

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**

MAYARA GABRIELE CARVALHO DE OLIVEIRA

**Estudo do efeito leishmanicida da dermaseptina-01,
um peptídeo antimicrobiano de *Phyllomedusa azurea***

Brasília, DF

2015

MAYARA GABRIELE CARVALHO DE OLIVEIRA

**Estudo do efeito leishmanicida da dermaseptina-01,
um peptídeo antimicrobiano de *Phyllomedusa azurea***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Medicina Tropical.

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

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



Brasília, DF

2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1020394.

O48e Oliveira, Mayara Gabriele Carvalho de.
Estudo do efeito leishmanicida da dermaseptina-01, um peptídeo antimicrobiano de *Phyllomedusa azurea* / Mayara Gabriele Carvalho de Oliveira. -- 2015.
xvii, 88 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical, 2015.

Inclui bibliografia.

Orientação: Selma Aparecida Souza Kuckelhaus ;
Co-orientação: Tatiana Karla dos Santos Borges.

1. Leishmaniose. 2. Medicamentos. 3. Macrófagos.
I. Kuckelhaus, Selma Aparecida Souza. II. Borges, Tatiana Karla dos Santos. III. Título.

CDU 616.993.161

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Mayara Gabriele Carvalho de Oliveira

ESTUDO DO EFEITO LEISHMANICIDA DA DERMASEPTINA-01, UM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DE *Phyllomedusa azurea*

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Medicina Tropical: Biologia da Interação Parasito-Hospedeiro

DATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

12 de Fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a Dr^a Tatiana Karla dos Santos Borges – Universidade de Brasília
(co-orientadora)

Prof Dr. Carlos dos Santos Kückelhaus – Secretaria de Saúde

Prof^a Dr^a Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo – Universidade de Brasília

Prof Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro – Universidade de Brasília
(suplente)

As pessoas que mais amo nesse mundo, meus pais, Francisca Gomes e José Francisco, meu alicerce e meu porto seguro, que nunca mediram esforços para o meu crescimento pessoal e profissional. Nada disso seria possível sem o incentivo, alegria, amor e apoio de vocês. Obrigada por serem esses pais maravilhosos! A vocês dedico mais essa conquista!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e sempre me manter de pé nos momentos difíceis! Principalmente por proporcionar a realização dos meus sonhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus, pela orientação e por sempre achar soluções quando os problemas apareciam. Muito obrigada pela oportunidade e incentivo para a realização deste trabalho e de outros que virão.

À minha co-orientadora Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges pelas orientações e ajuda na bancada. Agradeço a Deus por ter colocado em minha vida uma pessoa tão especial e querida como você! Obrigada por sempre acreditar e confiar em mim.

À Dra. Maria Imaculada Muniz-Junqueira por transmitir sempre com tanta sabedoria os seus conhecimentos sobre imunologia.

Ao meu grande amigo Danilo Corazza, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos do mestrado. Muito obrigada por estar sempre disposto a me ajudar independente de datas e horários; Serei eternamente grata pela sua ajuda e amizade!

À Luciana de Magalhães Leite pela ajuda com os materiais dos experimentos, pela sua amizade e muitas risadas ao longo desse mestrado.

À Graciene Araújo e Daniela Aquino por esclarecerem minhas dúvidas sobre a manutenção das leishmânias.

Aos meus amigos Danilo Corazza, Luciana Magalhães, Tatiana Karla Borges, Thaís Minuzzi, Márcia Cristina, Daniela Aquino, Graciene Araújo, Mariana Vieira, Elisabete Abrão, Carmem Lucia, Andréia Cascaes, Marcelo Nóvoa e André Cunha pelo carinho e momentos de descontração!

À minha grande amiga Daniella Alves, que me iniciou no meio acadêmico e sempre acreditou no meu trabalho.

À técnica Maria da Glória (Glorinha) por sempre estar disposta a me ajudar com a coloração de lâminas.

