

Karina Smidt Simon

Atividade de Peptídeos derivados da Peçonha de escorpiões em Macrófagos Murinos: Avaliação da Sua Influência na Resposta à Cryptococose.

Brasília-DF
2014

Karina Smidt Simon

Atividade de Peptídeos derivados da Peçonha de escorpiões em Macrófagos Murinos: Avaliação da Sua Influência na Resposta à Cryptococose.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Anamélia L. Bocca

Co-orientador: Prof. Dr. Aldo Henrique Tavares

Brasília-DF
2014

Karina Smidt Simon

Atividade de Peptídeos derivados da Peçonha de escorpiões em Macrófagos Murinos: Avaliação da Sua Influência na Resposta à Cryptococose.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília 20 de fevereiro de 2014

Banca examinadora

Anamélia L. Bocca, Dr^a. Orientadora

Andrea Q. Maranhão, Dr^a. Examinadora

Márcia Renata Mortari, Dr^a. Examinadora

Luciano Paulino Silva, Dr. Examinador

Dedico esse trabalho à toda a minha família, pais e irmãos, que , cada um a seu jeito, me apoiaram durante todo o trabalho e continuam me apoiando e aconselhando em cada uma das minhas escolhas.

Agradecimentos

Agradeço de coração à todos aqueles que participaram de alguma forma na realização desse trabalho. Todos os amigos que estiveram ao meu lado e enxugaram cada lágrima escorrida durante os últimos 30 meses. Cada um teve enorme importância na realização desse trabalho! Espero um dia poder retribuir apoio de vocês.

À minha orientadora, Anamélia Bocca, pela paciência e dedicação durante todos os anos que estive em seu laboratório.

Ao professor Aldo Henrique Tavares pela sua constante disposição a ajudar-me, mesmo com os questionamentos mais simples.

À professora Kelly Gracie Magalhães pela ajuda no início truncado do mestrado.

À professora Ildinete Pereira por ter me dado oportunidade de ingressar na pós-graduação.

À todos os alunos que passaram pelo Laboratório de Imunologia Aplicada e auxiliaram no trabalho, sendo discutindo um artigo, sendo na bancada ou ainda compartilhando as preocupações que são bastante peculiares, principalmente nos alunos de mestrado e doutorado.

À Universidade de Brasília, ao Instituto de Ciências Biológicas, à Faculdade de Medicina e ao programa de pós-graduação da Patologia Molecular, por concederem o espaço e parte dos recursos necessários para a realização desse projeto.

"If you can dream it, you can do it."

Walt Disney

Resumo

A ocorrência de infecções causadas por patógenos oportunistas, dentro das UTIs são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade, caracterizando um grave problema de saúde pública. Um desses patógenos é o *Cryptococcus neoformans*, um fungo basidiomiceto, causador da criptococose. Essa é uma doença manifestada principalmente por indivíduos imunocomprometidos, onde a incapacidade do organismo desses pacientes de eliminar o fungo acaba por permitir a migração do mesmo para diversos tecidos, incluindo o sistema nervoso. Lá ele se estabelece, causando a meningoencefalite, que é a forma mais grave da doença, e eventual morte. O sucesso terapêutico para a criptococose é bastante baixo, necessitando-se, então, de novas estratégias para o tratamento da doença. AMPs vem sendo investigados como elementos promissores no tratamento de diversas doenças. Estes peptídeos são encontrados em todos os organismos pluricelulares, onde exercem atividades regulatórias e microbicida. Os peptídeos com atividade protetora do organismo, podem, no caso de animais venenosos, ser expressos constitutivamente nas glândulas de veneno. Considerado que esses peptídeos tem o potencial de eliminar patógenos e alterar a atividade de células relacionadas com a defesa dos organismo, foram testados seis peptídeos para ação fungicida contra o *C. neoformans* e atividade imunomodulatória com macrófagos murinos. Esses peptídeos foram sintetizados a partir da biblioteca de cDNA das glândulas de veneno de escorpiões das espécies *Tityus obscurus*, *Tityus serrulatus* e *Hadrurus gerstchi*. Testes de atividade hemolítica, atividade citotóxica para células de mamíferos, e capacidade microbicida direta e indireta foram executados para todos os peptídeos. Foi verificada a atividade antiinflamatória de dois dos peptídeos, além a da alta toxicidade para o fungo de um terceiro peptídeo Estes peptídeos apresentaram, na concentração em que foram capazes de exercer suas respectivas atividades, baixa capacidade hemolítica e baixa toxicidade para células de mamíferos. Além disso, foi feito um primeiro esforço para entender a estrutura secundária dos peptídeos com atividades modulatória e microbicida, na tentativa de compreender melhor a ação dessas sequências. A utilização desses peptídeos pode ser considerada promissora para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da criptococose.

Abstract

The occurrence of infections caused by opportunistic pathogens within the ICU is responsible for high morbidity and mortality inside the hospitals, featuring a serious public health problem. One of them is the fungus *Cryptococcus neoformans*, a basidiomycete that is the cause of cryptococcosis. This is a disease manifested mainly in immunocompromised patients, where the body's inability to eliminate the pathogen eventually allow the fungus migration to various tissues, including the nervous system. There it establishes, causing meningoencephalitis, the most severe form of the disease, and eventual death. Successful treatment for cryptococcosis is rather low, so it becomes a necessity to search for new strategies of treatment for this infirmity. Antimicrobial peptides are being investigated as a promising treatment for many illness. These peptides are found in all multicellular organisms, where they exert regulatory and microbicidal activities. The peptides with protective activity of the organism may be expressed constitutively in venom glands, in the case of poisonous animals. Considering that these peptides has the potential to eliminate pathogens and alter the activity of cells related to the defense of the organisms, here we tested six peptides for a fungicide activity against *C. neoformans* and immunomodulatory capacity in murine macrophages. These peptides were synthesized from the cDNA library of the venom gland of *Tityus obscurus*, *Tityus serrulatus* and *Hadrurus gerstchi* scorpion species. Tests of hemolytic activity, cytotoxic activities to mammalian cells, and direct and indirect microbicidal capacity were performed for all peptides. There was verified the anti-inflammatory activity of two of the peptides, in addition to the high toxicity to the fungus of a third peptide. At the concentration in which they were able to pursue their activities, these peptides presented low hemolytic capacity and low toxicity to mammalian cells. Furthermore, a first effort has been made to understand the secondary structure of peptides with microbicidal and modulatory activities, in an attempt to better understand the action of these sequences. The use of these peptides may be considered promising for the development of new therapies for the treatment of cryptococcosis.

I. Sumário

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Introdução	1
Resposta imune inata	1
Peptídeos Anti-microbianos (AMPs)	8
Macrófagos	12
Cryptococcus neoformans	16
Objetivos	20
Objetivo geral	20
Objetivos específicos	20
Material e métodos.	21
Peptídeos	21
Animais	21
Teste da atividade hemolítica	22
Teste da atividade citotóxica em macrófagos murinos	23
Teste da capacidade microbicida	24
Teste de capacidade microbicida de macrófagos estimulados.	25
Dosagem de citocina	27
Dosagem de óxido nítrico	28
Teste de atividade citotóxica em monócitos humanos.	28
Modelagem da estrutura molecular dos peptídeos.	30
Análises estatísticas	30

Resultados	31
Peptídeo 1	32
Figura 1: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo 1.	34
Figura 2 Modelo proposto de estrutura secundária para o peptídeo 1.	35
AP2p	36
Figura 3: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo AP2p	37
Peptídeo 4	38
Figura 4: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo 4	39
Peptídeo 5	40
Figura 5: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo 5	42
Figura 6: Modelo proposto de estrutura secundária para o peptídeo 5.	43
Peptídeo 6	44
Figura 7: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo 6	45
Figura 8: Modelo proposto de estrutura secundária para o peptídeo 6.	46
NDBP-5.6	47
Figura 9: Resultados obtidos a partir dos testes com o NDBP-5.6	48
Discussão	49
Conclusão e perspectivas	57
Referências	58
Anexo 1	65
Resultados dos testes de capacidade hemolítica	65
Anexo 2	66
Resultados dos testes de atividade citotóxica	66
Anexo 3	67

Resultados dos testes de capacidade microbicida direta	67
Anexo 4	68
Resultados dos testes de capacidade microbicida indireta	68
Anexo 5	69
Resultados da dosagem de NO	69
Anexo 6	70
Resultados da dosagem da citocina TNF- α .	70
Anexo 7	71
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE	71

II. Introdução

Na atualidade, a ocorrência de infecções nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) é um grande problema de saúde pública. As infecções contraídas durante as internações são responsáveis por um alto índice de morbidade e mortalidade intra-hospitalar. Isso ocorre porque a maioria dos pacientes encontrados nesses setores está em uma condição fisiológica pouco favorável para responder a tais infecções. Alguns dos grandes responsáveis por essas infecções são fungos oportunistas como o *Cryptococcus neoformans*. Para esse tipo de doença, as abordagens terapêuticas incluem a administração de polienos, azóis e equinocandinos, porém estes nem sempre são capazes de sanar a doença (Perfect, J. *et al.* 1999). Além disso, o uso prolongado desses fármacos pode trazer prejuízos aos doentes, devido à toxicidade de tais substâncias.

Uma reação adequada aos agentes agressores depende de uma resposta eficaz do sistema imunológico do paciente, que reage à infecção dando início a uma sequência coordenada de eventos. Considerando a capacidade de influenciar as funções celulares do hospedeiro, a utilização AMPs como agentes terapêuticos pode ser promissora na resolução de diversos tipos de infecções, incluindo as doenças fúngicas, bem como uma forma de equilibrar o processo inflamatório, evitando, assim, danos teciduais exacerbados (Hirsch, T. *et al.* 2008). Sendo assim, o estudo da capacidade microbicida e modulatória de peptídeos derivados de artrópodes, como os escorpiões, torna-se uma importante forma de acessar o potencial terapêutico dessas pequenas peptídeos, que podem ser encontradas tanto na hemolinfa como nas glândulas de veneno de animais desse filo.

1. Resposta imune inata

Quando o organismo hospedeiro é invadido por um patógeno, as primeiras células ativadas são as envolvidas da resposta imune inata. O reconhecimento de estruturas conservadas em cada uma das classes de microrganismos é feito por receptores encontrados nas membranas das células do hospedeiro. O contato de certas estruturas dos patógenos com

esses receptores desencadeia uma diversidade de vias de sinalização, resultando na produção de moléculas com diversas funções no processo de resposta ao invasor, incluindo peptídeos com atividade microbicida e capacidade modulatória (Mookherjee, N. *et al.* 2007). Estes, têm sido descritos em todos os organismos multicelulares (Müller, W. *et al.* 1999), como os vegetais (Stotz, H. *et al.* 2009) e animais, tanto invertebrados como vertebrados (Mookherjee, N. *et al.* 2007).

O papel do sistema imunológico é a manutenção da homeostase, ou seja, defender o organismo de agentes que possuem o potencial para causar danos, de malformações durante o crescimento morfo genético e envelhecimento, e de fusão com organismos geneticamente não relacionados, evitando quimerismo e perda de individualidade do organismo (Müller, W. *et al.* 1999).

A capacidade de discriminação entre estruturas próprias e não próprias é uma característica fundamental para todos os organismos vivos e é a base para a ativação das respostas imunológicas (Nürnberg, T. *et al.* 2004). A resposta imune inata é a denominação dada ao conjunto de processos celulares e bioquímicos que funcionam para evitar a entrada de substâncias não próprias ou de microrganismos que possam interferir na homeostase de um organismo. É, portanto, a primeira linha de defesa e está pronta para responder rapidamente, mesmo sem um contato prévio com o patógeno.

As plantas são capazes de sintetizar polímeros de açúcar, que, em solução, formam um ambiente propício para o crescimento microbiano. Portanto, não é surpreendente que uma grande quantidade de microrganismos se desenvolva nesse meio (Dangl, J. *et al.* 2013). Além disso, são, também, desafiadas por uma grande quantidade de vírus, responsáveis por destruir colheitas inteiras (Dangl, J. *et al.* 2001). Durante a evolução dos vegetais, esses parasitas podem ter atuado como uma pressão evolutiva que favoreceu os organismos que desenvolveram mecanismos de defesa capazes de controlar a infecção causada por esses agentes patogênicos. Esses organismos prevaleceram, e provavelmente foram os ancestrais das espécies vegetais encontradas atualmente.

A primeira defesa encontrada nas plantas é a epiderme, que possui células justapostas, quase sem espaço intercelular, que pode ser impregnadas com cutina e, em uma camada mais externa, com revestimento de cera (Taiz, L. *et al.* 2009). A epiderme serve como

uma barreira mecânica para organismos invasores. Os patógenos, caso sejam bem sucedidos em penetrá-la, encontram células capazes de reconhecer estruturas encontradas nos microrganismos. Esse reconhecimento acontece por meio de receptores formados por proteínas transmembrana, chamados receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que se ligam a estruturas evolutivamente conservadas, chamados padrões moleculares associados a patógenos ou a micróbios (PAMPs ou MAMPs) (Dangl, J. *et al.* 2013; Jones, J. D. G. *et al.* 2006) ou, ainda, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Dodds, P. *et al.* 2010). Esses receptores encontrados nas células vegetais são amplamente análogas aos receptores do tipo Toll (TLRs) dos animais (Monaghan, J. *et al.* 2012). O reconhecimento de patógenos pelos PRRs desencadeia cascatas de reações bioquímicas, levando à reprogramação transcripcional que elimina ou restringe o crescimento do parasita (Monaghan, J. *et al.* 2012).

Nem todos os patógenos de vegetais são reconhecidos na região extracelular. Na região intracelular, outros receptores capazes de reconhecer padrões associados a patógenos em plantas são as proteínas de resistência (R proteins). Esses receptores são capazes de reconhecer patógenos polimórficos específicos de algumas cepas de microrganismos e, embora possuam algumas funções distintas, são estruturalmente semelhantes aos receptores do tipo NOD (NLR), que estão envolvidos na resposta inata em animais (Maekawa, T. *et al.* 2011).

Vegetais, portanto, desenvolveram uma imunidade baseada no reconhecimento inespecífico do patógeno, que é capaz de iniciar processos de defesa eficientes contra os mesmos (Jones, J. *et al.* 2006). Como os animais, os vegetais tem a capacidade de reconhecimento de estruturas encontradas nos patógenos, como LPS e flagelina bacterianos, ou ainda a estruturas de parede fúngica, e de responder de forma defensiva (Ausubel, F. 2005). O reconhecimento dos patógenos pelos receptores de membrana, ou pelos receptores intracelulares, desencadeiam várias cascatas de ativação nas células. Estas resultam em uma série de processos, tais como: produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ativação de proteínas quinases mitógeno-ativadas (MAPKs), reprogramação da expressão gênica, alteração na composição da parede celular nas células do local onde a ameaça foi detectada, além de, muitas vezes, morte celular (Dodds, P. N. *et al.* 2010). Além do aparato celular para a defesa do organismo, as células vegetais secretam, constitutivamente, em todos os tecidos, peptídeos catiônicos que possuem ação antimicrobiana. Dentre esses peptídeos, foi isolada

uma família denominada defensinas de plantas, assim nomeada devido à sua semelhança com as defensinas animais. Estas tem um importante papel na defesa do organismo, rompendo membranas de microrganismos e agindo como ligantes para reconhecimento e sinalização celular, além de terem capacidade de regular processos metabólicos, como o crescimento de estruturas nas plantas (Stotz, H. *et al.* 2009).

Os animais têm, como as plantas têm para cada uma de suas espécies, particularidades na sua capacidade de responder aos patógenos. Porém, todos possuem um mecanismo de defesa considerado como sendo o mais primitivo: a imunidade inata. A imunidade adaptativa só aparece juntamente com os vertebrados. Analisando primeiramente os animais que não possuem notocorda no seu desenvolvimento embrionário, pode-se notar que estes possuem células capazes de se mover livremente e que apresentam algumas funções compartilhadas com células sanguíneas de vertebrados. Essas células dos invertebrados são chamadas de hemócitos (Hartestein, V. 2006). Ainda que o sistema imunológico adquirido não esteja presente nos animais invertebrados, estes possuem uma forma de defesa eficiente contra patógenos, que envolve mecanismos como a síntese de diversos AMPs, lectinas, espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio, moléculas do tipo citocina e do tipo complemento, além de intermediários quinoides de melanina, que são mecanismos semelhantes aos da imunidade natural dos vertebrados.

A primeira linha de defesa desses animais contra os possíveis patógenos são os AMPs e as proteínas citotóxicas produzidas por células epidérmicas. Além da produção dessas moléculas, epiderme atua também como uma barreira mecânica e, caso os microrganismos sejam capazes de encontrar uma maneira de penetrá-la, as células que possuem função efetora na defesa do animal passam a ser responsáveis pela eliminação do patógeno (Nappi A. J. *et al.* 2000).

Em animais não-celomados, como esponjas, água-vivas e planárias, são encontradas células com capacidade fagocítica que se movem livremente, chamadas amebócitos, encontradas na sua mesoglea, interstício e parênquima, respectivamente. (Hartestein, V. 2006). Essas células tem como função a nutrição e, possivelmente, a defesa do organismo (Dzik, J. M. 2010).

Esponjas, aqui utilizadas como exemplo de animais não-celomados, são animais filtradores e, portanto, estão expostas a um variado contingente de microrganismos,

necessitando de estruturas nos amebócitos que os reconheçam. Essas células dos poríferos exercem tanto um papel relacionado à nutrição como um papel de proteção do organismo. mesmo sendo pertencente ao clado mais basal dos animais (Hartestein, V. 2006), possuem moléculas associadas à resposta imune estruturalmente similares às encontradas em animais mais derivados. Além disso, mecanismos de reconhecimento de próprio e não próprio já estão presentes nesse grupo de animais. Testes com aloenxertos e autoenxertos em esponjas mostraram que autoenxertos se fundem ao local, sem observação de área de cicatriz. Entretanto, os aloenxertos formam área bem demarcada ao redor do enxerto, com região necrótica e posterior absorção (Müller W. *et al.* 1999), demonstrando capacidade imunológica de rejeitar o que não lhes é próprio. Em experimentos *in vitro*, foi observado que células de diferentes espécies, quando cultivadas na presença de fatores de agregação, são capazes de dar início à transdução de sinais que induzem a transcrição do gene do fator de crescimento de colônia de células pre-B (preB-cell colony-enhancing factor: PBEF). A similaridade desse gene nas esponjas e em humanos é de 55% e, em humanos, ele codifica a proteína PBEF, um fator solúvel que não é tecido-específico e que pode ter a sua produção induzida em linfócitos pela lectina (Dzik, J. M. 2010). Outro exemplo de molécula relacionada com o reconhecimento de estruturas próprias e não próprias é o fator inflamatório de aloenxerto 1 (AIF-1). Esponjas possuem genes que codificam uma proteína do tipo AIF-1 que, como nos vertebrados, possui um motivo de ligação de cálcio e um motivo característico de hormônios peptídicos (Dzik, J. M. 2010). A presença de ambos os receptores citados suporta fortemente a idéia de que esponjas tem reconhecimento de estruturas próprias (Humphreys, T. *et al.* 1994) e de estruturas não próprias (Müller W. E. G. *et al.* 1999).

Além disso, os poríferas são capazes de reconhecer e responder de forma diferenciada a lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas. Ao LPS, a resposta é dependente de proteínas de superfície chamadas de proteínas de interação com LPS: (LPS)-interacting protein. Essas proteínas, ao se ligarem com o LPS, dimerizam e interagem com a molécula adaptadora chamada MyD88 (resposta primária de diferenciação mielóide 88), que por sua vez possui dois domínios de ligação proteica: um domínio Toll/IL-1 (encontrado em MyD88 de TLRs de vertebrados) e um domínio de morte (encontrado em quinases associadas a receptores MyD88 e IL-1). Durante a interação dos receptores de superfície celular e o LPS,

estes não tem alteração na sua expressão, mas o MyD88 é regulado positivamente, juntamente com o gene que codifica uma molécula do tipo perforina (Wiens, M *et al.* 2005): uma proteína com função microbicida que possui sequência bastante similar à perforinas secretadas por macrófagos em mamíferos (Dzik, J. M. 2010). Outras proteínas relacionadas com a defesa do organismo e transdução de sinais encontradas em esponjas são muito semelhantes à encontradas em organismos mais derivados do filo Metazoa: após o reconhecimento do LPS pelos receptores (LPS)-interacting protein, a via de sinalização de p53 e c-JunK e a via do NFκB são ativadas (Dzik, J. M. 2010).

Em animais celomados invertebrados, o sistema vascular é bem desenvolvido e é possível encontrar hemócitos com diferenciações e funções bem definidas. Dentre essas células são encontrados os plasmócitos, que podem ser melhor comparados a monócitos/macrófagos de vertebrados por possuírem capacidade fagocítica e de encapsulamento de patógenos, além de serem responsáveis por remover resíduos celulares de células apoptóticas (Dzik, J. M. 2010). Além dos plasmócitos, é possível diferenciar hemócitos granulares (granulócitos), que possuem grande quantidade de grânulos de tamanho médio contendo produto enzimático. Similarmente aos dos vertebrados, esses granulócitos são encontrados em diferentes taxas na hemolinfa e, embora não se tenha ainda o conhecimento da função exata de cada uma das suas subclasses, essas células estão envolvidas em funções imunes como fagocitose, encapsulamento de patógenos e cura de ferimentos (Hartestein, V. 2006).

Artrópodes, animais nos quais a principal via de resposta aos agentes infecciosos é a imunidade inata, tem sido alvo de recentes estudos. Isso se deve, em parte, ao interesse em desvendar seus mecanismo efetores e regulatórios do sistema imunológico, com a finalidade de elucidar os mecanismos de resposta imune inata em humanos. Esses animais serão utilizados, aqui, como exemplo de animais celomados.

Mecanismos bem reconhecidos, como a via de Toll/IL-1 e de IMD/INF- γ , além de fatores de transcrição como os da família NFκB/Rel, bem como algumas citocinas e alguns AMPs, já foram identificados como sendo altamente ortólogos no gênero *Drosophila* e em mamíferos (Shandala, T. *et al.* 2012). O paralelismo desses genes ortólogos se estende para a imunidade de *Drosophila* spp., onde já houve demonstrações de que componentes intracelulares da via de sinalização dorsoventral e do ligante extra celular Toll (spätzle)

controlam a expressão do peptídeo com ação antifúngica: drosomicina, em adultos; mostrando alterações da sobrevivência desses insetos após a infecção fúngica (Lemaitre, B. *et al.* 1996).

Nos vertebrados, os principais componentes da imunidade inata são: as barreiras físicas, como os epitélios; agentes químicos, como produtos secretados pelas próprias células epiteliais, incluindo peptídeos com ação antimicrobiana; células fagocíticas, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas; células de linhagem linfocitária nas quais não há rearranjo somático de receptores, como células natural killers (NK); proteínas do sangue, como o sistema complemento e citocinas reguladoras da resposta imunológica, tanto inata como adaptativa, e da migração das células para os locais onde são mais necessárias (Abbas, A. *et al.* 2012).

