isso resulta na indução da produção de citocinas inflamatórias, como o IFN- γ , que está relacionado com danos a integridade endotelial na malária cerebral (MAHITTIKORN et al., 2022).

A malária cerebral é a forma grave mais comum de malária e sua ocorrência varia de acordo com a idade do hospedeiro e distribuição geográfica. Em áreas de intensa transmissão, como no continente Africano, sua ocorrência é mais prevalente em crianças menores de 5 anos. A morte por malária cerebral pediátrica mostrou estar associada a acumulação de MO intravascular cerebral, que respondem com a produção citocinas inflamatórias como TNF, IL-6, IL-1 β (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019). Couto et al. (2021), que estudou os mecanismos imunopatogênicos da malária em três modelos de camundongos suscetíveis ou não à malária cerebral, observou que perfis de respostas de citocinas e de moléculas da via do NF-kB foram diferentes de acordo cada modelo, e que provavelmente o desenvolvimento dessa forma estaria relacionado com a suscetibilidade individual.

Na gravidez, a malária pode ter consequências graves, como anemia, abortos e baixo peso ao nascer (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019). Essas complicações estão relacionadas à adesão de hemácias infectadas ao sulfato de condroitina A (CSA) expresso no sinciciotrofoblasto placentário, mediada pelo antígeno VAR2CSA, um membro da família do PfEMP1. Apesar da resposta na gravidez normal ser suprimida, na malária gestacional pode ocorrer a elevação placentária de TNF- α , IFN- γ e IL-8 (JABBARZARE et al., 2020).

Outra forma comum tanto de infecções crônicas ou agudas é a anemia. As causas da anemia são diversas e incluem o próprio ciclo eritrocitário do parasito, deficiência de ferro e baixos níveis de IL-10 e IL-12. Essas e outras causas isoladas ou em conjunto provocam a perda substancial de hemácias. Por um outro lado, a infecção de sujeitos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) podem produzir hemólise intravascular aguda por medicamentos de quinino e 8-aminoquinolina, provocando anemia grave e insuficiência renal (GHOSH; GHOSH, 2007).

Embora o conhecimento sobre a fisiopatologia da malária seja vasta, pouco se sabe sobre o porquê não existir memória imunológica permanente, o que dificulta o conhecimento das bases imunológicas para produção de uma vacina eficaz contra o plasmódio. Além disso, os parasitos podem se tornar

resistentes, o que necessita o desenvolvimento constante de novas possibilidades terapêuticas, conforme será discutido na próxima seção.

1.5. Terapia antimalárica e resistência

No Brasil, o tratamento atual da malária consiste na utilização de antimaláricos como primaquina, derivados de artemisinina (ACT) e, em alguns casos, como em infecções provocadas por *P. vivax*, cloroquina. Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a Estratégia Técnica Global para a Malária, estabelecendo três pilares fundamentais para os programas nacionais: (1) garantir o acesso universal à prevenção, diagnóstico e tratamento da malária; (2) intensificar os esforços para eliminação da doença e obtenção do status de país livre de malária; e (3) fortalecer a vigilância da malária como uma intervenção central (BRASIL, 2022). Contudo, mesmo com o tratamento correto e suporte adequado, em áreas endêmicas alguns indivíduos podem sucumbir à doença. Isso é influenciado por vários fatores do parasita, do hospedeiro e do ambiente (SU et al., 2025).

Ainda, o surgimento de parasitas resistentes aos antimaláricos de primeira linha atuais, ou seja, as terapias combinadas de artemisinina, descritas no Sudeste Asiático e no continente Africano, vem acendendo uma grande preocupação mundial para a busca de compostos igualmente eficazes contra a infecção (SCHÄFER et al., 2024). Hoje, a depender da localidade, sabe-se que o *P. falciparum* pode ser resistente à cloroquina, sulfadoxina, amodiaquina, mefloquina e parcialmente à artemisinina, por mecanismos complexos e ainda não totalmente compreendidos (ZHENG et al., 2024).

A resistência do *P. falciparum* aos medicamentos é antiga. A primeira descrição de resistência à cloroquina ocorre desde meados de 1961, sendo esse o principal medicamento disponível na época para o tratamento da malária (ALENCAR; FERRARONI; SHRIMPTON, 1982). Na corrida mundial na busca de novos antimaláricos, derivados de plantas nativas chinesas, *Artemisia annua* L. foram apontados como principais fontes de artemisinina,

uma molécula promissora com potente ação inibitória no metabolismo do parasito. Após o isolamento pelos chineses e publicação do relatório da OMS em 1982, vários derivados da molécula foram criados para o tratamento da malária e são utilizados até hoje no Brasil como alternativa de tratamento da malária *falciparum* (SÁ, 2011; ZHENG et al., 2024).

Ainda que terapia antimalárica combinada, preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil, seja capaz de prolongar o tempo para o surgimento e a disseminação de parasitos resistentes (ANTONY; PARIJA, 2016), o risco de resistência aos antimaláricos atuais continua um sério risco para a saúde pública.

É relevante notar que o Brasil sempre focou em moléculas antimaláricas desenvolvidas por outros países, sem considerar a vasta quantidade de plantas e animais nativos (SÁ, 2011). A exemplo de moléculas nativas brasileiras, temos as dermaseptinas (DRS), um grupo de peptídeos microbianos extraídos da pele de diferentes espécies rãs sul-americanas *Phyllomedusa* que apresentam características intrigantes. São peptídeos lineares, anfipáticos e apresentam uma grande diversidade em seu comprimento, variando entre 21 e 33 resíduos de aminoácidos que são capazes de interagir com bicamadas lipídicas, desencadeando uma estrutura α -helicoidal, permeando a membrana citoplasmática das células-alvo (AMMAR et al., 1998; BRAND et al., 2002; LORIN et al., 2005; NICOLAS; AMICHE, 2006). Essa extensa família de peptídeos antimicrobianos (AMPs) foram primeiramente identificadas em 1991 na pele do sapo *Phyllomedusa sauvagii* (MOR et al., 1991). Atualmente, são conhecidas diversas variantes de dermaseptinas, cada uma com uma sequência única de aminoácidos e um padrão específico de seletividade contra microrganismos. Além disso, compartilham várias similaridades farmacológicas (BARTELS; DEKKER; AMICHE, 2019)

A dermaseptina 1, demonstrou *in vitro* possuir atividade tripanocida (BRAND et al., 2002), leishmanicida (HERNANDEZ et al., 1992; ZAMPA et al., 2009; OLIVEIRA, 2015) e até mesmo antiviral, interferindo na replicação do vírus da dengue (CARDOSO et al., 2013), fatos esses que permitem investigar

seu potencial para regular a resposta imune de monócitos, que são uma das principais células responsáveis pelo *clearance* e indução da resposta imune contra os plasmódios.

HIPÓTESES

2.1. A infecção pelo *P. falciparum* promove aumento da expressão de RelA e RelB, fatores de transcrição associados à via do NF-κB, resultando em um aumento na produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em monócitos. A dermasseptina 01, por sua vez, é capaz de modificar esses fatores pró inflamatórios, regulando a expressão de RelA e RelB e diminuindo a produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio em monócitos.

2.2. A infecção pelo *P. falciparum* promove aumento da expressão de RelA e RelB, fatores de transcrição associados à via do NF-κB, resultando em um aumento na produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em monócitos. A dermasseptina 01, por sua vez, não é capaz de modificar os fatores pró inflamatórios. (hipótese nula).

OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Avaliar se a dermasseptina 01 tem capacidade de modular a resposta inflamatória de monócitos estimulados por hemácias infectadas pelo *Plasmodium falciparum*.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da dermasseptina 01 (DRS-01) por meio de:

- A. Determinação da dose ótima do tratamento experimental dos monócitos;
- B. Avaliação da toxicidade da DRS-01 e do *P. falciparum* nos monócitos e hemácias;
- C. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos monócitos tratados ou não;
- D. Avaliação da produção de moléculas envolvidas na via do NF- κ B pelos monócitos tratados ou não;
- E. Quantificação de citocinas no sobrenadante da cultura de monócitos tratados ou não;

METODOLOGIA

4.1. Delineamento experimental

Neste trabalho, a influência da dermaseptina 01 (DRS-01) foi avaliada *in vitro* utilizando monócitos humanos da linhagem THP1 estimulados com a cepa 3D7 de *P. falciparum*. Para aferir o efeito sobre as células e realizar as avaliações comparativas, os seguintes grupos foram estudados:

- A. Células THP1 (grupo basal);
- B. Células THP1 e hemácias não parasitadas;
- C. Células THP1 e hemácias parasitadas;
- D. Células THP1 tratadas com DRS-01;
- E. Células THP1 e hemácias não parasitadas tratadas com DRS-01;
- F. Células THP1 e hemácias parasitadas tratadas com DRS-01;

Inicialmente, foi averiguado por espectrofotometria a toxicidade da DRS-01 nos monócitos utilizando os métodos de MTT (item 4.7) e DHL (item 4.8) e a atividade hemolítica pela dosagem de hemoglobina (item 4.5). Nestes experimentos, foram testadas as concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 µl/mL de DRS-01.

Para avaliar a capacidade antioxidativa, os testes para aferir a produção de ERO e ERN (item 4.9) foram avaliados nos grupos de estudo. Também foi estudada a resposta anti-inflamatória por meio da avaliação das moléculas da via do NF-kB (item 4.10), bem como analisadas as citocinas envolvidas no perfil inflamatório através de citometria de fluxo (item 4.11). Nestes experimentos, as concentrações utilizadas foram de 0,5 e 1 µl/mL de DRS-01.

Os experimentos foram realizados em tempos de incubação diferentes (24, 48 e 72h), mais de uma vez, utilizando cinco monoplicatas para cada grupo e com a adição de grupos de controles positivos. Todas as manutenções de células e experimentos de estímulo e tratamentos foram

realizadas em ambiente estéril. O diagrama do estudo pode ser observado na Figura 2.

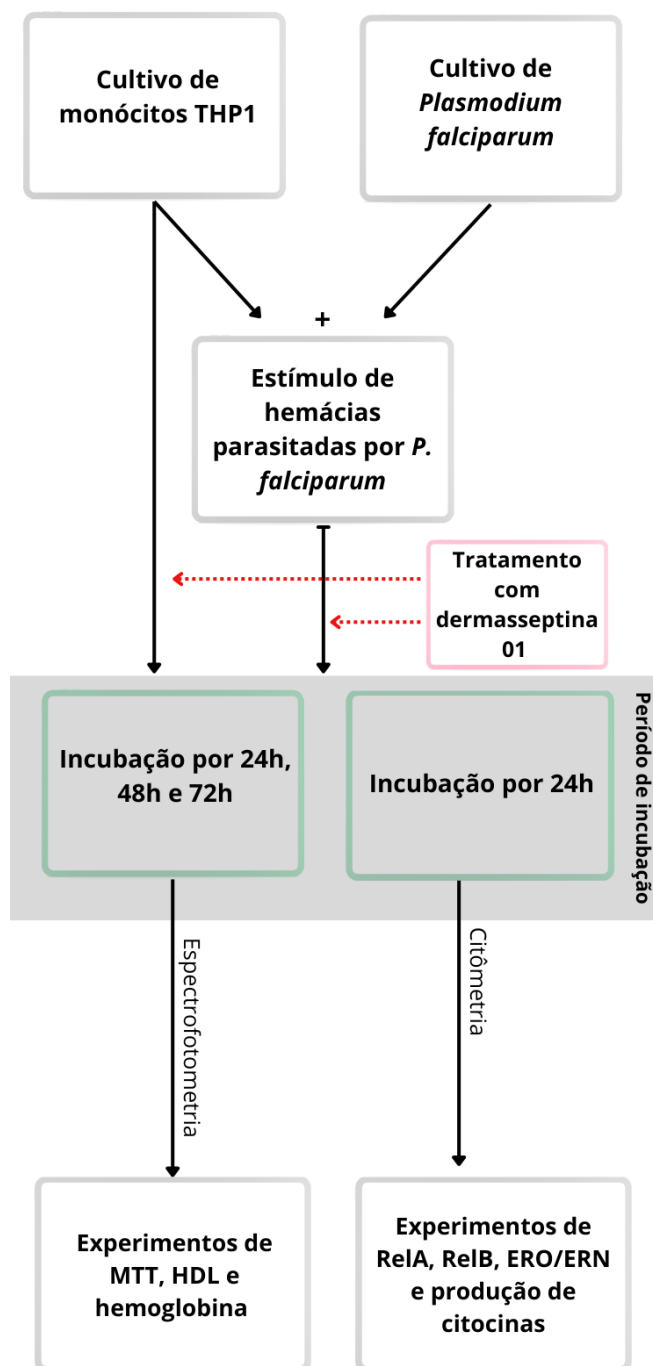


Figura 2. Delineamento experimental do estudo

4.2. Cultivo de *Plasmodium falciparum*

O *Plasmodium falciparum* utilizado nos experimentos pertence à cepa selvagem 3D7, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, professor do Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB).

O protozoário foi mantido congelado em meio de congelamento com 0,9% NaCL, 4,2% sorbitol e 28,0% glicerina. As sementes celulares foram mantidas em nitrogênio líquido a -80°C, no Laboratório de Imunologia Celular (LIC) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) até o início dos experimentos.

Para a cultura do plasmódio, foi coletado sangue de voluntários com tipo sanguíneo O+. A coleta foi aprovada pelo Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina/UnB sob o número 66943222.9.0000.5558 (parecer 5.898.353) e realizada por um profissional habilitado de acordo com o protocolo de coleta de sangue desenvolvido pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC, 2010). O sangue foi então centrifugado a 200 G por 10 minutos e todo o plasma sanguíneo foi retirado. As hemácias foram lavadas de três a cinco vezes com solução salina 0,9% para garantir que todos os glóbulos brancos fossem removidos.

O pool de soro humano utilizado nos meios foi obtido de doadores voluntários, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e submetido à inativação em banho-maria a 56°C por 30 minutos para desativar o sistema complemento.

O microtubo contendo *P. falciparum* criocongelado foi descongelado em banho maria à 37°C, centrifugado a 400 G por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi realizada uma nova lavagem com meio de cultura e as hemácias parasitadas foram ressuspensas em meio RPMI 1640 tamponado para o pH 7,2 com 7,5% de NaHCO₃, suplementado com 10% de soro humano inativado, 0,25 mg/dL de hipoxantina (Sigma) e 1% de penicilina/estreptomicina e transferido para garrafas de cultivo junto com as

hemácias saudáveis dos voluntários, conforme protocolo de Muniz-Junqueira e Tosta, 2009. As culturas foram mantidas em estufa com temperatura estável de 37°C e com 5% de CO₂. A substituição do meio de cultura foi feita diariamente. O acompanhamento da parasitemia foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo e gota espessa corados com solução giemsa à 10% diluído em solução tampão fosfato potássio (PBS), pH 7,2 conforme metodologia do Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005). As culturas foram utilizadas quando atingiam parasitemia acima de 5%.

4.3. Cultivo de monócitos THP1

As células THP1, utilizadas nos experimentos são originadas de uma linhagem imortalizada obtida do sangue periférico de um menino de 1 ano de idade portador de leucemia monocítica aguda (TSUCHIYA et al., 1980). As células foram mantidas criopreservadas em meio de congelamento contendo 10% de DMSO, 30% soro fetal bovino (SFB) e 60% de meio RPMI 1640 suplementado, no nitrogênio líquido a -80°C. Para os experimentos, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, centrifugadas a 200 G por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram adicionadas em garrafas de cultivo contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro humano e 1% de penicilina/estreptomicina e o pH ajustado para 7,4 (meio completo) utilizando NaHCO₃ 7,5%. Para as manutenções, as culturas foram centrifugadas a 200 G por 10 minutos, então o meio de cultura antigo foi retirado e substituído por um novo meio de manutenção. Esse processo foi repetido a cada dois dias. Os experimentos ou subculturas celulares foram realizados quando a confluência celular chegava a 80%, sendo avaliada também a morfologia celular através de um microscópio óptico invertido.

4.4. Avaliação da parasitemia

Antes dos experimentos, foi realizado um distendido delgado das culturas de *P. falciparum* corados com giemsa 10% diluída em solução PBS para estabelecer a parasitemia das culturas. Após a determinação da parasitemia e do número de hemácias por contagem em câmara de Neubauer, foi realizado o ajuste para 5% de parasitemia. Então, para os experimentos de MTT, DHL e hemoglobina, a cultura foi sincronizada com D-sorbitol a 5% para obtenção apenas das formas de anéis, conforme metodologia de Lambros e Vanderberg (1979). As hemácias então foram ressuspensas em meio RPMI 1640 com 7,5% de NaHCO₃, suplementado com 10% de soro humano inativado, 0,25 mg/dL de hipoxantina (Sigma) e 1% de penicilina/estreptomicina para contagem em câmara de Neubauer.

4.5. Dosagem de hemoglobina

Para o ensaio de hemoglobina, foi utilizado o protocolo adaptado de Magno et. al. (2017). O princípio do ensaio se baseia na medição da absorbância de amostras utilizando espectrofotometria. Para este experimento, 15×10^6 hemácias, sendo 5% parasitadas e suspensas em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol suplementado/poço foram acondicionadas em placas de 96 poços de fundo chato e avaliadas por 24h, 48h e 72h. Os experimentos foram realizados em quintuplicata em grupos de: A. hemácias não parasitadas; B. hemácias não parasitadas com DRS-01; C. hemácias parasitadas; e D. hemácias parasitadas com DRS-01. O controle utilizado foi de hemácias com 0,25 µg/mL de cloroquina. Após os períodos de estímulo, a placa foi centrifugada e 50µl do sobrenadante foi retirado e acondicionado em outra placa contendo 150µl de NaCl 0,9 %. A placa foi lida no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. O valor obtido foi multiplicado por 3,9 para obter os resultados em g/dL.

4.6. Tratamento com DRS-01 e estímulo com hemácias parasitadas

A dermaseptina 01 foi gentilmente cedida pelo Instituto de Química em parceria com o grupo Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Universidade de Brasília (UnB). Uma (1) mg de dermaseptina foi suspensa em 1mL de RPMI 1640, pH 7,2, suplementado e acondicionado em temperatura de -18°C. Para a diluição seriada, 8.8µl da solução criada foi acrescida em 1.091,2µl de RPMI, sendo essa solução equivalente a 8µg/mL. A partir desse valor, metade do volume foi transferido para um tubo falcon contendo a mesma quantidade de meio de cultura, num fator de diluição 1:2. A cada passagem, a solução era homogeneizada e passada no vortex para total homogeneização. A preparação do peptídeo foi realizada no dia dos experimentos.

Para os ensaios de viabilidade (MTT e DHL), 50 mil monócitos foram plaqueados em poços de placas de 96 poços com fundo chato e avaliados durante 24h, 48h e 72h. Foram então utilizadas 15×10^6 hemácias por poço, sendo 5% parasitadas. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol com 7,5% de NaHCO_3 , suplementado com 10% de soro humano inativado, 0,25 mg/dL de hipoxantina (Sigma) e 1% de penicilina/estreptomicina. As concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2µL/mL de DRS-01 foram utilizadas e distribuídas conforme os grupos descritos no item 4.1.

Para os ensaios que avaliaram a produção de mediadores inflamatórios por citometria (ERO/ERN, RelA/RelB e citocinas), 100 mil monócitos foram plaqueados em placas de 96 poços com fundo chato e 15×10^6 hemácias por poço, sendo 5% parasitadas, durante 24h. As células foram mantidas em RPMI 1640 com 7,5% de NaHCO_3 , suplementado com 10% de soro humano inativado e 1% de penicilina/estreptomicina. As concentrações de 0,5 e 1µL/mL de DRS-01 foram utilizadas e distribuídas conforme os grupos descritos no item 4.1.

4.7. Ensaio de MTT

Para verificar se a dermaseptina 01 (DSR-01) afeta a atividade metabólica ou causa toxicidade nos monócitos estimulados ou não com hemácias infectadas com *Plasmodium falciparum*, foram realizados ensaios de redução do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O princípio deste teste se baseia na incorporação do MTT pelas células vivas e metabolizadas para formar um produto insolúvel (sais formazan) de cor azul escura. A quantidade de produto formado é proporcional à atividade metabólica das células e, portanto, esse teste é usado para medir a viabilidade ou metabolismo celular. Neste ensaio, os grupos de células estimuladas ou não com hemácias não parasitadas ou hemácias com 5% de parasitemia e tratadas ou não com DRS-01 foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Para controle positivo, foram adicionados poços extras contendo sulfóxido de dimetilo (DMSO, Sigma, D5879-1L).

Após os períodos de estímulo, as placas foram centrifugadas por 10 minutos a 200 G para retirada do sobrenadante. Foi então adicionado solução de MTT (5mg/mL) e homogeneizado. Após 4 horas de incubação a 37°C no escuro, foi adicionado DMSO para dissolver os cristais de formazan. A placa então foi lida no espectrofotômetro (Spectra Max® Plus 384) no comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem.

4.8. Ensaio de DHL

Para avaliar se a DRS-01 provoca a ruptura da membrana de monócitos, diminuindo sua viabilidade na presença ou não de hemácias parasitadas ou não parasitadas, foi realizada a dosagem de lactato desidrogenase (DHL). O kit comercial Roche Diagnostic GmbH – 11644793001 (reagente 1 e 2) foi utilizado. O princípio deste teste se baseia

na redução do NAD⁺ para NADH+ H⁺ pela oxidação do lactato em piruvato. Então, em uma segunda reação enzimática, o catalisador transfere H/H⁺ de NADH/H⁺ para o sal de tetrazólio cloreto de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fenil tetrazólio (INT) que é reduzido a formazan. O aumento na quantidade de células mortas ou com membrana plasmática danificada resulta em um aumento da quantidade de DHL no sobrenadante da cultura celular.

Os grupos de células foram incubados conforme descrito no item 4.1 e mantidos durante o período de análise em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Para controle positivo, foram adicionados poços contendo DMSO. Após os períodos de estímulo, o sobrenadante dos poços foi coletado e misturado em partes iguais (1:1) com a solução contendo o catalisador (Diaphorase/NAD⁺) e solução corante (INT e lactato de sódio). Passado o período de 30 minutos, a placa foi lida no espectrofotômetro (Spectra Max® Plus 384) nos comprimentos de onda em 450 nm e 600 nm. Os números dados na leitura das duas ondas foram subtraídos conforme manual de uso do kit da Roche Diagnostic. Os resultados foram apresentados em densidade óptica (D.O.).

4.9. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As espécies reativas produzidas dentro das células foram avaliadas utilizando sondas fluorescentes com sinal adquirido por citometria após 24 horas de estímulo. Para tal, as células distribuídas conforme os grupos descritos no item 4.1 foram incubadas em duas placas distintas de 96 escavações e mantidas por 24 horas em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após este período, cada placa foi centrifugada, o sobrenadante foi desprezado e o tampão de lise (cloreto de amônio (0,891g), bicarbonato de potássio (0,1001g) e EDTA 0,2M pH 7,4) foi adicionado por 10 minutos em temperatura ambiente (TA) para evitar a interferência das hemácias durante a aquisição pela citometria. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 por 5 minutos a 200 G para retirada do tampão de lise.