À técnica Renata, do Laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Medicina Tropical, pela atenção e disposição para sanar minhas dúvidas a respeito do cultivo das leishmânias.

Ao Dr. José Roberto Leite por disponibilizar o peptídeo antimicrobiano utilizado nesse trabalho.

A Dra Eliza Carla, Dr Carlos Kuckelhaus e Dr Luiz Romeiro, por aceitarem o convite para participar da banca.

A todos os meus amigos do Núcleo de Medicina Tropical: Danilo Corazza, Rafaela Albuquerque, Juliana Sousa, Luciana Miranda, Paulo Cortez, Priscilla, Mariana Atanásio, Jonathas e Ana Torrens pelas risadas e companheirismo!

À secretária do Núcleo de Medicina Tropical, Lúcia Martins, por sempre estar disposta a resolver problemas referentes à matrícula e créditos. Obrigada também pelos momentos de descontração.

A todos os professores do Núcleo de Medicina Tropical pela excelência no ensino e por contribuir para a minha formação.

Ao funcionário Emiraldo, do alojamento de animais da Faculdade de Medicina, por cuidar tão bem dos animais utilizados nos experimentos.

A CAPES pela bolsa de estudos.

E a todos os meus amigos e parentes que me apoiaram e entenderam a minha ausência para que experimentos e dissertação fossem concluídos.

FINANCIAMENTO

Este trabalho contou com o apoio financeiro da CAPES, que disponibilizou uma bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
INTRODUÇÃO	1
1.1 Mecanismos de infecção e de escape na leishmaniose	4
1.2 Os mecanismos microbicidas na leishmaniose	7
1.3 A terapêutica na leishmaniose	10
OBJETIVOS	14
MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Delineamento experimental	17
3.2 Tipo de estudo	17
3.3 Animais e procedimentos éticos	18
3.4 Peptídeos	18
3.5 Micro-organismo	19
3.6 Obtenção dos macrófagos peritoneais	20
3.7 Determinação do efeito da DRS-01 no tratamento de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	20
3.8 Determinação da sobrevivência das leishmânias após o tratamento	21
3.9 Determinação da viabilidade das células peritoneais após tratamento com o peptídeo	22
3.10 Determinação da viabilidade dos macrófagos infectados e incubados com a DRS-01	22

3.11 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio	23
3.12 Determinação da produção de óxido nítrico	23
3.13 Determinação da formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos	24
3.14 Análise estatística	24
RESULTADOS	26
4.1 Influência da DRS-01 no tratamento de macrófagos peritoneais infectados como <i>L. amazonensis</i>	27
4.2 Influência da DRS-01 na aderência dos macrófagos peritoneais	30
4.3 Influência da DRS-01 na viabilidade de células peritoneais	32
4.4 Influência da DRS-01 na viabilidade de macrófagos peritoneais	33
4.5 Influência da DRS-01 na sobrevivência de <i>L. amazonensis</i> após tratamento dos macrófagos infectados	36
4.6 Influência da DRS-01 na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais	37
4.7 Influência da DRS-01 na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais	39
4.8 Influência da DRS-01 na formação do corpúsculo lipídico por macrófagos	42
A. Controle basal x infecção e o tratamento	42
B. Infecção x tratamento	43
C. Avaliação do padrão dose-resposta da DRS-01 na formação dos corpúsculos lipídicos	43
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	58
LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ANEXOS	77
9.1 Comitê de Ética	77
9.2 Reagentes	79
9.3 Tabelas e Resultados	83