A resposta imune inata tem um papel importantíssimo no controle e resolução das infecções. As barreiras epiteliais impedem mecanicamente a entrada de microorganismos no sistema, além de secretar componentes com ação microbicida direta para que os agentes invasores morram, antes mesmo de serem capazes de romper as barreiras. Isso ocorre em regiões recobertas de tecido epitelial, como a pele e o lúmen do sistema digestório, onde as células epiteliais produzem AMPs, de forma análoga ao que ocorre nos animais invertebrados e plantas. Caso ainda assim ocorra ruptura, o extravasamento de componentes celulares e o acúmulo de DAMPs dão início ao processo de inflamação, pelo qual os leucócitos e proteínas circulantes são atraídos para o local e podem iniciar seu papel na resposta imunológica (Abbas, A. *et al.* 2012).

Na entrada de patógenos no local onde houve, por exemplo, um corte, os fagócitos estão prontos para atuar de maneira a reconhecer esses agentes patogênicos por meio do reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs. Uma vez atraídos pelo início do processo inflamatório, essas células passam a ser responsáveis por amplificar a inflamação e determinar o padrão de resposta adaptativa.

Mesmo havendo divergências na literatura quanto à origem da imunidade nas plantas e nos animais, ou seja, se esses mecanismos foram todos herdados e desenvolvidos a partir de um ancestral comum desses dois reinos (Nürnbergger, T. 2004), ou se essa semelhança de receptores e respostas é devida a um processo de convergência evolutiva (Ausubel, F. 2005), observa-se que a resposta imune inata é eficiente em ambos, além de haver semelhanças das estruturas dos receptores, dos mediadores da resposta e das suas funções.

Entretanto, o processo evolutivo de cada um dos clados gerou particularidades em suas respectivas características do processo de defesa. Esses processos se desenvolveram em coevolução com o surgimento de patógenos capazes de infectar cada um dos organismos.

2. Peptídeos Anti-microbianos (AMPs)

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas efetoras importantes da imunidade inata, envolvidas na defesa do organismo, uma vez que a sua ausência aumenta a suscetibilidade a infecções, enquanto a sua super expressão ou a introdução de AMPs exógenos confere proteção contra doenças (Mookherjee, N. *et al.* 2007). São encontrados em todos os organismos pluricelulares, desde vegetais até animais vertebrados. Primeiramente, foram identificados como moléculas com atividade antimicrobiana em estudos com a hemolinfa de insetos. Ainda no início dos anos 80, estudos utilizando a espécie de mariposa *Hyalophora cecropia* mostraram dois componentes da hemolinfa desses animais. Esses componentes eram estruturas peptídicas e, já nessa época, foi observado que eles possuíam atividade bactericida para diversas espécies de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (Steiner, H. *et al.* 1981). Devido à essa ação, essas sequências peptídicas acabaram por ficar conhecidas por AMPs. Atualmente, além da atividade antibacteriana e o conhecimento de que essas moléculas possuem amplo espectro de ação, é reconhecida sua capacidade fungicida e a atuação contra vírus envelopados de peptídeos identificados em diversos seres vivos (Sørensen, O. *et al.* 2008).

Embora esses peptídeos apresentem diferenças em relação a suas estruturas, a maioria desses peptídeos possui sequências pequenas, entre 12 a 50 resíduos de aminoácidos (aa), carregadas positivamente, devido a presença de resíduos de arginina (Arg) e lisina (Lys). Essas sequências contêm até 50% dos aminoácidos da molécula hidrofóbicos (portanto possuindo características anfipáticas) (Hirsch, T. *et al.* 2008). Dessa forma, as famílias de AMPs (ou peptídeos catiônicos), são similares apenas pela sua capacidade de matar diretamente ou inibir o crescimento de micróbios (Lai, Y. *et al.* 2009). Essa similaridade consiste na capacidade desses peptídeos de interagir e de se inserir em biomembranas e exercer toxicidade direta aos microrganismos invasores (Mookherjee, N. *et al.* 2007).

Dependendo do tecido ou do tipo celular, essas sequências são expressas diferenciadamente: alguns são expressos constitutivamente, enquanto outros são expressos de acordo com os estímulos microbianos ou mediadores pro-inflamatórios. Mesmo tendo essa diferença na expressão nos diversos tecidos, eles normalmente são coexpressos e agem em conjunto.

Em geral, a expressão de AMPs é regulada positivamente no início da infecção, em resposta aos estímulos gerados pelos mediadores endógenos e exógenos da inflamação (Mookherjee, N. *et al.* 2007). Embora esses peptídeos sejam suficientemente potentes na sua ação microbicida, eles não mostram citotoxicidade relevante para as células que os produzem ou para o tecido onde estão presentes.

Como dentro do organismo diversos tipos AMPs são secretados simultaneamente, muitas vezes é possível encontrar várias sequências que tem seu espectro de atividade sobreposto (Lai, Y. *et al.* 2009). Sendo assim, é possível que, além de possuir menor capacidade de interação com as células teciduais para exercer alguma ação citotóxica, pode ser que a concentração necessária para causar danos às células do hospedeiro não ocorra *in vivo*. Havendo sobreposição de função dos peptídeos, mesmo que não seja encontrada uma grande quantidade de apenas uma sequência, a atividade microbicida ainda é eficiente. Isso indica a presença de alguma sinergia entre esses peptídeos e que realmente seja necessária uma concentração muito menor de cada um deles no local de infecção para que se possa obter uma capacidade microbicida mais alta do que observaríamos para cada uma dos peptídeos isoladamente (Sørensen, O. *et al.* 2008). A capacidade dos AMPs de interagir com diferentes membranas e receptores lhes confere a habilidade de proteger contra uma série de patógenos, limitar a sepse pela interação com endotoxinas (além da atividade microbicida) (Hirsch, T. *et al.* 2012; Schaubert, J. 2008) e até agir como agentes citotóxicos contra alguns tipos de tumor.

Outra possibilidade para a eficiência das propriedades anti-infectivas dos AMPs é a capacidade de regular o sistema imunológico. De fato, alguns desses peptídeos são capazes de conferir proteção ao hospedeiro por mecanismos de atividade indireta contra os patógenos. Após a ameaça patogênica, os AMPs criam um balanço do crescimento microbiano, estimulam a secreção de mediadores inflamatórios e são, além de tudo, capazes de atenuar as respostas inflamatórias quando estão exacerbadas. Para exemplificar as possibilidades de atuação dos AMPs, as duas famílias de AMPs de que se tem maior conhecimento da atividade

protetora do hospedeiro, as das defensinas e as catalecidinas (Auvynet, C. *et al.* 2009), serão descritas brevemente. Membros dessas duas famílias estão relacionados com a atividade antimicrobiana de fagócitos, com a produção de mediadores pró-inflamatórios e com a regulação de secreções epiteliais (Ganz, T. 2003).

As defensinas são peptídeos com importante ação microbicida, que estão amplamente distribuídos em células do epitélio e em fagócitos, ambos de mamíferos e, geralmente, são observadas em altas concentrações, na ordem de milimolar (Ganz, T. 2003). As formas maduras desses peptídeos possuem de 28 a 44 aa, com propriedades catiônicas e contêm de 6 a 8 resíduos de cisteína, que são evolutivamente conservados e favorecem a formação de ligações dissulfeto dentro da molécula (Radek, K. *et al.* 2007). As defensinas podem estar separadas em três classes, de acordo com a posição dos seis resíduos de cisteína formadores das ligações dissulfeto: α -defensinas, β -defensinas e θ -defensinas. Todas as classes de defensinas são sintetizadas como “prepropeptídeo” e são processadas em vários níveis, dependendo do local de expressão (Selsted, M. *et al.* 2005).

As α -defensinas foram identificadas em diversas espécies de mamíferos. Elas possuem três ligações dissulfeto entre os resíduos 1-6, 2-4, 3-5 e são encontradas nos leucócitos, no trato gastrointestinal e no trato urogenital. Nas células do sistema imune, estes peptídeos são encontrados nos grânulos azurófilos de neutrófilos como peptídeos maduros, com massa molecular de 3 kDa (Radek, K. *et al.* 2007). Embora essa classe de peptídeos seja diferente das β -defensinas em relação a sua estrutura linear e localização dos resíduos onde ocorrem as ligações dissulfeto, a estrutura terciária de ambas as classes é muito semelhante (Selsted, M. *et al.* 2005).

As β -defensinas são cadeias de aminoácidos com seis motivos de cisteína, ligadas por três ligações dissulfeto, alinhadas da seguinte forma: 1-5, 2-4 e 3-6. Esses peptídeos são produzidos constitutivamente por células epiteliais, porém sua produção pode ser estimulada pelo processo inflamatório (Radek, K. *et al.* 2007).

Outra classe de defensinas é a das θ -defensinas, um peptídeo com estrutura cíclica, que o torna bastante diferente das demais. Esses peptídeos foram identificados em diversas espécies de macacos do “velho mundo” e em orangotangos, mas não foram identificados em humanos (Nguyen, T. *et al.* 2003).

Embora o mecanismo pelo qual as defensinas são capazes de matar os microrganismos não esteja muito bem definido, o modelo aceito é o que aponta para a capacidade desses peptídeos de desestabilizar a membrana, formando poros. (Radek, K. *et al.* 2007). Além dessa atividade microbicida e antiviral, as defensinas tem diversas atividades imunomodulatórias. Elas podem induzir a produção de prostaglandinas e a liberação de histamina pelos mastócitos (Befus, A. *et al.* 1999), indicando um papel na resposta alérgica; atuar como fatores quimioatrativos para células dendríticas e linfócitos T de memória e queratinócitos; e estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Niyonsaba, F. 2007).

Peptídeos encontrados em plantas e em animais, que possuem de 6 a 8 resíduos de cisteína, também são chamados de defensinas. Eles possuem funções protetoras e regulatórias em todos os organismos onde estão presentes.

As catalecidinas são caracterizadas por possuírem um domínio catalina de 98 a 114 resíduos de aminoácidos (aa.) na sua forma inativa (Zanetti, M. *et al.* 1995). Esses peptídeos são encontrados em diversas espécies de vertebrados, sendo normalmente armazenados em grânulos de células mielóides. Uma vez liberados dos grânulos, enzimas ativas presentes no meio extracelular os quebram e a porção c-terminal do peptídeo é liberada do seu domínio catalina, transformando-o na sua forma ativa (Scocchi, M. *et al.* 1992). Como diferentes enzimas são capazes de atuar na molécula em pontos específicos, diversas sequências de catalecidinas, que podem variar de 12 a 80 resíduos de aminoácidos, são originadas com uma grande variedade de estruturas secundárias (Zanetti, M. 2004). Os peptídeos dessa família que são mais bem distribuídos entre os vertebrados são moléculas lineares, com de 23 a 37 resíduos de aminoácidos, que se dobram em α -hélices anfipáticas quando próximos a ambientes que mimetizam membranas biológicas (Zanetti, M. 2004).

Os peptídeos da família das catalecidinas, assim como as defensinas, possuem propriedades microbidas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e atividade antiviral para vírus envelopados (Zanetti, M. 2004). Na presença do estímulo patogênico, a expressão desses peptídeos é regulada positivamente (McMahon, L. *et al.* 2011), deixando claro o seu papel na defesa do organismo. Além das propriedades de defesa, esses peptídeos tem capacidade quimiotática para leucócitos, atuam em receptores celulares estimulando as células a responderem mais eficientemente às infecções e de regular a resposta

imunológica, de controlar o processo inflamatório e auxiliar no processo de angiogênese, além de estimular as células epiteliais no processo de fechamento de lesões (Zanetti, M. 2004).

Resumidamente, os AMPs, dentre os quais as duas classes mais conhecidas são as defensinas e catalecidinas, tem um papel importante na imunidade inata e na mediação da resposta adaptativa. Eles são regulados positivamente na presença de PAMPs e DAMPs, atuam na toxicidade direta aos microrganismos e vírus, se ligam a produtos microbianos, como as endotoxinas, regulam a produção de mediadores inflamatórios pelas células, agem como substâncias quimiotáticas e ainda são capazes de auxiliar na modulação do processo inflamatório e na reestruturação dos tecidos lesados. Essas atividades podem ser observadas em todos os organismos de diferentes espécies. Em glândulas de veneno de animais, foram encontrados peptídeos com funções semelhantes às dos AMPs. Peptídeos desse tipo também têm sido descritos na peçonha de escorpiões, onde, por meio de um mecanismo não-específico, inibem o crescimento de uma grande variedade de microrganismos, incluindo vírus, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários e fungos.

3. Macrófagos

Macrófagos são células da imunidade inata que, juntamente com as células epiteliais e neutrófilos, são capazes de produzir AMPs e tem essa produção regulada de acordo com o microambiente do tecido onde estão presentes. Além disso, a sua ativação é influenciada pela presença desses peptídeos. Essas células fazem parte do sistema fagocitário mononuclear, um subgrupo de leucócitos que foi originalmente descrito como pertencente à linhagem das células mielóides da medula óssea. Uma vez diferenciada, a célula precursora dá origem aos monócitos, células circulantes no sangue que possuem um núcleo ovóide, em forma de rim ou ferradura, geralmente excêntrico. Devido ao arranjo pouco denso de sua cromatina, o núcleo dos monócitos se apresenta de cor clara, contendo dois ou três nucléolos que, por vezes, podem ser observados em esfregaços comuns de sangue. Seu citoplasma é basófilo e contém grânulos azurófilos finos, que podem preencher todo o espaço intracelular, conferindo-lhe uma coloração cinzenta. A superfície dessa célula apresenta muitas

microvilosidades e diversas vesículas de pinocitose (Junqueira, L. *et al.* 2008). Monócitos são, sobretudo, células imunes efectoras, com capacidade de expressar citocinas pró-inflamatórias e que possuem receptores de quimiocinas, que os atraem para seu sítio de atuação e moléculas de adesão na sua superfície, que favorecem sua fixação ao endotélio vascular, o que possibilita a sua migração para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos. Os monócitos permanecem no sangue e, enquanto células circulantes, não se proliferam. Uma vez diferenciados, os macrófagos tem como função primordial reconhecer, internalizar e eliminar os agentes invasores. Outra função importante é a de sinalização para as demais células do sistema imunológico, por meio de citocinas. Isso lhes confere um papel de extrema importância na montagem da resposta aos patógenos pois, além da atividade fagocítica, produzem mediadores que atuam tanto na inflamação quanto na cicatrização e remodelagem de tecidos, bem como na sinalização para as células da imunidade adquirida. Os macrófagos podem se proliferar, quando em meio aos estímulos propícios (Jenkins, S. J. *et al.* 2011), para exercer suas funções de forma mais eficiente.

Em cada tecido, os macrófagos residentes tem grande variedade de morfologia e até mesmo de função (Geissman, F. *et al.* 2012). Ambas as características podem ser determinadas pelo próprio tecido ou pelo seu micro ambiente imunológico (Mantovani, A. *et al.* 2007). Algumas das células residentes, mesmo sendo consideradas macrófagos, não são advindos de um precursor na medula óssea, mas sim da diferenciação a partir de tecidos embrionários, como no caso das células de Langerhans, no fígado, e células da microglia, no sistema nervoso central. A manutenção do número dessas células independe da migração de monócitos circulantes em situação normal. Entretanto, elas coexistem com células diferenciadas a partir do precursor medular. Não se sabe qual é diferença entre essas duas populações de macrófagos em relação a sua função no tecido onde se encontram (Davis L. *et al.* 2013). Os macrófagos residentes, independentemente de suas origens, tem como função primordial manter a homeostase dos tecidos. Para que isso se realize, vários estímulos são necessários, como o encontro dos ligantes dos seus PRRs e o estímulo de citocinas. Estas podem fazer com que esse tipo celular possa se diferenciar em 2 grupos: os macrófagos classicamente ativados (M1) ou os macrófagos com ativação alternativa (M2). Esses são nomeados de acordo com a nomenclatura dada à resposta das células T helpers, que auxiliam na atuação de outras células de acordo com as citocinas que liberam: T_h1 (com perfil pró-

inflamatório) e T_h2 (com um perfil mais anti-inflamatório), respectivamente (Varin, A. *et al.* 2009). Os macrófagos M1 tem fenótipo IL-1^{high}, IL-23^{high} e IL-10^{low}. Eles são produtores eficientes de moléculas efetoras (espécies reativas de oxigênio) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e participam como indutoras e efetoras da resposta T_h1 (Montovani, A. *et al.* 2007), além de mediar a resistência contra uma variedade bactérias, protozoários e vírus, e de mediar respostas antitumorais (Murray, P. *et al.* 2011). Os macrófagos M2 possuem um fenótipo IL-12^{low}, IL-23^{low}, IL-10^{high} (Montovani, A. *et al.* 2007), podendo secretar grandes quantidades de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, em resposta ao estímulo do receptor da porção constante de imunoglobulinas (FcR γ) (Murray, P. *et al.* 2011). Eles geralmente tem grande quantidade de receptores do tipo *scavengers*, manose e galactose. Os macrófagos M2 são um grupo heterogêneo de células que, muitas vezes, participam da resposta T_h2, promovendo a morte e encapsulamento de parasitas e que, também, estão presentes no estabelecimento de tumores e na sua progressão, além do remodelamento dos tecidos (Montovani, A. *et al.* 2007). Embora seja um grupo heterogêneo, pois são classificados como M2 todos os macrófagos que tem ativação diferente da clássica, os macrófagos ativados alternativamente tem sempre um papel imunossupressor (Murray, P. *et al.* 2011).

Tradicionalmente, os macrófagos respondem da seguinte forma: uma vez sofrida a injúria do tecido, os macrófagos residentes reconhecem os microrganismos, ou as moléculas associadas a danos (PAMPs ou DAMPs), por meio dos seus receptores localizados na membrana plasmática (PRRs) (Chen, G. Y. *et al.* 2010; Davies L. C. *et al.* 2013). O contato do antígeno com essa célula fagocítica desencadeia dois acontecimentos: primeiro, a amostragem química do alvo por meio do recrutamento do receptor e, depois, a exploração do alvo pela membrana plasmática. O recrutamento e a oligomerização dos receptores que reconhecem constituintes químicos específicos do alvo o prende à superfície do fagócito e inicia algumas sinalizações intracelulares como, por exemplo, quando o TLR4 reconhece o lipopolissacaródeo (LPS) de bactérias Gram-negativas e sinaliza, via MyD88, ativando o fator de transcrição NF- κ B (Underhill, D. M. *et al.* 2012), que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, IL-1 e IL-6 e de quimiocinas (citocinas quimioatrativas) (Abbas, A. K. *et al.* 2012). Essas citocinas atuam não apenas nas células do sistema imunológico, mas também em tecidos como o mesotélio, onde há dilatação dos vasos

sanguíneos e aumento do espaço intercelular (o que favorece o extravasamento do plasma sanguíneo), além da expressão de moléculas de adesão, como selectinas e ICAM-1. As citocinas quimioatrativas sinalizam facilitando a migração das células para o local de inflamação e as moléculas de adesão se ligam às integrinas encontradas na membrana dos leucócitos, ocasionando o rolamento dessas células pelo endotélio, até que fiquem aderidas firmemente, evento mediado pela ligação das integrinas $\beta 1$ e $\beta 2$ com as moléculas de adesão ICAM- 1 e VCAM-1 endoteliais, para que possam entrar no tecido por diapedese. As quimiocinas produzidas no local de inflamação sinalizam para que as células que estão atravessando as paredes dos vasos sanguíneos possam encontrar o local no qual são necessárias (Esche, C. *et al.* 2005) . Assim, esses mediadores atuam nas células dos vasos sanguíneos e, dessa forma, permitem que os componentes celulares e não celulares do sistema imunológico cheguem ao local onde houve o dano tecidual.

Dentre os leucócitos recrutados para o tecido estão os monócitos que, após a migração para o tecido, maturam e se diferenciam em macrófagos efetores, tornando-se a população dominante nesse local (Davies L. *et al.* 2013). Estes macrófagos tem um perfil pró-inflamatório, liberando mediadores como o TNF, óxido nítrico (NO) e IL-1, além de produzir IL-12 e IL-23, citocinas decisivas na montagem das respostas T_h1 e T_h17 (Murray, P. *et al.* 2011). Os mediadores inflamatórios como o NO, produzidos e liberados no tecido, tem grande importância devido à sua capacidade microbicida, porém as células circundantes também sofrem danos, o que pode levar a um processo inflamatório exacerbado. É necessário, então, que haja um controle negativo na regulação da inflamação.

Uma das formas de controlar o processo inflamatório é pela atuação dos próprios macrófagos recrutados, que além da sua ação fagocítica e do seu papel na imunidade contra microrganismos, podem ter o seu perfil de ativação alterado e exercer um papel regulatório. Como já citado, as células M2 são uma população heterogênea, com múltiplas possibilidades de ativação, mas todas relacionadas com o controle e supressão da resposta inflamatória. Muitos fatores podem influenciar a mudança da predominância dos macrófagos de perfil M1 para os de perfil M2. Parte da função dessas células na resposta local é a fagocitose de corpos apoptóticos. Esse processo contribui para a alteração do fenótipo pró-inflamatório dessas células para o fenótipo anti-inflamatório, que promove a diferenciação das células musculares

em conjunto com uma alta produção do fator de transformação do crescimento (TGF- β), um potente supressor da ativação clássica dos macrófagos e mediador fundamental do crescimento dos tecidos. Outra razão da alteração do perfil para M2 é a produção de glucocorticóides induzida pelo dano tecidual (Nathan, C. *et al.* 2010; Wynn, T. *et al.* 2010). Entretanto, o fator que tem a maior influência na ativação alternativa dos macrófagos é a IL-4, citocina característica da resposta celular T_h2. Os macrófagos com ativação alternativa atuam na resolução da inflamação por meio da produção de fatores de crescimento, como o TGF- β 1 e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que estimulam as células epiteliais e fibroblastos. Dessa forma, essas células contribuem para a regeneração dos tecidos e para o reparo da ferida, promovendo a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, estimulando a síntese intersticial de colágenos fibrilares, induzindo a produção de matriz extracelular (MEC), além de promover o aumento da produção de inibidores de mieloproteinasas (TIMPs) pelo tecido, para que se interrompa a degradação da MEC (Murray, P. *et al.* 2011).

Os macrófagos M2 também são capazes de regular a cura da lesão tecidual, independentemente da sua interação com os miofibroblastos. Eles são capazes de produzir suas próprias metaloproteases de matriz (MMPs) e TIMPs, secretar quimiocinas que recrutam fibroblastos e outras células inflamatórias e expressar mediadores imunorregulatórios como Relm- α /Fizz1/Retnla, proteínas do tipo quitinase e óxido nítrico sintase (NOS)-2 ou arginase-1 (Arg-1), que alteram a magnitude e duração da resposta imune (Wynn, T. *et al.* 2010).

4. *Cryptococcus neoformans*

Macrófagos, juntamente com os neutrófilos, são células extremamente importantes na resposta imune inata contra fungos, sendo capazes de responder às infecções e, além da atuação na fagocitose, são capazes de sinalizar para outras células envolvidas na resposta imunológica, de forma a eliminar o patógeno. Entretanto, linhagens virulentas de *Cryptococcus neoformans* são capazes de modular a resposta desses macrófagos, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , e estimulando a produção de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10 (Abbas, A. K. *et al.*).