Para avaliar a produção de ERO, foi adicionada aos poços a sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetate (DCFH-DA, Sigma USA, nº D6883) (10 µM) diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 e a placa foi mantida em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos. O DCFH-DA é uma sonda não fluorescente permeável às células. Este composto quando hidrolisado por esterases intracelulares, é convertido em DCFC, que forma a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto altamente fluorescente quando oxidado por espécies reativas de oxigênio intracelular. Como controle positivo, foi adicionado poços contendo 800 nM de Phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma cat nº P8139).

Para a avaliação da produção de o ERN, foi utilizada a sonda 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein diacetate (DAF-FM, Invitrogen, USA, cat nº D23842) (2mM) diluída em PBS pH 7,2. Os poços foram homogeneizados e acondicionados por 1 hora na estufa 37°C com 5% de CO₂. Essa sonda também permeável à membrana celular, sofrem desacetilação por esterases intracelulares para 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), essencialmente não fluorescente até que sejam nitrosadas por produtos da oxidação do óxido nítrico. Como controle positivo, foi utilizado 50 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS, Sigma O55:B5 cat nº L2880) em poços extras.

O sinal fluorescente das placas de ERO e ERN foi adquirido por citometria de fluxo e os resultados foram apresentados com média de intensidade de fluorescência (MFI).

4.10. Ensaio de RelA e RelB

Para quantificar a expressão das moléculas de RelA (p 65) e RelB (p 68) da via do NF-κB, as células distribuídas conforme os grupos descritos no item 4.1 foram incubadas em duas placas distintas com 96 poços e mantidas por 24 horas em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas

de estímulo, o sobrenadante foi removido e adicionado o tampão de lise conforme descrito anteriormente no item 3.9.

As células então foram fixadas com paraformaldeído a 2% durante 20 minutos a 4°C e centrifugadas a 200 G por 5 minutos. Após duas lavagens, foi adicionado Tween 20 0,2% para permeabilização da membrana e então as placas foram mantidas por 30 minutos em T.A. Em seguida, os poços foram lavados novamente com PBS pH 7,2. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de 1% de albumina bovina (BSA) (cat nº. 158, Prothemo) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram duplamente lavadas com PBS pH 7,2 por centrifugação a 200 G durante 5 minutos.

Para marcação do RelA, o anticorpo policlonal de coelho NF- κ B p65 (H-286), marcado com o fluorocromo Alexa Fluor 488 (Santa Cruz, SC7151) diluído em PBS pH 7,2 foi adicionado às placas de cultura na proporção de 0,25 μ L de anticorpo para cada 100 mil de células; para marcação de RelB, o anticorpo primário anti-RelB (C19) (Santa Cruz, SC226) foi adicionado nas placas na proporção 0,25 μ L de anticorpo/poço para cada 100 mil de células. As placas foram então mantidas durante 24 horas no escuro a 4°C.

Após esse período, para a marcação final no experimento de RelB (C19), o anti-IgG1 de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SC55616, BD Pharmingen) diluído em PBS pH 7,2 foi adicionado à placa. A incubação com o anticorpo secundário durou 1 (uma) hora no escuro.

Ao final dos experimentos de RelA e RelB, após seus respectivos períodos de incubação, as placas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 a 100G por 5 minutos e as células foram ressuspensas em 200 μ L de azida sódica para leitura por citometria de fluxo.

O sinal fluorescente das placas de RelA e RelB foi adquirido e os resultados foram apresentados em MFI.

4.11. Ensaio de quantificação de citocinas

Para a quantificação de citocinas, o sobrenadante dos grupos descritos no item 4.1 foram obtidos após 24 horas de tratamento com 0,5 e 1 $\mu\text{L/mL}$ de DRS-01 e estímulo com as hemácias. A quantificação foi realizada utilizando um kit multiplex comercial com esferas de captura fluorescente (Human Inflammatory Cytokine CBA Kit, BD™, 551811). Brevemente, ao sobrenadante das culturas tratadas, foi adicionado esferas de captura com anticorpos específicos para citocinas humanas. O reagente de detecção consiste em uma mistura de anticorpos conjugados à ficoeritrina (PE), gerando um sinal fluorescente proporcional à quantidade de citocinas ligadas, para formando complexos sanduíche (bead de captura + amostra + reagente de detecção) que emite diferentes intensidades de fluorescência. Cada esfera de captura é revestida com anticorpo específico capaz de capturar as seguintes citocinas: interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 12p70 (IL-12p70).

O sinal fluorescente dos complexos formados foi adquirido e os resultados foram apresentados em pg/mL, conforme curva de calibração realizada simultaneamente ao experimento.

4.12. Estratégia de aquisição na citometria de fluxo

Para avaliar a expressão de RelA, RelB, das citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os sinais fluorescentes foram adquiridos no citômetro de fluxo BD LSR II FORTESA, utilizando o software DIVA (BD Biosciences, EUA). O software FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, EUA) foi utilizado na sequência para o tratamento dos dados.

A excitação dos fluorocromo marcados com Alexa Fluor 488, FITC, DCF e DAF respectivamente marcando os experimentos de RelA, RelB, ERO

e ERN foi realizada com o laser azul de 488 nm. A configuração e calibragem do citômetro utilizou um espelho de passagem longa de 505 nm e um espelho de passagem de banda de 530/30 nm. Nos experimentos foram avaliados 10.000 eventos dentro do gate do gráfico “dot plot” de FSC/SSC setado em log. Para cada fluorocromo foi produzido um histograma para ajuste da fluorescência. Os ajustes dos canais FSC, SSC e fluorocromos foram realizados com amostras de células sem marcação e utilizando um *threshold* de 1.000 no canal de FSC.

Os arquivos .fcs dos dados coletados no citômetro foram tratados no programa FlowJo™ versão 10 (BD Biosciences). Os resultados foram apresentados em intensidade média de fluorescência (MFI).

Para a avaliação das citocinas, o SSC e o FSC foram configurados para o modo de log e o limite do SSC estabelecido em 650. Utilizando esferas de configuração multiplex do kit comercial, foi delimitado a população de interesse em um gate P1, e a partir dos eventos dentro do gate foram configurados os histogramas de FITC, PE e APC. Para cada tipo de esfera de citocina, foram avaliados 300 eventos. Os arquivos .fcs dos dados coletados no citômetro foram tratados no programa FCAP Array versão 3 (BD Biosciences) e os resultados de MFI foram avaliados contra uma curva de calibração seriada de 10 pontos a partir do padrão fornecido pelo kit com concentração de 5.000 pg/mL.

4.13. Análise estatística

Os dados resultantes foram analisados quanto a sua normalidade de distribuição utilizando o teste Kolmogorov e Shapiro-Wilk. Para avaliar a homogeneidade de variâncias foram utilizados os testes Brown-Forsythe test Bartlett's test. A análise estatística utilizou os seguintes testes aplicado ao estudo com dados não pareados:

Quadro 1. Testes estatísticos utilizados para a análise de dados:

Quantidade de grupos	Teste de normalidade	Teste de homogeneidade de variâncias	Teste aplicado	Teste de múltiplas comparações
2 grupos	Paramétrico	Não realizado	t de Student	Não realizado
	Não paramétrico	Não realizado	Mann-Whitney	Não realizado
3 ou mais grupos	Paramétrico	Variância diferente	ANOVA	Brown-Forsythe
	Paramétrico	Variância homogênea	ANOVA	Tukey, Sidak's ou Fisher's LSD
	Não paramétrico		Kruskal-Wallis	Dunn's

Foi considerada diferença significativa quando o valor de “p” resultou menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os dados foram apresentados nos gráficos como mediana, quartis e valores superior e inferior e no texto como mediana. O programa Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA; 2005) foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

RESULTADOS

5.1. A DRS-01 reduz a viabilidade das células THP1

Para avaliar se a DRS-01 causa perda de viabilidade celular em monócitos, independentemente da infecção por *P. falciparum*, foram comparados os grupos de THP1 com e sem DRS-01 através do ensaio de MTT.

De maneira geral, nota-se que a DRS-01 reduziu significativamente a viabilidade celular dos grupos tratados em relação às células não tratadas (basais) para valores próximos ao do controle positivo (DMSO). Nas primeiras 24 horas, a viabilidade foi reduzida para as medianas de 48,6% na concentração de 0,25 µL/mL ($p < 0,0001$); 80,5% em 0,5 µL/mL ($p = 0,0239$); 68,6% em 1 µL/mL ($p = 0,0025$); e 62,7% em 2 µL/mL ($p = 0,0005$) ($p < 0,0001$; ANOVA, seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações).

De forma semelhante, após 48 horas, o tratamento reduziu a viabilidade aferida pelo MTT ($p < 0,0001$; ANOVA, seguido de Tukey) para 59,4% na concentração de 0,25 µL/mL ($p = 0,0032$); para 59,8% na concentração de 0,5 µL/mL ($p = 0,006$); para 80,3% na concentração de 1 µL/mL (t de Student, $p = 0,0351$); e 74,5% na concentração de 2 µL/mL ($p = 0,0246$). Embora a DRS-01 tenha causado redução significativa em todas as concentrações nas 24 e 48 horas, essa diminuição não foi dose-dependente, já que não houve diferenças estatísticas entre as concentrações de tratamento (Figura 2).

Já após 72 horas, a redução da viabilidade celular foi observada em todas as concentrações do tratamento ($p < 0,0001$; ANOVA). Segundo o teste de múltiplas comparações de Tukey, os efeitos foram os seguintes: 0,25 µL/mL reduziu a viabilidade para 31,9% ($p < 0,0001$); 0,5 µL/mL, para 36,7% ($p = 0,0002$); 1 µL/mL, para 69,7% (t de Student, $p = 0,0016$); e 2 µL/mL, para 79,4% (t de Student, $p = 0,0187$). Porém, essa diminuição foi dose-dependente, com as concentrações mais elevadas mostrando capacidade de manter melhor a viabilidade (Figura 2).

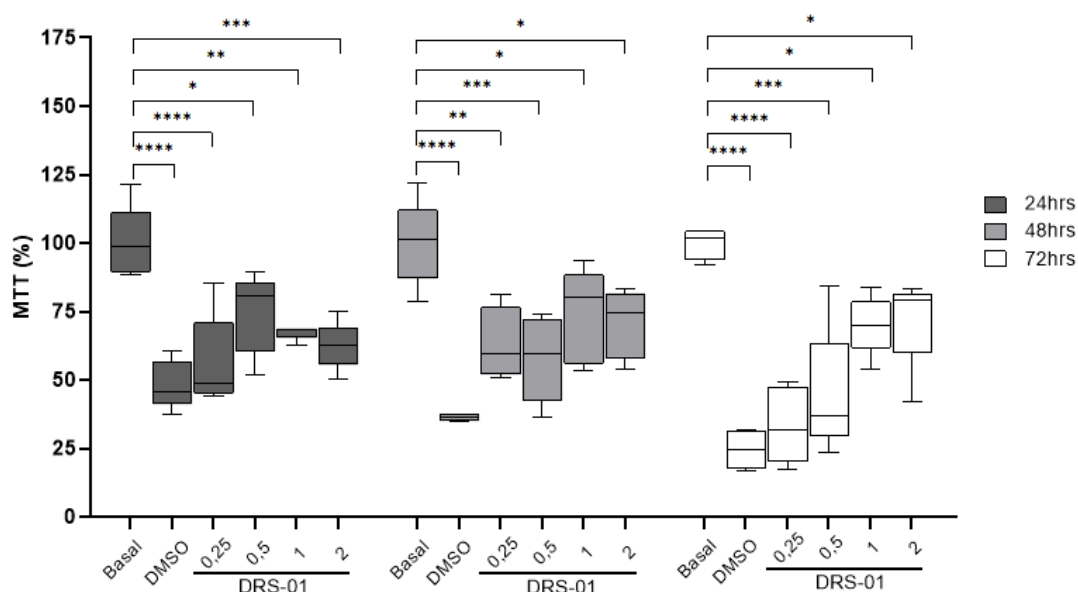


Figura 2. Percentual de células THP1 viáveis incubadas ou não com 0,25 $\mu\text{L/mL}$, 0,5 $\mu\text{L/mL}$, 1 $\mu\text{L/mL}$ e 2 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas ($n=5$). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA, seguido por teste Tukey.

Para verificar se a perda de viabilidade celular foi decorrente de lise celular, realizou-se a análise da liberação de DHL. Os resultados indicaram que o peptídeo não provocou lise nas células nas 24 horas ($p=0,0720$) e nas 48 horas ($p=0,5160$). Já nas 72 horas, houve redução na liberação de DHL nas concentrações de 1 $\mu\text{L/mL}$ e 2 $\mu\text{L/mL}$ (respectivamente $p=0,0211$ e $p=0,0499$; Kruskal-Wallis seguido de uncorrected Dunn's test; Figura 3).

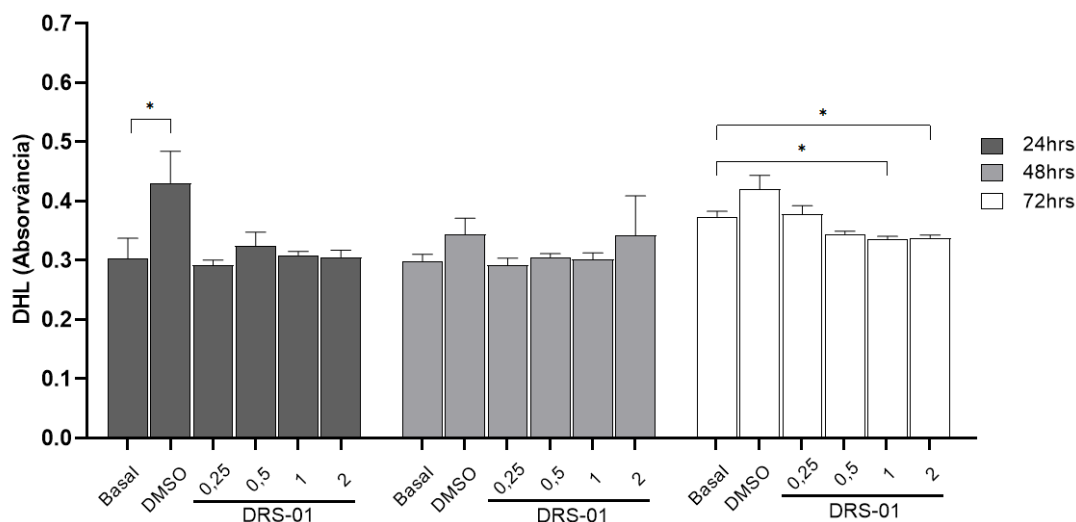


Figura 3. Absorvância de DHL em células THP1 incubadas ou não com 0,25 $\mu\text{L/mL}$, 0,5 $\mu\text{L/mL}$, 1 $\mu\text{L/mL}$ e 2 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas (n=5). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo basal, com exceção do grupo controle em 24 horas. Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Kruskal-Wallis, seguido de uncorrected Dunn's test

5.2. A DRS-01 não interfere na lise das hemácias promovida pelo *Plasmodium falciparum* após 24 horas

Para avaliar se a DRS-01 influencia a lise das hemácias, a dosagem de hemoglobina foi realizada após 24 horas.

Quando incubadas com DRS-01, nos grupos de hemácias não parasitadas, houve redução da hemoglobina livre para 0,1770 g/dL ($p = 0,0261$) na concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$, 0,1770 g/dL ($p = 0,0299$) na de 1 $\mu\text{L/mL}$ e 0,1730 g/dL ($p = 0,0029$) na de 2 $\mu\text{L/mL}$. Isso também foi observado no grupo de hemácias parasitadas, com menor liberação de hemoglobina livre nas concentrações de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p=0,0019$), 1 $\mu\text{L/mL}$ ($p=0,0023$) e 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p=0,0001$) (Kruskal-Wallis, seguido de uncorrected Dunn's test; Figura 4).

Logo, independente da presença ou ausência de plasmódio, a DRS-01 reduz a liberação de hemoglobina livre após 24 horas ($p = 0,0002$, Kruskal-Wallis, uncorrected Dunn's test), ficando próximas aos valores dos grupos

tratados com cloroquina. Esse efeito não foi observado na concentração de 0,25 $\mu\text{L/mL}$ (Figura 4).

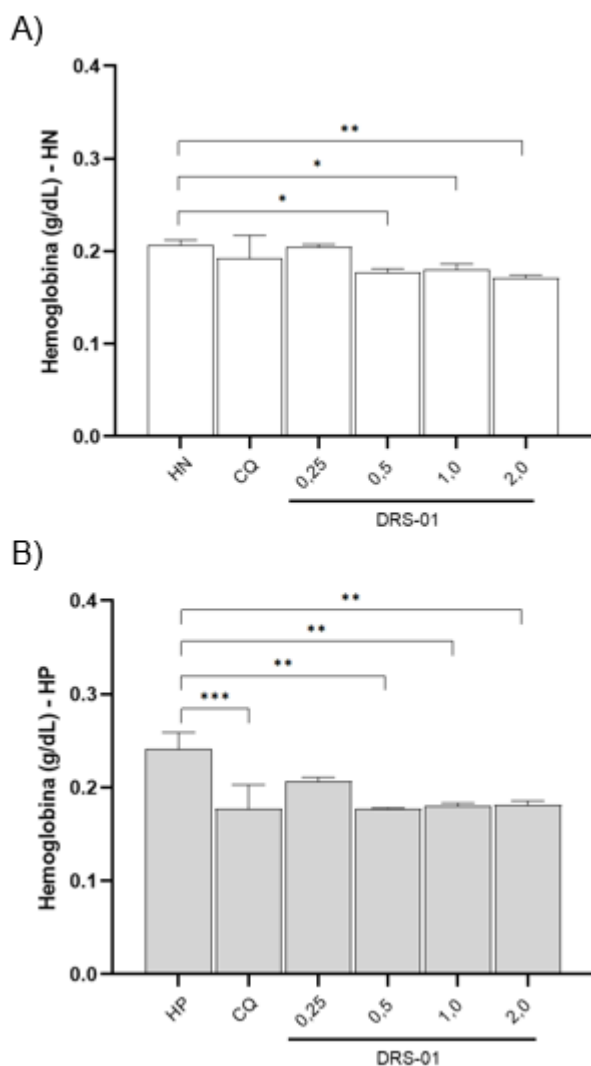


Figura 4. Hemoglobina liberada (g/dL) no sobrenadante de hemácias incubadas com 0,25 $\mu\text{L/mL}$, 0,5 $\mu\text{L/mL}$, 1 $\mu\text{L/mL}$ e 2 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24 horas (n=5). A) Grupo de hemácias não parasitadas. B) Grupo de hemácias parasitadas. Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Kruskal-Wallis, seguido de uncorrected Dunn's test.

Os resultados da análise de hemoglobina para os períodos de 48 e 72 horas não foram utilizados devido a problemas metodológicos. Assim, não foi possível averiguar diretamente a lise das hemácias provocada pela replicação do plasmódio nesses períodos.

No entanto, os resultados de DLH mostraram que houve um aumento gradual dessa enzima no grupo de hemácias não parasitadas ao longo do tempo. Em comparação com o período inicial, a liberação aumentou 5,8% em

48 horas ($p = 0,7417$) e 31,3% nas 72 horas ($p = 0,0321$) ($p = 0,0026$; Kruskal-Wallis, uncorrected Dunn's test; Figura 5). Neste grupo, a viabilidade dos monócitos também sofreu queda gradual, reduzindo 42,8% em 48 horas ($p < 0,0001$) e 69,9% nas 72 horas ($p < 0,0001$) ($p < 0,0001$; ANOVA, seguido por teste Sidak's; Figura 6).

Já no grupo de hemácias parasitadas, houve um aumento acentuado na liberação de DLH apenas após 72 horas. Em comparação com o período de 48 horas, a liberação aumentou 31,0% ($p = 0,0469$) (Kruskal-Wallis, uncorrected Dunn's test; Figura 5). Neste grupo, a viabilidade dos monócitos também sofreu queda expressiva, reduzindo 65,3% após 72 horas ($p < 0,0001$) (ANOVA, seguido por teste Sidak's; Figura 6).

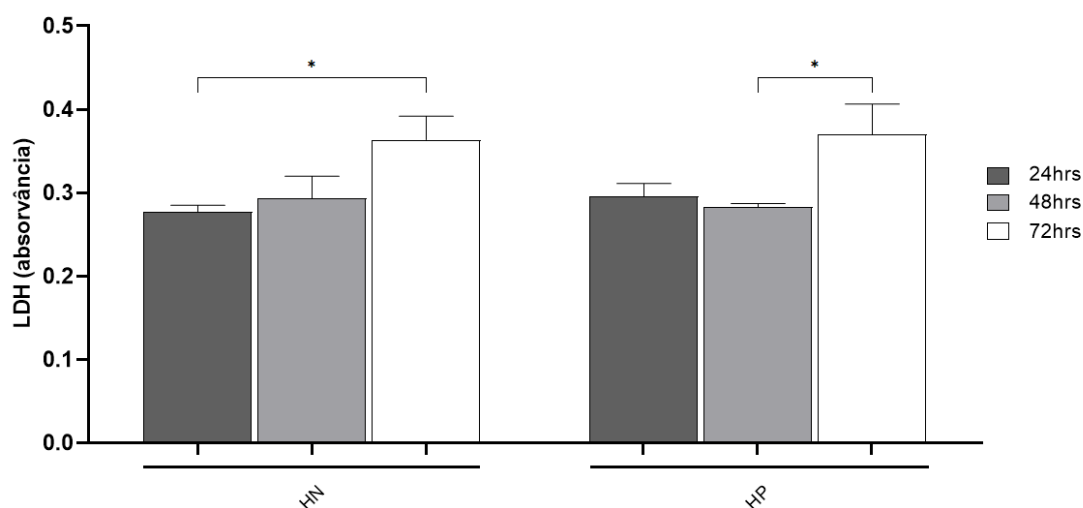


Figura 5. Absorvância de LDH em células THP1 incubadas com hemácias não parasitadas (HN) ou hemácias parasitadas (HP) durante 24, 48 e 72 horas ($n=5$). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Kruskal-Wallis, seguido de uncorrected Dunn's test.