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo da <i>Leishmania</i> sp.	3
Figura 2. Fluxograma dos ensaios <i>in vitro</i>	17
Figura 3. Estrutura do peptídeo antimicrobiano DRS-01	19
Figura 4. Efeito da DRS-01 em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=6) infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	29
Figura 5. Fotomicrografias de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e tratados ou não com DRS-01	30
Figura 6. Percentual de células, preponderantemente macrófagos, de camundongos Swiss (n=6) aderidos sobre as lamínulas	32
Figura 7. Efeito da DRS-01 em cultivos de células peritoneais de camundongos Swiss (n=6)	33
Figura 8. Efeito da DRS-01 em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=6) infectados com <i>L. amazonensis</i>	34
Figura 9. Fotomicrografia de macrófagos corados com laranja de acridina para identificar células viáveis (verde) e não viáveis (laranja-avermelhadas), infectados ou não e na presença ou não da DRS-01	35
Figura 10. Percentual de sobrevivência de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com diferentes concentrações de DRS-01 em cultivos de macrófagos de camundongos Swiss (n=6) infectados	36
Figura 11. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados ou não com diferentes concentrações de DRS-01	38
Figura 12. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8), infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e tratados ou não com diferentes concentrações da DRS-01	39

Figura 13. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados ou não com diferentes concentrações da DRS-01	41
Figura 14. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8), infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e tratados ou não com diferentes concentrações da DRS-01	42
Figura 15. Efeito da DRS-01 na formação de corpúsculos lipídicos em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=6) infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	45
Figura 16. Fotomicrografias de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss, infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e tratados ou não com DRS-01	46
Tabela 1. Avaliação do índice de infecção por <i>L. amazonensis</i> em relação ao controle não tratado.	27
Tabela 2. Percentual de células, preponderantemente macrófagos, infectados ou não e tratados ou não com diferentes concentrações de DRS-01	31
Tabela 3. Influência da DRS-01 na formação dos corpúsculos lipídicos avaliada pelo Índice corpuscular.	43
Tabela 4. Efeito microbicida da DRS-01 nas formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos. Percentual de macrófagos infectados.	84
Tabela 5. Efeito microbicida da DRS-01 nas formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos. Média de Leishmânias.	84
Tabela 6. Efeito microbicida da DRS-01 nas formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos. Índice de infecção	84
Tabela 7. Viabilidade de células peritoneais de camundongos Swiss infectados com <i>L. amazonensis</i> e incubados com DRS-01	85
Tabela 8. Viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados com <i>L. amazonensis</i> e incubados com DRS-01	85
Tabela 9. Sobrevida de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com 1, 4 ou 16 de DRS-01	85

Tabela 10. Produção de corpúsculo lipídico em macrófagos infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> . Percentual de macrófago com corpúsculo lipídico.	86
Tabela 11. Produção de corpúsculo lipídico em macrófagos infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> . Média de corpúsculo lipídico	86
Tabela 12. Produção de corpúsculo lipídico em macrófagos infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> . Índice corpuscular.	86
Tabela 13. Produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e estimulados ou não com PMA e INF- γ	87
Tabela 14. Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e estimulados ou não com LPS e INF- γ	88

LISTA DE ABREVIATURAS

cNOS – sintase óxido nítrico constitutiva
DRS-01 – dermaseptina 01
ERN – intermediários reativos de nitrogênio
ERO – espécies reativas de oxigênio
FcR- receptor Fc
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HO. – hidroxil
HO₂ - hidroperoxila
IFN-γ – Interferon gama
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
iNOS – sintase óxido nítrico induzível
LPG – lipofosfoglicano
LPS – lipopolissacarídeo
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NK - células natural killer
NO - óxido nítrico
NOS - síntese do óxido nítrico
NOS 2 – sintase óxido nítrico 2
O₂⁻ - ânion superóxido
ONOO⁻ - peroxinitrito
PAM – peptídeo antimicrobiano
PAMP – padrões moleculares de patógenos
PKC - proteína kinase C
PSN-1 – filoseptina 1