O *Cryptococcus neoformans* é um fungo basidiomiceto, considerado um patógeno oportunista, capaz de causar uma doença chamada cryptococose. Embora seja um fungo dimórfico, na maioria dos isolados clínicos e ambientais ele se apresenta como uma levedura protegida por uma capsula polissacarídica. Tendo sido isolado em diversos ambientes, o *C. neoformans* é um parasita facultativo, sendo encontrado em condições onde é capaz de reproduzir e dispersar propágulos fúngicos. Ele está distribuído em todo o mundo, e o fator mais associado com a dispersão é o guano de pombos, que serve de meio propício para a reprodução desse fungo (Nielsen, K. *et al.* 2007). Uma vez que o propágulos fúngicos, como os esporos formados durante a reprodução sexuada (Velagapudi, R. *et al.* 2009), entram em suspensão no ambiente, eles podem ser aspirados pelo hospedeiro. Quando entra na via respiratória do animal, o *C. neoformans* causa uma infecção nas vias aéreas do hospedeiro, podendo, dependendo da espécie, se restringir às vias aéreas superiores (Lin, X. *et al.* 2006) ou causar uma infecção do tipo pneumonia. A infecção causada pelo fungo é melhor descrita em humanos, embora animais como gatos, cães, bovinos, caprinos e roedores também foram relatados como hospedeiros do fungo com sintomas relacionados à cryptococose em cada uma dessas espécies (Lin, X. *et al.* 2006).

Em humanos, o *Cryptococcus neoformans* inalado se instala primeiramente nos pulmões. Uma vez no tecido, macrófagos residentes começam o processo de resposta, reconhecendo o patógeno e iniciando o processo de fagocitose. Como defesa para esse mecanismo, esse fungo possui uma cápsula formada por glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), que o protege, fazendo com que a fagocitose dos macrófagos não seja eficiente (Zaragoza, O. *et al.* 2010). Para que o processo de internalização desse patógeno ocorra, é necessário que anticorpos ou proteínas do sistema complemento o opsonisem. Uma vez que a célula passa a ser capaz de internalizar esse patógeno é formado um fagossomo, que passa por uma sequência de processos de maturação até virar um fagolisossomo (Brown, G. 2012). Neste local, o *C. neoformans* deveria ser morto e digerido, porém não é o que pode ser observado. Dentro do fagolisossomo a cápsula do fungo pode aumentar e produzir o pigmento melanina, conferindo uma maior proteção contra os processos enzimáticos que ocorrem na organela e, além disso, esse patógeno é capaz de se reproduzir nesse ambiente.

Apesar dos macrófagos não se mostrarem capazes de eliminar o *Cryptococcus neoformans*, em indivíduos imunocompetentes ele permanece habitualmente inerte no pulmão, isolado por granulomas. Quando um indivíduo passa por uma situação de debilidade do sistema imunológico, o organismo passa a responder à infecção fúngica menos eficientemente, não conseguindo controlar o crescimento da levedura e o *C. neoformans* pode cair na corrente sanguínea, caracterizando uma doença sistêmica. Uma vez circulante, esse microrganismo pode colonizar todos os tecidos do corpo, porém, por razões ainda não muito bem elucidadas, ele tem um tropismo pelo sistema nervoso central (Lin, X. *et al.* 2006).

Existem três teorias para explicar a forma como o *Cryptococcus neoformans* é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica: a primeira é o “cavalo de Tróia”, que diz que o fungo, por ser capaz de se reproduzir dentro do fagolisossomo dos macrófagos, atravessa a barreira dentro dessas células e, já no sistema nervoso, sai de dentro do leucócito e coloniza o tecido (Chrétien, F, *et al.* 2002); a segunda está relacionada com a capacidade desse fungo de se ligar às células do endotélio dos capilares da barreira hemato-encefálica e induzir alterações nessas células que permitem a travessia transcelular das leveduras (Chang, Y. *et al.* 2004); e a terceira é relacionada à capacidade desse fungo em alterar a matriz extracelular das células endoteliais, além de induzir mudanças morfológicas nas células do endotélio, permitindo sua travessia (Chen, S. *et al.* 2003). Dessa forma, o fungo é capaz de causar meningoencefalite, que é a forma mais grave da doença. Nesse período, o tratamento é bastante complicado e o prognóstico é grave.

5. Escorpiões

Peptídeos semelhantes aos AMPs de mamíferos já foram encontrados em glândulas de veneno de uma grande variedade de espécies, incluindo nas glândulas de peçonha de escorpiões. Alguns desses peptídeos encontrados possuem capacidade de modular a resposta inflamatória, com a regulação da expressão de citocinas e outros mediadores da inflamação (Fialho, E. *et al.* 2011; Zoccal, K. *et al.* 2013).

Escorpiões são artópodes venenosos, membros da classe Arachnida e ordem Scorpiones. Estes animais podem ser encontrados em todos os continentes, com exceção da

Antártica (Petricevich, V. 2010). São de grande relevância médica, devido aos acidentes que causam envenenamento causados por espécies, principalmente, da família Buthidae, que podem levar à morte, especialmente em crianças (Marcussi, S. *et al.* 2011).

Os escorpiões estão dentre as espécies viventes mais antigas sobre o planeta. Durante a sua existência, eles desenvolveram uma grande variedade de substância biologicamente ativas, com propriedades tóxicas e farmacológicas, que são utilizadas por esses animais como mecanismo de defesa e obtenção de alimentos (Marcussi, S. *et al.* 2011). Sua peçonha é constituída por toxinas com três ou quatro ligações dissulfeto, que podem interagir especificamente com canais iônicos incluindo os canais permeáveis a Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} . Além disso, a peçonha de escorpiões contém enzimas, nucleotídeos, lipídios, e pequenos peptídeos sem ligações dissulfeto. Estas moléculas podem participar de diversas atividades biológicas, sendo hemolítica, imunomoduladora e microbicida (Rates, B. *et al.* 2008).

Sendo assim, é justificável a utilização desses pequenos peptídeos derivados da peçonha de escorpiões como uma forma terapêutica para micoses causadas por fungos oportunistas, como o *C. neoformans*, que são responsáveis por um grande número de óbitos em pacientes imunocomprometidos.

Os peptídeos isolados dos invertebrados atuam de maneira diferente dos antibióticos e fármacos quimioterapêuticas usadas atualmente. Eles são menos tóxicos e mais efetivos contra microrganismos multiresistentes (Dai, C, *et al.* 2008). Embora a ação protetora contra microrganismos patogênicos tenha sido relatada, a interação destes peptídeos com as células responsáveis pela defesa do organismo de mamíferos ainda é pouco conhecida. Tendo isso em mente, foram testados, neste trabalho, seis peptídeos identificados na peçonha de escorpiões quando a sua atividade hemolítica, citotóxica, fungicida e imunomodulatória.

III. Objetivos

1. Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico de peptídeos derivados da peçonha dos escorpiões *Tityus obscurus*, *Tityus serrulatus* e *Hadrurus gerstchi* para a criptococose, levando em consideração as ações microbicida e imunomodulatória desses peptídeos.

2. Objetivos específicos

1. Verificar a possível atividade hemolítica de cada um dos peptídeos;
2. Verificar a capacidade citotóxica de cada um dos peptídeos para macrófagos murinos;
3. Caracterizar a possível capacidade microbicida de cada um dos peptídeos para o fungo *Cryptococcus neoformans*;
4. Conhecer o potencial imunomodulatório dos peptídeos;
5. Propor um novo potencial terapêutico para a criptococose.

IV. Material e métodos.

1. Peptídeos

As sequências preditas correspondentes aos peptídeos utilizados foram todas traduzidas *in silico* obtidos a partir de bibliotecas de cDNA de glândulas de peçonha de diferentes espécies de escorpiões. Os peptídeos 1, 4, 5 e 6 foram identificados na espécie *Tityus obscurus*, enquanto o AP2 precursor (AP2p) foi adquirido a partir da biblioteca de cDNA de *Tityus serrulatus* e o peptídeo NDBP-5.6 (peptídeo sem ponte dissulfeto, família 5.6) foi proveniente da peçonha da espécie *Hadrurus gerstchi*. Os peptídeos foram sintetizados pela empresa GenOne Soluções em Biotecnologia.

Esses peptídeos foram solubilizados em água, na concentração de 10mg/mL e mantidos a -20° C. Para os ensaios, alíquotas foram diluídas para a concentração de 500 µM.

Algumas dos peptídeos dos peptídeos utilizados neste trabalho estão em processo de pedido de patente pelo grupo de toxinologia da Universidade de Brasília, liderado Dra. Elizabeth Schwartz, pela rede centro-oeste INOVATOXIN. Por esta razão não serão mostradas as suas estruturas primárias.

2. Animais

Para todos os testes de atividade dos peptídeos em macrófagos foram utilizadas células peritoneais de camundongos BALB/c. No total foram utilizadas 18 fêmeas dessa linhagem, com idade de 6 a 12 semanas. Esses animais foram mantidos no Alojamento de Animais, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, com água e comida *ad libitum*.

Todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, com os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB).

3. Teste da atividade hemolítica

Para testar a capacidade hemolítica de cada um dos peptídeos foi utilizada uma suspensão de hemácias humanas frescas, coletadas em um tubo Vacutainer® com EDTA, de doadores saudáveis, com os procedimentos de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB). As hemácias foram centrifugadas a 800 g, por 5 min a temperatura ambiente, e então lavadas com PBS até que o sobrenadante, após a centrifugação, se apresentasse transparente, assim como a solução salina utilizada. Foram feitas, então, duas soluções com 3% de eritrócitos, cujos veículos eram PBS e água destilada estéril, sendo utilizadas como controle negativo e positivo de hemólise, respectivamente.

Os peptídeos, já em uma concentração estoque de 500 μM , foram utilizados em concentrações de 0,78 μM a 100 μM , sempre geradas a partir de diluição seriada com fator 2, em água destilada estéril, em placas de 96 poços. Em cada poço, foram utilizados 50 μL da mistura de peptídeo na diluição desejada, adicionados de 50 μL da suspensão de hemácias em PBS. A placa foi deixada pra descansar por uma hora em temperatura ambiente.

Após o tempo de espera, a placa foi centrifugada a 800 g por 5 min. O sobrenadante foi recolhido cuidadosamente e transferido para outra placa de 96 poços, de fundo chato, para ser lida em uma leitora de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram obtidos a partir a equação:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{DOs} - \text{DO}_0) / (\text{DO}_{100} - \text{DO}_0) \times 100,$$

sendo “DOs” a densidade óptica da amostra, “DO₁₀₀” a densidade óptica do controle positivo para hemólise (hemácias diluídas em água) e “DO₀” é o controle negativo de hemólise (hemácias diluídas em PBS, assim como utilizado para o teste com os peptídeos) (Nahar, M. *et al* 2008; Italia J. *et al.* 2009).

4. Teste da atividade citotóxica em macrófagos murinos

Nesse teste foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, fêmeas, obtidos por meio de lavagem peritoneal com 10 mL de RPMI-1640, com adição de bicarbonato de sódio. Para isso, os animais receberam injeções intraperitoneais de tioglicolado a 4% e permaneceram no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) por 4 dias, com água e alimento *ad libitum*.

As células recolhidas foram centrifugadas a 300 g por 5 min na temperatura de 4° C. O sobrenadante foi dispensado e o pellet ressuspendido no mesmo tipo de meio usado para coletá-las. Esse procedimento foi realizado mais duas vezes, porém, na última vez, as células foram ressuspendidas em meio RPMI-1640 suplementado com bicarbonato de sódio e 2% de soro fetal bovino (SFB). Em 10 µL dessa mistura foi adicionada a mesma quantidade do corante azul de Tripan e foi feita a contagem das células no contador de células automático Luna Cell Counter® (Logos Biosystems). A concentração da suspensão foi ajustada para 4×10^6 células/mL, para que houvesse 2×10^5 células/poço, na placa de 96 poços. Esta, foi armazenada em uma estufa úmida a 37° C, com 5% de CO₂, por 24h, para que as células pudessem se aderir à placa. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas foram consideradas macrófagos. Foi colocado, então, 50µL de meio de cultura em cada um dos poços.

Os peptídeos foram diluídos diferenciadamente, de acordo com a atividade hemolítica verificada. Os peptídeos 1 e 5 foram utilizados nas concentrações de 0,78 µM a 50µM, os peptídeos 2 e 4 de 0,78 µM a 25 µM, para o peptídeo 6 apenas as concentrações de 0,78 µM a 12,5 µM, enquanto que para o peptídeo 9 todas as concentrações utilizadas no ensaio de atividade hemolítica foram mantidas. As diluições seguiram o mesmo método: diluições seriadas com fator 2, de forma que cada poço com células recebesse 50 µL da solução na concentração desejada, sempre diluído em água, totalizando 100 µL de solução por poço. A placa retornou à estufa por mais 24 h.

Após esse período de incubação dos macrófagos peritoneais estimulados com os peptídeos, o sobrenadante de cada um dos poços foi recolhido e armazenado a -20° C. As células aderidas foram lavadas 3 vezes com PBS. Por último, 100 µL de PBS foram colocados

nos poços e depois foi adicionando 15µL de solução de lise 10x, contida no kit Cytotox 96® (Promega) e incubado por 45 min, segundo o protocolo do próprio fabricante para realização do ensaio de número total de células. A verificação da viabilidade celular foi feita por meio da dosagem da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH), que é liberada no meio extra celular apenas quando há ruptura da membrana plasmática. Então, foram recolhidos 50µL de cada poço após a lise das células e transferidos para uma placa de 96 poços, de fundo chato e 50µL do substrato foi adicionado em cada poço. Após 30 min, colocou-se 50µL da solução de parada e foi feita a leitura em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Como a coloração observada é proporcional à quantidade de células lisadas, nesse caso, a intensidade de cor vista é proporcional à quantidade de células que restaram no poços após as lavagens.

O percentual de viabilidade foi gerado a partir da fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = (DOs) / (DO_{100}) \times 100,$$

sendo “DOs” a densidade óptica da amostra e “DO₁₀₀” a densidade óptica do controle positivo para a viabilidade celular (células não estimuladas, viáveis).

5. Teste da capacidade microbicida

Para verificar a capacidade microbicidas dos peptídeos para o *Cryptococcus neoformans*, o experimento foi conduzido da seguinte forma: Uma colônia única da cepa H99, cultivada em Sabouraud dextrose ágar (SDA), foi colocada em um recipiente estéril, contendo o meio caldo Sabouraud dextrose (SD) e incubada a 37° C, sob agitação por 24h a 48h. Após o período de crescimento, esse microrganismo foi centrifugado em um tubo falcon de 50 mL, a 2500 rpm, por 5 min e o seu sobrenadante descartado. Então o pellet ressuspensionado em 25 mL de tampão fosfato-salino (PBS), estéril. Essa lavagem foi repetida mais duas vezes. Após descartar o sobrenadante pela última vez, o pellet foi ressuspensionado em meio RPMI-1640,

sem bicarbonato de sódio, com adição de MOPS. Uma alíquota foi corada com azul de Tripan e analisada no contador de células automático Luna Cell Counter® (Logos Biosystems). O inóculo foi ajustado a uma concentração de 2×10^4 cél/mL.

Os peptídeos foram diluídos em uma concentração estoque de 500 μ M para os experimentos. Três deles foram utilizados em concentrações de 0,78 μ M a 100 μ M, sempre geradas a partir de diluição seriada com fator 2, em água destilada estéril, em placas de 96 poços. Os demais foram diluídos a partir das concentrações do MIC₉₀, previamente determinadas (dados não apresentados), como mostra a tabela a seguir (Tabela 1). Cada poço continha 50 μ L da mistura de peptídeo ao final da diluição. Foram adicionados 50 μ L do inóculo na concentração ajustada e a placa foi incubada a 37° C, sob agitação por 24h e 48h.

Tabela 1: Mínima concentração inibitória dos peptídeos 2, 4 e 6. Resultados não publicados, cedidos gentilmente pela mestrandia Fernanda Costa, do programa de Biologia Molecular da UnB.

Peptídeos	MIC
2	19,9 (17,5 a 22,5)
4	27,3 (22,1 a 35,0)
6	6,0 (5,5 a 6,6)

Após o período de incubação, o meio de cultura de cada um dos poços foi diluído mil vezes e 100 μ L dessa diluição foi plaqueado em SDA. As placas foram incubadas a 37° C por 48h para que então fosse feita a contagem das unidades formadoras de colônia (CFU) e determinada a mínima concentração letal dos peptídeos para o *C. neoformans*.

6. Teste de capacidade microbicida de macrófagos estimulados.

Nesse ensaio, assim como descrito para o teste de atividade citotóxica em macrófagos murinos, as células foram obtidas por meio de lavado peritoneal, após 4 dias de estímulo com tioglicolato a 4%. Essas células passaram pelo mesmo procedimento desse ensaio, porém foram ajustadas para a concentração de 10^6 células/mL e 100 μ L dessa mistura

foi colocada em cada poço de uma placa de 48 poços. Após o período de 24 horas de adesão, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes consideradas macrófagos.

Foi preparado um inóculo de *Cryptococcus noformans*, de cepa H99, obedecendo o mesmo procedimento utilizado no teste da capacidade microbicida, contendo 2×10^6 células/mL, opsonizado com o anticorpo 18B7 (5µg/mL) (gentilmente cedido pelo Dr. Arturo Casadevall, AECOM/EUA), no mesmo meio de cultura utilizado para os macrófagos. A cada um dos poços da placa contendo macrófagos, foi adicionado 100 µL desse inóculo e a placa foi armazenada em estufa úmida a 37° C com 5% de CO₂, por 1h. Passado esse tempo, a placa foi lavada com PBS duas vezes, para remover os fungos aderidos e não internalizados, e uma vez com PBS mais fluconazol a 20 µg/mL.

Os peptídeos, assim como no ensaio descrito anteriormente, foram diluídos diferenciadamente, agora de acordo com a atividade citotóxica para as células utilizadas. Os peptídeos 1, 2 e 4 foram utilizados nas concentrações de 0,78 µM a 25µM; o peptídeo 5 de 0,78 µM a 12,5 µM; o peptídeo 6 nas concentrações de 0,78 µM a 6,25 µM; e para o peptídeo 9, as concentrações de 0,78 µM a 100 µM foram mantidas. As diluições seguiram o mesmo método: diluições seriadas com fator 2, de forma que cada poço com células recebesse 50 µL da solução na concentração desejada. A placa retornou a estufa até completar 24h.

O sobrenadante dos poços foi recolhido e armazenado a -20° C e a placa foi lavada com PBS 2 vezes e uma vez com PBS mais fluconazol a 20µg/mL, para a retirada do fungo que cresceu no ambiente extra celular. As células aderidas na placa foram, então, lisadas com uma solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 0,05% em água. O conteúdo de cada um dos poços foi recolhido em eppendorffs e centrifugado a 2500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 38,75 µL de PBS.

Para verificação da viabilidade dos fungos internalizados pelos macrófagos e para ser possível fazer uma comparação da atividade dos peptídeos, foi utilizado o 2H-Tetrazolium, 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-hydroxide (XTT), que verifica a viabilidade celular em função do potencial redox: o processo de respiração celular converte o XTT em cristais de formazan na coloração laranja, que são solúveis em água. Para isso, o pellet dos eppendorffs que foi ressuspensionado em 38,75 µL de PBS foi transferido para uma placa de 96 poços e foram acrescentados 10µL de XTT a 1mg/

mL e 1,25 µL de menadiona a 10 mM em cada um dos poços. Essa placa foi, incubada em uma estufa úmida a 37° C, com 5% de CO₂, por 4h, protegido da luz. Passado esse período, a placa foi lida em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm.

O percentual de viabilidade das das leveduras foi determinada por meio da equação:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO}_s - \text{DO}_0) / (\text{DO}_{100} - \text{DO}_0) \times 100,$$

sendo “DO_s” a densidade óptica da amostra, “DO₁₀₀” a densidade óptica do controle positivo de viabilidade (leveduras obtidas a partir do lisado de células que não receberam nenhum tratamento posterior à fagocitose) e “DO₀” é o controle negativo de viabilidade (obtido a partir do lisado de células que não foram infectadas com o *C. neoformans*).

7. Dosagem de citocina

A citocina utilizada como marcador de atividade pró-inflamatória é o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). Esta foi dosada nos sobrenadantes armazenados a -20° C, como descrito nos experimentos de teste de capacidade microbicida de macrófagos estimulados e de teste de atividade citotóxica em macrófagos murinos. Os sobrenadantes foram descongelado à temperatura ambiente e dosados utilizando-se o método *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), com o kit para essa citocina da R&D Systems®, seguindo as orientações do fabricante.

Brevemente: uma placa de 96 poços para ELISA foi sensibilizada com o anticorpo de captura e, após 12 horas, ela foi lavada com uma solução de PBS com 0,05% de Tween e os anticorpos foram bloqueados com solução de bloqueio para diminuir ligações não específicas. A amostra foi adicionada, incubada por um período de 2 h e, passado esse tempo, a placa foi lavada novamente. Um segundo anticorpo (anticorpo de detecção) foi adicionado, a placa foi incubada a temperatura ambiente por mais 2 h e passou mais uma vez pelo processo de lavagem. Nesse momento, adicionou-se o substrato da enzima conjugada ao

anticorpo de detecção e a placa foi novamente incubada por 30 min. Depois desse tempo, adicionou-se à placa a solução de parada para a reação e, então, realizou-se a leitura em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Os resultados foram obtidos a partir da comparação das leituras com uma curva feita com concentrações conhecidas, feita na mesma placa onde as amostras foram dosadas.

8. Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi feita segundo o método de Griess, um método colorimétrico que é capaz de identificar e quantificar a presença de NO₂⁻ em amostras biológicas por meio da leitura em um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm.

Brevemente, 100 µL das amostras foram depositadas em uma placa de 96 poços, juntamente com uma curva de concentrações conhecidas. À esses poços foi adicionado um volume igual da solução de Griess (Sufanilamida 1%, diluída em 5% de H₃PO₄ e naphthylethylenediamine dihydrochloride - NEED 0,1%, diluído em água destilada) e após 5 min a 10 min a placa foi lida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Os resultados foram obtidos a partir da comparação das leituras com uma curva feita com concentrações conhecidas, feita na mesma placa onde as amostras foram dosadas.

9. Teste de atividade citotóxica em monócitos humanos.

Neste ensaio, as células de linhagem imortalizada THP-1, [THP1] (ATCC® TIB-202™) uma linhagem de monócitos humanos, foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com bicarbonato de sódio e soro fetal bovino (SFB) a 10%, em uma estufa úmida a 37° C, com 5% de CO₂. Essas células foram centrifugadas a 300 g por 5 min e ressuspendidas em meio RPMI-1640, suplementado como descrito acima, e uma alíquota foi corada com azul de Tripán e para ser contada no contador de células automático Luna Cell

Counter® (Logo Biosystems). As células foram ajustadas para a concentração de 4×10^6 células/mL, para que houvesse 2×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços.

Os peptídeos, foram utilizados em concentrações de $0,78 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$, sempre geradas a partir de diluição seriada com fator 2, como já descrito. Cada poço continha $50 \mu\text{L}$ da mistura de peptídeo ao final da diluição. A esses poços, foram adicionados $50 \mu\text{L}$ da mistura de células e essa placa foi incubada na mesma estufa de crescimento das células, por 24h.