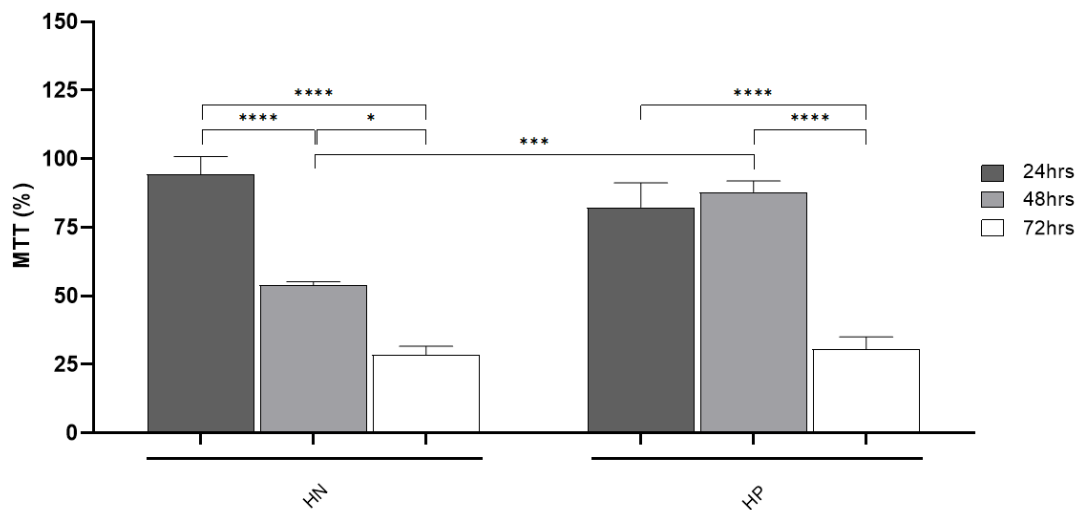


Figura 6. Percentual de células THP1 viáveis incubadas com hemácias não parasitadas (HN) ou hemácias parasitadas (HP) durante 24, 48 e 72 horas. Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA, seguido por teste Sidak's.

5.3. A DRS-01 reverte o efeito citotóxico de hemácias saudáveis após 48 e 72 horas de estimulação.

Para conduzir os ensaios entre células, hemácias e tratamento, inicialmente, avaliou-se o efeito das hemácias não parasitadas (saudáveis) sobre os monócitos THP1 utilizando o teste de MTT e DHL. Segundo o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações, a viabilidade dos monócitos reduziu para 52,8% ($p < 0,0001$) após 48 horas e para 26,8% ($p < 0,0001$) após 72 horas quando eles estavam na presença de hemácias normais (Figura 7).

Pelo ensaio de MTT, na cultura de células estimuladas com hemácias não parasitadas, o tratamento com DRS-01 reduziu 22,4% da viabilidade das THP1 na concentração 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0103$) nas primeiras 24 horas ($p < 0,0001$, ANOVA uncorrected Fisher's LSD). Já o tratamento após 48 e 72 horas mostra que foi capaz de reverter o efeito citotóxico das hemácias normais sobre os monócitos, aumentando a viabilidade das células.

Nas 48 horas, a viabilidade melhorou na presença de DRS-01, passando da viabilidade de 52,8% (mediana) para do grupo de hemácias sem DRS-01 para 70,8% na concentração de 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0195$), para 77,5% na concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0004$), para 78,0% na concentração de 1 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0002$) e 92,0% na concentração de 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p < 0,0001$) ($p < 0,0001$, ANOVA uncorrected Fisher's LSD; Figura 7).

Já nas 72 horas ($p < 0,0001$, ANOVA e teste Sidak's para múltiplas comparações), a viabilidade passou de 26,8% para 74,6% na concentração de 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0050$), para 55,4% na concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0189$), 84,2% na concentração de 1 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0005$) e 83,6% na concentração de 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0024$) ($p < 0,0001$, ANOVA seguido por teste Sidak's para múltiplas comparações; Figura 7).

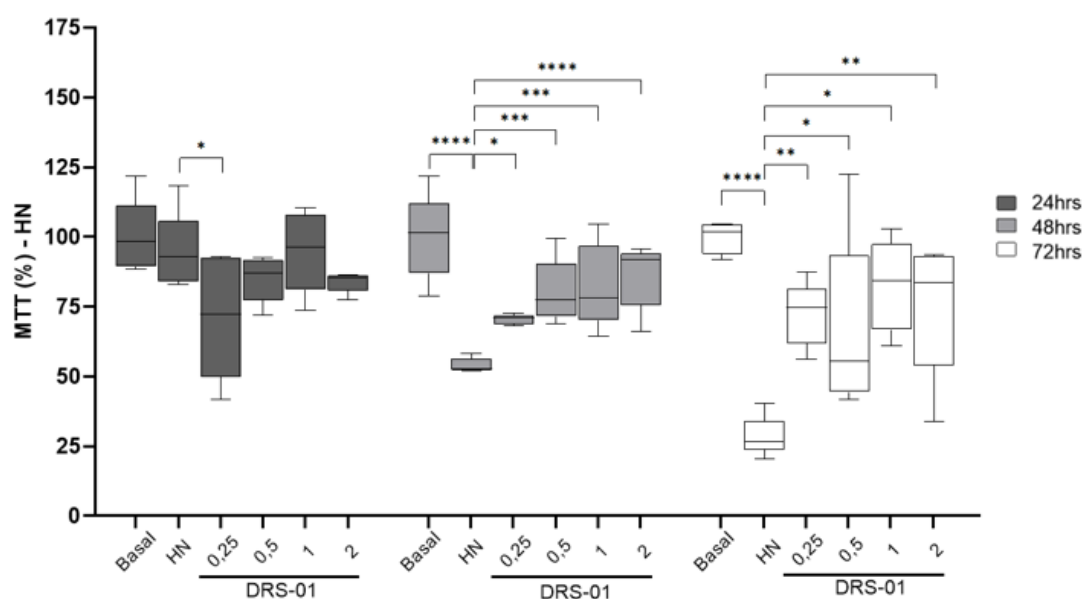


Figura 7. Percentual de células THP1 viáveis incubadas com hemácias não parasitadas (HN) e 0,25 $\mu\text{L/mL}$, 0,5 $\mu\text{L/mL}$, 1 $\mu\text{L/mL}$ e 2 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24¹, 48¹ e 72² horas (n=5). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ¹ANOVA uncorrected Fisher's LSD; ²ANOVA seguido por Sidak's.

Na análise da liberação de DHL, nas culturas de células estimuladas com hemácias saudáveis, o tratamento com DRS-01 não teve influência sobre a liberação de conteúdo celular em nenhuma concentração entre 24 horas (p

= 0,0717, ANOVA) e 48 horas ($p = 0,5617$, ANOVA). Nas 72 horas, a concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ mostrou um efeito protetor, reduzindo 21,4% a liberação de DHL em relação ao grupo sem tratamento ($p = 0,0359$, Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's; Figura 8).

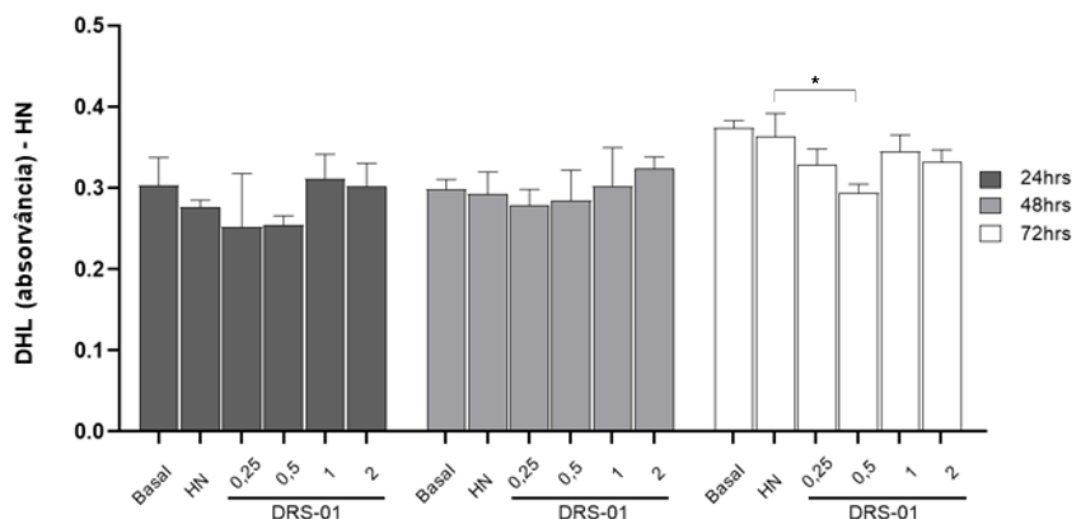


Figura 8. Absorvância de DHL em células THP1 incubadas com hemácias não parasitadas (HN) durante 24¹, 48¹ e 72² horas (n=5). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo basal. Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ¹ANOVA, ²Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's.

5.4. A DRS-01 melhora parcialmente e tardiamente o efeito negativo promovido pelas hemácias parasitadas no metabolismo celular dos monócitos

Considerando que a DRS-01 foi capaz de reverter o efeito citotóxico de hemácias normais, em consequência, foi aferido se as hemácias parasitadas foram citotóxicas para as células THP1 sozinhas e se o peptídeo era capaz de reverter esse efeito.

No teste de MTT, as hemácias parasitadas promoveram uma queda importante na viabilidade das células THP1 somente após 72 horas de estímulo em comparação ao grupo basal (redução de 66,8%; $p < 0,0001$,

ANOVA e teste Sidak's para múltiplas comparações). Esse efeito foi parcialmente revertido pelo tratamento com a DRS1 em todas as concentrações, exceto para a concentração 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,1110$), que reduziu excessivamente (mediana = 12,9%), abaixo do controle com DMSO (mediana = 24,45%), podendo indicar uma possível falha metodológica (Figura 9).

A viabilidade de hemácias parasitadas melhorou de 33,8% para 66,8% na concentração 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p < 0,0001$), para 71,9% na concentração 1 $\mu\text{L/mL}$ ($p < 0,0001$) e para 50,8% na concentração 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0084$; Figura 9).

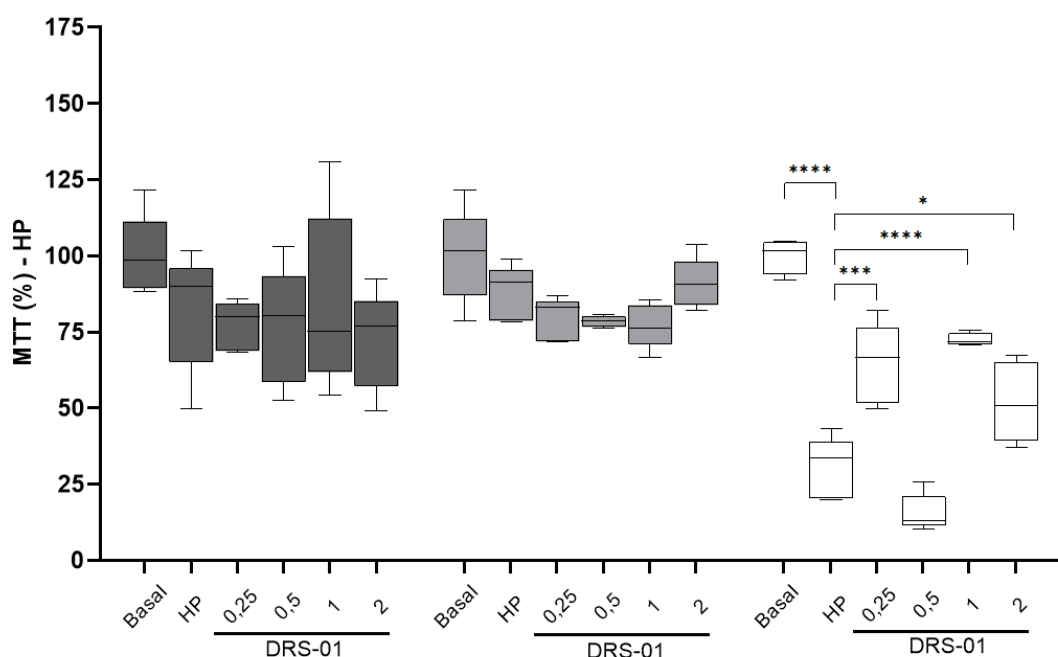


Figura 9. Percentual de células THP1 viáveis incubadas com hemácias parasitadas (HP) e 0,25 $\mu\text{L/mL}$, 0,5 $\mu\text{L/mL}$, 1 $\mu\text{L/mL}$ e 2 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas ($n=5$). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA e teste Sidak's para múltiplas comparações.

Para averiguar se a redução observada foi provocada por lise celular, foi realizada avaliação do DLH, mostrando que o tratamento com DRS-01 não teve influência sobre a liberação de conteúdo celular em nenhuma concentração e em nenhum dos períodos testados (nas 24 horas, $p = 0,0975$;

48 horas, $p = 0,5016$; e 72 horas, $p = 0,0827$; Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's; Figura 10).

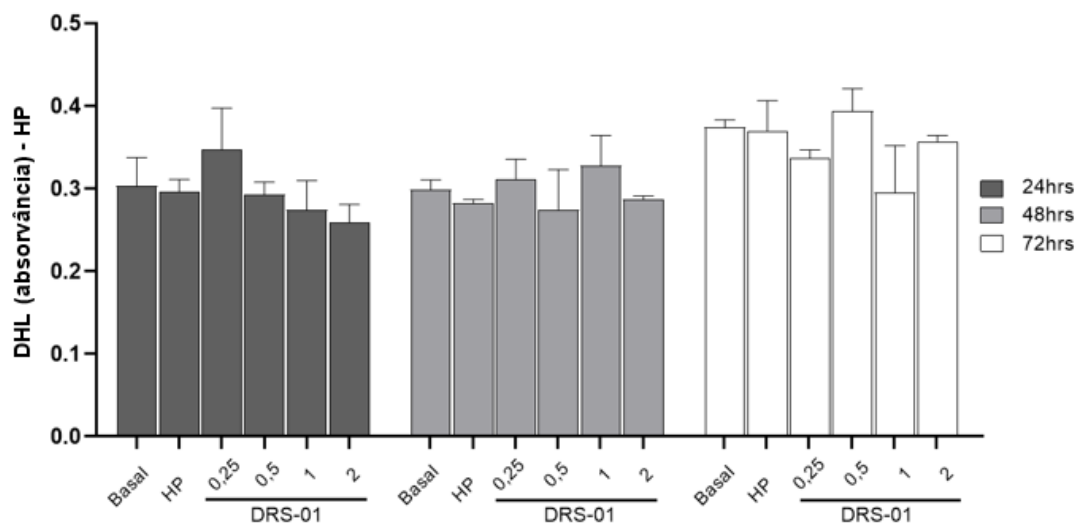


Figura 10. Absorvância de DHL em células THP1 viáveis incubadas com hemácias parasitadas (HP) durante 24, 48 e 72 horas ($n=5$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo basal. Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's.

5.5. A DRS-01 aumenta a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) pelos monócitos.

Uma vez que a DRS-01 influencia na atividade metabólica e/ou viabilidade das células THP1, bem como é capaz de ter um pequeno efeito tardio, melhorando a viabilidade de células estimuladas com hemácias parasitadas, procurou-se avaliar sua influência na função de produção de espécies reativas pelos monócitos THP1. Com base nos resultados de viabilidade, as concentrações de 0,5 e 1 $\mu\text{L/mL}$ foram escolhidas para as próximas avaliações.

Após 24 horas, os resultados indicam um aumento na produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) pelas células THP1 de tratamento com DRS-01 na concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ (aumento de 75,3%; $p = 0,00129$,

ANOVA e teste Sidak's para múltiplas comparações) e 1 $\mu\text{L/mL}$ (aumento de 117,1%; $p = 0,0003$, ANOVA e teste Sidak's para múltiplas comparações) em comparação com o basal (Figura 11A).

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos de células incubadas apenas com hemácias (parasitadas ou não) em comparação ao basal. A produção de ERNS pelas THP1 aumentou 57,6% quanto incubadas com hemácias normais ($p = 0,0073$, teste t) e 33,5% quanto incubadas com hemácias parasitadas ($p = 0,0039$, teste t) (Figura 11B e 11C).

Por sua vez, o tratamento com DRS-01 dos grupos de células estimulados com as hemácias normais ou parasitadas não promoveu aumento da produção de ERN em relação ao grupo de hemácias saudáveis sem tratamento (Figura 11B e 11C). Conforme esperado, o controle positivo (LPS) do experimento aumentou 1,66 vezes a produção de ERN em relação ao grupo basal.

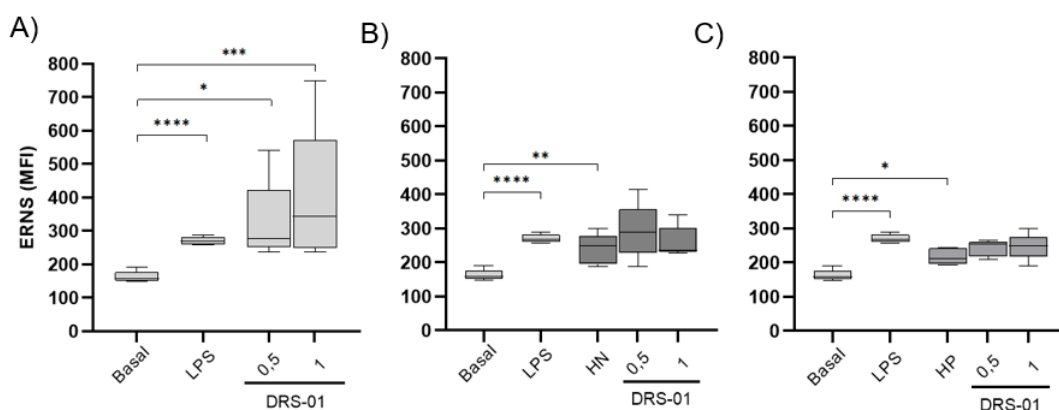


Figura 11. Produção de ERNS apresentada por intensidade média de fluorescência (MFI) por monócitos incubados ou não com 0,5 $\mu\text{L/mL}$ e 1 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24 horas ($n=5$). A) grupo tratado com DRS-01. B) grupo incubado com hemácias não parasitadas (HN). C) grupo incubado com hemácias parasitadas (HP). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA e teste Sidak's para múltiplas comparações.

5.6. A DRS-01 é eficaz na diminuição da produção de ERO pelos monócitos estimulados por hemácias parasitadas.

Quanto à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o tratamento com DRS-01 não apresentou impacto significativo nos monócitos em comparação ao basal ($p = 0,1374$; ANOVA e teste de Sidak para múltiplas comparações; Figura 12A).

Não se observou um aumento de ERO quando os monócitos foram incubados junto com hemácias normais. No entanto, na concentração $1 \mu\text{L/mL}$, a produção dessas espécies em relação ao grupo de hemácias sem tratamento aumentou 29,9 vezes ($p = 0,0067$, Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's; Figura 12B).

Já quando os monócitos foram incubados junto às hemácias parasitadas, a produção de ERO elevou 42,2 vezes em comparação ao basal ($p = 0,0176$). Este grupo, quando tratado com DRS-01, diminuiu a produção de ERO de forma drástica, ficando mais próxima dos níveis basais. Na concentração de $0,5 \mu\text{L/mL}$, a produção reduziu 92,1% ($p = 0,0222$) e na concentração de $1 \mu\text{L/mL}$ 93,7% ($p = 0,0202$) quando comparado ao grupo de hemácias parasitadas sem tratamento ($p = 0,0134$; Brown-Forsythe and Welch ANOVA; Figura 12C).

Conforme esperado, a produção de ERO do controle positivo (PMA) foi 7,2 vezes maior em relação a produção basal.

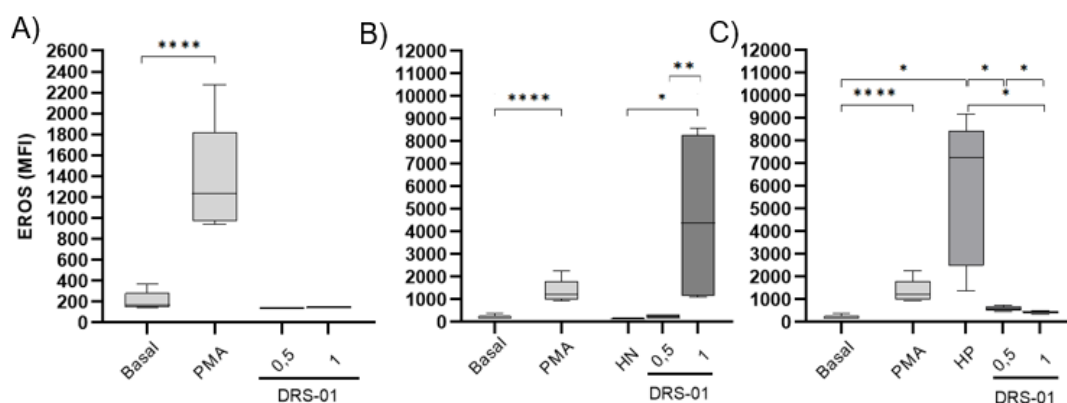


Figura 12. Produção de EROS apresentada por intensidade média de fluorescência (MFI) por monócitos incubados ou não com 0,5 μ L/mL e 1 μ L/mL DRS-01 durante 24 horas (n=5). A) grupo incubado apenas com o tratamento¹. B) grupo incubado com hemácias não parasitadas (HN) e tratamento². C) grupo incubado com hemácias parasitadas (HP) e tratamento³. Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ¹Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's, ²Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's, ³Brown-Forsythe and Welch ANOVA.

5.7. A DRS-01 interfere na produção de algumas citocinas inflamatórias, mas não é capaz de modificar a resposta de monócitos estimulados com hemácias

Ainda avaliando a funcionalidade das células THP1 durante a exposição às hemácias e sob tratamento com DRS-01, as citocinas produzidas nestas interações foram quantificadas no sobrenadante das culturas após 24h.

Em relação ao tratamento com DRS-01, os resultados mostram que houve aumento na produção de IL-8 pelos monócitos tratados. A concentração dessa citocina aumentou 108,8% e 100% respectivamente, com os tratamentos 0,5 μ L/mL (mediana = 119,2 pg/mL; p=0,0113) e 1 μ L/mL (114,2 pg/mL; p=0,0139) em relação ao basal (57,1 pg/mL) (p = 0,0130, ANOVA uncorrected Fisher's LSD; Figura 13).

Além disso, nota-se um leve aumento dessa citocina no grupo de hemácias não parasitadas, passando para 103,9 pg/mL, 181,9% a mais em relação ao grupo basal (p = 0,0627, ANOVA uncorrected Fisher's LSD). No

entanto, quando os monócitos estimulados com as hemácias normais são tratados com DRS-01 esse incremento é perdido. A concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ resultou em uma produção de 45,7 pg/mL ($p = 0,0161$), enquanto a concentração de 1 $\mu\text{L/mL}$ levou a uma produção de 56,25 pg/mL ($p = 0,0428$). Por outro lado, não se observa aumento semelhante quando as células são incubadas com hemácias parasitadas (45,48 pg/mL), ficando todos os grupos, independente da presença ou não de DRS-01, próximos ao basal (Figura 13).

Chama-se atenção para o tratamento dos monócitos com 1 $\mu\text{L/mL}$, onde os grupos estimulados com hemácias parasitadas (67,40 pg/mL) ou não (56,25 pg/mL) e tratados com 1 $\mu\text{L/mL}$ apresentaram uma quantidade significativamente menor de IL-8 em relação ao grupo tratado com a mesma concentração (114,7 pg/mL), mas sem o estímulo das hemácias ($p = 0,0334$ vs. hemácias parasitadas; $p = 0,0092$ vs. hemácias não parasitadas). Um resultado semelhante foi observado entre o grupo tratado com 0,5 $\mu\text{L/mL}$ sem hemácias e o grupo tratado com hemácias normais ($p = 0,0033$, ANOVA uncorrected Fisher's LSD; Figura 13).

Em relação a IL-12p70, tanto no grupo estimulado com as hemácias normais (1,900 pg/mL) quanto os estimulados com as hemácias parasitadas (1,140 pg/mL), a produção de citocinas pelos monócitos diminuiu em relação ao basal (2,785 pg/mL). Quando a DRS-01 foi adicionada no tratamento na concentração 0,5 e 1 $\mu\text{L/mL}$ (mediana = 0,5900 pg/mL e 1,680 pg/mL respectivamente), a produção da IL-12p70 pelos monócitos não estimulados (2,785 pg/mL) caiu. Nos grupos estimulados com as hemácias, o tratamento, independente da concentração, manteve os níveis da citocina baixa em relação ao basal e praticamente na mesma quantidade em relação aos grupos com hemácias sem tratamento ($p = 0,1461$, ANOVA uncorrected Fisher's LSD; Figura 14).

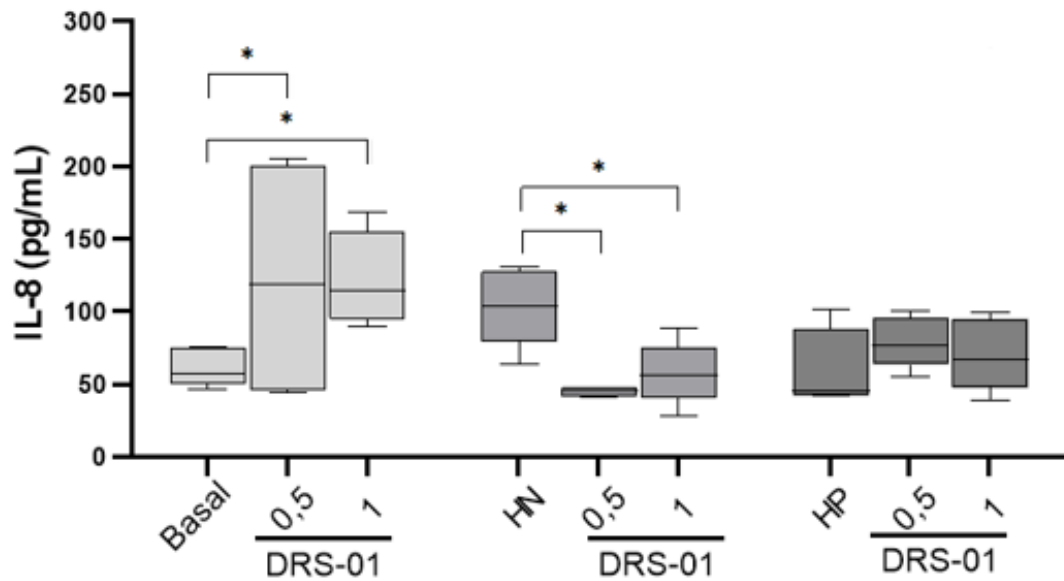


Figura 13. Produção de IL-8 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas (n=5). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA uncorrected Fisher's LSD.

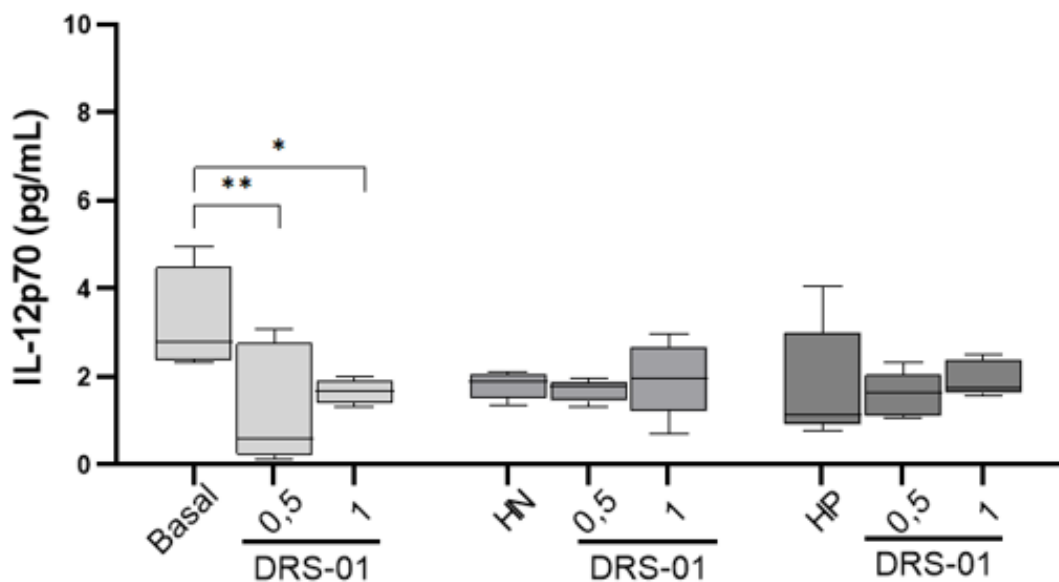


Figura 14. Produção de IL-12p70 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas (n=5). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA uncorrected Fisher's LSD.

Um padrão semelhante foi observado na produção de IL-6 (Figura 15). Percebe-se que essa citocina apresentou redução significativa com o tratamento de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01, passando do basal 1,8 pg/mL para 0,5 pg/mL. Isso também foi observado quando estimuladas com hemácias parasitadas, passando para 0,8 pg/mL ($p < 0,0001$, ANOVA, seguido por teste Tukey).

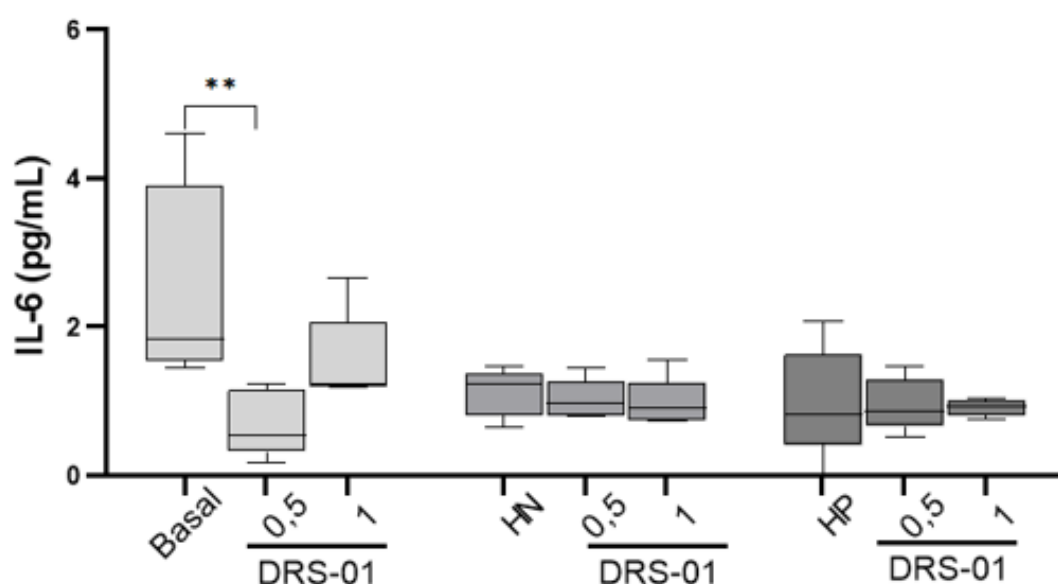


Figura 15. Produção de IL-6 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 $\mu\text{L/mL}$ e 1 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24 horas ($n=5$). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA, seguido por teste Tukey.

Nos resultados de TNF ($p = 0,8020$; Brown-Forsythe and Welch ANOVA; Figura 16), IL-10 ($p = 1,1024$, Ordinary one-way ANOVA; Figura 17) e IL-1 β ($p = 0,2190$, Brown-Forsythe and Welch ANOVA; Figura 18), nem as hemácias normais, nem as parasitadas, alteraram a produção de citocinas em relação ao basal. Da mesma forma, a DRS-01 não teve impacto na produção de citocinas dos monócitos estimulados ou não com hemácias.

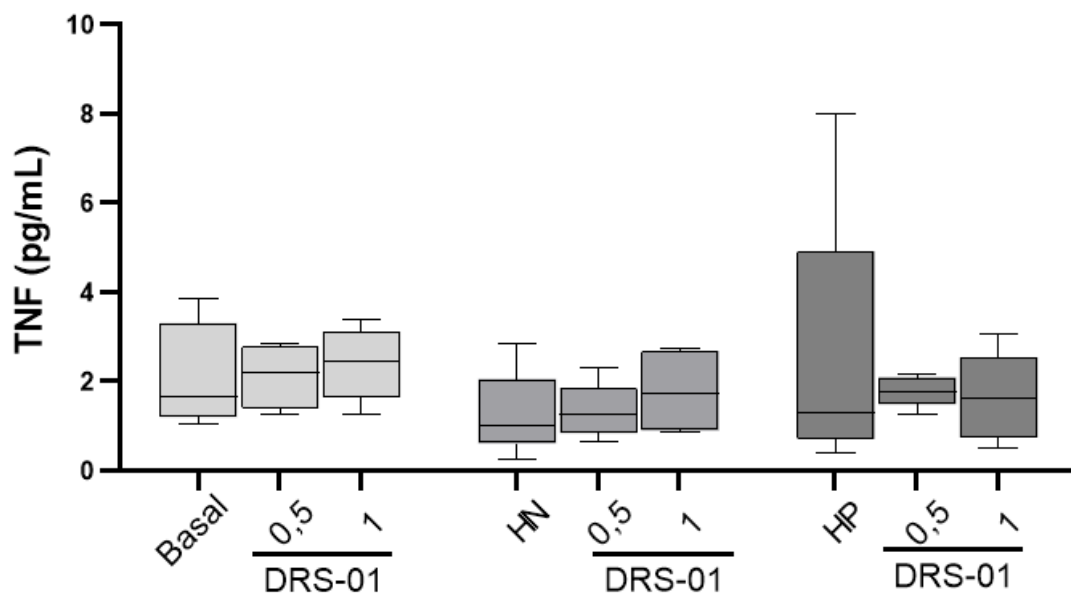


Figura 16. Produção de TNF (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas (n=5). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Brown-Forsythe and Welch ANOVA.

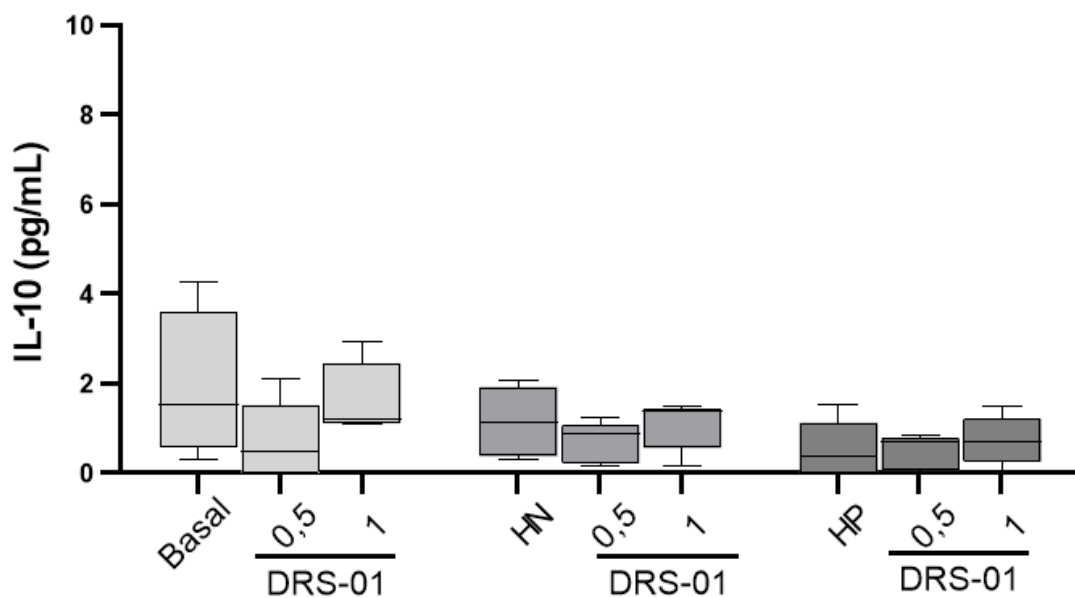


Figura 17. Produção de IL-10 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas (n=5). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Ordinary one-way ANOVA.

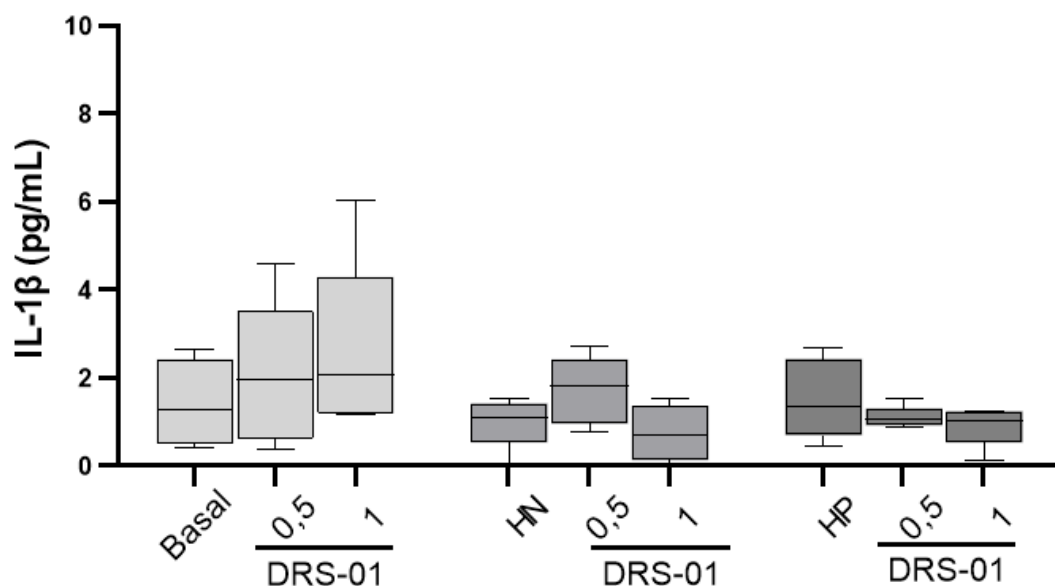


Figura 18. Produção de IL-1 β (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 μ L/mL e 1 μ L/mL DRS-01 durante 24 horas (n=5). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Brown-Forsythe and Welch ANOVA.

Para garantir que o experimento para dosar citocinas foi realizado adequadamente, 5 monoplicatas de LPS foram adicionadas como controle positivo. Os resultados mostraram que as células foram capazes de responder ao estímulo de LPS (exceto IL-10 e IL-12p70) em relação aos grupos basais. Os seguintes resultados em % foram maiores que o valor de pg/mL basal: 22.983% (IL-8), 218,7% (IL-6), 2.895,8% (TNF), 1.034,8% (IL-1 β).

5.8. Efeito do tratamento com DRS-01 sobre a expressão dos promotores gênicos RelA e RelB da via do NF- κ B, em monócitos estimulados ou não com hemácias parasitadas

Considerando que a DRS-01 teve influência na produção de espécies reativas e citocinas pró-inflamatórias, a expressão dos promotores gênicos RelA e RelB da via do NF- κ B que regula os mediadores citados foi avaliada após 24 horas nos grupos de estudo.

Nos resultados obtidos, de forma geral, não houve aumento significativo desses promotores. No caso do promotor RelA houve um aumento de 13,39% de RelA ($p = 0,0192$) quando o grupo de hemácias parasitadas foram tratadas com 1 $\mu\text{L/mL}$ de DRS-01 em comparação ao grupo de hemácias parasitadas sem tratamento ($p = 0,0842$ para RelA e $p = 0,4413$ para RelB; Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's; Figura 19A).

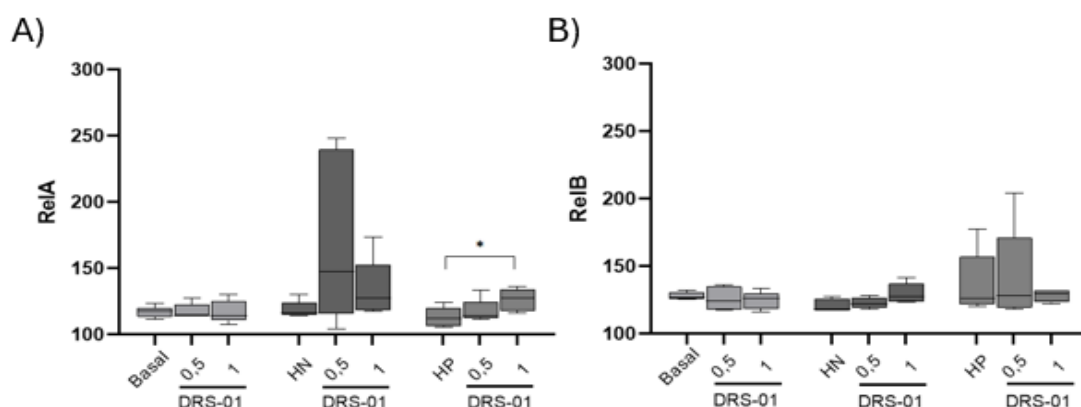


Figura 19. Produção de A) RelA (p65) e B) RelB apresentada por intensidade média de fluorescência (MFI) por monócitos incubados ou não com 0,5 $\mu\text{L/mL}$ e 1 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24 horas ($n=5$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo basal. Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's.

5.9. Resumo dos resultados obtidos

Tabela 01: Resumo de resultados das avaliações em relação ao grupo basal em 24 horas.

Análise	HN	HP	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	NA	NA	↓	↓	↓	↓
DLH	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EROS	NA	↑	SR	NA	NA	SR
ERNS	↑	↑	SR	↑	↑	SR
RelA	NA	NA	SR	NA	NA	SR
RelB	NA	NA	SR	NA	NA	SR
IL-8	NA	NA	SR	↑	↑	SR
IL-1β	NA	NA	SR	NA	NA	SR
IL-6	NA	↓	SR	↓	NA	SR
IL-10	NA	NA	SR	NA	NA	SR
TNF	NA	NA	SR	NA	NA	SR
IL-12p70	↓	↓	SR	↓	↓	SR

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

Tabela 02: Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias normais em 24 horas.

Análise	Hemácia não parasitada (HN)				
	HP	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	NA	↓	NA	NA	NA
DLH	NA	NA	NA	NA	NA
Hemoglobina	NA	NA	↓	↓	↓
EROS	↑	SR	NA	↑	SR
ERNS	NA	SR	NA	NA	SR
RelA	NA	SR	NA	NA	SR
RelB	NA	SR	NA	NA	SR
IL-8	NA	SR	↓	↓	SR
IL-1β	NA	SR	NA	NA	SR
IL-6	NA	SR	NA	NA	SR
IL-10	NA	SR	NA	NA	SR
TNF	NA	SR	NA	NA	SR
IL-12p70	NA	SR	NA	NA	SR

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

Tabela 03: Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias parasitadas em 24 horas.

Análise	Hemácia parasitada (HP)				
	HN	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	NA	NA	NA	NA	NA
DLH	NA	NA	NA	NA	NA
Hemoglobina	NA	NA	↓	↓	↓
EROS	↓	SR	↓	↓	SR
ERNS	NA	SR	NA	NA	SR
RelA	NA	SR	NA	↑	SR
RelB	NA	SR	NA	NA	SR
IL-8	NA	SR	NA	NA	SR
IL-1 β	NA	SR	NA	NA	SR
IL-6	NA	SR	NA	NA	SR
IL-10	NA	SR	NA	NA	SR
TNF	NA	SR	NA	NA	SR
IL-12p70	NA	SR	NA	NA	SR

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

Tabela 04: Resumo de resultados das avaliações em relação ao grupo basal em 48 horas.

Análise	HN	HP	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	↓	NA	↓	↓	↓	↓
DLH	NA	NA	NA	NA	NA	NA

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

Tabela 05: Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias normais em 48 horas.

Análise	Hemácia não parasitada (HN)				
	HP	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	↑	↑	↑	↑	↑
DLH	NA	NA	NA	NA	NA

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

Tabela 06: Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias parasitadas em 48 horas.

Análise	Hemácia parasitada (HP)				
	HN	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	↓	NA	NA	NA	NA
DLH	NA	NA	NA	NA	NA

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

Tabela 07: Resumo de resultados das avaliações em relação ao grupo basal em 72 horas.

Análise	HN	HP	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	↓	↓	↓	↓	↓	↓
DLH	NA	NA	NA	NA	↓	↓

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

Tabela 08: Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias normais em 72 horas.

Análise	Hemácia não parasitada (HN)				
	HP	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	NA	↑	↑	↑	↑
DLH	NA	NA	NA	↓	NA

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

Tabela 09: Resumo de resultados das avaliações em relação às hemácias parasitadas em 72 horas.

Análise	Hemácia parasitada (HP)				
	HN	DRS-01 (0,25)	DRS-01 (0,5)	DRS-01 (1)	DRS-01 (2)
MTT	NA	↑	NA	↑	↑
DLH	NA	NA	NA	NA	NA

↑: aumento, ↓: diminuição, NA: não alterou; SR: não avaliado/ sem resultado

DISCUSSÃO

Sendo a malária uma doença que afeta uma parte significativa da população mundial, especialmente nas regiões endêmicas, estando associada a altas taxas de morbimortalidade e impactos econômicos, o estudo dos mecanismos da resposta imune ao plasmódio, bem como a identificação de possíveis moléculas capazes de aprimorar a resposta imunológica e eliminar a parasitemia, é fundamental. Isso é amplificado pelo risco de resistência aos antimaláricos. Assim, esse trabalho apresentou pela primeira vez a ação da dermasseptina 1 na resposta de monócitos humanos contra *Plasmodium falciparum*, o principal agente causador da malária grave.

Em conjunto, nossos dados mostraram que a dermosseptina 01 sozinha influencia em aspectos importantes do metabolismo fisiológico do monócito e na resposta celular às hemácias parasitadas. Esse conjunto de resultados será, portanto, discutido nesta seção.

6.1. A DRS-01 é capaz de causar citotoxicidade em monócitos, independente da presença de plasmódio.

Nossos resultados mostram que a dermosseptina promoveu perda de viabilidade dos monócitos em 24, 48 e 72 horas em todas as concentrações testadas. Embora existam estudos mostrando que as dermosseptinas são pouco citotóxicas para células saudáveis, esse efeito é dependente do tipo celular, do tipo de DRS, tempo e concentrações de tratamento (NICOLAS; AMICHE, 2006; ZHU et al., 2018).

No estudo de Oliveira (2015), diferentes concentrações de DRS-01 (1 e 16 µg/mL) provocaram redução na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. De forma semelhante, outros estudos com células de linhagem monocíticas demonstram morte celular provocada pela DRS. Como exemplo, o estudo de Cano (2012), que demonstrou que a dermosseptina S1 foi capaz de gerar uma queda na viabilidade de células das linhagens de macrófagos murinos J774 e de monócitos humanos U937 em concentrações

que variaram entre 6,25 e 50,0 µg/mL. No entanto, esse efeito foi geralmente restrito a concentrações muito altas, diferente do presente estudo, que avaliou a viabilidade de monócitos em concentrações bem menores de DRS-01. Certamente, essas diferenças podem ser atribuídas a variações metodológicas entre os estudos.