Para verificar a viabilidade celular, foi conduzido um ensaio colorimétrico com o brometo de [3(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium (MTT). Esse método baseia-se na capacidade das células viáveis intactas reduzirem o sal de tetrazólio por ação de enzimas succinato desidrogenase, mitocondriais ou citoplasmáticas. Para isso, foram adicionados, em cada um dos poços da placa. MTT o suficiente para que houvesse uma concentração de $500 \mu\text{g/mL}$. A placa voltou a ser incubada na estufa por 4h. Uma vez reduzido a cristais de formazan, o MTT torna-se insolúvel e com coloração púrpura no meio de cultura. A placa utilizada no experimento de viabilidade foi centrifugada a 300 g por 5 min para a sedimentação desses cristais e o sobrenadante foi recolhido. Os cristais foram dissolvidos em dimetilsulfoxido (DMSO) para a sua mensuração por meio de espectrofotometria, com o aparelho ajustado para fazer a leitura a 540 nm .

O percentual de viabilidade foi determinado segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO}_s - \text{DO}_0) / (\text{DO}_{100} - \text{DO}_0) \times 100$$

sendo “DO_s” a densidade óptica da amostra, “DO₁₀₀” a densidade óptica do controle positivo de viabilidade (células THP-1 cultivadas em meio RPMI com 10% de SFB) e “DO₀” é o controle negativo de viabilidade (poço contendo apenas o meio de cultura utilizado no ensaio).

10. Modelagem da estrutura molecular dos peptídeos.

Para essas análises, foram utilizadas ferramentas online de banco de dados de proteínas: Uniprot, Blast e RCSB PDB. Para o cálculo da provável estrutura tridimensional, baseado nos tipos de resíduos de aminoácido formadores da molécula foi utilizado o, NPS@: Network Protein Sequence Analysis, com acesso pelo site <http://npsa-pbil.ibcp.fr>. Os programas Modeller 9.12, mantido pela Ben Webb, e VMD 1.9.1, desenvolvido pela National Institutes of Health (NHI), foram utilizados para modelagem das moléculas.

11. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism®, versão 6.0, utilizando o método 2way ANOVA, para múltiplas comparações. O resultado foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

V. Resultados

Para averiguar a possibilidade de utilizar os peptídeos *in vivo*, testes preliminares de toxicidade, como os de capacidade hemolítica e de citotoxicidade para células de mamíferos, foram realizados para todos os peptídeos utilizados no trabalho.

Para a testar a capacidade cada um dos peptídeos de causar hemólise em eritrócitos humanos cada uma dos peptídeos foi colocado em contato com uma suspensão de hemácias em meio fisiológico. As concentrações de cada um dos peptídeos que se mostraram incapazes de causar hemólise acima de 50% foram utilizadas como ponto de corte para os demais experimentos com células de mamíferos.

Além do teste preliminar de atividade hemolítica, os peptídeos foram testados quanto ao seu potencial citotóxico para macrófagos peritoneais de camundongos, coletados 72 h após a injeção intraperitoneal de tioglicolato a 4%, e mantidas em estufa úmida a 37° C e 5 % de CO₂. Essas células foram utilizadas para o experimento 24 h após serem coletadas. O percentual de 50% de viabilidade celular, após 24 h de estímulo com cada um dos peptídeos testados, também foi utilizado como critério para que se pudesse considerar as concentrações de cada um dos peptídeos como adequadas para a possibilidade da utilização *in vivo*. Como um teste complementar, foram utilizadas células de linhagem imortalizada derivadas de monócitos humanos (THP-1) para a avaliação da viabilidade celular depois dessas células serem estimuladas por 24 h com o peptídeo 1 ou com o peptídeo 5.

A observação dos resultados das interações dos peptídeos testados com as células de mamíferos não se restringiram à capacidade citotóxica para essas células. Como peptídeos com potencial antimicrobiano também poderiam interagir com as células do sistema imunológico, a produção de citocinas por macrófagos murinos na presença dos peptídeos foi averiguada para a confirmação da hipótese do potencial modulatório dos peptídeos utilizados nesse trabalho. Para isso, foi feita a dosagem da citocina fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e de óxido nítrico (NO) com o intuito de avaliar a ativação da célula e perfil pró-inflamatório.

Por fim, experimentos para observar a capacidade microbicida dos peptídeos também foram conduzidos. Os testes de citotoxicidade para o *Cryptococcus neoformans* teve como objetivo julgar a eficiência dos peptídeos na diminuição carga fúngica *in vitro*. Nesses testes, foram observados os resultados das interações diretas entre o *C. neoformans* e cada um

dos peptídeos, colocados em contato por 24h e 48h. Além disso, como as sequências testadas poderiam ter ação na alteração da capacidade celular de eliminar o patógeno (referência?), foram observados os resultados das interações indiretas entre os peptídeos e o fungo, uma vez que o contato dos peptídeos seria com macrófagos que continham leveduras internalizadas.

Quatro dos peptídeos testados tem sequência de aminoácidos muito próximas: os peptídeos 1, AP2p, 4 e 5; e embora a diferença de suas sequências não ultrapasse o número de três resíduos de aminoácidos, os resultados encontrados apresentaram diferenças em relação a todos os parâmetros testados. Em um primeiro esforço para entender as diferentes ações dos peptídeos, principalmente entre o peptídeo 1 e o peptídeo 5, que possuem sequências de aa. muito similares, foram avaliados modelos das possíveis hélices, que auxiliariam na compreensão de algumas diferenças estruturais e utilizá-las para especular algumas das ações dos peptídeos 1, 5 e 6.

1. Peptídeo 1

Na avaliação da capacidade de causar a lise de eritrócitos humanos, o peptídeo 1 causou um percentual de hemólise abaixo de 50% até concentração de 50 μ M (Fig. 1 A). Isso indica a possibilidade de utilização desse peptídeo *in vivo*, quando baseando-se apenas nesse critério. Portanto, o teste seguinte, de capacidade citotóxica, foi realizado utilizando-se apenas concentrações de 50 μ M ou menores.

No teste de citotoxicidade para macrófagos murinos, as células foram estimuladas com concentrações do peptídeo 1 que variaram de 0,78 μ M a 50 μ M (Fig. 1 B). Apenas nas concentrações até 25 μ M foi observado um percentual acima de 50 % de viabilidade (Fig. 1 B). A citotoxicidade do peptídeo 1 também foi testada para uma linhagem de monócitos humanos: as células THP-1. Essas células apresentaram uma maior resistência ao peptídeo que os macrófagos murinos, mantendo a viabilidade celular acima de 50% nas concentrações até 50 μ M. Nesse teste, foi observada, ainda, uma diferença significativa da viabilidade entre a concentração de 100 μ M e de 50 μ M (Fig. 2 E).

No teste de atividade microbicida direta, as concentrações utilizadas foram de 12,5 μ M a 100 μ M (Fig. 1 C). Após ambos os períodos, a contagem de unidades formadoras

de colônia mostrou que nenhuma das concentrações testadas foi capaz de reduzir significativamente a contagem de colônias (Fig. 1 C). Sendo assim, o peptídeo 1 não demonstrou atividade microbicida relevante.

Os macrófagos murinos foram estimulados com o peptídeo 1 por 24 h nas concentrações de 0,78 a 50 μM para que fosse feita a dosagem da citocina TNF- α e da espécie reativa de nitrogênio. Nesse teste, foi observado que há uma queda significativa na produção de TNF- α , a partir da concentração de 12,5 μM . Além disso, mesmo na presença de lipolissacarídeo (LPS), que é um forte indutor da produção da citocina, o peptídeo 1, na concentração de 12,5 μM , foi capaz de reduzir a produção de TNF- α , quando comparado com a célula estimulada somente com LPS (Fig. 2 A). Entretanto, a produção de NO se manteve baixa em todas as concentrações. Isso mostra que o peptídeo não induz mudança na produção de NO, porém é capaz de inibir a produção de TNF- α .

Por último foi feito um ensaio de fagocitose com os macrófagos e, depois, essas células com o *C. neoformans* internalizado foram submetidas ao estímulo com o peptídeo 1 por 24 h. A viabilidade das unidades formadoras de colônia fagocitadas foi averiguada utilizando XTT. Aparentemente, a quantidade de propágulos fúngicos viáveis diminuiu conforme houve aumento da concentração do peptídeo, porém, diferença significativa só apareceu entre as concentrações 25 μM e 1,56 μM (Fig. 2 C). A partir do sobrenadante desse ensaio, foi dosada a citocina TNF- α e o resultado mostrou que não há diferença na produção da citocina nas células estimuladas com os peptídeos, quando essas dosagens são comparadas com as das células não estimuladas com os mesmos (Fig. 2 D).

O modelo dessa molécula mostra que ela é uma hélice anfifílica, com uma face polar e outra apolar (Fig. 13 B e C), com um ponto de quebra no meio da sequência (Fig. 13 D).

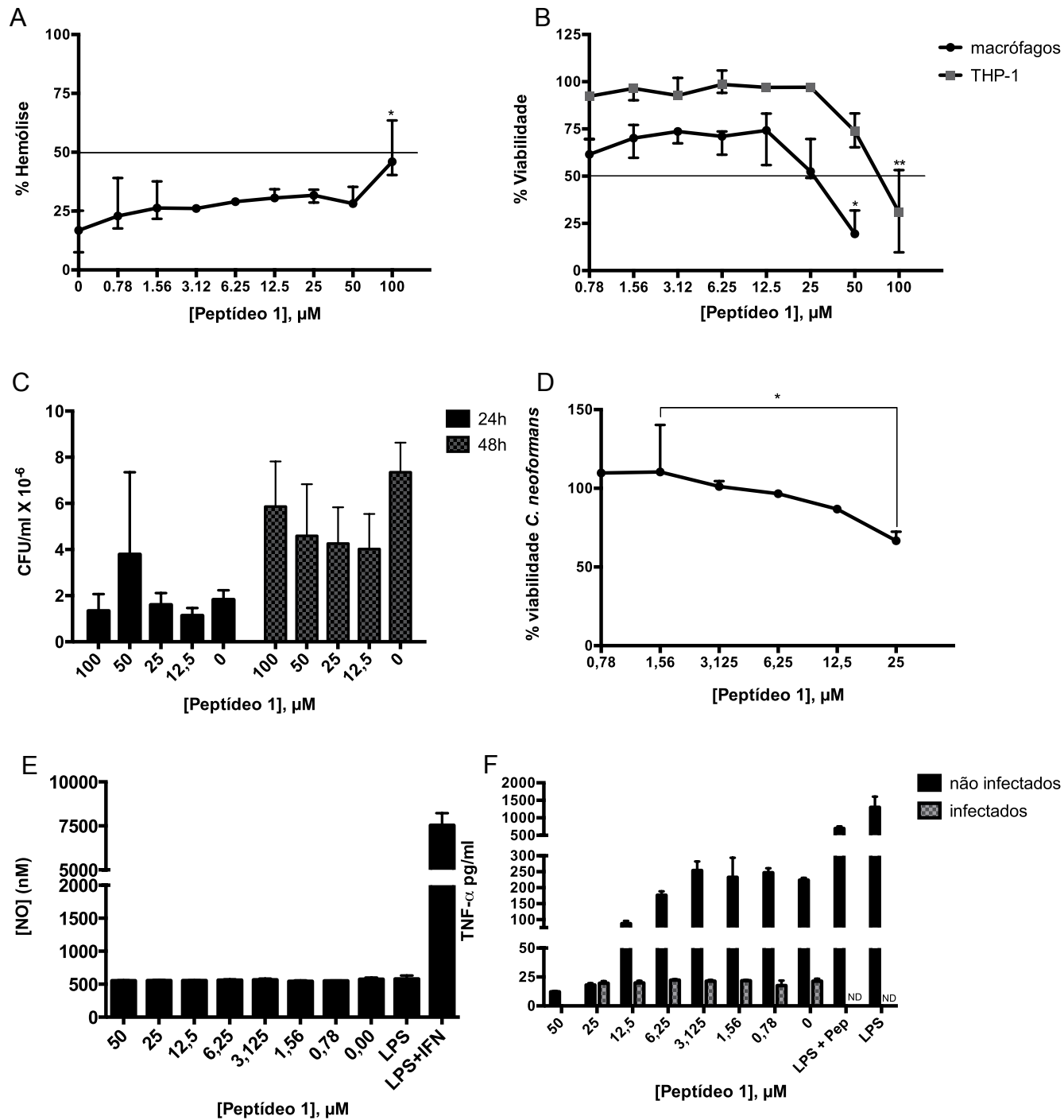


Figura 1. Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo 1.

O percentual de hemólise, causado pelo peptídeo 1, mostrando a diferença significativa entre as concentrações de 100 μM e 50 μM (A); O percentual de viabilidade dos macrófagos murinos e células THP-1, ambos os tipos celulares estimulados por 24 horas pelo peptídeo 1, mostrando, para o primeiro, que além da diferença estatística entre as concentrações de 50 e 25 μM , apenas a concentração de 25 μM atinge o percentual mínimo de viabilidade para que o peptídeo seja considerado não tóxico, e, para o segundo, o percentual de viabilidade das células apresentou diferença significativa entre as concentrações de 100 μM e 50 μM , com percentual de viabilidade acima de 50 % apenas nessa segunda concentração (B); a contagem de unidades formadoras de colônias de *Cryptococcus neoformans*, que permaneceram viáveis após o tratamento com o peptídeo por 24 h e 48 h (C); avaliação da capacidade imunomodulatória, com a dosagem de óxido nítrico (D) e de TNF- α , em células infectadas com o *C. neoformans* e não infectadas (E). Dado não disponível (ND). Valor de $p < 0,05$ (*).

DSC cccccc hhhhhhhhhhhh
 MLRC cccccc hhhhhhhhhccc
 PHD cccc hhhhhhhhhhhccc
 Sec.Cons. cccccc hhhhhhhhhccc

Sequence length : 17

Sec.Cons. :
 Alpha helix (Hh) : 10 is 58.82%
 3₁₀ helix (Gg) : 0 is 0.00%
 Pi helix (Ii) : 0 is 0.00%
 Beta bridge (Bb) : 0 is 0.00%
 Extended strand (Ee) : 0 is 0.00%
 Beta turn (Tt) : 0 is 0.00%
 Bend region (Ss) : 0 is 0.00%
 Random coil (Cc) : 7 is 41.18%
 Ambiguous states (?) : 0 is 0.00%
 Other states : 0 is 0.00%

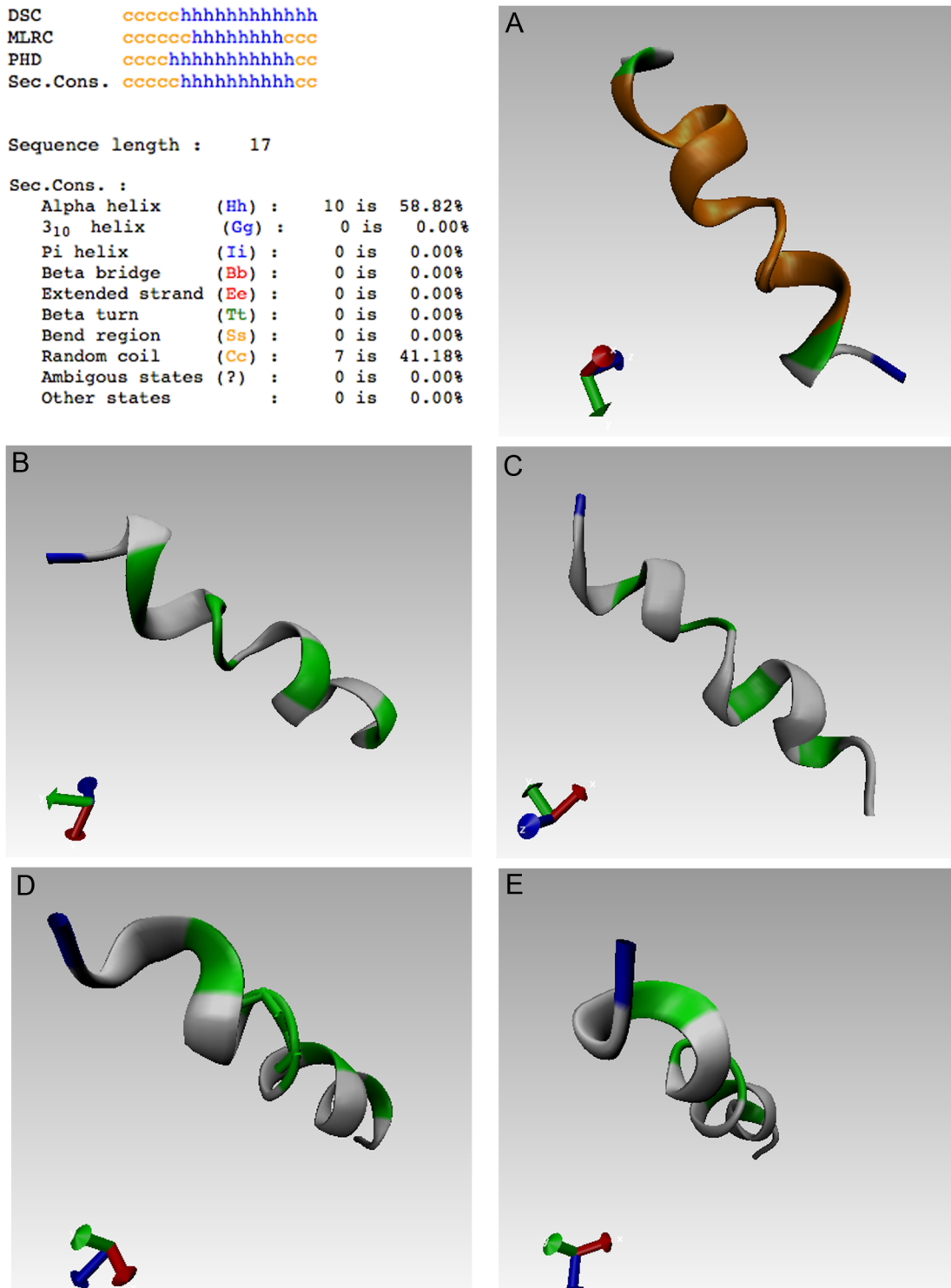


Figura 2. Modelo proposto de estrutura secundária para o peptídeo 1.

(A) em laranja, a estrutura predita dos resíduos de aa. que formam hélice; (B) Face hidrofílica da molécula (em verde); (C) face hidrofóbica da molécula (em cinza); (D) resíduos de glicina justapostos, formando ponto de fragilidade da hélice, (E) ponta positiva da molécula (em azul).

2. AP2p

No teste de hemólise com o peptídeo AP2p, observou-se que as concentrações até 25 μM poderiam ser consideradas seguras, não causando lise em mais de 50 % dos eritrócitos (Fig. 3 A). A concentração de 25 μM passou a ser, então, a concentração limite para os demais experimentos com células de mamíferos. Essa mesma concentração do peptídeo permitiu mais de 50 % de viabilidade para os macrófagos murinos utilizados no teste de citotoxicidade (Fig. 3 B). Nem essa nem as concentrações menores deste peptídeo foram capazes de induzir ou reduzir significativamente a produção de TNF- α ou a produção de NO (Fig. 4 A e B). Portanto, esse peptídeo não apresentou atividade modulatória.

Com relação à capacidade microbicida do peptídeo AP2p, o tratamento do *Cryptococcus neoformans* com o peptídeo foi avaliado através do teste de concentração inibitória mínima (MIC) e contagem de CFU. As concentrações capazes de reduzir 90 % o crescimento do fungo foram a partir de 19,9 μM (Tabela 1). Sabendo que a capacidade desse peptídeo de inibir 90 % o crescimento do *C. neoformans* já era alcançada na concentração de 25 μM , a contagem de CFU nos testes com o peptídeo AP2p foi apenas para as concentrações de 3,12 μM a 25 μM . Foi observado que em 24 horas houve uma redução significativa na viabilidade das leveduras nas concentrações de 25 μM e 12,5 μM , quando comparamos ao controle (Fig. 3 C). Entretanto, com 48 h de cultura, todas as concentrações testadas apresentaram capacidade de reduzir significativamente a viabilidade do fungo (Fig. 3 C).

Ao testar a capacidade microbicida indireta desse peptídeo, foi observado que nenhuma concentração (partindo de 0,78 μM até 25 μM) foi capaz de induzir uma redução significativa da viabilidade fúngica dentro das células (Fig. 4 C) ou de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias das células que haviam fagocitado as leveduras (Fig. 3 D).

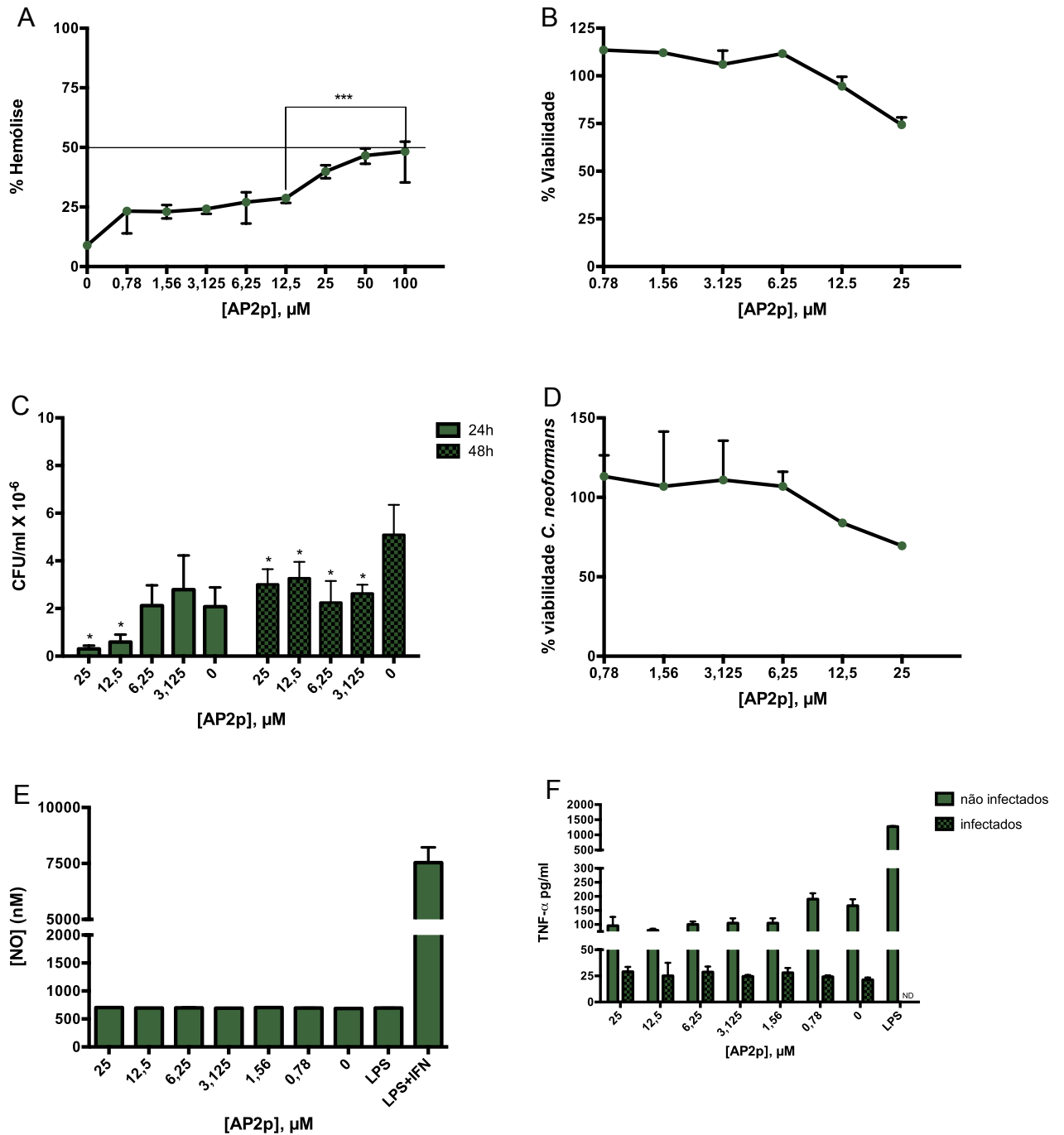


Figura 3: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo AP2p

A figura mostra o percentual de hemólise, causado pelo peptídeo AP2p, apresentando-se 50 % somente até a concentração de 25 μM (A); o percentual de viabilidade dos macrófagos estimulados por 24 horas com o peptídeo AP2p (B); a contagem de unidades formadoras de colônias que permaneceram viáveis após o tratamento com o peptídeo por 24 h e 48 h, mostrando diferenças significativas entre todos os tratamento com o peptídeo e as células não tratadas, no tempo de 48 h (C); a viabilidade do fungo após o ensaio de fagocitose, nos macrófagos estimulados por 24 h com o peptídeo (D). A figura mostra também os resultados dos testes de imunomodulação utilizando macrófagos murinos: o NO (E) e o TNF- α para células infectadas e não infectadas (F). Valor de $p < 0,05$ (*). Dados não disponíveis (ND).