Por exemplo, o tempo de tratamento varia consideravelmente entre os estudos: enquanto uns avaliaram a viabilidade celular após 1 a 2 horas de exposição, nosso estudo analisou períodos mais longos, de 24, 48 e 72 horas. Além disso, os métodos de análise também diferem, visto que a viabilidade celular foi determinada por contagem direta de células viáveis usando coloração com nigrosina ou azul de tripano em outros estudos, enquanto neste estudo foi principalmente empregada a técnica de MTT, que avalia o metabolismo celular mitocondrial e não refletem necessariamente morte celular, como ocorre nos ensaios diretos (VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015).

É importante considerar, que o mecanismo de ação das DRS decorre principalmente da sua interação direta nas membranas lipídicas, promovendo sua permeabilização e ruptura (AMICHE; GALANTH, 2011). Diante disso, buscamos entender se a perda de viabilidade das THP1 foi decorrente da lise celular por meio da dosagem de DLH no sobrenadante das culturas. Curiosamente, nossos resultados sugerem fortemente que a interação do peptídeo em baixas concentrações não promoveu morte celular por rompimento da membrana, e que provavelmente os resultados do MTT se devem a alterações metabólicas ocasionadas pela interação do peptídeo na membrana celular, o que poderia ter provocado uma morte celular apoptótica, sem liberação do seu conteúdo intracelular.

De forma semelhante, Long et al. (2019) observou que a dermosseptina PS1 foi capaz de induzir proteínas marcadoras da cascata apoptótica intrínseca de células de glioblastoma humano. Utilizando técnicas de MTT e DLH, o estudo também mostrou a capacidade do peptídeo de reduzir a viabilidade sem apresentar indícios de dano mecânico a membrana.

Apesar da perda de viabilidade observada, nota-se que em 72 horas, conforme a concentração aumenta, ocorre uma perda parcial na capacidade da DRS-01 em influenciar na viabilidade celular dos monócitos. Isso pode ter ocorrido pela perda de eficácia do peptídeo ou pela adaptação dos monócitos em regular a apoptose nas concentrações mais altas, porém estudos diretos são necessários para investigar essas hipóteses.

6.2. Ciclo parasitário e citotoxicidade provocada pelas hemácias parasitadas e não parasitadas

Ao longo dos períodos propostos neste trabalho, houve uma perda gradual na viabilidade dos monócitos incubados somente com hemácias não parasitadas. Acreditamos que isso ocorra porque, ao longo do tempo, o contato com as células THP1 possibilita a fagocitose de hemácias saudáveis e envelhecidas presentes na cultura. Ainda, ressaltamos que utilizamos em nossas culturas meio suplementado com pool de soro humano, o que pode ter favorecido a opsonização e fagocitose das hemácias (MEINDERTS et al., 2017). Assim, a fagocitose das hemácias pode provocar a ativação celular que altera o balanço energético, aumenta a necessidade nutricional e regulação da resposta imune; e no meio, as condições de suplementação são finitas. De fato, diariamente, hemácias envelhecidas são fagocitadas via CD47-SIRP α por monócitos, o que ativa o inflamassoma como resposta; em contrapartida, ocorre aumento de autofagia (LI et al., 2022) que pode levar os monócitos à morte. Esse tipo de morte pode responder pela perda de viabilidade no ensaio do MTT sem liberação evidente de conteúdo intracelular para o meio, como demonstrado pelo DLH.

Soma-se ao entendimento acima, o fato de que as hemácias podem ter se rompido naturalmente ao longo do tempo, explicando em parte o resultado do DLH que evidenciou a liberação desta enzima no grupo estimulado com hemácias normais após 72 horas quando comparado com o

período de 24 horas. Sabe-se que as isoenzimas lactato desidrogenase (DLH) do tipo 1 e do tipo 2 estão amplamente distribuídas no citoplasma das hemácias (MENDES et al., 2019) que quando rompidas pode ser detectada pela dosagem de DLH no meio.

Uma vez rompida, a hemácia também pode liberar produtos que são reconhecidos pelos monócitos como um padrão molecular de dano. É o caso da hemoglobina, que quando livre, forma um complexo com a haptoglobina, capaz de ser reconhecido através do receptor CD163 de monócitos, promovendo sua endocitose. Após da endocitose, o complexo hemoglobina-haptoglobina é degradada nos lisossomos liberando moléculas de heme, que então são degradadas pela heme oxigenase-1 (HO-1), que resulta na liberação de ferro, biliverdina e monóxido de carbono (DE OLIVEIRA; DENADAI; COSTA, 2022; NIMZ et al., 2023).

Embora esse processo seja necessário para a homeostase, a heme possui potencial de perturbar processos celulares, tornando-a citotóxica sobre certas condições, particularmente quando não é devidamente regulada, sendo capaz de causar danos ao DNA, peroxidação lipídica e desnaturação de proteínas (WIJAYANTI; KATZ; IMMENSCHUH, 2004).

Por sua vez, quando as hemácias parasitadas foram utilizadas no estudo, houve uma diminuição acentuada na viabilidade do MTT e aumento na liberação de DHL somente nas 72hrs. Provavelmente, isso possa ser explicado pelo ciclo do plasmódio dentro da hemácia, visto que alguns relatos mostram que o parasito é capaz de prevenir a hemólise precoce através do consumo da hemoglobina, reduzindo assim a pressão coloidosmótica dentro das hemácias parasitadas (MAURITZ et al., 2009).

Esse fato pode responder pelo não rompimento das hemácias parasitadas nas 48h, o que refletiu na melhor viabilidade dos monócitos. Já após este período, o rompimento das hemácias após a esquizogonia, libera, além do conteúdo intracelular, os antígenos parasitários o que pode ter impactado na viabilidade dos monócitos pela alta demanda energética e ativação.

6.3. DRS-01 melhora a viabilidade de monócitos estimulados por hemácias parasitadas

De maneira geral, o tratamento com DRS-01 reverteu a perda de viabilidade das células THP1 que estavam em contato com as hemácias normais nos períodos de 24 e 48 horas praticamente em todas as concentrações, chegando próximos aos basais nas concentrações mais altas.

A DRS-01 é um peptídeo recém-descoberto, pouco ainda se conhece das suas interações celulares, contudo é possível que a melhora da viabilidade das células estimuladas com hemácias normais seja reflexo de uma ação direta em vias celulares na THP1 e/ou porque o peptídeo intergiu com a hemácia mascarando moléculas de superfície utilizadas para reconhecimento do fagócito. De fato, Brand et al. (2002) demonstram que a DRS-01 tem capacidade de interagir com a bicamada da membrana eritrocitária, de uma maneira sem provocar danos. Esse efeito também foi observado com outras DRS, como descrito por Ghosh et al. (1997) utilizando DRS-S3. Por outro lado, é possível que esta interação do peptídeo com as hemácias, o indisponibilize para interagir com os monócitos.

Já com o grupo de células em contato com as hemácias parasitadas esse efeito só ocorreu após 72 horas de forma marcante com praticamente todas as concentrações, porém, a viabilidade não chegou próxima aos valores basais.

Segundo Salay et al. (2011), a ação da DRS-01 ocorre pela sua afinidade por membranas negativamente carregadas, como a membrana da *Leishmania*. De forma semelhante, o mesmo pode ser presumido para o plasmódio, que apresenta carga negativa em grande parte da sua superfície, com exceção do complexo apical, importantes na orientação e invasão das hemácias (AKAKI et al., 2002). Portanto, sendo possível esta interação, a DRS-01 poderia reduzir a quantidade de parasitas presentes, aliviando o impacto sobre as células imunes e, assim, favorecendo sua viabilidade.

Estudos prévios corroboram essa ideia; Ghosh et al. (1997) demonstraram que a DRS-S4 e DRS-S3 foram capazes de interagir diretamente com a membrana do *P. falciparum*, embora a DRS-S4 tenha apresentado citotoxicidade para hemácias saudáveis. Já a DRS-S3 ficou retida na membrana plasmática das hemácias saudáveis sem provocar sua ruptura. Além disso, ambas DRS foram capazes de inibir a incorporação da hipoxantina pelo parasito, sendo ela um importante componente para o metabolismo energético do plasmódio (GHOSH et al., 1997).

Um resultado semelhante foi observado por Krugliak et al. (2000) e Dagan et al. (2002), que testaram derivados de DRS-S4 capazes de lisar seletivamente as hemácias infectadas. Proaño-Bolaños (2024) também observou o efeito antiplasmodial da dermaseptina-SP2 em cepas de plasmódio resistentes ou não a múltiplas drogas.

Ainda, é reconhecido que as dermaseptinas e seus análogos apresentam atividade lítica *in vitro*, possuindo ação contra uma ampla gama de microrganismos de vida livre (NICOLAS; AMICHE, 2006). Brand et al. (2002) demonstrou a atividade tripanocida da DRS-01 utilizando formas sanguíneas de *T. cruzi*, incubados durante 2 horas, sendo a população de células reduzida a um nível indetectável, sem provocar alteração na população de células sanguíneas. Já Oliveira (2015) observou que o peptídeo foi capaz de destruir formas amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* a partir de baixas concentrações e de maneira dose-dependente. Em seus resultados, o peptídeo mostrou capacidade microbicida sem provocar a morte celular de macrófagos infectados. Zampa et al. (2009) também observou que a DRS-01 inibiu o crescimento do parasita *L. chagasi* e Hernandez et al. (1992) verificou a ausência de crescimento da *L. mexicana* incubada com meio de cultura por 3 dias após o tratamento com DRS. Diante desses achados, fica evidente que a DRS-01 e outros análogos apresentam um potencial microbicida significativo, atuando sobre uma vasta gama de protozoários.

6.4. DRS-01 é capaz de alterar a produção de ERO e ERN em monócitos estimulados ou não por *P. falciparum*

Como discutido anteriormente, é possível que o tratamento com DRS-01 tenha atuado nas vias intracelulares das células THP1. Um dos principais mecanismos de reposta de monócitos é sua capacidade microbicida que neste contexto produz espécies reativas para auxiliar nos mecanismos de degradação de antígenos via fagocitose.

De fato, observamos que a DRS-01 é capaz de promover aumento de ERN no interior das células tratadas nas concentrações de 0,5 e 1 µL/mL de DRS-01. De modo semelhante, a produção dessas espécies é aumentada na presença de hemácias parasitadas ou não, sendo que esse aumento não é afetado pelo tratamento com DRS-01. Assim como no estudo de Oliveira (2015), onde a produção de NO foi avaliada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, infectados ou não com *L. amazonensis* e incubados por 24 horas, com ou sem DRS-01, e concluiu que há uma maior produção desses radicais em concentrações maiores que 4 µg/mL, tanto em macrófagos peritoneais infectados e não infectados. Porém, nosso achado descreve pela primeira vez o efeito estimulado da DRS-01, utilizando a quantificação intracelular, em monócitos THP1 e em concentrações mais baixas.

Em contrapartida, no nosso estudo quando o tratamento foi adicionado ao grupo de hemácias normais e ao grupo de hemácias parasitadas a produção de ERN intracelulare não aumenta.

É importante mencionar que entre as espécies reativas de nitrogênio, encontra-se o óxido nítrico (NO). Nas células, essa espécie reativa é sintetizada principalmente a partir da L-argina e catalisada por três enzimas diferentes, óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Ainda, o NO é sintetizado no citoplasma celular e se difunde

rapidamente através da membrana, podendo apresentar diversos efeitos citotóxicos. Como exemplo, são capazes de interagir rapidamente com outros radicais, como o O_2^- gerando uma alta quantidade de peroxinitrito ($ONOO^-$), no qual é capaz de danificar proteínas, DNA, provocar disfunção mitocondrial e conseqüentemente a morte celular (PREDONZANI et al., 2015).

Na malária, a produção excessiva de NO apresenta um papel importante na imunopatologia da doença, no entanto, sua significância clínica ainda é alvo de muito debate (NAHREVANIAN, 2006). Se por um lado, a produção excessiva de NO pode levar à inflamação sistêmica e disfunção celular, potencialmente exacerbando a gravidade da doença (NAHREVANIAN, 2006; DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019), a ausência desse radical em modelos murinos tem sido associada à inflamação exacerbada, dano hepático e aumento da mortalidade (OLIVEIRA-LIMA et al., 2013; TRIPATHY; ROY, 2015; BARBOSA et al., 2021).

Isso pode ocorrer, pois em condições de hemólise, as células fagocíticas enfrentam grandes desafios ao encontrarem níveis elevados de hemoglobina ou heme livre. A endocitose dessas moléculas resulta no acúmulo de hemoglobina e heme dentro dos fagócitos, ativando a heme oxigenase-1 (HO-1), o que aumenta a produção de monóxido de carbono (CO). O CO, bem como o NO, possuem efeitos antiinflamatórios e citoprotetores potentes, capazes de atuar como inibidores reversíveis da respiração mitocondrial, competindo com o O_2 pela ligação à fração heme da enzima citocromo c oxidase (COX). Isso produz um feedback negativo na produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS), o que inibe a reação de Fenton mediada pela NADPH oxidase (NOX), diminuindo a formação de radicais de oxigênio (SCHAER et al., 2006; DUTRA; BOZZA, 2014; MÜLLEBNER et al., 2018).

De fato, observamos que a produção de EROs pelas THP1 não é afetada pelo tratamento com a DRS-01. Porém, o peptídeo apresenta uma ação imunomoduladora na presença das hemácias, aumentando a produção de EROs na concentração mais alta no grupo de hemácias normais, e diminuindo a mesma produção em ambas as concentrações na infecção pelo

plasmódio, que reconhecidamente aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio. Provavelmente isso inclusive responda pela melhora de viabilidade no grupo de hemácias normais e no grupo com hemácias parasitadas.

O aumento observado na produção de espécie reativas de oxigênio no grupo incubado com hemácias já era esperado, pois, já está bem estabelecido que a infecção pelo plasmódio leva ao acúmulo de hemozoína no interior dos fagócitos e aumenta a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, além de promover a migração de leucócitos, sendo a geração de radicais hidroxila ($\text{OH}\bullet$), uma ERO, apontada como principal razão pelo estresse oxidativo e ativação da caspase-9, levando a apoptose (DEY et al., 2009; TRIPATHY; ROY, 2015; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

A produção de EROS aumentada pode inclusive responder pela perda de viabilidade no grupo de célula estimuladas com a hemácias parasitadas, isso porque o “burst” oxidativo em condições patológicas provoca a peroxidação lipídica, apontada principal mecanismos de dano a membrana biológicas (WEIDINGER; KOZLOV, 2015). Esse mecanismo foi demonstrado por Nielsen e Theander (1989), que observou um aumento significativo desse mecanismo em monócitos de casos não tratados de malária por *P. falciparum*.

De forma interessante, na presença de DRS-01 há uma redução na produção de ERO. Uma possível explicação para esse achado seria a capacidade da dermaseptina interagir com a proteína C quinase (PKC), uma enzima importante na formação de superóxido em fagócitos através da ativação da NOX (AMMAR et al., 1998). A interferência nesta via poderia diminuir o “burst” oxidativo dos monócitos e conferir uma viabilidade melhor frente a infecção por plasmódio.

6.5. A DRS-01 interfere na produção de algumas citocinas inflamatórias, mas não é capaz de modificar a resposta de monócitos estimulados com hemácias

Outra característica da resposta imune contra os plasmódios é a produção de citocinas inflamatórias em resposta à parasitemia, principalmente por monócitos que reconhecem os antígenos plasmodiais. Na malária grave, o excesso de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e uma resposta Th1 desregulada (IFN- γ , IL-12, IL-18) podem causar inflamação intensa e danos aos tecidos. A IL-10, apesar de seu papel anti-inflamatório, nem sempre consegue controlar essa resposta. Além disso, quimiocinas como IL-8 e CCL2 atraem células imunes. A inflamação excessiva está associada à gravidade e à morte, particularmente quando a proporção de citocinas pró-inflamatórias é maior do que as citocinas reguladoras, como TGF- β e IL-10 (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019; OBEAGU, 2024)

No entanto, no nosso trabalho não observamos a produção das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 por monócitos após 24 horas de estimulação com hemácias parasitadas. É válido ressaltar que as hemácias parasitadas foram inseridas contendo trofozoítos, portanto, somente após 24 horas, estavam se formando os primeiros esquizontes (SIMPSON et al., 2002; VENUGOPAL et al., 2020). É justamente na fase trofozoítica do ciclo parasitário que a proteína de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum* (PfEMP1) é transportada para a superfície hemácia (MCMILLAN et al., 2013; VENUGOPAL et al., 2020). De acordo com Sampaio et al. (2017) a presença da PfEMP1 impacta na produção de citocinas. No estudo deste grupo, os macrófagos murinos tratados com parasitas que expressam a PfEMP1 liberaram menos TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 após 12 horas em comparação com macrófagos expostos a parasitas onde o PfEMP1 não foi expresso na superfície, indicando que essa molécula apresenta características imunomoduladora e tem função importante na evasão imunológica.

Esses resultados foram corroborados por Romero et al. (2024), que concluíram que a produção de IL-6 e TNF era mais robusta quando os monócitos humanos eram expostos a hemácias infectadas lisadas do que hemácias infectadas por *P. falciparum* vivas após 24 horas, possivelmente pela interação do PfEMP1. Desta forma, consideramos que seria importante dosar as citocinas no período referente a 72 horas de exposição com hemácias parasitadas, em que muitas merozoítos já teriam sido liberados no meio de cultura.

Outro ponto importante de ser destacado, é que a síntese e regulação das citocinas na malária podem variar dependendo do tipo de estímulo, da célula envolvida e do seu estado de ativação. A expressão dos genes que produzem as citocinas também é controlada por fatores epigenéticos e passa por regulação pós-transcricional, mediada pelo mRNA (MAHANTA et al., 2018; SEGBEFIA et al., 2024). Esses mecanismos são fundamentais para a adaptação do parasita ao ambiente do hospedeiro.

Por outro lado, o maior estímulo para que os monócitos produzam citocinas como o TNF, IL1 β , IL-6, IL-8 e IL-12 é a presença do interferon gamma produzido pelos linfócitos CD4 Th1, células CD8 e NKs (SCHOENBORN; WILSON, 2007) que não estavam presentes na nossa cultura. Por isso, é bem possível que mesmo existindo o primeiro sinal de ativação dos monócitos, representados pelos antígenos, o segundo sinal necessário a produção de citocinas, que é mediado pelo INF- γ , não estava presente. Isso é diferente para as espécies reativas que são produzidas em resposta à ativação mediada por receptores de PAMPs durante o mecanismo de fagocitose (CRUVINEL et al., 2010).

Quando tratamos as células estimuladas com as hemácias parasitadas com a DRS-01, o padrão de produção de citocinas frente ao grupo somente estimulado com as hemácias parasitadas não modificou; embora, o tratamento sozinho ser capaz de reduzir os níveis de IL-6 e IL-12 e aumentar os níveis de IL-8. Esta resposta sugere que a DRS-01 tenha impacto na supressão da resposta Th1 estimulada por monócitos. Nesta resposta, a IL-12 é necessária para polarizar o perfil Th1 e a IL-6 é uma importante citocina

pró-inflamatória durante a resposta de fase aguda (OPAL; DEPALO, 2000). Por outro lado, a produção de IL-8, principal quimiocinas para neutrófilos, pode ser produzida, mesmo sem a presença de citocina como o TNF e IL1- β (KOTEPUI et al., 2023). Em conjunto, os dados sugerem que a DRS-01 poderia regular a resposta intravascular hiperinflamatória nos estados graves da malária, melhorando a resposta de neutrófilos.

6.6. A DRS-01 pouco afeta a ativação da via NF- κ B em monócitos estimulados por hemácias parasitadas

Tanto a produção de citocinas, quanto a produção de enzimas envolvidas na produção de espécie reativas de oxigênio e nitrogênio são reguladas pela via do NF- κ B. A via de sinalização NF- κ B pode ser ativada por meio de duas vias principais: canônica e não canônica. A via canônica, também conhecida como clássica, resulta na ativação do RelA, que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de sobrevivência. Já a via não canônica resulta na ativação dos dímero RelB/p52, levando a respostas tipicamente lentas e sustentadas, associada à resposta imune adaptativa e também à mecanismos proliferativos (MSWELI; PAKALA; SYED, 2024).

Com base nos resultados, nenhuma molécula do NF- κ B foi significativamente ativada, exceto por um leve aumento de RelA no grupo de hemácias parasitadas tratadas com 1 μ L/mL de DRS-01 em comparação com as não tratadas após 24 horas. É possível que essa pouca expressão se relacione com a produção de IL-8 e aumento de ERNS, já que a produção da citocina, bem como, da enzima NOS é controlada pela via canônica do NF- κ B. No entanto, é necessário averiguar se após 48 e 72 horas, como discutido anteriormente, se a produção em função do aumento de merozoítos liberados não afetaria a expressão de RelA e RelB.

Na malária, o NF- κ B é um regulador central da resposta imune e influencia tanto a defesa do hospedeiro, quanto a patogênese. Na malária

cerebral, a ativação do RelA foi observada *in vitro* em células endoteliais microvasculares do cérebro humano em cultura, como também demonstrado *in vivo* em camundongos susceptíveis à malária cerebral (BORGES, 2013; BAŞKA; NORBURY, 2022). Além disso, em monócitos humanos, a ativação e translocação do RelA levam ao aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β . Por outro lado, para a produção de mediadores inflamatórios como é o caso das citocinas supracitadas, existe a necessidade da proteína RelA se dimerizar com o p50 (LIU et al., 2017) ou outra proteína da família. Neste estudo, este promotor não foi avaliado. Portanto, embora tenha ocorrido leve aumento na expressão de RelA, outros promotores do NF-kB podem não ter sido impactados (BAŞKA; NORBURY, 2022).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A corrida mundial para encontrar compostos igualmente eficazes para o tratamento da malária é um tópico fundamental que contribui com os avanços na eliminação da doença no mundo. No Brasil, bem como em grande parte do mundo, o diagnóstico e tratamento são utilizados como as principais estratégias de controle da doença, tornando a resistência aos medicamentos antimaláricos uma séria ameaça à saúde pública.

Compostos com atividade antimicrobianas são apontados como alvos terapêuticos. Atualmente, os medicamentos utilizados são aqueles com capacidade de interferir no metabolismo ou agir diretamente na integridade da membrana do protozoário. Neste estudo, focou-se em entender o efeito do tratamento da DRS-01 sobre monócitos quando estimulados ou não por hemácias parasitadas por *P. falciparum*.

A partir de nossos resultados, constatamos que a DRS-01 por si só causa citotoxicidade nos monócitos sem promover ruptura celular, mas que na presença de hemácias, independente da presença de parasito, o tratamento foi capaz de melhorar essa condição. O tratamento da DRS-01 também previniu hemólise em concentrações acima de 0,5 $\mu\text{L/mL}$. Em função destes resultados, observamos que as maiores doses (0,5, 1 e 2 $\mu\text{L/mL}$) apresentaram melhores resultados, e por isso, averiguamos a capacidade antioxidativa e perfil de inflamatório das concentrações de 0,5 e 1 $\mu\text{L/mL}$ de DRS-01.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que o tratamento após 24 horas promoveu o aumento de ERN nos monócitos, semelhante ao observado na presença de hemácias, independentemente de estarem parasitadas ou não, sendo que o tratamento com DRS-01 não modificou esse aumento. Por outro lado, apesar da ausência na produção de ERO pelos monócitos incubados apenas com DRS-01, a concentração de 1 $\mu\text{L/mL}$ foi capaz de aumentar a produção desse radical na presença de hemácias não parasitadas. Além disso, as duas concentrações do peptídeo demonstraram capacidade de modular a produção de ERO pelos monócitos expostos às hemácias parasitadas, indicando uma possível interferência no estresse oxidativo associado à resposta inflamatória na malária.

Já em relação às citocinas, o efeito do tratamento após 24 horas foi observado somente na presença exclusiva da DRS-01, causando a redução dos níveis de IL-6 e IL-12 e aumentando os níveis de IL-8. Essa resposta sugere que a DRS-01 pode ter um efeito de supressão da resposta Th1 mediada por monócitos. As citocinas TNF, IL-10 e IL-1 β não tiveram alteração. Ainda, só observamos ativação de RelA no tratamento de 1 μ L/mL de DRS-01 após 24 horas nos monócitos estimulados com hemácias parasitadas.

Concluimos, portanto, que a DRS-01 apresenta a capacidade de interferir no “burst” oxidativo e conferir uma viabilidade melhor frente a infecção por plasmódio, além de que sua atividade na membrana plasmática das hemácias poderia aliviar seu impacto sobre as células imunes. No entanto, apresenta citotoxicidade quando incubada exclusivamente com os monócitos. Portanto, sugere-se que novos estudos que avaliem qual a interferência da DRS-01 em vias de morte celular, para melhor entender o mecanismo de citotoxicidade.

Ainda, entendemos que a DRS-01 possui efeito modulador na produção de espécies reativas e da produção de citocinas do ramo de resposta inflamatória de linfócitos T, o que poderá melhorar a resposta inflamatória exacerbada na malária. Contudo, sugerimos que esse efeito seja avaliado após 48 horas e 72 horas, inserindo também no estudo a dosagem de outras proteínas do NF-kB como a p50, p52 e cRel.

Os achados apresentados são inéditos e indicam que a DRS-01 possui características favoráveis para aplicação em uma futura terapia antimalárica. Sua aplicação torna-se ainda mais atrativa devido a sua aplicabilidade em diversos microrganismos, com atividade lítica contra agentes do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, além de apresentar potente atividade antibacteriana, podendo ser considerada um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças negligenciadas.

REFERÊNCIAS

1. ALENCAR, F. H.; FERRARONI, J. J.; SHRIMPTON, R. Resistência do *Plasmodium falciparum* ao fansidar, quinina e tetraciclina. *Revista de Saúde Pública*, v. 16, n. 5, out. 1982. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsp/a/YP6prcmscqYCN7jfnRDmZ7L/>>.
2. ALVES, F. P. et al. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 66, n. 6, p. 641–648, jun. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12224567/>>.
3. AMICHE, M.; GALANTH, C. Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 12, n. 8, p. 1184–1193, jun. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21470155/>>.
4. AMMAR, B. et al. Dermaseptin, a Peptide Antibiotic, Stimulates Microbicidal Activities of Polymorphonuclear Leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 247, n. 3, p. 870–875, jun. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9647785/>>.
5. ANDOLINA, C. et al. *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in longitudinally monitored incident infections is associated with duration of infection and human host factors. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 1–16, maio 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-023-33657-3>>.
6. ANDRADE, C. M. et al. Increased circulation time of *Plasmodium falciparum* underlies persistent asymptomatic infection in the dry season. *Nature Medicine* 2020 26:12, v. 26, n. 12, p. 1929–1940, out. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-020-1084-0>>.
7. ANTONY, H. A.; PARIJA, S. C. Antimalarial drug resistance: An overview. *Tropical Parasitology*, v. 6, n. 1, p. 30–41, jun. 2016. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4778180/>>.
8. BARBOSA, A. da S. et al. Inhibition of nitric oxide synthesis promotes increased mortality despite the reduction of parasitemia in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 1, jan. 2021. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11805>>.
9. BARTELS, E. J. H.; DEKKER, D.; AMICHE, M. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: A review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future directions. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, n. 1421, nov. 2019. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6901996/>>.

10. BAŞKA, P.; NORBURY, L. J. The Role of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in the Immune Response against parasites. *Pathogens*, v. 11, n. 3, mar. 2022. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8950322/>>.
11. BASTOS, A. da S. et al. Evaluation of insemination, blood feeding, and Plasmodium vivax infection effects on locomotor activity patterns of the malaria vector Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, v. 123, n. 1, dez. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38060049/>>.
12. BEESON, J. G.; BROWN, G. V. Pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria: The roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, n. 2, fev. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11915943/>>.
13. BLANKEN, S. L. et al. Plasmodium falciparum gametocyte production correlates with genetic markers of parasite replication but is not influenced by experimental exposure to mosquito biting. *eBioMedicine*, v. 105, n. 105190, jul. 2024. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11239461/>>.
14. BORGES, T. K. S. *Mecanismos de resposta inflamatória em modelos murinos de Plasmodium berghei ANKA, suscetível ou não à malária cerebral. Tese (Doutorado em Patologia Molecular)—Universidade de Brasília*, 2013. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/15217>>.
15. BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from Phyllomedusa oreades and Phyllomedusa distincta. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 51, dez. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12379643/>>.
16. BRASIL. *Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária*. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde., 2005.
17. BRASIL. *Elimina Malária Brasil: Plano Nacional de Eliminação da Malária*. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.
18. CANO, C.; SORAYA, B. *Péptidos antimicrobianos y su efecto en el desarrollo de formas parasitarias de leishmania* Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidad Nacional de Colombia, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/9673>>.
19. CAO, H.; VICKERS, M. A. Oxidative stress, malaria, sickle cell disease, and innate immunity. *Trends in Immunology*, v. 42, n. 10, out. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34503910/>>.
20. CARDOSO, M. de S. et al. Antiviral activity of dermaseptin 01 against Dengue virus type 2, Herpes simplex virus type 1 and Vaccinia virus.

SciMedicine Journal, v. 1, n. 23, mar. 2013. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/view/12751/9040>>.

21. CORONADO, L. M.; NADOVICH, C. T.; SPADAFORA, C. Malarial hemozoin: From target to tool. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1840, n. 6, jun. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24556123/>>.

22. COUTO, S. C. P. *Efeito da pentoxifilina nas vias canônica e não canônica do NF-kB determinantes de resposta inflamatória em modelos suscetíveis ou não à malária cerebral*. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) — Universidade de Brasília, 2021. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/43388>>.

23. CRUVINEL, W. de M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, ago. 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbr/a/QdW9KFBP3XsLvCYRJ8Q7SRb/>>.

24. DAGAN, A. et al. In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 4, p. 1059–1066, 2002. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.46.4.1059-1066.2002>>.

25. DE OLIVEIRA, J.; DENADAI, M. B.; COSTA, D. L. Crosstalk between Heme Oxygenase-1 and Iron Metabolism in Macrophages: Implications for the Modulation of Inflammation and Immunity. *Antioxidants*, v. 11, n. 5, abr. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35624725/>>.

26. DEY, S. et al. Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 46, n. 2, p. 271–281, jan. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19015023/>>.

27. DOBBS, K. R.; CRABTREE, J. N.; DENT, A. E. Innate immunity to malaria-The role of monocytes. *Immunological reviews*, v. 293, n. 1, p. 8–24, jan. 2019. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6986449/>>.

28. DUTRA, F. F.; BOZZA, M. T. Heme on innate immunity and inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5, maio 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24904418/>>.

29. DZIKOWSKI, R.; TEMPLETON, T. J.; DEITSCH, K. Variant antigen gene expression in malaria. *Cellular Microbiology*, v. 8, n. 9, jul. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16848786/>>.

30. FERREIRA, N. S. et al. Plasmodium vivax infection alters the peripheral immunoregulatory network of CD4 T follicular cells and B cells. *European Journal of Immunology*, v. 53, n. 8, ago. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37160134/>>.
31. FORNACE, K. M. et al. Zoonotic malaria requires new policy approaches to malaria elimination. *Nature Communications*, v. 14, n. 5750, 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-023-41546-6#citeas>>.
32. FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G. dos; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1271–1278, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/SMXmZdpmMxXsGQpztSCpTS/>>.
33. FRASER, M.; MATUSCHEWSKI, K.; MAIER, A. G. Of membranes and malaria: phospholipid asymmetry in Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 78, n. 10, p. 4545–4561, 2021. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11071739/>>.
34. GHOSH, J. K. et al. Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic Plasmodium falciparum and the underlying molecular basis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 50, p. 31609–31616, dez. 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9395500/>>.
35. GHOSH, K.; GHOSH, K. Pathogenesis of anemia in malaria: a concise review. *Parasitology Research*, v. 101, n. 6, p. 1463–1469, nov. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17874326/>>.
36. GOMES, A. P. et al. Malária grave por Plasmodium falciparum. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 23, n. 3, p. 358–369, set. 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbti/a/fF8CRKZ9TBX6X8MD4WvVTqS/>>.
37. GOZALO, A. S. et al. Overview of Plasmodium spp. and Animal Models in Malaria Research. *Comparative medicine*, v. 74, n. 4, ago. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38902006/>>.
38. HERNANDEZ, C. et al. Functional and structural damage in Leishmania mexicana exposed to the cationic peptide dermaseptin. *European Journal of Cell Biology*, v. 59, n. 2, dez. 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1493807/>>.
39. JABBARZARE, M. et al. Innate immune responses to malaria-infected erythrocytes in pregnant women: Effects of gravidity, malaria infection, and geographic location. *PLoS ONE*, v. 15, n. 7, jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32726331/>>.

40. KALANTARI, P. The Emerging Role of Pattern Recognition Receptors in the Pathogenesis of Malaria. *Vaccines*, v. 6, n. 1, fev. 2018. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5874654/>>.
41. KOTEPUI, K. U. et al. Association between Plasmodium Infection and Nitric Oxide Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antioxidants*, v. 12, n. 10, out. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/12/10/1868>>.
42. KRUGLIAK, M. et al. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 9, p. 2442–2451, set. 2000. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC90083/>>.
43. KÜSTER, N. et al. A systematic targeted genetic screen identifies proteins involved in cytoadherence of the malaria parasite *P. falciparum*. *Molecular Microbiology*, p. 1–14, jan. 2025. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.15337>>.
44. LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology*, v. 65, n. 3, jun. 1979. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/383936/>>.
45. LI, Q. et al. NLRP3 Inflammasome Simultaneously Involved in Autophagy and Phagocytosis of THP-1 Cells to Clear Aged Erythrocytes. *Journal of Immunology Research*, set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36213328/>>.
46. LIU, T. et al. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 2, n. 17023, jul. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/sigtrans201723>>.
47. LONG, Q. et al. Novel peptide dermaseptin-PS1 exhibits anticancer activity via induction of intrinsic apoptosis signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 23, n. 2, p. 1300–1312, fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30461197/>>.
48. LORIN, C. et al. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology*, v. 334, n. 2, p. 264–275, abr. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15780876/>>.
49. MAGNO, J. A.; MIGUITA, K.; OSHIRO, M. Métodos alternativos para avaliar a concentração de Hemoglobina livre no plasma. *Boletim do Instituto Adolfo Lutz.*, n. 27, p. 1–3, 2017. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1048869>>.

50. MAHANTA, A. et al. Integrative Approaches to Understand the Mastery in Manipulation of Host Cytokine Networks by Protozoan Parasites with Emphasis on Plasmodium and Leishmania Species. *Frontiers in Immunology*, v. 9, fev. 2018. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5829655/>>.
51. MAHITTIKORN, A. et al. Increased interferon- γ levels and risk of severe malaria: a meta-analysis. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, nov. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36344583/>>.
52. MATZ, J. M. et al. A lipocalin mediates unidirectional heme biomineralization in malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 28, p. 16546–16556, jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32601225/>>.
53. MAURITZ, J. M. A. et al. The Homeostasis of Plasmodium falciparum-Infected Red Blood Cells. *PLoS Computational Biology*, v. 5, n. 4, abr. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19343220/>>.
54. MCMILLAN, P. J. et al. Spatial and temporal mapping of the PfEMP1 export pathway in Plasmodium falciparum. *Cellular microbiology*, v. 15, n. 8, p. 1401–1418, ago. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23421990/>>.
55. MCQUAID, F.; ROWE, J. A. Rosetting revisited: a critical look at the evidence for host erythrocyte receptors in Plasmodium falciparum rosetting. *Parasitology*, v. 147, n. 1, p. 1, jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31455446/>>.
56. MEINDERTS, S. M. et al. Human and murine splenic neutrophils are potent phagocytes of IgG-opsonized red blood cells. *Blood Advances*, v. 1, n. 14, p. 875–886, maio 2017. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5737592/>>.
57. MENDES, M. T. D. M. et al. Marcadores de hemólise em concentrado de hemácias administrados por cateter central de inserção periférica não valvulado*. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 32, n. 2, p. 139–146, 2019. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ape/a/bVcLTpHMFZSFd55p8gCYnzG/abstract/?lang=pt>>.
58. MER, M. et al. Severe malaria. Current concepts and practical overview: What every intensivist should know. *Intensive Care Medicine*, v. 46, n. 5, p. 907–918, abr. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32347322/>>.

59. MOLINA-FRANKY, J. et al. The Cellular and Molecular Interaction Between Erythrocytes and Plasmodium falciparum Merozoite. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35433504/>>.
60. MOR, A. et al. Isolation, Amino Acid Sequence, and Synthesis of Dermaseptin, a Novel Antimicrobial Peptide of Amphibian Skin. *Biochemistry*, v. 30, n. 36, p. 8824–8830, set. 1991. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1909573/>>.
61. MSWELI, S.; PAKALA, S. B.; SYED, K. NF- κ B Transcription Factors: Their Distribution, Family Expansion, Structural Conservation, and Evolution in Animals. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 18, set. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39337282/>>.
62. MÜLLEBNER, A. et al. Interaction between Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Heme Oxygenase, and Nitric Oxide Synthase Stimulates Phagocytosis in Macrophages. *Frontiers in Medicine*, v. 4, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29404326/>>.
63. MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; TOSTA, C. E. Stages of in vitro phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by human monocytes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 2, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/qqMVmW6tC99NMrJHmPTkbZF/>>.
64. NAHRENDORF, W.; IVENS, A.; SPENCE, P. J. Inducible mechanisms of disease tolerance provide an alternative strategy of acquired immunity to malaria. *eLife*, v. 10, mar. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33752799/>>.
65. NAHREVANIAN, H. Immune effector mechanisms of the nitric oxide pathway in malaria: cytotoxicity versus cytoprotection. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 10, n. 4, p. 283–292, ago. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17293913/>>.
66. NICOLAS, P.; AMICHE, M. The Dermaseptins. *Handbook of Biologically Active Peptides*, n. 45, p. 295–304, out. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123694423500489>>.
67. NIELSEN, H.; THEANDER, T. G. Blood monocyte oxidative burst activity in acute P. falciparum malaria. *APMIS*, v. 97, n. 5, 1989.
68. NIMZ, J. G. et al. Recognition mechanisms of hemoglobin particles by monocytes - CD163 may just be one. *Beilstein journal of nanotechnology*, v.

14, p. 1028–1040, out. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37915310/>>.

69. OBEAGU, E. I. Role of cytokines in immunomodulation during malaria clearance. *Annals of Medicine and Surgery*, v. 86, n. 5, p. 2873–2882, abr. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38694310/>>.

70. OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 1, n. 4, out. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20066092/>>.

71. OLIVEIRA, M. G. C. de. *Estudo do efeito leishmanicida da dermaseptina-01, um peptídeo antimicrobiano de Phyllomedusa azurea*. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)—Universidade de Brasília, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/handle/10482/18605>>.

72. OLIVEIRA-LIMA, O. C. et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase develop exacerbated hepatic inflammatory responses induced by Plasmodium berghei NK65 infection. *Microbes and Infection*, v. 15, n. 13, p. 903–910, nov. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23988520/>>.

73. OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, v. 117, n. 4, p. 1162–1172, abr. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10767254/>>.

74. POHL, K.; COCKBURN, I. A. Innate immunity to malaria: The good, the bad and the unknown. *Frontiers in Immunology*, v. 13, ago. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36059493/>>.

75. PREDONZANI, A. et al. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. *World Journal of Experimental Medicine*, v. 5, n. 2, p. 64–76, maio 2015. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4436941/>>.

76. PROAÑO-BOLAÑOS, C. et al. Bioactivity of synthetic peptides from Ecuadorian frog skin secretions against Leishmania mexicana, Plasmodium falciparum, and Trypanosoma cruzi. *Microbiology Spectrum*, v. 12, jun. 2024. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.03339-23>>.

77. REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27646922/>>.

78. ROMERO, D. V. L. et al. Epigenetic and transcriptional regulation of cytokine production by Plasmodium falciparum-exposed monocytes. *Scientific*

Reports, v. 14, n. 1, fev. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38316918/>>.

79. SÁ, I. M. de. A resistência à cloroquina e a busca de antimalaríais entre as décadas de 1960 e 1980. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 18, n. 2, jun. 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/hcsm/a/T4RxPCyCvpZSsSnQC5zzfgG/>>.

80. SAMPAIO, N. G.; ERIKSSON, E. M.; SCHOFIELD, L. Plasmodium falciparum PfEMP1 modulates monocyte/macrophage transcription factor activation and cytokine and chemokine responses. *Infection and Immunity*, v. 86, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29038124/>>.

81. SCHAER, C. A. et al. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circulation Research*, v. 99, n. 9, p. 943–950, out. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17008602/>>.

82. SCHÄFER, T. M. et al. The problem of antimalarial resistance and its implications for drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, v. 19, n. 2, p. 209–224, fev. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38108082/>>.

83. SCHEINER, M.; BURDA, P. C.; INGMUNDSON, A. Moving on: How malaria parasites exit the liver. *Molecular Microbiology*, v. 121, n. 3, p. 328–340, mar. 2024. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.15141>>.

84. SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*, v. 96, p. 41–101, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17981204/>>.

85. SEGBEFIA, S. P. et al. Cytokine gene polymorphisms implicated in the pathogenesis of Plasmodium falciparum infection outcome. *Frontiers in Immunology*, v. 15, fev. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38404582/>>.

86. SEKAR, P. et al. NK cell-induced damage to P.falciparum-infected erythrocytes requires ligand-specific recognition and releases parasitophorous vacuoles that are phagocytosed by monocytes in the presence of immune IgG. *PLOS Pathogens*, v. 19, n. 11, nov. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37939134/>>.

87. SIMPSON, J. A. et al. Population dynamics of untreated Plasmodium falciparum malaria within the adult human host during the expansion phase of

the infection. *Parasitology*, v. 124, n. 3, p. 247–263, mar. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11922427/>>.

88. SU, X. Z. et al. Malaria: Factors affecting disease severity, immune evasion mechanisms, and reversal of immune inhibition to enhance vaccine efficacy. *PLOS Pathogens*, v. 21, n. 1, jan. 2025. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39847577/>>.

89. TORRE, D. et al. Role of Th1 and Th2 Cytokines in Immune Response to Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 2, p. 348–351, mar. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11874876/>>.

90. TRIPATHY, S.; ROY, S. Redox sensing and signaling by malaria parasite in vertebrate host. *Journal of Basic Microbiology*, v. 55, n. 9, p. 1053–1063, set. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25740654/>>.

91. TSUCHIYA, S. et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, v. 26, n. 2, p. 171–176, ago. 1980. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6970727/>>.

92. VALENCIANO, A. L. et al. In vitro models for human malaria: targeting the liver stage. *Trends in Parasitology*, v. 38, n. 9, set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35780012/>>.

93. VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, v. 8, fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25884200/>>.

94. VASQUEZ, M.; ZUNIGA, M.; RODRIGUEZ, A. Oxidative Stress and Pathogenesis in Malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 768182, nov. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34917519/>>.

95. VENUGOPAL, K. et al. *Plasmodium* asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, n. 3, mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31919479/>>.

96. WANG, Z. X. et al. Role of inflammasomes in *Toxoplasma* and *Plasmodium* infections. *Parasites and Vectors*, v. 17, n. 1, nov. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39548522/>>.

97. WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*, v. 5, n. 2, p. 472–484, abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25884116/>>.
98. WHITE, N. J. Malaria parasite clearance. *Malaria Journal*, v. 16, n. 1, p. 14, fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28231817/>>.
99. WHO. *World malaria report 2024: addressing inequity in the global malaria response*. Geneva: WHO, 2024.
100. WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. *Current medicinal chemistry*, v. 11, n. 8, p. 981–986, abr. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15078160/>>.
101. WISER, M. F. Knobs, Adhesion, and Severe Falciparum Malaria. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 7, p. 353, jul. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37505649/>>.
102. YAHATA, K. et al. Gliding motility of Plasmodium merozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 118, n. 48, nov. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34819379/>>.
103. ZAMPA, M. F. et al. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. *Nanomedicine*, v. 5, n. 3, p. 352–358, set. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19215729/>>.
104. ZHENG, D. et al. Antimalarial Mechanisms and Resistance Status of Artemisinin and Its Derivatives. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 9, p. 223, set. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39330912/>>.
105. ZHOU, J. et al. Opsonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and enhances inflammatory cytokine secretion by human macrophages. *Malaria Journal*, n. 343, out. 2012. Disponível em: <<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-343>>.
106. ZHU, H. et al. Discovery of two skin-derived dermaseptins and design of a TAT-fusion analogue with broad-spectrum antimicrobial activity and low cytotoxicity on healthy cells. *PeerJ*, n. 9, set. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30258724/>>.
107. ZÚÑIGA, M. A.; RUBIO-PALIS, Y.; BROCHERO, H. Updating the bionomy and geographical distribution of Anopheles (Nyssorhynchus)

albitarsis F: A vector of malaria parasites in northern South America. *PloS one*, v. 16, n. 6, jun. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34138918/>>.

ANEXO 1

ARTIGO

Estudo do efeito da dermaseptina-01 sobre monócitos estimulados por hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* - Periódico pretendido para publicação: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

CIARLINI, A.C.L.¹, GONTIJO, A.C.G.C¹, RIBEIRO, M.S. de O.¹, COUTO, S.C.P¹, CARDOSO, M.², LEITE, J.R.S³, BORGES, T.K.S¹

¹ Laboratório de Imunologia Celular, Área de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, 70910900, Brasil.

² Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, NuPMIA, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília-DF, 70910-900, Brazil; iMed.ULisboa-Research Institute for Medicines, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisbon 1649-003, Portugal.

³ Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, Área de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, UnB, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, 70910900, Brazil

Correspondente: tatianakarla@unb.br; carollciarlini@gmail.com

RESUMO

Introdução: A malária causada pela espécie *Plasmodium falciparum* se destaca pela maior gravidade clínica. Diante da crescente resistência aos antimaláricos, é crucial explorar novos compostos terapêuticos. As dermaseptinas são peptídeos antimicrobianos capazes de romper a membrana celular, possuindo atividade tripanocida e leishmanicida descrita. Buscou-se avaliar os efeitos da dermaseptina 01 (DRS-01) sobre monócitos estimulados com hemácias infectadas pelo *P. falciparum*.

Metodologia: Monócitos THP1 foram estimulados *in vitro* com 5% de hemácias infectadas com a cepa 3D7 de *P. falciparum* (HP), com hemácias não parasitadas (HN), tratados ou não com DRS-01. A viabilidade foi avaliada por MTT e DHL e a atividade hemolítica foi medida pela dosagem de hemoglobina. A capacidade antioxidativa foi averiguada pela produção de ERO e ERN. Foi avaliada as moléculas da via do NF-κB, bem como analisadas as citocinas envolvidas no perfil inflamatório.

Resultados: A DRS-01 reduziu a viabilidade celular, mas sem induzir lise celular. Em monócitos expostos às HP ou HN, o peptídeo apresentou efeito protetor parcial, aumentando a viabilidade em relação aos controles. A DRS-01 mostrou potencial interferência no estresse oxidativo, porém nenhuma molécula do NF-κB foi significativamente ativada. Apesar disso, houve um aumento na produção de IL-8 no grupo de monócitos incubados somente com o peptídeo; porém, diminuição das citocinas IL-6 e IL-12. **Conclusão:** A DRS-01 pode atuar como modulador da resposta imune em monócitos expostos a *P. falciparum*, principalmente no que diz respeito à

atividade antioxidante e anti-inflamatória. Esses achados indicam que a DRS-01 possui potencial de aplicação em uma futura terapia antimalárica.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*, dermaseptina, monócitos, estresse oxidativo e citocinas inflamatórias.

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença febril causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e é considerada um sério problema de saúde pública^{1,2}. A infecção provocada pela espécie *P. falciparum* é frequentemente relacionada com a maior gravidade da doença devido à sua maior rapidez do ciclo biológico, competência de infectar hemácias de todas as idades e maior parasitemia³⁻⁵. Além disso, a capacidade do parasito em alterar a microvascularização e sequestrar hemácias infectadas para diversos órgãos, como o cérebro, pulmões e placenta, aumenta o risco de complicações graves^{3,4,6}.

Durante os últimos anos, a resistência aos antimaláricos atuais tornou-se uma grande preocupação mundial para a busca de compostos igualmente eficazes contra a infecção⁷. Em termos de controle e eliminação da doença, a resistência aos antimaláricos é uma séria ameaça aos países que adotaram a Estratégia Técnica Global para Malária da OMS, que promove o diagnóstico oportuno como principal estratégia de enfrentamento da doença⁸.

Um grupo de peptídeos microbianos extraídos da pele de rãs sul-americanas *Phyllomedusa*, as dermaseptinas (DRS), são lineares, anfipáticos e capazes de formar α -hélices quando associadas a bicamadas lipídicas, sendo capazes de permear e romper a membrana celular⁹⁻¹². Sua atividade microbicida foi demonstrada in vitro contra *Trypanosoma*¹⁰, *Leishmania*¹³⁻¹⁵ e até mesmo contra vírus, interferindo na replicação do vírus da dengue¹⁶. Por pouco se saber sobre seu potencial na infecção por *P. falciparum*, foi realizada a avaliação da interação do peptídeo antimicrobiano sintético dermaseptina 01 sobre a resposta imune de monócitos estimulados por hemácias infectadas por *P. falciparum*.

METODOLOGIA

3.1 Delineamento experimental

A influência da dermaseptina 01 (DRS-01) foi avaliada in vitro utilizando monócitos humanos da linhagem THP1 estimulados com a cepa 3D7 de *P. falciparum*. Os seguintes grupos contendo cinco monoplicatas foram estudados em placas de 96 poços de fundo chato: a) Células THP1 (grupo basal); b) Células THP1 e hemácias não parasitadas; c) Células THP1 e hemácias parasitadas; d) Células THP1 tratadas com DRS-01; e) Células THP1 e hemácias não parasitadas tratadas com DRS-01; f) Células THP1 e hemácias parasitadas tratadas com DRS-01.

Os períodos analisados nos ensaios de viabilidade (MTT e DHL) foram de 24h, 48h e 72h nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 μ L/mL e de ERN/EROS e citocinas de 24h nas concentrações de 0,5 e 1 μ L/mL de DRS-01.

3.2 Avaliação da parasitemia

91 Antes dos experimentos, foi realizado um distendido delgado das culturas de *P.*
92 *falciparum* e as lâminas coradas com giemsa 10% diluída em solução tampão fosfato
93 potássio (PBS), conforme o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária do
94 Ministério da Saúde¹⁷. Após a determinação da parasitemia e do número de hemácias
95 por contagem em câmara de Neubauer, foi realizado o ajuste para 5% de parasitemia.
96 Para os experimentos de viabilidade a cultura foi sincronizada com D-sorbitol a 5%
97 para obtenção apenas das formas de anéis¹⁸.

98 99 **3.4 Tratamento com DRS-01 e estímulo com hemácias parasitadas**

100

101 Para os ensaios de viabilidade, 50 mil monócitos foram plaqueados. Foram utilizadas
102 15x10⁶ hemácias por poço, sendo 5% parasitadas. As células foram mantidas em meio
103 de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol com 7,5% de NaHCO₃, suplementado
104 com 10% de soro humano inativado, 0,25 mg/dL de hipoxantina (Sigma) e 1% de
105 penicilina/estreptomicina. As concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 µL/mL de DRS-01
106 foram utilizadas e distribuídas conforme os grupos descritos.

107 Para os ensaios que avaliaram a produção de mediadores inflamatórios por citometria
108 (ERO/ERN, RelA/RelB e citocinas), 100 mil monócitos foram plaqueados com
109 15x10⁶ hemácias por poço, sendo 5% parasitadas e avaliadas durante 24h. nas
110 concentrações de 0,5 e 1 µL/mL de DRS-01.

111

112 **3.5 Ensaio de MTT**

113

114 Para verificar se a DSR-01 afeta a atividade metabólica ou causa toxicidade nos
115 monócitos estimulados ou não com hemácias infectadas, foi realizado o ensaio de
116 redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Os grupos
117 de células foram incubadas em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Para
118 controle positivo, foram adicionados poços extras contendo sulfóxido de dimetilo
119 (DMSO).

120 Após os períodos de estímulo e a retirada do meio de cultura dos poços, foi adicionado
121 solução de MTT (5mg/mL). Após 4 horas de incubação a 37°C no escuro, as placas
122 foram centrifugadas e foi adicionado DMSO para dissolver os cristais de formazan. A
123 placa foi lida no espectrofotômetro (Spectra Max® Plus 384) em comprimentos de
124 ondas de 570nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem.

125

126 **3.6 Ensaio de DHL**

127

128 Para avaliar se a DRS-01 provoca a ruptura de membranas, foi realizada a dosagem de
129 lactato desidrogenase (DHL) utilizando o kit comercial Roche Diagnostic GmbH –
130 11644793001 (reagente 1 e 2). Para controle positivo, foram adicionados poços
131 contendo DMSO. Após os períodos de estímulo, o sobrenadante dos poços foi coletado
132 e misturado em partes iguais (1:1) com a solução contendo o catalisador
133 (Diaphorase/NAD⁺) e solução corante (INT e lactato de sódio). Passado o período de
134 30 minutos, a placa foi lida no espectrofotômetro (Spectra Max® Plus 384) nos
135 comprimentos de onda em 450 nm e 600 nm. Os números dados na leitura das duas
136 ondas foram subtraídos conforme manual de uso do kit da Roche Diagnostic.

137

3.7 Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As espécies reativas produzidas dentro das células foram avaliadas por sondas fluorescentes após 24 horas de estímulo. As células distribuídas conforme os grupos descritos foram incubadas em duas placas distintas e mantidas em estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após este período, cada placa foi centrifugada, o sobrenadante foi desprezado e o tampão de lise (cloreto de amônio, bicarbonato de potássio e EDTA 0,2M pH 7,4) foi adicionado por 10 minutos em T.A para lisar as hemácias. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS pH 7,2.

Para avaliar a produção de ERO, foi adicionada a sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetate (DCFH-DA) (10 µM) diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 e a placa foi mantida incubada por 30 minutos. Como controle positivo, foi adicionado poços contendo 800 nM de Phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

Para a avaliação da produção de o ERN, foi utilizada a sonda 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein diacetate (DAF-FM) (2mM) diluída em PBS pH 7,2 acondicionada por 1 hora. Como controle positivo, foi utilizado 50 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS).

3.8 Ensaio de RelA e RelB

Para quantificar a expressão das moléculas de RelA (p 65) e RelB (p 68), as células foram incubadas em duas placas distintas. Após o estímulo, o sobrenadante foi removido e adicionado o tampão de lise. Em seguida as células foram fixadas com paraformaldeído a 2% durante 20 minutos a 4°C. Após duas lavagens, foi adicionado Tween 20 (concentração de 0,2%) para permeabilização da membrana e então as placas foram mantidas por 30 minutos em T.A. Os poços foram lavados com PBS pH 7,2. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de 1% de albumina bovina (Sigma) por 30 minutos em T.A. As placas foram novamente lavadas.

Para marcação do RelA, foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho NF-κB p65 (H-286) (Santa Cruz) e para marcação de RelB, o anticorpo primário anti-RelB (C19) (Santa Cruz). A proporção utilizada foi de 0,25µL de anticorpo para cada 100 mil células. As placas foram mantidas durante 24 horas no escuro a 4°C.

Após esse período, na placa de RelB, foi adicionado 50µL de suspensão do anticorpo secundário (49,75 de PBS e 0,25µL de anticorpo/poço) anti-IgG1 de camundongo fluorescente (BD Pharmingen). A incubação com o anticorpo secundário durou uma hora em ambiente escuro. Após, as placas foram lavadas duas vezes e foram ressuspensas em 200µL de azida sódica a 4°C para leitura por citometria de fluxo. Como controle positivo do experimento, foi acrescentado poços de células estimuladas com 50ng/mL de LPS.

3.9 Ensaio de quantificação de citocinas

Para a quantificação de citocinas, foi utilizado o kit multiplex comercial com esferas de captura fluorescente Human Inflammatory Cytokine CBA (BD™), capazes de capturar: interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 (IL-1β), interleucina-6 (IL-6),

interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 12p70 (IL-12p70). Os resultados foram apresentados em pg/mL.

3.10 Estratégia de aquisição na citometria de fluxo

Para avaliar a expressão das citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, foram analisados os sinais fluorescentes adquiridos através do citômetro de fluxo BD LSR II FORTESA, utilizando o software DIVA (BD Biosciences, EUA). O software FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, EUA) foi usado posteriormente para o tratamento dos dados.

A aquisição da fluorescência de RelA, RelB, ERO e ERN foi feita através de laser azul com 488 nm, capaz de excitar os fluorocromos. A configuração e calibragem do citômetro foi realizada para utilizar um espelho de passagem longa de 505 nm e um espelho de passagem de banda de 530/30 nm. Foram avaliados entre 1.000 e 10.000 eventos dentro do gate celular FSC/SSC.

Para a avaliação das citocinas, o SSC e o FSC foram configurados para o modo de log e o limite do SSC estabelecido em 650. Foi delimitado a população de interesse, e os histogramas de FITC, PE e APC foram empregados para calibrar o citômetro utilizando uma configuração de esferas e um modelo multiplex BD CBA. Para cada tipo de esfera, foram avaliados 300 eventos.

3.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 5. A normalidade dos dados foi testada por Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias por Brown-Forsythe e Bartlett. Para comparações, foram utilizados os testes t de Student ou Mann-Whitney (dois grupos) e ANOVA ou Kruskal-Wallis com pós-testes apropriados (três ou mais grupos). Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como medianas, quartis e valores extremos nos gráficos, e como mediana no texto.

RESULTADOS

4.1 A DRS-01 reduz a viabilidade das células THP1

A DRS-01 reduziu significativamente a viabilidade celular dos grupos tratados em relação às células não tratadas. Nas primeiras 24 horas, a viabilidade foi reduzida para as medianas de 48,6% na concentração de 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p < 0,0001$); 80,5% em 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0239$); 68,6% em 1 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0025$); e 62,7% em 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0005$) ($p < 0,0001$) (Figura 1).

De forma semelhante, após 48 horas, o tratamento reduziu a viabilidade ($p < 0,0001$) para 59,4% na concentração de 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0032$); para 59,8% na concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,006$); para 80,3% na concentração de 1 $\mu\text{L/mL}$ (t de Student, $p = 0,0351$); e 74,5% na concentração de 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0246$). Embora a DRS-01 tenha causado redução significativa em todas as concentrações, essa diminuição não foi dose-dependente.

Após 72 horas, a redução também foi observada em todas as concentrações de tratamento ($p < 0,0001$; ANOVA), porém, essa diminuição foi dose-dependente, com as concentrações mais elevadas mostrando capacidade de manter melhor a viabilidade (Figura 2). Os efeitos foram os seguintes: 0,25 $\mu\text{L/mL}$ reduziu a viabilidade para 31,9% ($p < 0,0001$); 0,5 $\mu\text{L/mL}$, para 36,7% ($p = 0,0002$); 1 $\mu\text{L/mL}$, para 69,7% (t de Student, $p = 0,0016$); e 2 $\mu\text{L/mL}$, para 79,4% (t de Student, $p = 0,0187$). A liberação de DHL foi analisada para verificar se a perda de viabilidade celular devido ao DRS-01 estava relacionada à lise celular. Os resultados indicaram que o peptídeo não provocou lise nas células nas 24 horas ($p=0,0720$) e nas 48 horas ($p=0,5160$). Já nas 72 horas, houve redução na liberação de DHL nas concentrações de 1 $\mu\text{L/mL}$ e 2 $\mu\text{L/mL}$ (respectivamente $p=0,0211$ e $p=0,0499$; Kruskal-Wallis).

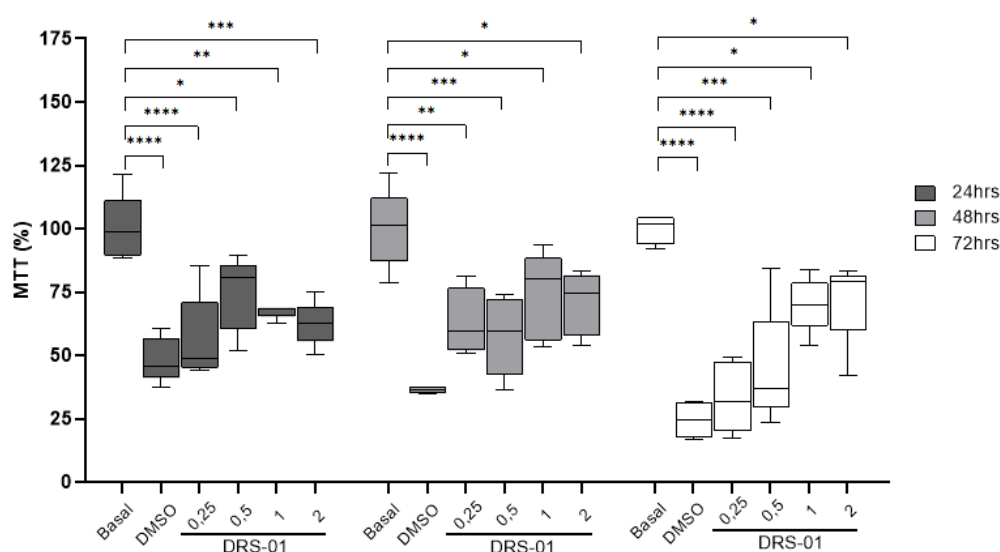


Figura 1. Percentual de células THP1 viáveis incubadas ou não com 0,25 $\mu\text{L/mL}$, 0,5 $\mu\text{L/mL}$, 1 $\mu\text{L/mL}$ e 2 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas ($n=5$). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA, seguido por teste Tukey.

4.2 A DRS-01 reverte o efeito citotóxico de hemácias saudáveis e melhora parcialmente, de forma tardia, o impacto negativo das hemácias parasitadas nos monócitos.

Para conduzir os ensaios entre células, hemácias e tratamento, inicialmente, avaliou-se o efeito das hemácias não parasitadas (saudáveis) sobre os monócitos. A viabilidade dos monócitos reduziu gradualmente para 52,8% ($p < 0,0001$) após 48 horas e para 26,8% ($p < 0,0001$) após 72 horas quando eles estavam na presença de hemácias normais (Figura 2A).

O tratamento com DRS-01 reduziu 22,4% da viabilidade das THP1 na concentração 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0103$) nas primeiras 24 horas ($p < 0,0001$, ANOVA). Já o tratamento após 48 e 72 horas mostra que foi capaz de reverter parcialmente o efeito citotóxico das hemácias normais sobre os monócitos. Nas 48 horas, a viabilidade celular aumentou de 52,8% no grupo de hemácias normais sem DRS-01 para 70,8% na concentração de 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0195$), 77,5% em 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0004$),

78,0% em 1 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0002$) e 92,0% em 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p < 0,0001$). Nas 72 horas, a viabilidade aumentou de 26,8% para 74,6% em 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0050$), 55,4% em 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0189$), 84,2% em 1 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0005$) e 83,6% em 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0024$).

Na análise da liberação de DHL, nas culturas de células estimuladas com hemácias saudáveis, o tratamento com DRS-01 não teve influência sobre a liberação de conteúdo celular em nenhuma concentração entre 24 e 48 horas, mas nas 72 horas, a concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ mostrou um efeito protetor, reduzindo 21,4% a liberação de DHL em relação ao grupo sem tratamento ($p = 0,0359$, Kruskal Wallis, seguido de teste Dunn's).

Considerando que a DRS-01 foi capaz de reverter o efeito citotóxico de hemácias normais, foi aferido se as hemácias parasitadas foram citotóxicas para as células THP1 sozinhas e se o peptídeo era capaz de reverter esse efeito. No MTT, as hemácias parasitadas promoveram uma queda importante na viabilidade das células após 72 horas em comparação ao basal (redução de 66,8%; $p < 0,0001$, ANOVA) (Figura 2B). Esse efeito foi parcialmente revertido pelo tratamento com a DRS1 em todas as concentrações, exceto para a concentração 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,1110$), que reduziu excessivamente (mediana = 12,9%), abaixo do controle com DMSO (mediana = 24,45%), podendo indicar uma possível falha metodológica (Figura 2B). A viabilidade de hemácias parasitadas melhorou de 33,8% para 66,8% na concentração 0,25 $\mu\text{L/mL}$ ($p < 0,0001$), para 71,9% na concentração 1 $\mu\text{L/mL}$ ($p < 0,0001$) e para 50,8% na concentração 2 $\mu\text{L/mL}$ ($p = 0,0084$; Figura 2B).

Para averiguar se a redução observada foi provocada por lise celular, foi realizado avaliação do DLH, mostrando que o tratamento com DRS-01 não teve influência sobre a liberação de conteúdo celular em nenhuma concentração e períodos testados.

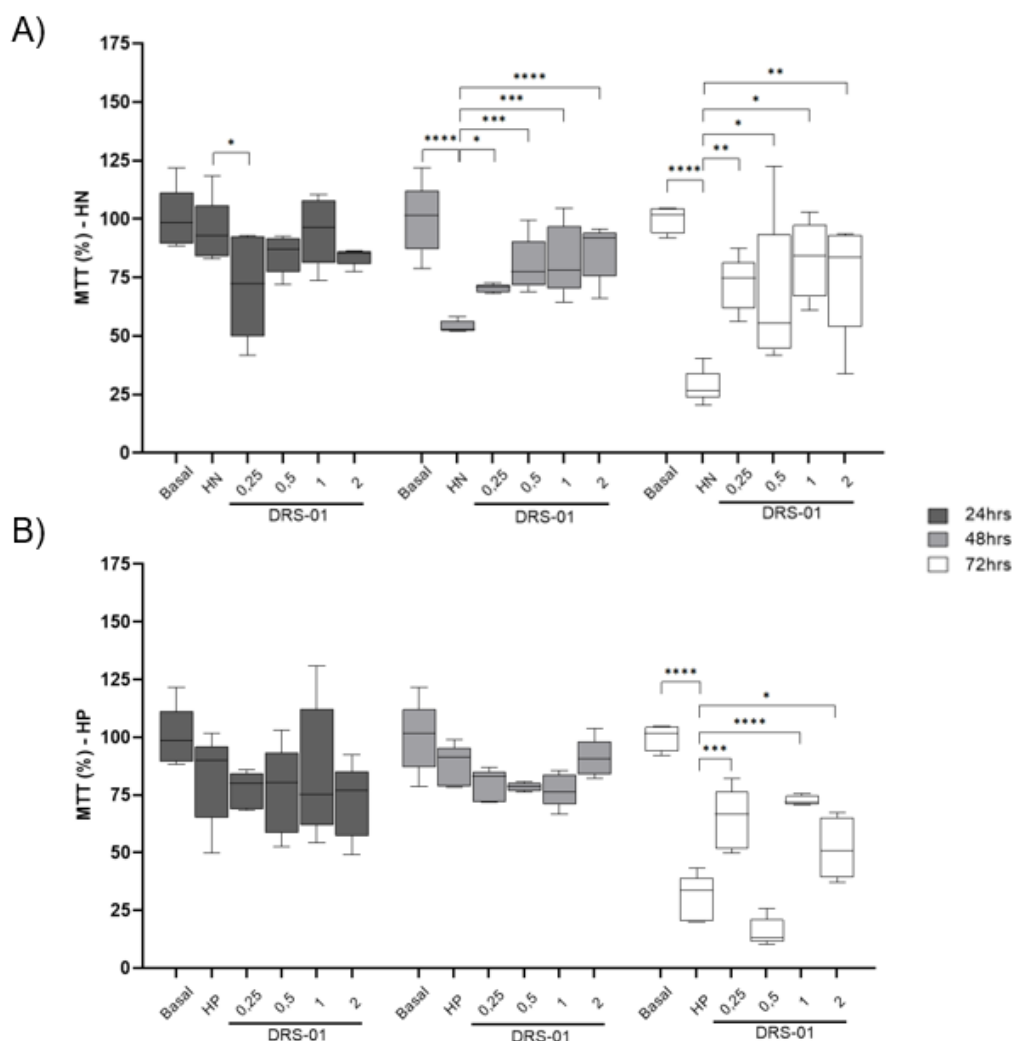
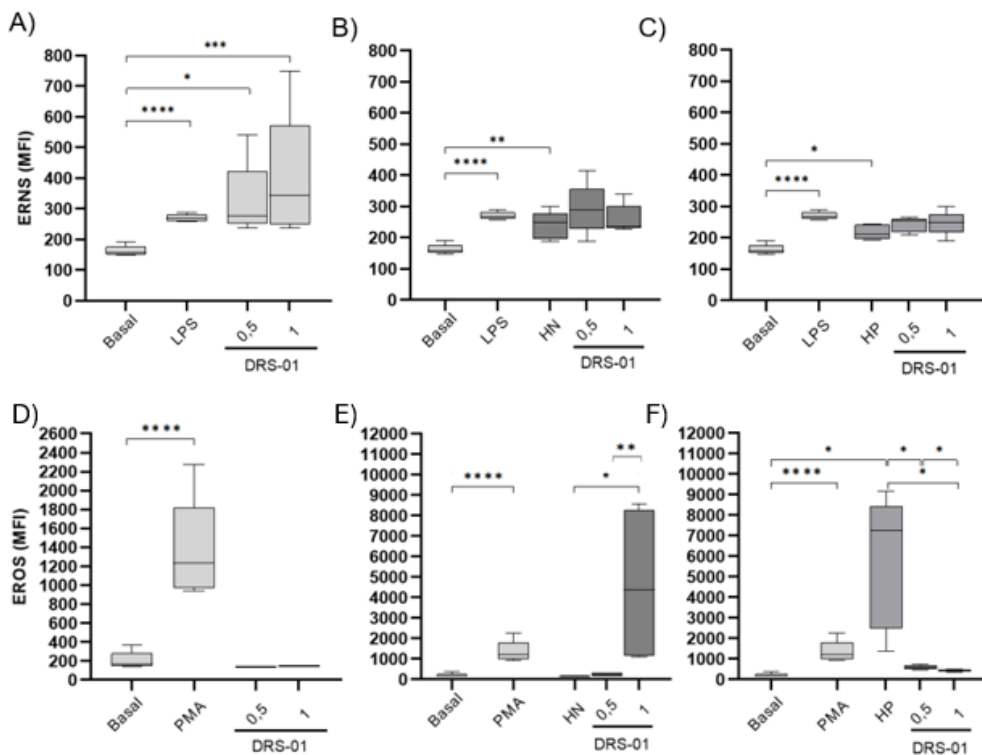


Figura 2. A) Percentual de células THP1 viáveis incubadas com hemácias não parasitadas (HN) e 0,25 μL/mL, 0,5 μL/mL, 1 μL/mL e 2 μL/mL DRS-01 durante 24^h, 48^h e 72^h horas (n=5). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). 1ANOVA uncorrected Fisher's LSD; 2ANOVA seguido por Sidak's. B) Percentual de células THP1 viáveis incubadas com hemácias parasitadas (HP) e 0,25 μL/mL, 0,5 μL/mL, 1 μL/mL e 2 μL/mL DRS-01 durante 24, 48 e 72 horas (n=5). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA e teste Sidak's para múltiplas comparações.