3. Peptídeo 4

Os resultados do teste de capacidade hemolítica do peptídeo 4 mostraram que a concentração de 25 μM causou um percentual de hemólise significativamente menor que 50 % (Fig. 5 A). Embora a concentração de 50 μM tenha causado um percentual de hemólise abaixo do limite estipulado (Fig. 5 A), a concentração mais baixa foi escolhida para os demais experimentos pela sua significância estatística em relação ao limite de 50% de hemólise. A toxicidade do peptídeo 4 também foi testada para macrófagos. Nesse teste, foi observado que as concentrações até 25 μM não eram capazes de diminuir a viabilidade dos macrófagos estimulados para um percentual menor que 50 % nas 24 h de cultura (Fig. 5 B). Observado isso, foi verificado o seu potencial imunomodulatório para essas células, com a dosagem de TNF- α (Fig. 6 A) e NO (Fig. 6 B). O peptídeo 4 não foi capaz de modificar a produção de TNF- α ou de NO (Fig. 6 A e B).

A concentração de 25 μM apresentou-se capaz de matar o *C. neoformans* em relação ao controle experimental, em 24 h de cultura (Fig. 5 C). As concentrações mais altas já haviam sido testadas para a determinação do MIC, onde o MIC90 foi de 25 μM (Tabela 1). Entretanto, quando feita a contagem de CFU em 48 h, a concentração de 25 μM ou as mais baixas não reduziram a quantidade de leveduras viáveis (Fig. 5 C).

Mesmo com os resultados negativos para a variação de produção dos mediadores pró-inflamatórios, ainda foi testada a capacidade de induzir a eliminação das leveduras internalizadas pelas células, quando estas fossem estimuladas com o peptídeo 4. Entretanto, nenhuma das concentrações testadas foi capaz de contribuir na eliminação do fungo fagocitado pelos macrófagos, nem teve capacidade de alterar a produção da citocina TNF- α por essas células (Fig. 6 C e D).

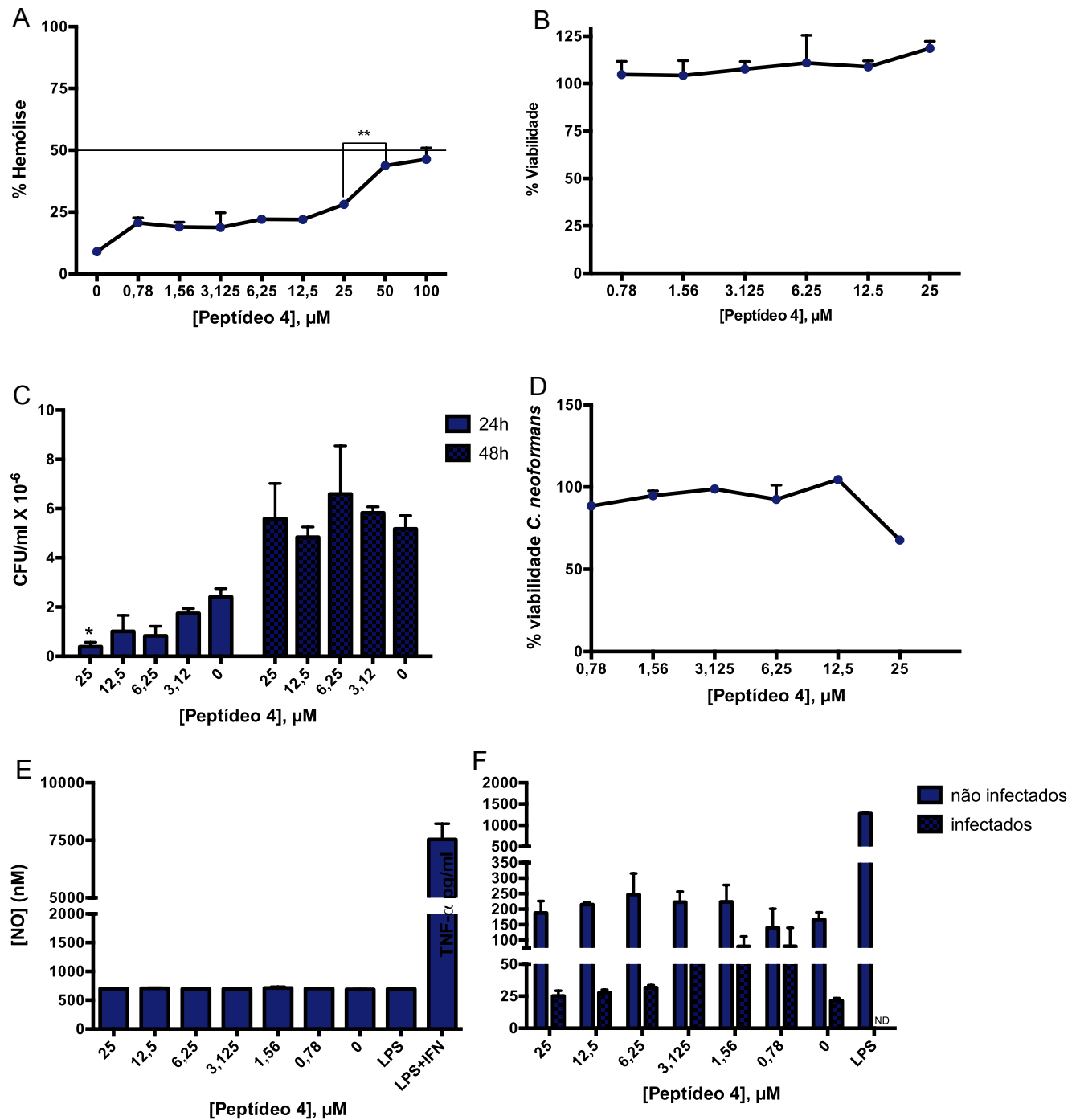


Figura 4: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo 4

A figura mostra os resultados obtidos a partir dos testes de atividade hemolítica e citotóxica para células de mamíferos e de atividade fungicida para o *C. neoformans*: o percentual de hemólise, causado pelo peptídeo 4, mostrando o percentual de hemólise abaixo de 50 % até a concentração de 25 μM , apresentando diferença significativa entre essa concentração e a de 50 μM (A); o percentual de viabilidade dos macrófagos estimulados por 24 horas com o peptídeo 4 (B); a contagem de unidades formadoras de colônia após o tratamento com o peptídeo por 24 h e 48 h, mostrando diferenças significativas apenas no tratamento com 25 μM do peptídeo e as células não tratadas, nas primeiras 24h (C); a viabilidade do fungo após o ensaio de fagocitose, nos macrófagos estimulados por 24 h com o peptídeo (D). A figura mostra também os resultados dos testes de imunomodulação utilizando macrófagos murinos: dosagem de NO (E); dosagem de TNF- α com células infectadas e não infectadas (F); Dados não disponíveis (ND). Valor de $p < 0,05$ (*).

4. Peptídeo 5

O peptídeo 5 mostrou uma atividade biológica diferente das observadas para os demais peptídeos que possuem sequências parecidas com a sua. A concentração de 50 μM teve capacidade hemolítica abaixo de 50 %, mas somente foi observada uma diferença estatística entre as concentrações de 50 μM e de 25 μM para a atividade hemolítica. Não foi observada diferença estatística entre as concentrações 100 μM e 50 μM nem entre 25 μM e as diluições menores, mesmo sugerindo uma progressiva diminuição do percentual de hemólise conforme as concentrações eram menores (Fig. 7 A).

Em relação à capacidade citotóxica, dentre as quatro sequências com a estrutura primária bem próxima, o peptídeo 5 foi o que apresentou maior citotoxicidade (Fig. 7 B), mantendo um percentual acima de 50 % de viabilidade para os macrófagos murinos apenas nas concentrações até 12,5 μM (Fig. 7 B). Esse teste foi realizado também utilizando células THP-1. Essas células se mostraram viáveis nas concentrações até 50 μM . Entretanto, uma diferença significativa na viabilidade dessas células foi observada entre a concentração de 50 μM e de 25 μM (Fig. 8 E).

Mesmo com uma maior toxicidade para as células de mamíferos, esse peptídeo não apresentou ação microbicida direta relevante, mesmo na concentração mais alta testada (Fig. 7 C). Ele também não apresentou atividade microbicida indireta, ou qualquer indicativo de redução do percentual de leveduras viáveis após 24h de estímulo no ensaio de fagocitose (Fig. 8 C).

Embora esse peptídeo e não tenha apresentado capacidade microbicida direta ou indireta, os resultados do teste de imunomodulação apenas com macrófagos se mostraram promissores e próximos aos do peptídeo 1. O peptídeo 5 mostrou um significativo decréscimo na produção de TNF- α na concentração de 12,5 μM , ou nas concentrações mais altas. Além disso, se mostrou eficiente na diminuição da produção dessa citocina, mesmo quando as células foram estimuladas com LPS (Fig. 8 A). Entretanto, nas células que haviam internalizado o fungo, esse peptídeo não foi capaz de alterar o padrão de produção desta citocina (Fig. 8 D). A produção de NO, assim como nos demais peptídeos apresentados, não foi alterada na presença do peptídeo 5 (Fig. 8 B).

O modelo da estrutura secundária desse peptídeo se apresentou como uma hélice (Fig. 14 A), com uma face polar e uma apolar (Fig. 14 B e B), com uma das extremidades possuindo resíduos de aa. carregados positivamente, que poderiam servir como ponto de ancoragem em membranas aniônicas (Fig. 14 E).

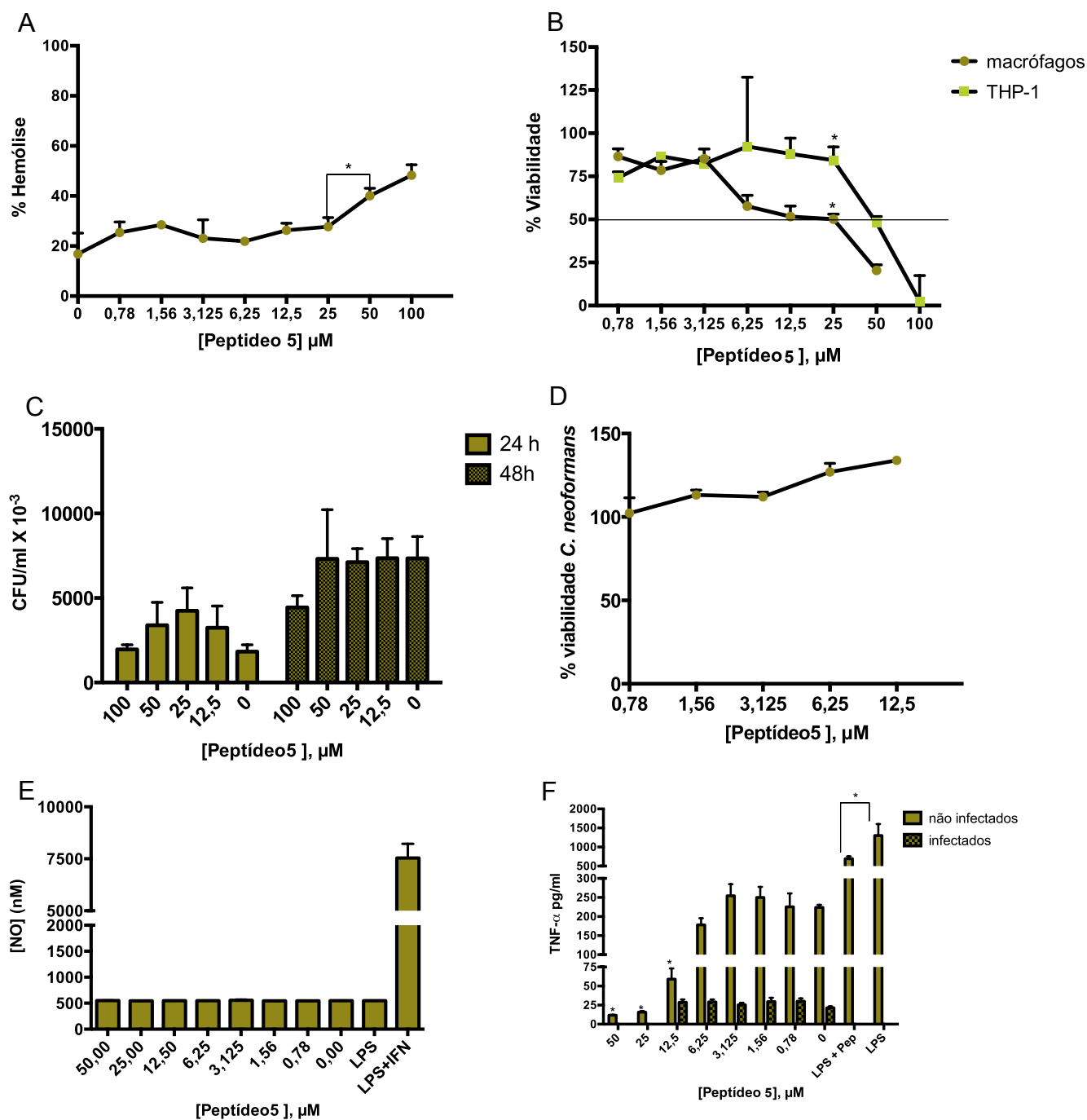


Figura 5: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo 5

A figura mostra os resultados obtidos a partir dos testes de atividade hemolítica e citotóxica para células de mamíferos e ação fungicida para o *C. neoformans*: o percentual de hemólise, causado pelo peptídeo 5, apresentando diferença significativa entre a concentração de 50 μM e a de 25 μM (A); o percentual de viabilidade dos macrófagos estimulados por 24 horas com o peptídeo 5, com mais de 50 % de células viáveis na concentração de 25 μM ou mais baixas (B); a contagem de unidades formadoras de colônia após o tratamento com o peptídeo por 24 h e 48 h, mostrando que não houve redução significativa do número de CFU para qualquer concentração em ambos os períodos (C) e a viabilidade do fungo fagocitado, quando após a fagocitose, os macrófagos murinos foram estimulados por 24 h com o peptídeo (D). A figura mostra também os resultados dos testes de imunomodulação com o peptídeo 5: dosagem de NO (E) e a dosagem de TNF- α do sobrenadante de células infectadas e não infectadas, mostrando, nestas, a capacidade de inibição da produção da citocina, mesmo na presença de LPS (F) (Valor de $p < 0,05$ (*)).

```

UNK_70230 FIGMIPGLIGGLISAIK
DSC      ccccchhhhhhhhhhhh
MLRC     cccccchhhhhhhhhccc
PHD      ccccchhhhhhhhhhhccc
Sec.Cons. cccccchhhhhhhhhccc

```

Sequence length : 17

```

MLRC :
Alpha helix (Hh) : 8 is 47.06%
310 helix (Gg) : 0 is 0.00%
Pi helix (Ii) : 0 is 0.00%
Beta bridge (Bb) : 0 is 0.00%
Extended strand (Ee) : 0 is 0.00%
Beta turn (Tt) : 0 is 0.00%
Bend region (Ss) : 0 is 0.00%
Random coil (Cc) : 9 is 52.94%
Ambiguous states (?) : 0 is 0.00%
Other states : 0 is 0.00%

```

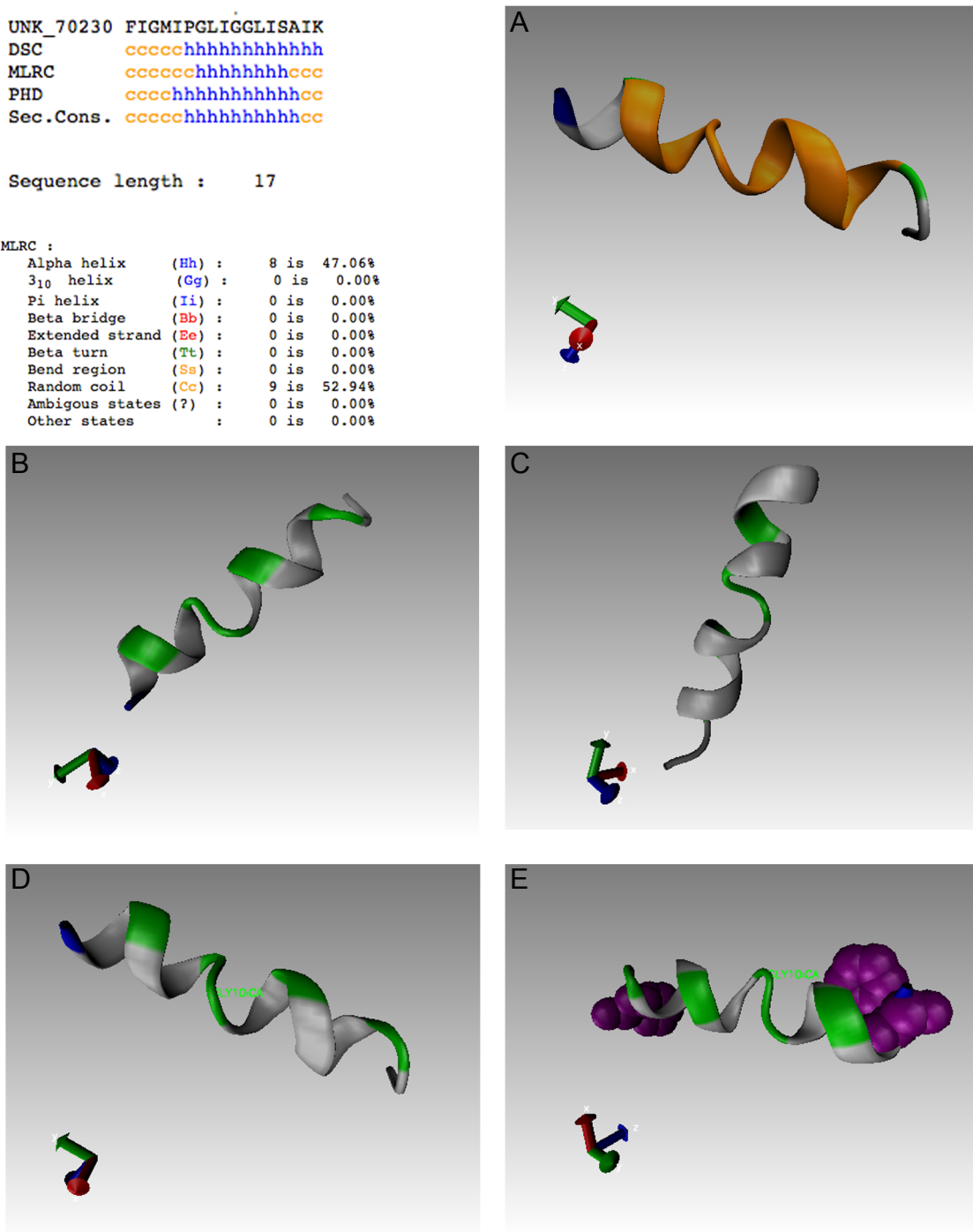


Figura 6: Modelo proposto de estrutura secundária para o peptídeo 5.

(A) em laranja, a estrutura predita dos resíduos de aa. que formam hélice; (B) Face hidrofílica da molécula (em verde); (C) face hidrofóbica da molécula (em cinza); (D) Posição da fenilalanina em uma das extremidades com a extremidade oposta positiva (em azul); (E) imagem evidenciando as duas PHE da molécula.

5. Peptídeo 6

Apresentando uma sequência bastante diferente dos peptídeos já citados nesta seção, o peptídeo 6 foi aquele que apresentou o maior potencial microbicida direto. Com um MIC₉₀ de 6 (Tabela 1), este peptídeo mostrou resultados significativos no ensaio de atividade microbicida direta para ambos os tempos testados (Fig. 5 C). Na mesma concentração necessária para a atividade microbicida (6,25 μ M), não foi observada uma citotoxicidade importante para macrófagos peritoneais de camundongos, apresentando uma viabilidade de aproximadamente 80% (Fig. 5 B).

Além de se mostrar muito eficiente na eliminação das leveduras de *C. neoformas*, esse peptídeo foi capaz de influenciar um modesto aumento da eficiência dos macrófagos para a eliminação dos propágulos fúngicos fagocitados (Fig. 5 F). Entretanto, esse peptídeo não foi capaz de alterar o padrão de produção de TNF- α do tipo celular testado (Fig. 5 D e E), incluindo-se as células com fungo fagocitado (Fig. 5 G).

Como esse peptídeo apresentou uma importante atividade microbicida, na tentativa de esclarecer essa sua ação um modelo da molécula foi feito. Nesse modelo, o peptídeo se mostra como uma hélice (Fig. 15 A), com diversas regiões polares e apolares intercaladas e bastante carregado positivamente (Fig. 15 B, C e D). Além disso, ele apresenta dois resíduos bastante apolares em uma das extremidades, sugerindo que esse local pode ser um ponto de forte interação entre esse peptídeo e as membranas dos tipos celulares testados (Fig. E).

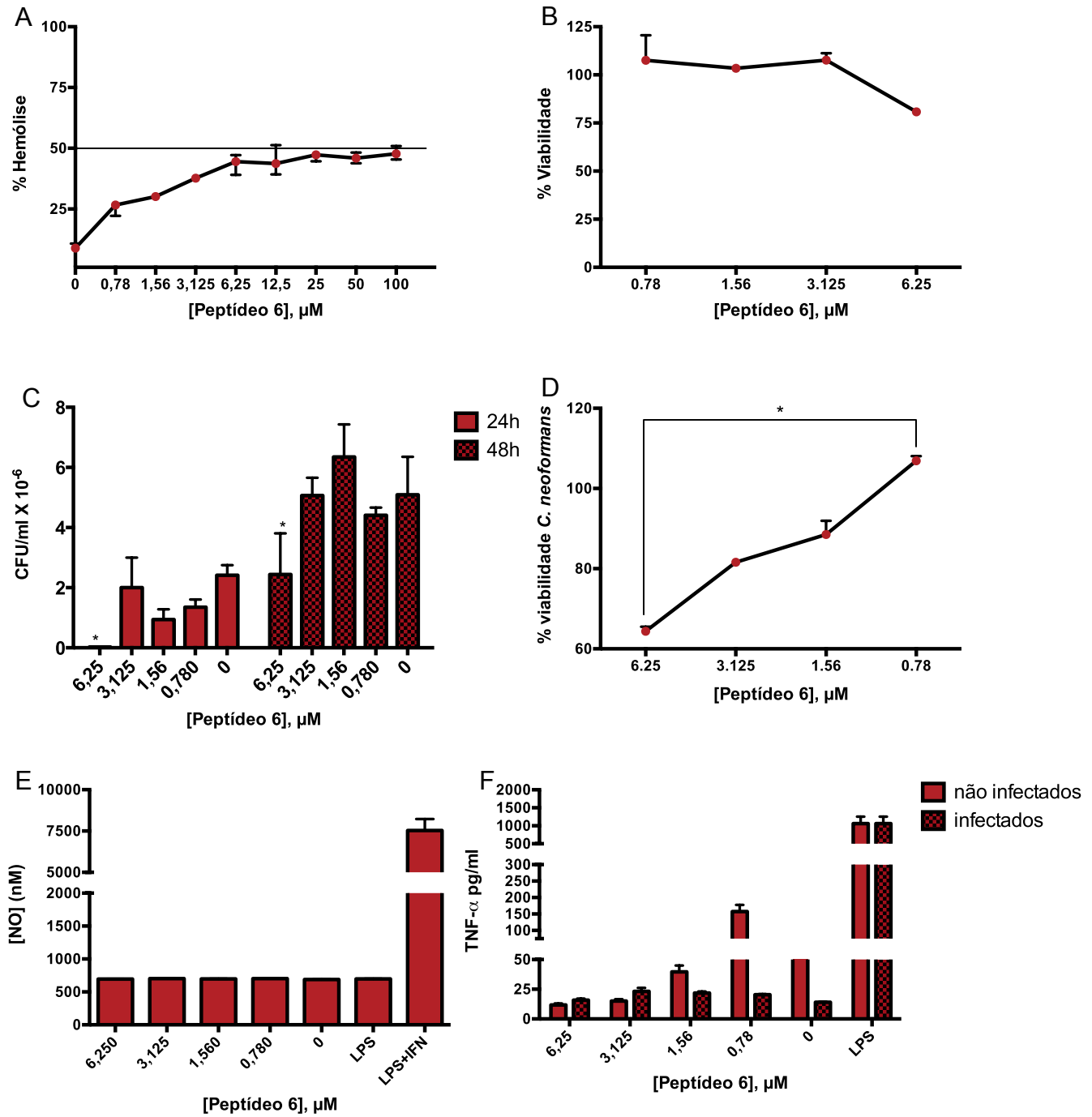


Figura 7: Resultados obtidos a partir dos testes com o peptídeo 6

A figura mostra os resultados obtidos a partir dos testes de atividade tóxica para células de mamíferos e para o *C. neoformans*: o percentual de hemólise causado pelo peptídeo 6 se manteve próximo ao limite de 50 %, só apresentando diferença significativa entre as concentrações 6,25 μM e 1,56 μM (ou mais baixas) (A); o percentual de viabilidade dos macrófagos estimulados por 24 horas se manteve alto em todas as concentrações testadas (B); a contagem de unidades formadoras de colônia após o tratamento com o peptídeo por 24 h e 48 h mostrou diferença significativa na concentração de 6,25 μM (C) e a viabilidade do fungo fagocitado os macrófagos murinos foram estimulados por 24 h com o peptídeo, que apresentou diferença significativa entre as concentrações de 6,25 μM e 0,78 μM (D). A figura mostra também os resultados dos testes de imunomodulação com o peptídeo 6 mostrando: a dosagem de NO (E) e a dosagem de TNF- α no sobrenadante de células infectadas e não infectadas (F); Valor de $p < 0,05$ (*).

6. NDBP-5.6

O último peptídeo testado foi o NDBP-5.6. Esse peptídeo não apresentou capacidade hemolítica significativa mesmo para as doses mais altas, tendo o percentual de hemólise quase zero para a concentração de 100 μM (Fig. 6 A). Sendo assim, para os demais testes ainda foram utilizadas concentrações de 0,78 μM a 100 μM .

Condizente com o resultado de hemólise, na concentração mais alta testada, os macrófagos murinos estavam viáveis quase em sua totalidade 24h depois do estímulo com o peptídeo (Fig. 6 B). O NDBP-5.6 também não mostrou capacidade microbicida direta ou indireta (Fig. 6 C e G) e nem qualquer alteração significativa na produção de $\text{TNF-}\alpha$, tanto nas células estimuladas apenas com o peptídeo como nos macrófagos com o *Cryptococcus neoformans* internalizado previamente ao estímulo (Fig. 6 D e G) ou de NO (Fig. 6 E).

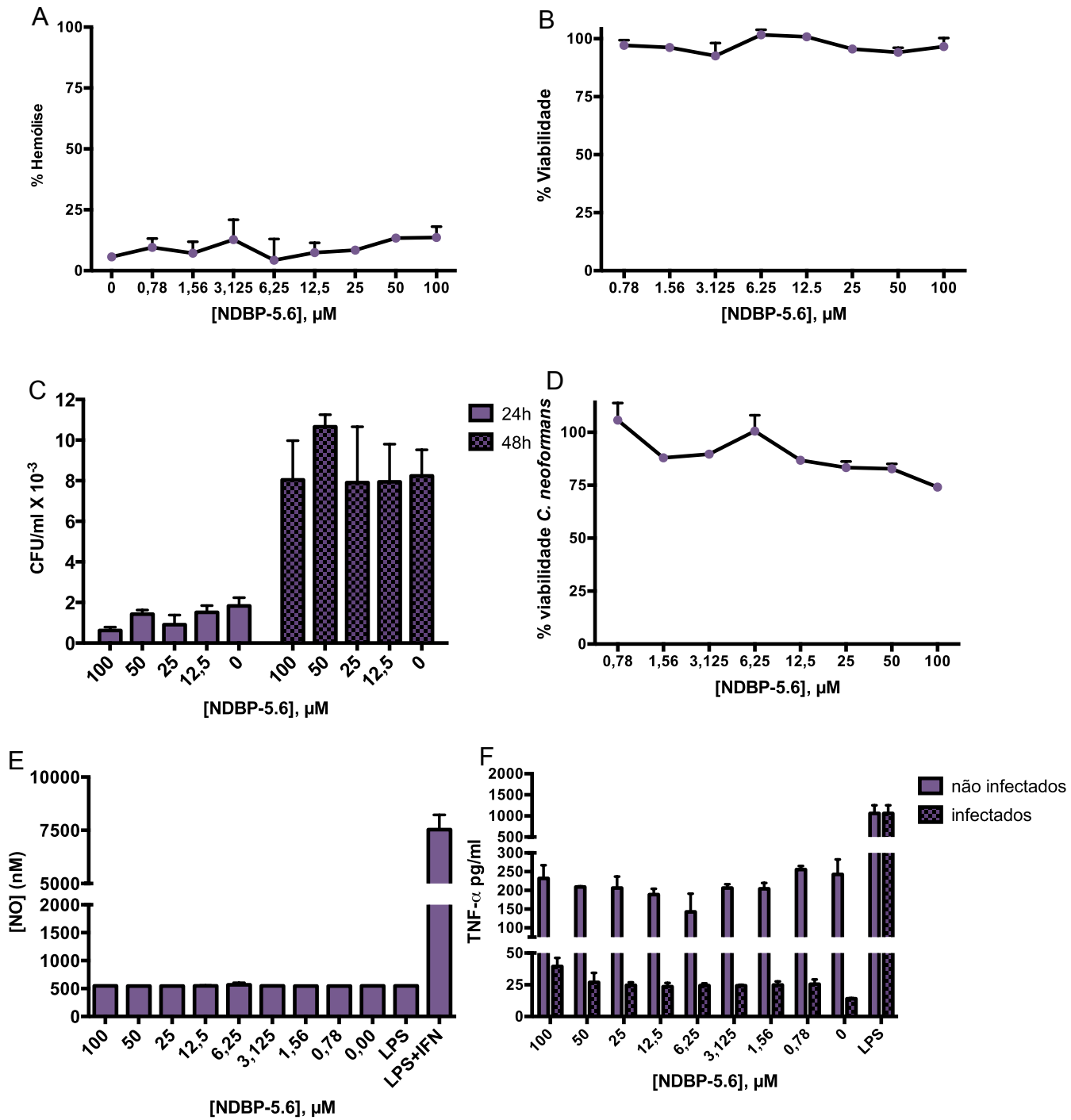


Figura 9: Resultados obtidos a partir dos testes com o NDBP-5.6

A figura mostra os resultados obtidos a partir dos testes de toxicidade para células de mamíferos e para o *C. neoformans*: o percentual de hemólise, causado pelo peptídeo 9 (A); o percentual de viabilidade dos macrófagos estimulados por 24 horas com peptídeo 9 (B) a contagem de unidades formadoras de colônia após o tratamento com o peptídeo por 24 h e 48 h (C) e a viabilidade do fungo fagocitado (D). A figura mostra também os resultados dos testes de imunomodulação com o peptídeo 9: dosagem do NO (E) e do TNF- α (F), a partir do sobrenadante da cultura de células infectadas e não infectadas. Valor de $p < 0,05$ (*).

VI. Discussão

AMPs são moléculas efetoras e regulatórias importantes da imunidade inata. Eles estão presentes em todos os organismos complexos (plantas, animais vertebrados e animais invertebrados) e possuem uma ampla gama de atividade que engloba a atividade microbicida direta, a capacidade microbicida indireta (alterando padrões das células e interagindo com moléculas presentes no local de infecção) e a regulação da resposta inflamatória. Embora o papel microbicida da lisozima já fosse conhecido, a exploração do potencial dos AMPs é recente, iniciando de fato nos anos 80, com a purificação dos peptídeos P9A e P9B, de *Hyalophora cecropia* (Steiner, H. *et al.* 1981).

Os AMPs são, em geral, secretados pelas células responsáveis pela defesa de um organismo, mas todas as células são potenciais produtoras dessas estruturas. Nos insetos, os AMPs foram identificados como advindos dos corpos de gordura, uma estrutura funcionalmente análoga ao fígado humano (Landon, C. *et al.* 1997). Em artrópodes que possuem glândulas de veneno, é possível que AMPs, que são relacionados primordialmente com a defesa do organismo contra patógenos, estejam sendo expressos constitutivamente, assim como acontece em vertebrados (Oguiura, N. *et al.* 2009).

Os peptídeos derivados da peçonha de insetos, ou até mesmo de animais mais derivados, como anfíbios e serpentes, representam uma fonte promissora de novas estratégias microbicidas pela sua interação direta com as bicamadas lipídicas, resultando na desestruturação das membranas celulares e alterando a permeabilidade celular, além da capacidade de alteração do metabolismo dos microrganismos, ocasionando sua eventual morte (Brogden, K. 2005; Dai, L. *et al.* 2002).

Os AMPs podem ser divididos em três classes: peptídeos lineares sem resíduos de cisteína, normalmente com uma α -hélice anfipática; peptídeos que contêm uma ou mais pontes dissulfeto, que possuem estrutura de folha- β associada ou não com uma α -hélice; e peptídeos com estruturas irregulares de aa. ou cíclicas com anéis tio-éter (Epanand, R. *et al.* 1999). Os peptídeos utilizados nesse trabalho não possuem resíduos de cisteína e, segundo as análises de bioinformática feitas para três deles, são possivelmente hélices anfipáticas (Fig. 13, Fig. 14 e Fig 15).

Na tentativa de compreender melhor as interações dos peptídeos sintetizados a partir da biblioteca de cDNA das glândulas de peçonha das espécies *Tityus obscurus*, *Tityus serrulatus* e *Hadrurus gerstchi*, foram feitos testes de atividade citotóxica para células de mamíferos e para o fungo *Cryptococcus neoformans*. Além disso, foram avaliados os produtos das interações desses peptídeos com células do sistema imunológico.

Os peptídeos 1, 4, 5 e 6 são encontrados na peçonha de *Tityus obscurus*, e o peptídeo peptídeo AP2p foi identificado em *Tityus serrulatus*. Dentre esses peptídeos encontrados nessas espécies do mesmo gênero, as sequências 1, 4, 5 e peptídeo AP2p tem o mesmo número de resíduos de aminoácidos e poucas variações entre suas estruturas primárias.

No alinhamento das estruturas primárias dos peptídeos 1, 4, 5 e AP2p, feito utilizando ferramentas virtuais, foi encontrada identidade entre esses peptídeos e a mucroporina e a imcroporina. Entre o peptídeo AP2p e a mucroporina, foi encontrada 97% de identidade. Esse peptídeo é extraído dos escorpiões da espécie *Lychas mucronatus* e funciona como um potente inibidor do crescimento de bactérias Gram-positivas, com limitada atividade hemolítica (Dai, C. *et al.* 2008).

Na tentativa de melhorar a performance da mucroporina, Dai C. e colaboradores alteraram os aminoácidos da porção hidrofóbica do peptídeo por resíduos de aa. mais positivos, gerando o peptídeo chamado Mucroporina-M1, que possui atividade inibitória tanto para bactérias Gram-positivas como para bactérias Gram-negativas, e é bastante eficaz contra cepas de *Staphylococcus aureus* multiresistentes (MRSA) (Dai, C. *et al.* 2008). Isso demonstra que poucas alterações nas sequências primárias dos peptídeos podem gerar diferenças nos resultados das interações com microrganismos.

A imcroporina, por sua vez, possui alta similaridade com os peptídeos utilizados nesse trabalho e a mucroporina. Esse é um peptídeo catiônico encontrado no veneno da espécie de escorpião *Isometrus maculatus* que possui alta eficiência na eliminação de microrganismos multiresistentes, com atividade hemolítica moderada, porém com alta toxicidade para as células SMMC-7721, uma linhagem imortalizada derivada de células humanas do fígado (Zhao, Z. *et al.* 2009). Tanto a mucroporina como a imcroporina têm alta atividade microbicida para bactérias multiresistentes como a MRSA, quando comparados aos fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento da infecção por essa cepa. Entretanto,

ainda não há comparações entre atividade entre esses peptídeos que possuem sequências com alta identidade. Além disso, não há dados relevantes sobre a sua atuação no contato com fungos patogênicos como o *Cryptococcus neoformans*.

As poucas variações entre os peptídeos 1, 4, 5 e peptídeo AP2p se mostraram importantes nas interações com as células testadas. Já nos testes de capacidade hemolítica e citotóxica foram observadas essas diferenças. No resultado das interações com os eritrócitos humanos e com os macrófagos murinos, cada um dos peptídeos mostraram capacidade hemolítica distinta (Fig. 1 A, Fig. 3 A, Fig. 5 A, Fig. 7 A). Esse mesmo fenômeno foi observado também nos testes de viabilidade celular com macrófagos murinos (Fig. 1 B, Fig. 3 B, Fig. 5 B, Fig. 7 B) e com monócitos humanos (Fig. 2 E e Fig. 8 E). Essas diferenças nos resultados das interações entre cada um desses peptídeos com as células de mamíferos testadas pode ocorrer devido às diferenças nas estruturas secundárias e às alterações que a troca de alguns resíduos de aa. podem causar nas cadeias (Fig. 13 e Fig. 14).

As diferenças entre os resultados obtidos com a utilização desses peptídeos que são semelhantes entre si prosseguiram. A atividade microbicida foi observada como estatisticamente significativa apenas para o peptídeo 4 e para o peptídeo AP2p. O peptídeo 4 se mostrou capaz de reduzir significativamente a quantidade de unidades formadoras de colônias na concentração de 25 μ M. Entretanto, no tempo de 48 h isso não foi observado. A contagem de CFU no tempo de 48 h foi semelhante à contagem do controle (Fig. 1 C).

Não é possível afirmar se a atividade do peptídeo 4 é fungicida ou fungistática, porém esse resultado sugere que a diferença entre os tempos se deve a uma atividade apenas fungistática. As leveduras colocadas inicialmente na placa poderiam ter o seu crescimento controlado, mas permaneceram viáveis e, por algum motivo que ainda não é claro, o peptídeo 4 deixou de ser eficiente no controle da proliferação do fungo. Dessa forma, as unidades formadoras de colônia podem ter sido capazes de retomar o seu crescimento. Não houve diferença entre os dois tempos em relação a proliferação das leveduras, possivelmente, porque com 48h de cultura, o fungo atinge a sua fase estacionária. Nesse tempo, é possível que as células fúngicas estimuladas pelo peptídeo 4 tenham sido capazes de retomar o seu crescimento, entrando na fase exponencial e chegando a um número de leveduras equivalente ao das células não estimuladas, uma vez que na fase estacionária o crescimento fúngico é limitado.

O peptídeo AP2p, apesar de também ter apresentado capacidade microbicida, induziu um comportamento diferente do peptídeo 4. Após 24 h de contato com o fungo, as concentrações de 25 μM e de 12,5 μM foram capazes de reduzir significativamente a contagem de CFU (Fig. 1 C). Além disso, quando foi feita essa contagem com 48 h de contato entre o fungo e o peptídeo AP2p o número de colônias aumentou para todas as concentrações. Mesmo tendo apresentado um aumento da contagem de colônias em relação à contagem de 24h, todas as concentrações geraram queda significativa de CFU em relação ao controle (Fig. 1 C). Isso sugere que esse peptídeo pode ter ação fungicida nas concentração mais altas e fungistática nas concentrações menores, por não haver proliferação das leveduras em níveis suficientes para se igualar ao controle em 48 h de cultura.

Não foi explorada extensivamente a razão pela qual o peptídeo 4 e o peptídeo AP2p apresentaram comportamentos diferentes nos dois tempos de cultura. Uma possibilidade é que em um primeiro momento eles sejam mais eficientes por manterem a sua estrutura secundária. Com o passar do tempo, esses peptídeos, na presença do fungo, podem ter perdido a sua estrutura secundária, limitando, assim, a capacidade de interagir com as células como era possível no início do tratamento.

Alguns peptídeos como o TsCT, o IsCT2, o IsCTf e o IsCT2f, têm alta homologia, porém apresentam capacidades microbicida e hemolítica distintas. O IsCT e o IsCT2 têm capacidade microbicida para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e alta atividade hemolítica. No entanto, os peptídeos IsCTf e IsCT2f não apresentam capacidade microbicida ou hemolítica. Esse dado pode ser explicado pela diferença da estrutura secundária nesses quatro peptídeos. O TsCT e o IsCT2 são peptídeos de sequência curta, que forma uma α -hélice anfipática. A alteração da estrutura primária do IsCTf e do IsCT2f impede a formação da α -hélice, mesmo em solução promotora da formação de estruturas secundárias de peptídeos (Dai, L. *et al.* 2002). Isso demonstra que alterações de poucos resíduos de aminoácidos na sequência pode modificar a ação dos peptídeos devido às mudanças estruturais.

A atividade microbicida indireta dos peptídeos 4, 5 e peptídeo AP2p não foi importante para nenhuma concentração testada. Entretanto, para o peptídeo 1, a concentração de 25 μM apresentou diferença significativa em relação à concentração de 1,56 μM . Além disso, embora só seja observada diferença estatística entre essas duas concentrações, os resultados indicam que pode haver uma diminuição progressiva das leveduras internalizadas,

conforme há aumento na concentração do peptídeo, indicando uma possível capacidade modulatória desse peptídeo. Entretanto, não houve alteração no padrão da citocina produzida pelos macrófagos murinos, além diminuição da produção de NO, normalmente induzida pela fagocitose do fungo.

A diversidade da ação dos quatro peptídeos de estrutura primária semelhantes não se restringiu à capacidade citotóxica e antifúngica deles. Dois desses peptídeos testados apresentaram atividade antiinflamatória. Os peptídeos 1 e 5 foram capazes de reduzir significativamente a produção de TNF- α , mesmo nas células estimuladas com LPS, quando comparadas com as células que não foram tratadas com o peptídeo (Fig. 2 A e Fig. 4 A). Essa inibição da produção de TNF- α poderia se dar pela diminuição da viabilidade que os peptídeos causam nas células. Entretanto, a concentração de ambos os peptídeos que foi utilizada ao testar a atividade inibitória do peptídeo 1 e do peptídeo 5 permitiu mais de 80% de viabilidade dos macrófagos murinos (Fig. 1 B e Fig. 3 B). Embora tenha sido observada a alteração do padrão de produção do TNF- α , a produção de NO, que também é um mediador pró-inflamatório, não foi alterada.

O peptídeo 5 é mais hemolítico e mais tóxico para células de mamíferos que o peptídeo 1. A variação de poucos aminoácidos pode ser responsável por esse efeito. A conformação das moléculas pode fazer com que o sítio de interação do peptídeo com a célula se altere. AMPs comumente são atraídos eletrostaticamente para as membranas e interagem com as mesmas. Quando em baixas concentrações, os peptídeos se ligam paralelamente à bicamada lipídica. Conforme ocorre aumento na concentração, os peptídeos começam a se orientar perpendicularmente à membrana, adquirindo a capacidade de se inserir nela, formando poros transmembrana (Brogden, K. 2005).

O peptídeo 1 é rico em resíduos de glicinas (GLY), quando comparado com o peptídeo 5. A presença dessas GLY gera um ponto de fragilidade no meio da molécula (Fig 13). Esse pode ser um fator importante para a diminuição da capacidade citotóxica desse peptídeo. A possibilidade de dobramento da molécula e a menor quantidade de resíduos hidrofóbicos nas extremidades na molécula podem dificultar a formação das estruturas que geram aumento da permeabilidade da célula de eventual lise das mesmas. Isso pode explicar a capacidade citotóxica desse peptídeo apenas nas concentrações mais altas (Fig 1 B e Fig. 2 E).

O peptídeo 5 possui uma hélice mais estruturada, com dois resíduos de PHE em uma das extremidades. Esse aumento de resíduos aromáticos com hidrofobicidade em uma das pontas da molécula pode favorecer o contato vertical com a membrana celular, o que, por sua vez, facilita a interação com as estruturas hidrofóbicas da membrana. Os peptídeos, quando estão em alta concentração na membrana tendem a se aglomerar, permitindo a formação de estruturas que aumentam a permeabilidade da membrana plasmática, que levam à lise das células (Brogden, K. 2005).

A concentração 12,5 μ M dos peptídeos 1 e 5 permitem alta viabilidade celular (Fig. 1 B e Fig. 3 B). A capacidade de inibição da produção de TNF- α , mesmo na presença de um forte indutor, foi significativa em relação às células estimuladas com LPS. Esses dados levam a crer que a atividade que o peptídeo exerce na célula é via receptores de membrana. Mesmo o peptídeo 5 possuindo algumas alterações na sua estrutura primária em relação ao peptídeo 1, ambos formam uma α -hélice, que deve manter o sítio de ligação dos peptídeos com o receptor intacto. Dessa forma, ambos são capazes de exercer o mesmo efeito inibitório da produção da citocina.