4.3 Produção de radicais livres (ERO e ERN) pelos monócitos estimulados ou não e o efeito da DRS-01

Após 24 horas, os resultados indicam um aumento na produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) pelas células com DRS-01 na concentração de 0,5 μL/mL (aumento de 75,3%; p = 0,00129, ANOVA) e 1 μL/mL (aumento de 117,1%; p = 0,0003, ANOVA) em comparação com o basal (Figura 3A).

310 Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos de células
 311 incubadas apenas com hemácias (parasitadas ou não) em comparação ao basal. A
 312 produção de ERNS pelas THP1 aumentou 57,6% quanto incubadas com hemácias
 313 normais ($p = 0,0073$, teste t) e 33,5% quanto incubadas com hemácias parasitadas (p
 314 $= 0,0039$, teste t) (Figura 3B e 3C).
 315 Por sua vez, o tratamento com DRS-01 dos grupos de células estimulados com as
 316 hemácias normais ou parasitadas não promoveu aumento da produção de ERN em
 317 relação ao grupo de hemácias saudáveis sem tratamento (Figura 3B e 3C). Conforme
 318 esperado, o controle positivo (LPS) do experimento aumentou 1,66 vezes a produção
 319 de ERN em relação ao grupo basal.
 320 Quanto à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o tratamento com DRS-
 321 01 não apresentou impacto significativo nos monócitos em comparação ao basal ($p =$
 322 $0,1374$; ANOVA; Figura 3D). Não se observou um aumento de ERO quando os
 323 monócitos foram incubados junto com hemácias normais. No entanto, na concentração
 324 $1 \mu\text{L/mL}$, a produção dessas espécies em relação ao grupo de hemácias sem tratamento
 325 aumentou 29,9 vezes ($p = 0,0067$, Kruskal-Wallis) (Figura 3E).
 326 Já quando os monócitos foram incubados junto às hemácias parasitadas, a produção
 327 de ERO elevou 42,2 vezes em comparação ao basal ($p = 0,0176$). Este grupo quando
 328 tratado com DRS-01, diminuiu a produção de ERO de forma drástica, ficando mais
 329 próxima dos níveis basais. Na concentração de $0,5 \mu\text{L/mL}$, a produção reduziu 92,1%
 330 ($p = 0,0222$) e na concentração de $1 \mu\text{L/mL}$ 93,7% ($p = 0,0202$) quando comparado ao
 331 grupo de hemácias parasitadas sem tratamento ($p = 0,0134$; Brown-Forsythe and
 332 Welch ANOVA; Figura 3F). Conforme esperado, a produção de ERO do controle
 333 positivo (PMA) foi 7,2 vezes maior em relação a produção basal.
 334



335

Figura 3. Produção de ERNs e EROs, expressa como MFI, por monócitos incubados com 0,5 $\mu\text{L/mL}$ ou 1 $\mu\text{L/mL}$ de DRS-01 por 24 horas ($n=5$). Os grupos analisados incluem: (A e D) apenas tratamento, (B e E) hemácias não parasitadas (HN) + tratamento e (C e F) hemácias parasitadas (HP) + tratamento. A análise estatística foi realizada da seguinte forma: A, B e C – ANOVA e teste Sidak's para múltiplas comparações; D – Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's; E – Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's; F – Brown-Forsythe e ANOVA de Welch.

4.4 A DRS-01 interfere na produção de algumas citocinas inflamatórias, mas não é capaz de modificar a resposta de monócitos estimulados com hemácias.

Em relação ao tratamento com DRS-01, os resultados mostram que houve aumento na produção de IL-8 pelos monócitos tratados. A concentração dessa citocina aumentou 108,8% e 100% respectivamente, com os tratamentos 0,5 $\mu\text{L/mL}$ (mediana = 119,2 pg/mL; $p=0,0113$) e 1 $\mu\text{L/mL}$ (114,2 pg/mL; $p=0,0139$) em relação ao basal (57,1 pg/mL) ($p = 0,0130$, ANOVA; Figura 4). Além disso, nota-se um leve aumento dessa citocina no grupo de hemácias não parasitadas, passando para 103,9 pg/mL, 181,9% a mais em relação ao grupo basal ($p = 0,0627$, ANOVA).

No entanto, quando os monócitos estimulados com as hemácias normais são tratados com DRS-01 esse incremento é perdido. A concentração de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ resultou em uma produção de 45,7 pg/mL ($p = 0,0161$), enquanto a concentração de 1 $\mu\text{L/mL}$ levou a uma produção de 56,25 pg/mL ($p = 0,0428$). Por outro lado, não se observa aumento semelhante quando as células são incubadas com hemácias parasitadas (45,48 pg/mL), ficando todos os grupos, independente da presença ou não de DRS-01, próximos ao basal (Figura 4).

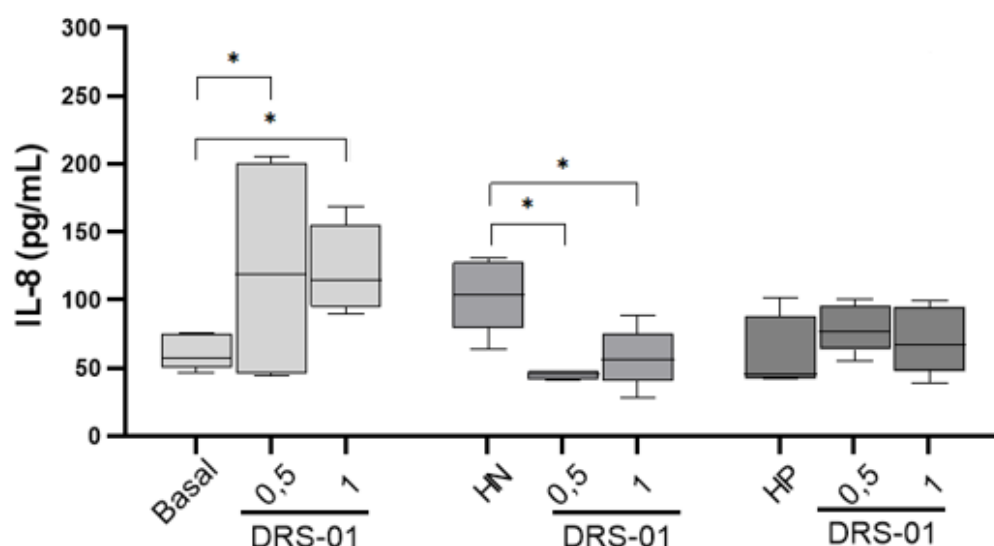


Figura 4. Produção de IL-8 (pg/mL) por monócitos incubados ou não com 0,5 $\mu\text{L/mL}$ e 1 $\mu\text{L/mL}$ DRS-01 durante 24 horas ($n=5$). Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**), um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***) e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). ANOVA uncorrected Fisher's LSD.

Chama-se atenção para o tratamento dos monócitos com 1 $\mu\text{L/mL}$, onde os grupos estimulados com hemácias parasitadas (67,40 pg/mL) ou não (56,25 pg/mL) e tratados

com 1 µL/mL apresentaram uma quantidade significativamente menor de IL-8 em relação ao grupo tratado com a mesma concentração (114,7 pg/mL), mas sem o estímulo das hemácias ($p = 0,0334$ vs. hemácias parasitadas; $p = 0,0092$ vs. hemácias não parasitadas). Um resultado semelhante foi observado entre o grupo tratado com 0,5 µL/mL sem hemácias e o grupo tratado com hemácias normais ($p = 0,0033$, ANOVA).

A produção de IL-12p70 pelos monócitos foi reduzida tanto na presença de hemácias normais (1,900 pg/mL) quanto parasitadas (1,140 pg/mL), em comparação ao basal (2,785 pg/mL). O tratamento com DRS-01 (0,5 e 1 µL/mL) também diminuiu a IL-12p70 nos monócitos não estimulados (mediana = 0,5900 pg/mL e 1,680 pg/mL, respectivamente). Nos grupos estimulados com hemácias, os níveis da citocina permaneceram reduzidos e semelhantes aos dos grupos sem tratamento ($p = 0,1461$, ANOVA uncorrected Fisher's LSD).

A IL-6 seguiu um padrão semelhante, com redução significativa após o tratamento com 0,5 µL/mL de DRS-01, diminuindo de 1,8 pg/mL (basal) para 0,5 pg/mL. Nos monócitos estimulados com hemácias parasitadas, a citocina também foi reduzida para 0,8 pg/mL ($p < 0,0001$, ANOVA seguido por teste de Tukey).

A produção de TNF ($p = 0,8020$; Brown-Forsythe and Welch ANOVA), IL-10 ($p = 1,1024$; Ordinary one-way ANOVA) e IL-1 β ($p = 0,2190$; Brown-Forsythe and Welch ANOVA) não foi alterada pela presença de hemácias normais ou parasitadas em relação ao basal. Da mesma forma, o tratamento com DRS-01 não teve impacto na produção dessas citocinas, independentemente da estimulação com hemácias. O controle positivo com LPS confirmou a responsividade celular.

A expressão dos promotores gênicos RelA e RelB da via do NF- κ B foi avaliada após 24 horas, mas, de forma geral, não apresentou aumento significativo. No entanto, o promotor RelA teve um aumento de 13,39% ($p = 0,0192$) no grupo de hemácias parasitadas tratadas com 1 µL/mL de DRS-01 em comparação ao grupo sem tratamento. Nos demais grupos, não houve diferença significativa ($p = 0,0842$ para RelA e $p = 0,4413$ para RelB; Kruskal-Wallis) (Figura 5).

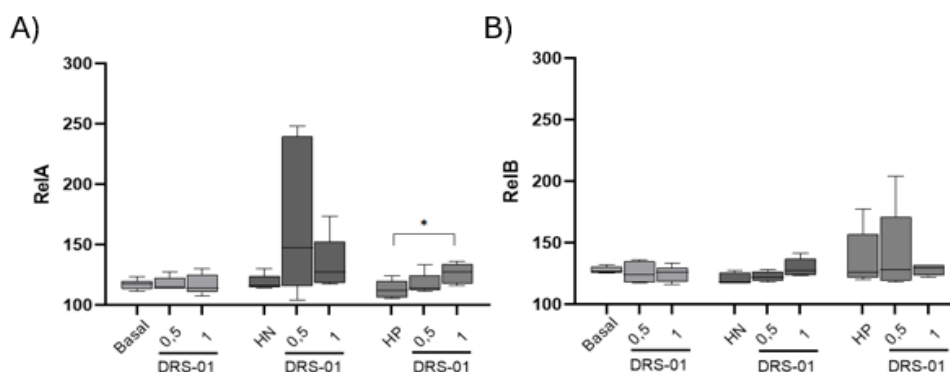


Figura 5. Produção de A) RelA (p65) e B) RelB apresentada por intensidade média de fluorescência (MFI) por monócitos incubados ou não com 0,5 µL/mL e 1 µL/mL DRS-01 durante 24 horas (n=5). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo basal. Um valor de p entre 0,05 e 0,01 é indicado por um asterisco (*), um valor de p entre 0,01 e 0,001 é indicado por dois asteriscos (**). Um valor de p entre 0,001 e 0,0001 é indicado por três asteriscos (***)

e um valor de p menor que 0,0001 é indicado por quatro asteriscos (****). Kruskal-Wallis, seguido de teste Dunn's.

DISCUSSÃO

As dermaseptinas constituem uma extensa família de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e foram primeiramente identificadas na pele do sapo *Phyllomedusa sauvagii*¹³. A estrutura linear, policatiônica, anfipática é capaz de interagir com bicamadas lipídicas, desencadeando uma estrutura α -helicoidal, permeando a membrana citoplasmática das células-alvo¹⁴⁻¹⁶.

Apesar de serem conhecidas como pouco citotóxicas para células saudáveis¹⁷ a citotoxicidade da DRS-01 foi demonstrada *in vitro* para da linhagem J774 (macrófago) e U937 (linhagem celular de monócitos não aderentes) e *in vivo* em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss^{7,18}. Esse efeito foi semelhante em monócitos da linhagem THP1, possivelmente provocando uma morte celular apoptótica.

É reconhecido que as dermaseptinas e seus análogos apresentam atividade lítica *in vitro*, possuindo ação contra uma ampla gama de microrganismos¹⁶. Sua ação foi demonstrada em formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* e *L. mexicana*⁶⁻⁹.

Como a ação da DRS-01 ocorre pela sua afinidade por membranas negativamente carregadas, como a membrana da *Leishmania*, o mesmo pode ser presumido para o plasmódio, que apresenta carga negativa em grande parte da sua superfície¹⁹. Além disso, outras DRS mostraram-se capazes de lisar seletivamente hemácias infectadas por *P. falciparum*²⁰⁻²².

De acordo com os resultados obtidos, independente da presença de hemácias e infecção pelo plasmódio, houve uma maior produção de ERN. Além disso, a produção de ERO, comum na infecção por malária²³, foi regulada na presença de DRS-01. É plausível que a ausência de resposta inflamatória seja decorrente do sequestro da DRS-01 pelas hemácias, a níveis não tóxicos aos monócitos.

Ainda, entendemos que a DRS-01 possui efeito modulador na produção de citocinas, o que poderá melhorar a resposta inflamatória exacerbada na malária.

Os achados deste estudo são inéditos e indicam que a DRS-01 possui características favoráveis para aplicação em uma futura terapia antimalárica. Sugere capacidade microbicida mesmo em baixas concentrações e provoca pouca ou nenhuma citotoxicidade às hemácias. Sua aplicação torna-se ainda mais atrativa devido a sua aplicabilidade em diversos microrganismos, com atividade lítica contra agentes do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, além de apresentar potente atividade antibacteriana, podendo ser considerada um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças negligenciadas.

REFERÊNCIAS

1. Gomes AP, Vitorino RR, Costa A de P, Mendonça EG de, Oliveira MG de A, Siqueira-Batista R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. Rev Bras Ter Intensiva 2011;23(3):358–69.
2. OMS. World Malaria Report. Geneva: 2024.

3. Beeson JG, Brown G V. Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: The roles of parasite adhesion and antigenic variation. Cellular and Molecular Life Sciences 2002.
4. Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ. Reduced microcirculatory flow in severe *falciparum* malaria: Pathophysiology and electron-microscopic pathology. Acta Trop 2004;89(3).
5. Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. vol. 1. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
6. Brand GD, Leite JRSA, Silva LP, Albuquerque S, Prates M V, Azevedo RB, et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Journal of Biological Chemistry 2002;277(51).
7. Zampa MF, Araújo IMS, Costa V, Nery Costa CH, Santos JR, Zucolotto V, et al. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. Nanomedicine 2009;5(3):352–8.
8. Hernandez C, Mor A, Dagger F, Nicolas P, Hernandez A, Benedetti EL, et al. Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin. Eur J Cell Biol 1992;59(2).
9. Cardoso M de S, Soares J dos S, Leite SA, Malaquias C, Coelho L. Antiviral activity of dermaseptin 01 against Dengue virus type 2, Herpes simplex virus type 1 and Vaccinia virus. Sci Med 2013.
10. Brasil. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.; 2005.
11. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of Parasitology 1979;65(3).
12. Mor A, Delfour A, Nicolas P, Van Nguyen H, Migliore-Samour D. Isolation, Amino Acid Sequence, and Synthesis of Dermaseptin, a Novel Antimicrobial Peptide of Amphibian Skin. Biochemistry 1991;30(36):8824–30.
13. Ammar B, Périanin A, Mor A, Sarfati G, Tissot M, Nicolas P, et al. Dermaseptin, a Peptide Antibiotic, Stimulates Microbicidal Activities of Polymorphonuclear Leukocytes. Biochem Biophys Res Commun 1998;247(3):870–5.
14. Lorin C, Saidi H, Belaid A, Zairi A, Baleux F, Hocini H, et al. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. Virology 2005;334(2):264–75.

500 15. Nicolas P, Amiche M. The Dermaseptins. Handbook of Biologically Active
501 Peptides 2006;295–304.
502

503 16. Zhu H, Ding X, Li W, Lu T, Ma C, Xi X, et al. Discovery of two skin-derived
504 dermaseptins and design of a TAT-fusion analogue with broad-spectrum antimicrobial
505 activity and low cytotoxicity on healthy cells. PeerJ 2018;2018(9):e5635.
506

507 17. Cano BSC. Péptidos antimicrobianos y su efecto en el desarrollo de formas
508 parasitarias de leishmania 2012.
509

510 18. Akaki M, Nagayasu E, Nakano Y, Aikawa M. Surface charge of *Plasmodium*
511 *falciparum* merozoites as revealed by atomic force microscopy with surface potential
512 spectroscopy. Parasitol Res 2002;88(1).
513

514 19. Ghosh JK, Shaool D, Guillaud P, Cicéron L, Mazier D, Kustanovich I, et al.
515 Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium*
516 *falciparum* and the underlying molecular basis. Journal of Biological Chemistry
517 1997;272(50):31609–16.
518

519 20. Krugliak M, Feder R, Zolotarev VY, Gaidukov L, Dagan A, Ginsburg H, et al.
520 Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. Antimicrob Agents Chemother
521 2000;44(9):2442–51.
522

523 21. Dagan A, Efron L, Gaidukov L, Mor A, Ginsburg H. In vitro antiplasmodium
524 effects of dermaseptin S4 derivatives. Antimicrob Agents Chemother
525 2002;46(4):1059–66.
526

527 22. Tripathy S, Roy S. Redox sensing and signaling by malaria parasite in
528 vertebrate host. J Basic Microbiol 2015;55(9):1053–63.

ANEXO 02

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito imunomodulador do ácido anacárdico em micróglias estimuladas por eritrócitos infectados pelo plasmódio

Pesquisador: ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66943222.9.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.989.750

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um trabalho que será realizado in-vitro, mas que necessitará de 10mls de sangue humano para realização dos experimentos. Trata-se da segunda versão modificada do projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito do ácido anacárdico sobre a produção de citocina e quimiocinas, sobre a expressão das moléculas da via do NFB, sobre a expressão do PPAR e eicosanoides.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos relacionados à coleta do sangue e quebra do sigilo da informação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pendências respondidas. Riscos e benefícios incluídos no projeto e TCLE ajustado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados: O Novo TCLE está em linguagem própria e atendeu aos pedidos anteriores.

Recomendações:

Não há menção no projeto completo do número de pacientes que terão o sangue coletado, uma vez que o projeto é, em sua maior parte, in vitro. O número de 10 amostras de sangue está indicado nas informações básicas e este número foi considerado justificável.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)31071-7170

E-mail: cepfm@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 5.989.750

Recomendo aprovação com a observação que o tamanho amostral é de 10 pacientes conforme indicado no projeto básico.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após apreciação na reunião extraordinária dia 05/04/2023 do colegiado CEP/FM o projeto foi aprovado. OBS: De acordo com a Resolução CNS 466/12, nos inciso II.19 e II.20, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP os relatórios parciais e final do seu projeto de pesquisa. Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2044178.pdf	26/02/2023 22:01:04		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_5898353.pdf	26/02/2023 21:59:06	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	4_Projeto_modificado.pdf	26/02/2023 21:58:34	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Cronograma	Cronograma_atualizado.pdf	26/02/2023 21:58:15	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	6_TCLE_modificado.pdf	26/02/2023 21:57:21	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Outros	02_Carta_de_Encaminhamento_de_projetos.docx	16/01/2023 11:22:24	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Outros	9_Resumo.docx	16/01/2023 11:20:05	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3_Declaracao_de_Responsabilidade.docx	16/01/2023 11:13:53	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Orçamento	orcamento.doc	16/01/2023 11:13:18	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)31071-7170 **E-mail:** cepfm@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 5.989.750

Outros	Curriculo_Lattes_Mariangela_Souza_de_Oliveira.pdf	10/01/2023 21:49:17	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Tatiana_Karla_dos_Santos_Borges.pdf	10/01/2023 21:42:06	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Outros	Curriculos_Lattes_Shirley_Claudino_Pereira_Couto.pdf	23/11/2022 22:01:47	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Outros	Curriculos_Lattes_Maria_Iraculada_Muniz_Barboza_Junqueira.pdf	23/11/2022 22:01:14	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Andreia_Cristina_Goncalves_Cascaes_Gontijo.pdf	23/11/2022 22:00:28	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito
Folha de Rosto	1_Folha_de_Rosto.pdf	23/11/2022 21:40:09	ANDREIA CRISTINA GONCALVES CASCAES GONTIJO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 07 de Abril de 2023

Assinado por:
Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)31071-7170 **E-mail:** cepfm@unb.br