O mecanismo mais simples de inibição da produção de TNF- α seria via ocupação alostérica do sítio de reconhecimento do TLR-4. Nesse caso, o peptídeo estaria competindo com o LPS pelo receptor, sem ativá-lo. Dessa forma, o reconhecimento e a ativação da via de produção da citocina estaria reduzido. Entretanto, os peptídeos 1 e 5 foram capazes de reduzir a produção basal do TNF- α . Isso indica a possibilidade de haver interação com outros receptores, que quando estimulados, podem ser capazes de inibir a via de ativação da produção dessa citocina.

Já é conhecida a capacidade das defensinas e catalecidinas de interagir com receptores das células (Hiemstra, P. 2006; Schaubert, J. *et al.* 2008). Ambos os peptídeos tem capacidade quimiotática, de indução de citocinas e de ativação do sistema complemento. A catalecidina LL-37, por exemplo, atua em receptores quimioatrativos para neutrófilos e eosinófilos, como FPRL1 (receptor to tipo peptídeo formil 1), no receptor EGFR (receptor de fator de crescimento epidérmico) e em receptores purinérgicos (Hiemstra, P. 2006). Outro exemplo é o das defensinas hBDs. Essas defensinas estimulam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelos queratinócitos pela via de sinalização da proteína G e PLC (fosfolipase C), além de mediar a migração e proliferação dos queratinócitos sob o

controle da ativação de EGFR e dos fatores de transcrição STAT1 (transdutores de sinais e ativadores de transcrição 1) e STAT3 (Niyonsaba, F, *et al.* 2007). É possível que peptídeos de estruturas ou ação similares às defensinas e catalecidinas, encontradas em todos os animais pluricelulares, sejam capazes de alterar os padrões de ativação de células de mamíferos, como já foi observado esse efeito para defensinas de plantas (Stotz, H. *et al.* 2009).

O peptídeo 6 e o NDBP-5.6, encontrado em animais da espécie *Hadrurus gerstchi*, possuem sequências e número de resíduos bastante diferente entre si e dos demais peptídeos utilizados nesse trabalho. O primeiro é formado por cerca de 10 resíduos de aminoácidos a mais que os peptídeos 1, 4, 5 e Peptídeo AP2p, enquanto o segundo possui aproximadamente esse o mesmo número de resíduos a menos.

O NDBP-5.6 não apresentou nenhuma atividade relevante para os testes realizados nesse trabalho, enquanto o peptídeo 6 teve uma alta capacidade microbicida. Este peptídeo gerou resultados bastante relevantes em relação à sua atividade microbicida necessitando de baixa concentração para exercer papel antifúngico. Na concentração de 6,25 μM ele foi capaz de minimizar o número de CFU com 24 h de cultura (Fig. 9 C). Quando foi feita a contagem de colônias onde foram plaqueadas as leveduras que tiveram o estímulo por 48h, foi observado um aumento na quantidade de CFU, embora esse número ainda fosse significativamente menor que o controle para essa concentração. É possível que, como especulado para os outros peptídeos, ele tenha perdido sua atividade e as leveduras que restaram na placa conseguiram se proliferar.

Existe a possibilidade desse peptídeo atravessar a cápsula do *Cryptococcus neoformans* e, assim, interagir com a membrana do fungo. Essa capacidade poderia explicar a sua alta atividade microbicida, contrastante com os demais peptídeos testados no trabalho. Olhando para a estrutura secundária, esse peptídeo possui uma hélice com várias regiões positivas e áreas hidrofóbicas intercaladas com áreas hidrofílicas. Além disso, assim como o peptídeo 5, ele tem duas PHE em uma das suas extremidades, que pode facilitar o seu ataque às membranas, levando por fim a morte dessas células. Mesmo tendo característica que poderiam ser nocivas às células de mamíferos, na concentração de 6, 25 μM o peptídeo 6 não apresentou atividade citotóxica relevante nem atividade hemolítica exacerbada, se mostrando como um possível alvo para terapias contra a criptococose.

O peptídeo 6, além de mostrar alta citotoxicidade direta, foi capaz de mostrar uma modesta influência na atividade microbicida indireta. Entretanto, os testes nos quais foi dosada a citocina produzida pelos macrófagos após o estímulo com o peptídeo 6 não apresentaram alteração do padrão de produção. Isso sugere que esse peptídeo possui alguma capacidade modulatória para as células testadas, que não envolve a via de produção das citocinas.

É descrito na literatura a capacidade sinérgica de AMPs. Essa sinergia possibilita a ação microbicida e imunomodulatória amplificada dos peptídeos, necessitando de menores concentrações e, assim, diminuindo a possibilidade dessas moléculas mostrarem atividade citotóxica para o organismo hospedeiro (Sørensen, O. *et al.* 2008). Todos os peptídeos testados neste trabalho tiveram o seu potencial analisado somente em testes realizados com cada um, isoladamente. Os peptídeos que tiveram ação microbicida relevante ou imunomodulatória poderiam ter seus efeitos amplificados, caso esses peptídeos atuassem em sinergia. Não foram feitos testes com os peptídeos em conjunto, porém é possível que, em sinergia, o potencial para a atuação em infecções e doenças inflamatórias fosse amplificado, tornando esses peptídeos ainda mais interessantes como estratégia terapêutica para tais doenças.

No caso da cryptococose, a possibilidade de termos um peptídeo capaz de matar o fungo agindo concomitantemente com outro capaz de induzir a diminuição da viabilidade das leveduras internalizadas e regular o processo inflamatório, gera um potencial terapêutico para a doença causada por um fungo cujo sucesso terapêutico é bastante baixo quando se utiliza as às terapias farmacológicas atuais.

VII. Conclusão e perspectivas

Ao longo do trabalho foram encontrados dois peptídeos com ação imunomodulatória, sendo ambos anti-inflamatórios, um peptídeo com ação fungistática e um peptídeo com ação fungicida.

A utilização desses peptídeos no controle de doenças fúngicas, nas quais é necessário um estímulo da célula para que ela seja capaz de eliminar o fungo fagocitado, controlando a inflamação para que haja menores danos na região afetada e a morte de propágulos fúngicos não fagocitados, é promissora, devido a ação observada nesses peptídeos.

Além disso, todos esses peptídeos foram testados isoladamente, não possibilitando a observação da capacidade sinérgica entre eles. A possibilidade de haver sinergia entre os AMPs abre novas possibilidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para micoses e/ou doenças inflamatórias crônicas, que sejam embasadas na atuação desses peptídeos. Nesse contexto, a utilização dos peptídeos 1 e 6, devido à sua ação imunomodulatória e microbicida, respectivamente, são alvos promissores para o tratamento da criptococose.

VIII.Referências

ABBAS, A. K. *et al.* *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7^a ed, 2012.

AUSUBEL, F. M. Are Innate Immune Signaling Pathways In Plants And Animals Conserved? *Nature Immunology*, v. 6, n. 10, p. 973–9, doi:10.1038/ni1253, 2005.

BEFUS, A. D. *et al.* Neutrophil Defensins Induce Histamine Secretion From Mast Cells: Mechanisms Of Action. *Journal of Immunology*, v. 163, n. 2, p. 947–53, 1999.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers Or Metabolic Inhibitors In Bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238–50, doi:10.1038/nrmicro1098, 2005.

BROWN, G. D. Innate Antifungal Immunity: The Key Role Of Phagocytes. *Annual Review Of Immunology*, v. 29, n. 3, p. 1–21, doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229.INNATE, 2012.

CHANG, Y. C. *et al.* Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 9, p. 4985–4995, doi:10.1128/IAI.72.9.4985, 2004.

CHEN, G. Y. *et al.* Sterile Inflammation: Sensing And Reacting To Damage. *Nature Reviews. Immunology*, v. 10, n. 12, p. 826–37, doi:10.1038/nri2873, 2010.

CHEN, S. H. M. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Induces Alterations In The Cytoskeleton Of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, n. 11, p. 961–970, doi:10.1099/jmm.0.05230-0, 2003.

CHRÉTIEN, F. *et al.* Pathogenesis Of Cerebral *Cryptococcus neoformans* Infection After Fungemia. *The Journal Of Infectious Diseases*, v. 186, n. 4, p. 522–30, doi:10.1086/341564, 2002.

DAI, C. *et al.* Mucroporin, The First Cationic Host Defense Peptide From The Venom Of *Lychas mucronatus*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 52, n. 11, p. 3967–72, doi:10.1128/AAC.00542-08, 2008.

- DAI, L. *et al.* Purification, Structure-Function Analysis, And Molecular Characterization Of Novel Linear Peptides From Scorpion *Opisthacanthus Madagascariensis*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 293, n. 5, p. 1514–22, doi:10.1016/S0006-291X(02)00423-0, 2002.
- DANGL, J. L. *et al.* Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science*, v. 341, n. 6147, p. 1–14, doi:10.1126/science.1236011.Pivoting, 2013.
- DANGL, J. L. *et al.* Plant Pathogens And Integrated Defence Responses To Infection. *Nature*, v. 411, p. 826–833, 2001.
- DAVIES, L. C. *et al.* Tissue-Resident Macrophages. *Nature Immunology*, v. 14, n. 10, p. 986–95, doi:10.1038/ni.2705, 2013.
- DAVIS, M. J. *et al.* Macrophage M1 / M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in *Cryptococcus neoformans* Infection. *mBio*, v. 4, n. 3, p. 1–10, doi:10.1128/mBio.00264-13.Editor, 2013.
- DODDS, P. N. *et al.* Plant Immunity: Towards An Integrated View Of Plant-Pathogen Interactions. *Nature Reviews. Genetics*, v. 11, n. 8, p. 539–48, doi:10.1038/nrg2812, 2010.
- DZIK, J. M. The Ancestry And Cumulative Evolution Of Immune Reactions. *Acta Biochimica Polonica*, v. 57, n. 4, p. 443–66, 2010.
- EPAND, R. M. *et al.* Diversity Of Antimicrobial Peptides And Their Mechanisms Of Action. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1462, n. 1-2, p. 11–28, 1999.
- ESCHE, C. *et al.* Chemokines: Key Players In Innate And Adaptive Immunity. *The Journal Of Investigative Dermatology*, v. 125, n. 4, p. 615–28, doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23841.x, 2005.
- FIALHO, E. M. S. *et al.* Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 58, n. 6-7, p. 480–5, doi:10.1016/j.toxicon.2011.08.006, 2011.

GANZ, T. Defensins: Antimicrobial Peptides Of Innate Immunity. *Nature Reviews. Immunology*, v. 3, n. 9, p. 710–20, doi:10.1038/nri1180, 2003.

GEISSMANN, F. et al. Development Of Monocytes, Macrophages, And Dendritic Cells. *Science*, v. 327, n. 5966, p. 656–61, doi:10.1126/science.1178331, 2010.

HARTENSTEIN, V. Blood Cells And Blood Cell Development In The Animal Kingdom. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, v. 22, p. 677–712, doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093317, 2006.

HIEMSTRA, P. S. Defensins And Cathelicidins In Inflammatory Lung Disease: Beyond Antimicrobial Activity. *Biochemical Society Transactions*, v. 34, p. 276–8, doi:10.1042/BST20060276, 2006.

HIRSCH, T. *et al.* Role of the Host Defense Peptides of the Innate Immune Response in Sepsis. *Shock*, v. 30, n. 2, p. 117–126, doi:10.1097/SHK.0b013e318160de11, 2008.

HUMPHREYS, T. *et al.* Invertebrate Immune Recognition , Natural Immunity And The Evolution Of Positive Selection. *Immunology Today*, v. 15, n. 7, p. 316–320, 1994.

ITALIA, J. L. *et al.* Biodegradable Nanoparticles Improve Oral Bioavailability Of Amphotericin B And Show Reduced Nephrotoxicity Compared To Intravenous Fungizone. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 6, p. 1324–31, doi:10.1007/s11095-009-9841-2, 2009.

JENKINS, S. J. *et al.* Local Macrophage Proliferation, Rather Than Recruitment From The Blood, Is A Signature Of Th2 Inflammation. *Science*, v. 332, n. 6035, p. 1284–8, doi:10.1126/science.1204351, 2011.

JONES, J. D. G. *et al.* The Plant Immune System. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 323–9, doi:10.1038/nature05286, 2006.

JUNQUEIRA, L. *et al.* *Histologia Básica*. Guanabara Koogan 11ª edição, 2008.

LAI, Y. *et al.* Amped Up Immunity: How Antimicrobial Peptides Have Multiple Roles In Immune Defense. *Trends In Immunology*, v. 30, n. 3, p. 131–41, doi:10.1016/j.it.2008.12.003, 2009.

LANDON, C. *et al.* Solution Structure Of Drosomycin, The First Inducible Antifungal Protein From Insects. *Protein Science : A Publication Of The Protein Society*, v. 6, n. 9, p. 1878–84, doi:10.1002/pro.5560060908, 1997.

LEMAITRE, B. *et al.* The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Spätzle/Toll/Cactus Controls The Potent Antifungal Response In *Drosophila* Adults. *Cell*, v. 86, n. 6, p. 973–83, 1996.

LIN, X. *et al.* The Biology Of The Cryptococcus Neoformans Species Complex. *Annual Review Of Microbiology*, v. 60, p. 69–105, doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142102, 2006.

MAEKAWA, T. *et al.* Nlr Functions In Plant And Animal Immune Systems: So Far And Yet So Close. *Nature Immunology*, v. 12, n. 9, p. 817–26, doi:10.1038/ni.2083, 2011.

MANTOVANI, A. *et al.* New Vistas On Macrophage Differentiation And Activation. *European Journal Of Immunology*, v. 37, n. 1, p. 14–6, doi:10.1002/eji.200636910, 2007.

McMAHON, L. *et al.* Vitamin D-Mediated Induction Of Innate Immunity In Gingival Epithelial Cells. *Infection And Immunity*, v. 79, n. 6, p. 2250–6, doi:10.1128/IAI.00099-11, 2011.

MARCUSSI, S. *et al.* Escorpiões. Editora FUNPEC, 1ª edição, 2011

MONAGHAN, J. *et al.* Plant Pattern Recognition Receptor Complexes At The Plasma Membrane. *Current Opinion In Plant Biology*, v. 15, n. 4, p. 349–57, doi:10.1016/j.pbi.2012.05.006, 2012.

MOOKHERJEE, N. *et al.* Cationic Host Defence Peptides: Innate Immune Regulatory Peptides As A Novel Approach For Treating Infections. *Cellular And Molecular Life Sciences : CMLS*, v. 64, n. 7-8, p. 922–33, doi:10.1007/s00018-007-6475-6, 2007.

MÜLLER, W. E. G. *et al.* Evolution Of The Innate And Adaptative Immune Systems. *Transplantation*, v. 68, n. 9, p. 1215–1227, 1999.

MURRAY, P. J. *et al.* Protective And Pathogenic Functions Of Macrophage Subsets. *Nature Reviews. Immunology*, n. Box 1, p. 1–15, doi:10.1038/nri3073, 2011.

NAHAR, M. *et al.* Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, v. 4, n. 3, p. 252–61, doi:10.1016/j.nano.2008.03.007, 2008.

NAPPI, A. J. *et al.* Cytotoxicity And Cytotoxic Molecules In Invertebrates. *BioEssays*, v. 22, n. 5, p. 469–80, doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4, 2000.

NATHAN, C. *et al.* Nonresolving Inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 871–82, doi:10.1016/j.cell.2010.02.029, 2010.

NGUYEN, T. X. *et al.* Evolution Of Primate Theta-Defensins: A Serpentine Path To A Sweet Tooth. *Peptides*, v. 24, n. 11, p. 1647–54, doi:10.1016/j.peptides.2003.07.023, 2003.

NIELSEN, K. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Mates On Pigeon Guano: Implications For The Realized Ecological Niche And Globalization. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 6, p. 949–59, doi:10.1128/EC.00097-07, 2007.

NIYONSABA, F. *et al.* Antimicrobial Peptides Human Beta-Defensins Stimulate Epidermal Keratinocyte Migration, Proliferation And Production Of Proinflammatory Cytokines And Chemokines. *Journal Of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 3, p. 594–604, doi:10.1038/sj.jid.5700599, 2007.

NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS 2000 March Vol. 25, No 3 [291]:147-150
Combet C., Blanchet C., Geourjon C. and Deléage G.

NÜRNBERGER, T. *et al.* Innate Immunity In Plants And Animals: Striking Similarities And Obvious Differences. *Immunological Reviews*, v. 198, p. 249–66, 2004.

OGUIURA, N. *et al.* Intraspecific Variation Of The Crotonamine And Crotonasin Genes In *Crotalus durissus* Rattlesnakes. *Gene*, v. 446, n. 1, p. 35–40, doi:10.1016/j.gene.2009.05.015, 2009.

PERFECT, J. R. *et al.* Drug Resistance in *Cryptococcus neoformans*. Drug Resistance Updates : Reviews And Commentaries In Antimicrobial And Anticancer Chemotherapy, v. 2, n. 4, p. 259–269, doi:10.1054/drup.1999.0090, 1999.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. Mediators of inflammation, v. 2010, p. 903295, doi:10.1155/2010/903295, 2010.

RADEK, K. *et al.* Antimicrobial Peptides: Natural Effectors Of The Innate Immune System. Seminars In Immunopathology, v. 29, n. 1, p. 27–43, doi:10.1007/s00281-007-0064-5, 2007.

SCHAUBER, J. *et al.* Antimicrobial Peptides And The Skin Immune Defense System. The Journal Of Allergy And Clinical Immunology, v. 122, n. 2, p. 261–6, doi:10.1016/j.jaci.2008.03.027, 2008.

SCOCCHI, M. *et al.* Proteolytic Cleavage By Neutrophil Elastase Converts Inactive Storage Proforms To Antibacterial Bactenecins. European Journal Of Biochemistry, v. 209, n. 2, p. 589–95, 1992.

SELSTED, M. E. *et al.* Mammalian Defensins In The Antimicrobial Immune Response. Nature Immunology, v. 6, n. 6, p. 551–7, doi:10.1038/ni1206, 2005.

SHANDALA, T. *et al.* Innate Immunity And Exocytosis Of Antimicrobial Peptides. Communicative & Integrative Biology, v. 5, n. 2, p. 214–6, doi:10.4161/cib.19018, 2012.

SØRENSEN, O. E. *et al.* Antimicrobial Peptides In Innate Immune Responses. Contributions To Microbiology, v. 15, p. 61–77, doi:10.1159/000136315, 2008.

STEINER, H. *et al.* Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect Immunity. Nature, v. 292, p. 246–248, 1981.

STOTZ, H. U. *et al.* Plant Defensins: Defense, Development And Application. Plant Signaling & Behavior, v. 4, n. 11, p. 1010–2, 2009.

TAIZ, L. *et al.* Fisiologia Vegetal. Artmed, 4^a edição, 2009.

UNDERHILL, D. M. *et al.* Information Processing During Phagocytosis. Nature Reviews. Immunology, v. 12, n. 7, p. 492–502, doi:10.1038/nri3244, 2012.

VARIN, A. *et al.* Alternative Activation Of Macrophages: Immune Function And Cellular Biology. *Immunobiology*, v. 214, n. 7, p. 630–41, doi:10.1016/j.imbio.2008.11.009, 2009.

VELAGAPUDI, R. *et al.* Spores As Infectious Propagules Of *Cryptococcus Neoformans*. *Infection And Immunity*, v. 77, n. 10, p. 4345–55, doi:10.1128/IAI.00542-09, 2009.

WIENS, M. *et al.* Innate Immune Defense Of The Sponge *Suberites Domuncula* Against Bacteria Involves A Myd88-Dependent Signaling Pathway. Induction Of A Perforin-Like Molecule. *The Journal Of Biological Chemistry*, v. 280, n. 30, p. 27949–59, doi:10.1074/jbc.M504049200, 2005.

WYNN, T. A. *et al.* Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, v. 30, n. 3, p. 245–257, doi:10.1055/s-0030-1255354.Macrophages, 2010.

ZANETTI, M *et al.*. Cathelicidins : A Novel Protein Family With A Common Proregion And A Variable C-Terminal Antimicrobial Domain. *FEBS letters*, v. 374, p. 1–5, 1995.

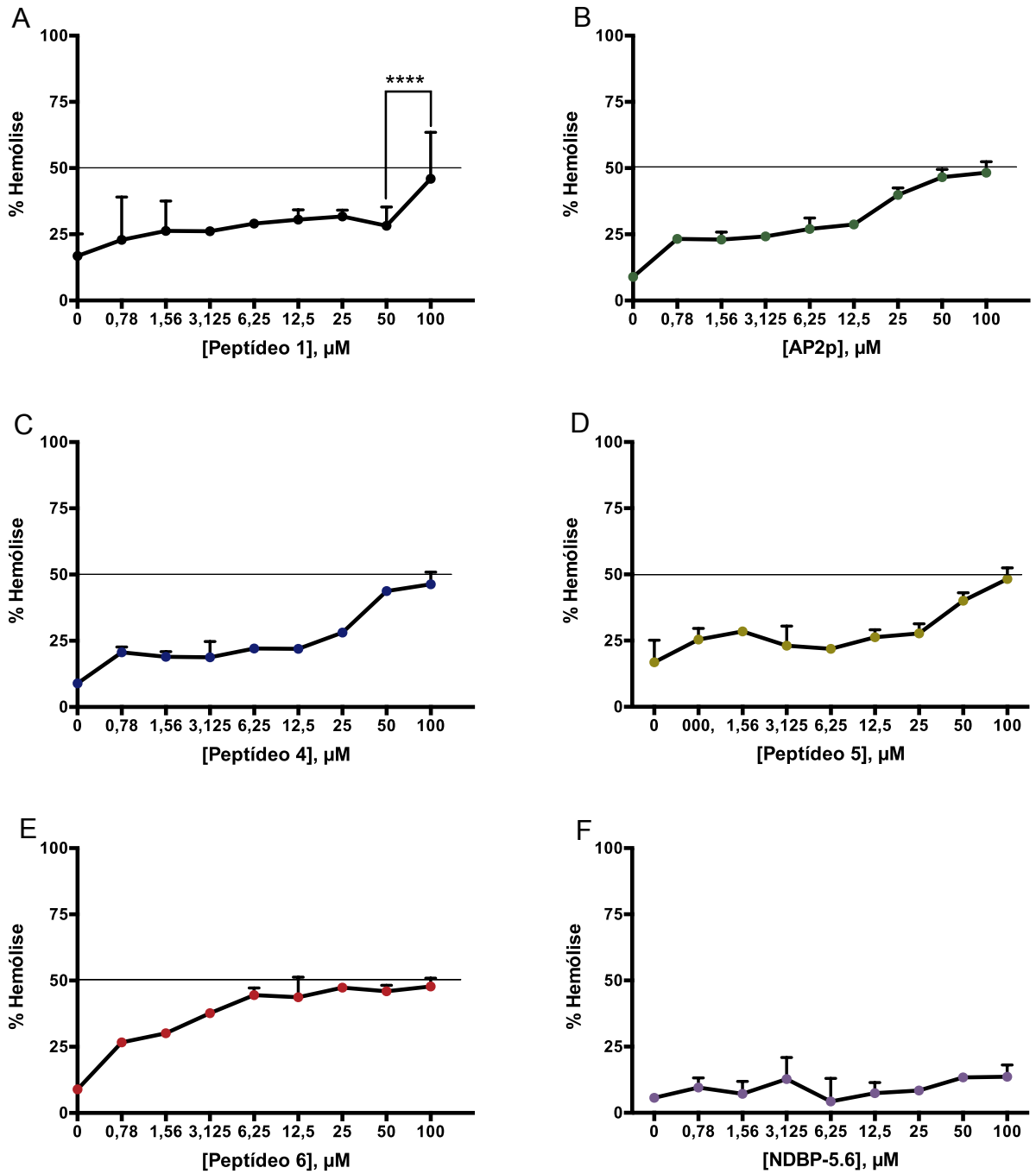
ZARAGOZA, O. *et al.* The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, v. 68, n. 09, p. 1–64, doi:10.1016/S0065-2164(09)01204-0.The, 2009.

ZHAO, Z. *et al.* Imcroporin, a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Venom of the Scorpion *Isometrus maculatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 8, p. 3472–7, doi:10.1128/AAC.01436-08, 2009.

ZOCCAL, K. F. *et al.* *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 57, n. 7-8, p. 1101–8, doi:10.1016/j.toxicon.2011.04.017, 2011.

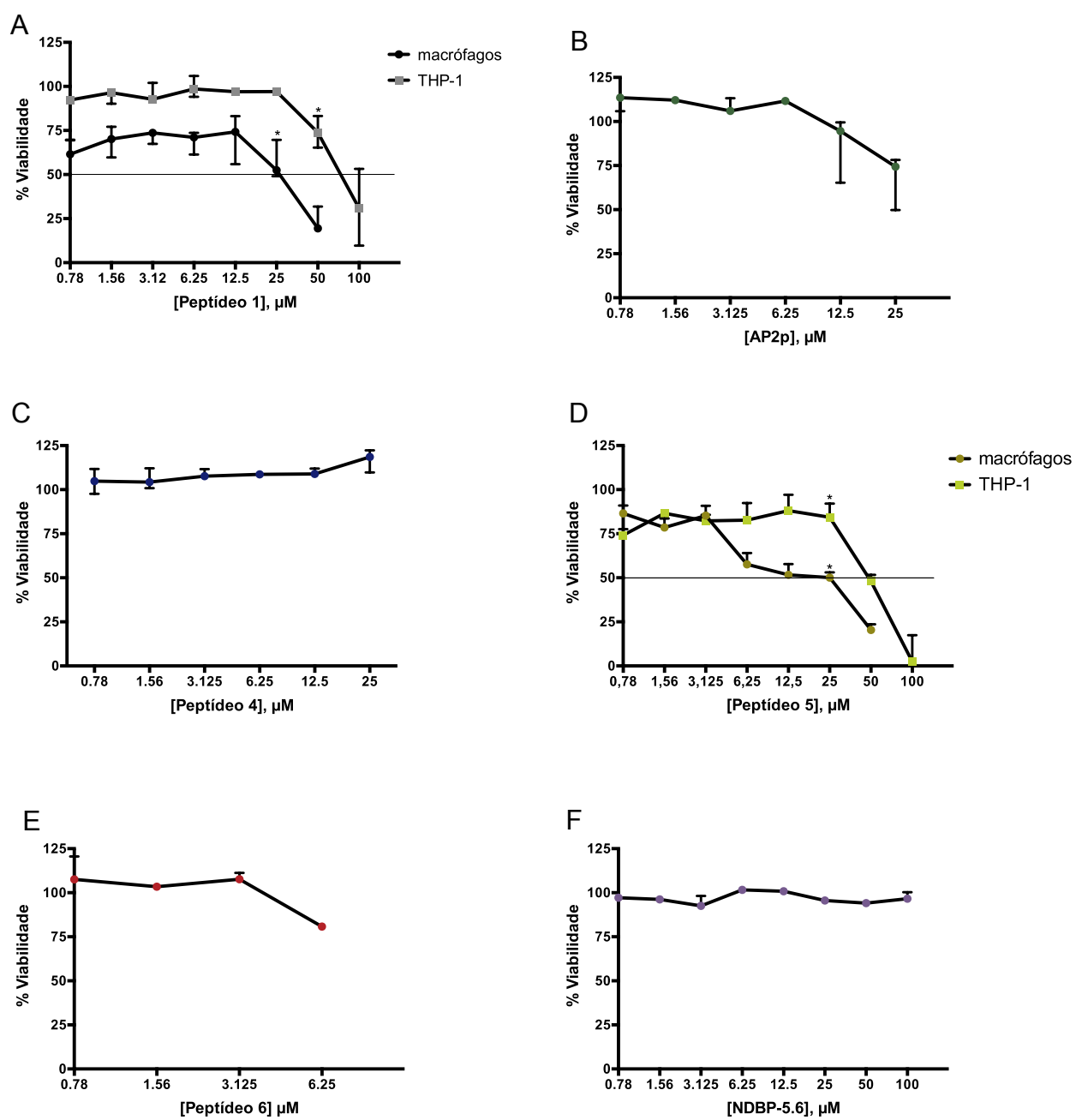
Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica : Norma Aprovada – Segunda Edição. M27-A2, v. 22, n. 15, [S.d.].

Anexo 1:

**Resultados dos testes de capacidade hemolítica.**

Peptídeo 1 (A); AP2p (B); peptídeo 4 (C); peptídeo 5 (D); peptídeo 6 (E); NDBP-5.6 (F). Valor de $p < 0,05$ (*)

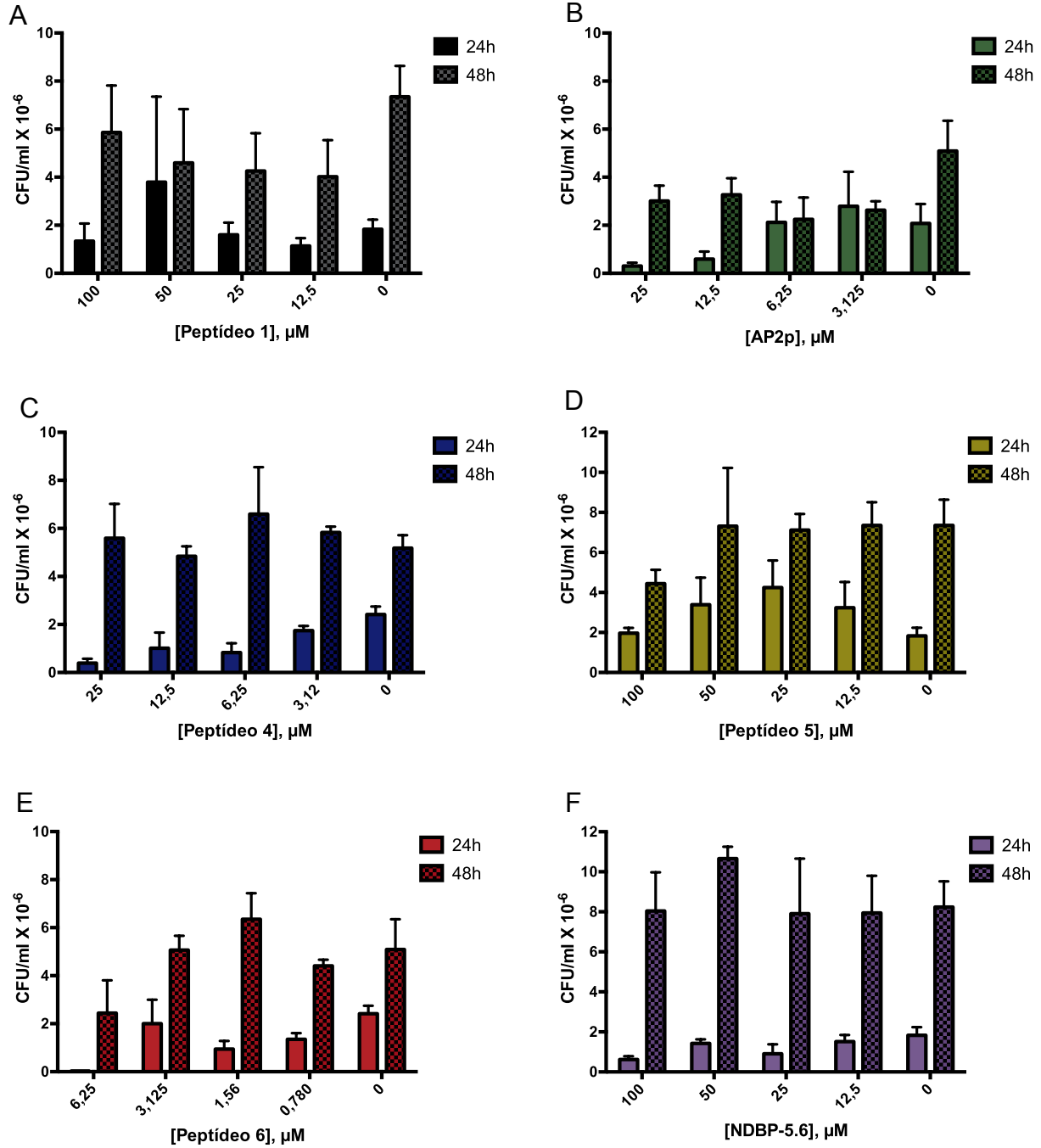
Anexo 2



Resultados dos testes de atividade citotóxica.

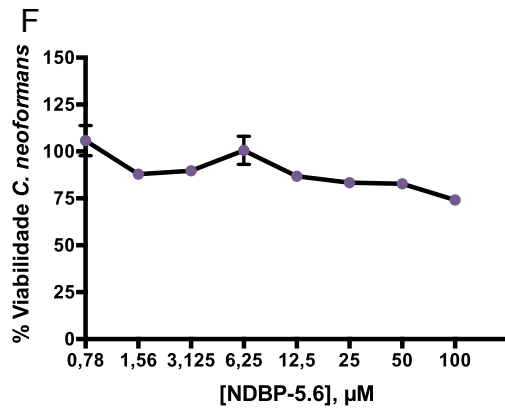
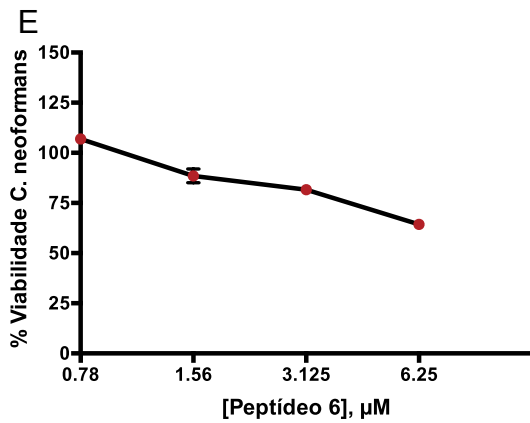
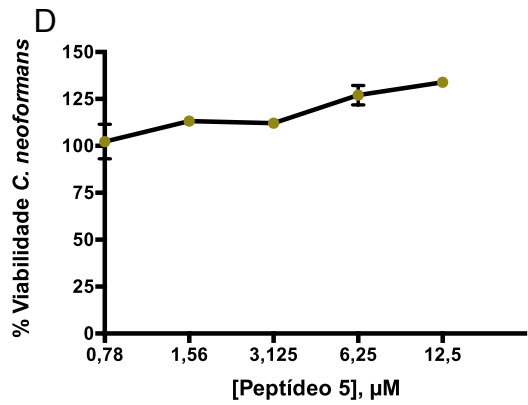
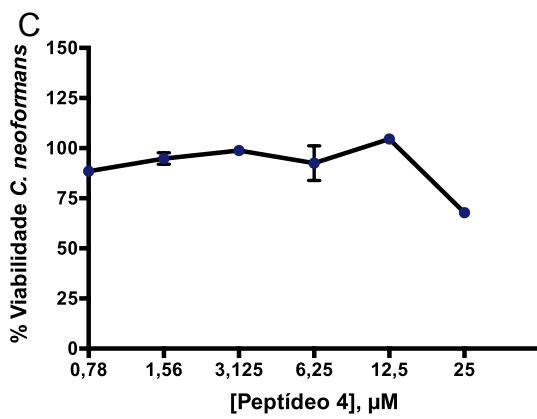
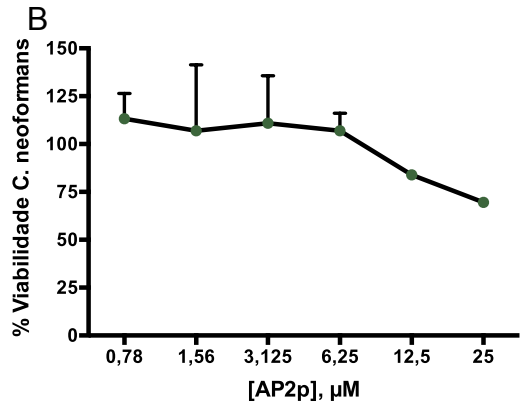
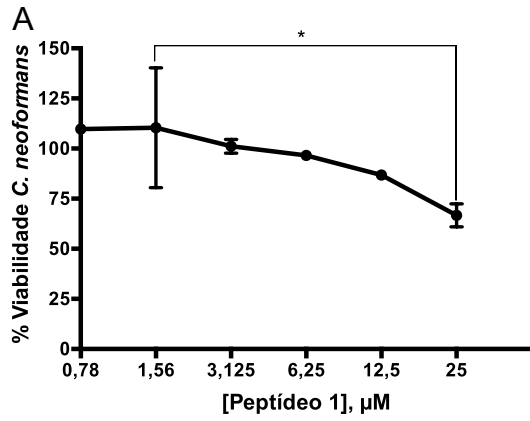
Peptídeo 1 (A); AP2p (B); Peptídeo 4 (C); Peptídeo 5 (D); Peptídeo 6 (E); NCPF (F). Valor de $p < 0,05$ (*).

Anexo 3

**Resultados dos testes de capacidade microbicida direta.**

Peptídeo 1 (A); AP2p (B); Peptídeo 4 (C); Peptídeo 5 (D); Peptídeo 6 (E); NCPF (F). Valor de $p < 0,05$ (*).

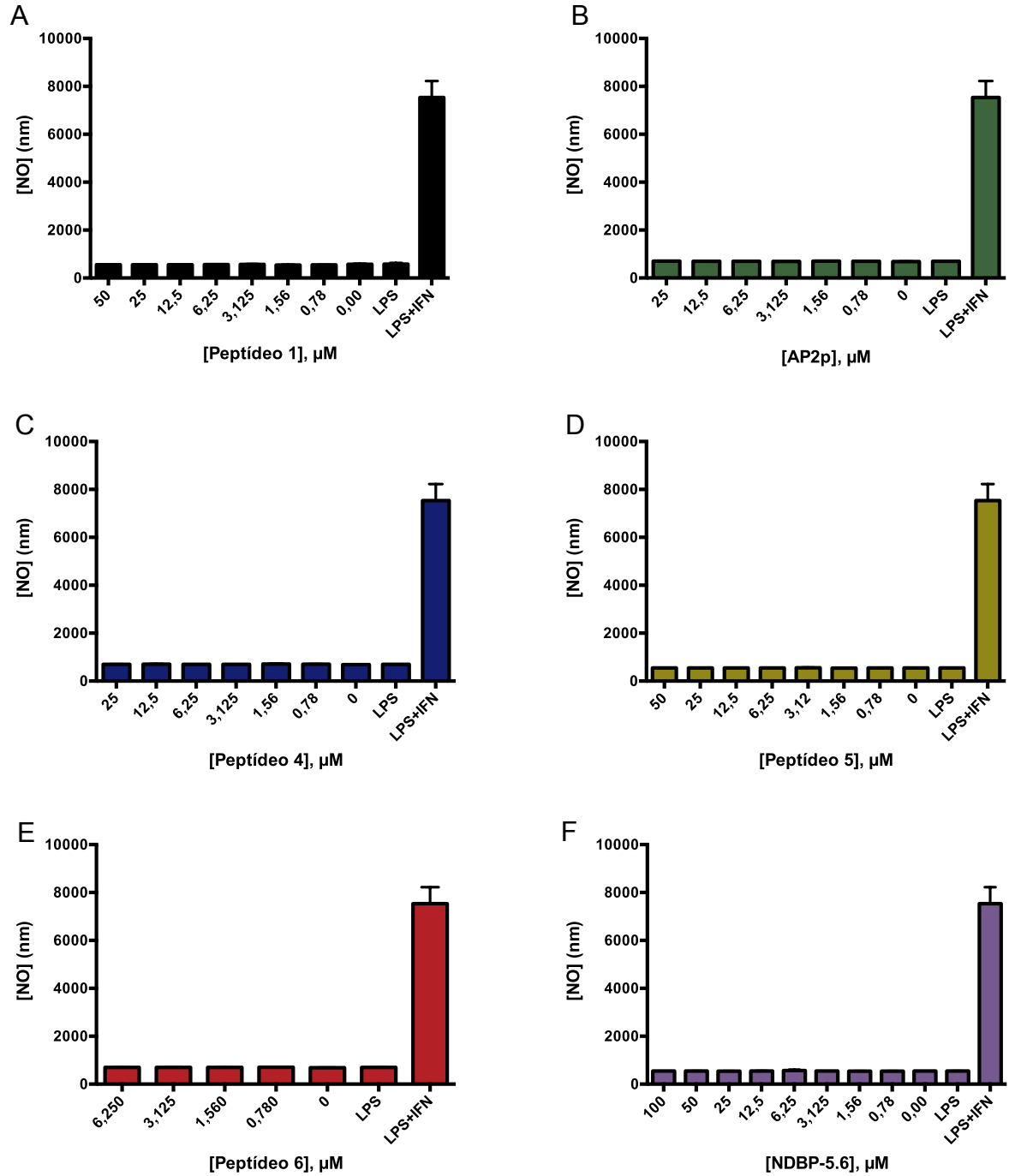
Anexo 4



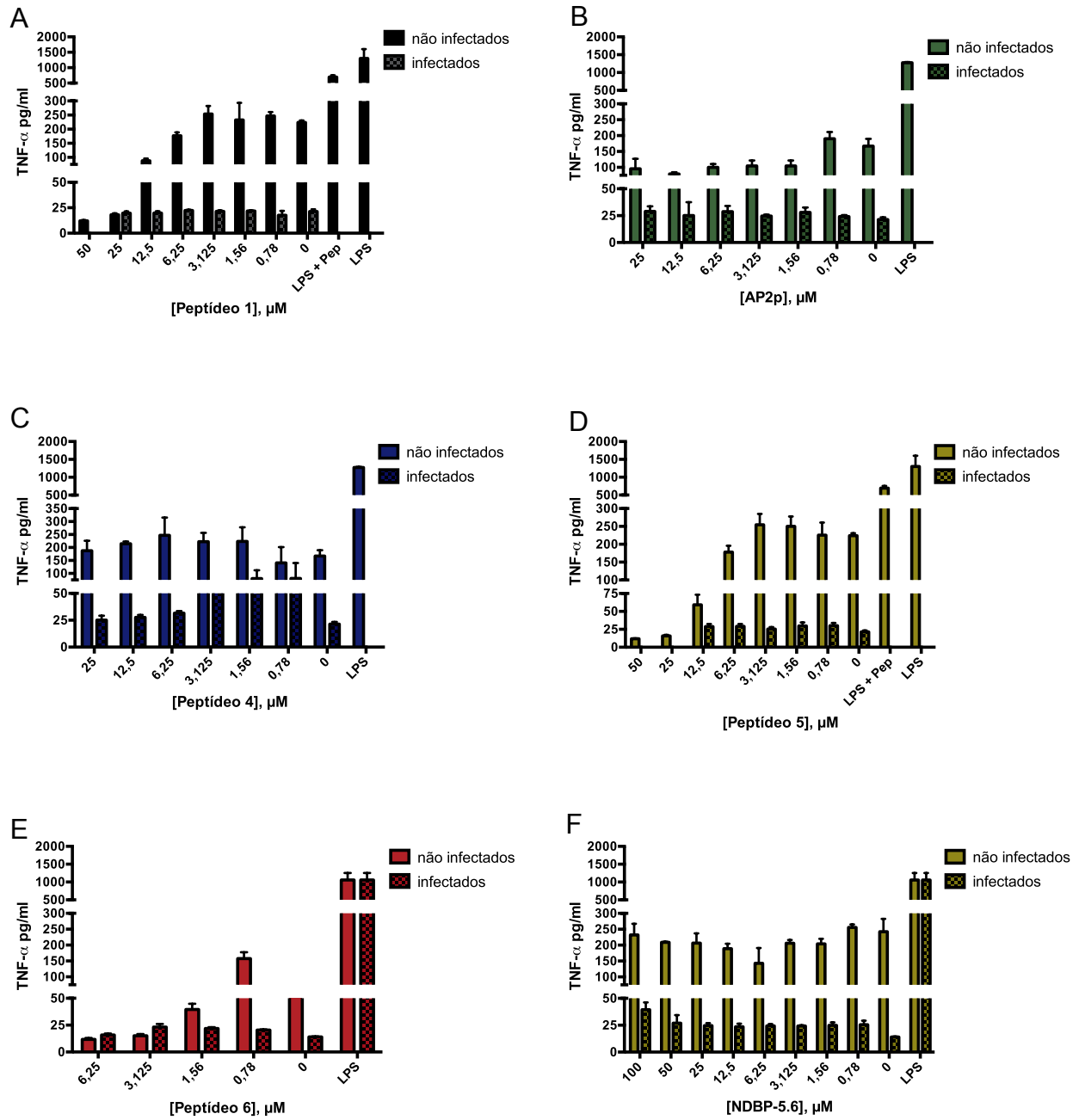
Resultados dos testes de capacidade microbicida indireta

Peptídeo 1 (A); AP2p (B); peptídeo 4 (C); peptídeo 5 (D); peptídeo 6 (E); NDBP-5.6 (F). Valor de $p < 0,05$ (*)

Anexo 5

**Resultados da dosagem de óxido nítrico (NO).**

Peptídeo 1 (A); AP2p (B); peptídeo 4 (C); peptídeo 5 (D); peptídeo 6 (E); NDBP-5.6 (F). Valor de $p < 0,05$ (*)



Resultados das dosagens de TNF- α

Peptídeo 1 (A); AP2p (B); Peptídeo 4 (C); Peptídeo 5 (D); Peptídeo 6 (E); NCPF (F). Valor de $p < 0,05$ (*).

Anexo 7

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

O (a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto Atividade de Peptídeos derivados da Peçonha de escorpiões em Macrófagos Murinos: Avaliação da Sua Influência na Resposta à Cryptococose.

O objetivo desta pesquisa é: avaliar o efeito hemolítico, microbicida e imunomodulatório de peptídeos sintetizados a partir da biblioteca de cDNA das espécies *Tityus serrulatus*, *Tityus obscurus* e *Hadrurus gertschi*.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a)

A sua participação será através de doações de amostras sanguíneas para os ensaios de atividade hemolítica. Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Instituição Universidade de Brasília (UnB) podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dr(a).Anamélia Bocca, na UnB telefone: _____, no horário: 8 às 12h.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

 Nome / assinatura

 Pesquisador Responsável
 Nome e assinatura

Brasília, ____ de _____ de _____