SFB – soro fetal bovino

SOD – superóxido dismutase

STF – salina tamponada com fosfato

Ta1 – linfócito T auxiliar tipo 1

Ta2 – linfócito auxiliar tipo 2

TCD4 – linfócito T CD4

TGF-beta – fator de crescimento beta

TNF- α – fator de necrose tumoral α

RESUMO

A leishmaniose coloca em risco atualmente 350 milhões de pessoas em 88 países ao redor do mundo e estima-se que existam 12 milhões de pessoas infectadas no mundo. Os medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose são tóxicos e podem provocar resistência farmacológica. Portanto, é importante a busca por novos princípios ativos com ação leishmanicida. Entre eles, a dermaseptina-01 é um peptídeo catiônico e anfifílico que potencialmente pode ser introduzido em novas formulações terapêuticas devido a sua capacidade de interagir com as membranas das células resultando em um processo de permeabilização e rompimento da membrana do micro-organismo. No entanto, devido a sua capacidade lítica e por ser um princípio ativo novo, faz-se necessário compreender seu efeito nos macrófagos, que por um lado, são as células hospedeiras da infecção, e por outro são importantes na resposta inata contra o parasito. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da dermaseptina-01 na função e na viabilidade dos macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*. Macrófagos de camundongos Swiss coletados por lavagem peritoneal foram infectados ou não com formas amastigotas e tratados ou não com 0,06, 0,13, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ou 64 µg/mL de dermaseptina-01 para avaliar funções celulares como aderência, formação de corpúsculos lipídicos (coloração com Óleo Vermelho), a capacidade fagocitária e a microbicida pela produção de peróxido de hidrogênio (Método de Pick) e óxido nítrico (Método de Greiss), bem como avaliar seu efeito sobre a viabilidade dos macrófagos (coloração com laranja de acridina) e células (Método de exclusão com nigrosina). Os resultados, analisados por testes pareados mostraram que a dermaseptina-01: 1) reduziu o índice de infecção de macrófagos em todas as concentrações testadas (Teste t-pareado, $p < 0,05$) de forma dose-dependente; 2) todas as concentrações reduziram o percentual de aderência dos macrófagos em relação ao controle (t-pareado, $p < 0,01$); 3) reduziu o percentual de células viáveis nas concentrações de 1 ($p < 0,005$) e 16 ($p < 0,021$) µg/mL, enquanto que a concentração de 4 µg/mL não afetou a viabilidade celular ($p > 0,05$); 4) diminuiu a viabilidade em cultivos de macrófagos nas concentrações de 1, 4 e 16 µg/mL ($p = 0,009$); 5) inibiu a produção de peróxido de hidrogênio na presença ou não da infecção nas concentrações de 1, 4 e 16 µg/mL ($p < 0,05$); 6) aumentou a produção de óxido nítrico quando as concentrações 4 e 16 µg/mL foram utilizadas ($p < 0,05$); 7) aumentou o índice corpuscular de forma dose-dependente pelo aumento do número de corpúsculos no citoplasma dos macrófago ($p < 0,05$). Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que a dermosseptina foi capaz de diminuir a infecção pela *L. amazonensis*, possivelmente por melhorar a capacidade microbicida e modular as funções dos macrófagos, sem, contudo provocar a morte dessas células. Esses dados indicam o potencial leishmanicida da dermaseptina-01 e apontam para futuras aplicações biomédicas.

ABSTRACT

Leishmaniasis currently affects 350 million people in 88 countries around the world and it is estimated that there are 12 million people infected worldwide. The drugs used in the treatment of leishmaniasis are toxic and can cause drug resistance. Therefore, it is important to search for new active ingredients with leishmanicide action. Among them, dermaseptin-01 is a cationic and amphiphilic peptide which can be potentially introduced into new therapeutic formulations due to their ability to interact with cell membranes resulting in a process of permeabilization and disruption of the microorganism membrane. However, due to their lytic capacity and due to them being a new active ingredient, it is necessary to understand its effect on macrophages, which are both the host cells for the infection and important in the innate response against the parasite. The objective of this study was to evaluate the effect of dermaseptina-01 in the function and viability of macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. Macrophages collected from Swiss mice by peritoneal lavage were infected or not with amastigotes and treated or not with 0.06, 0.13, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 or 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of dermaseptin-01 to assess cellular functions such as adhesion, formation of lipid bodies (coloring Red Oil), the phagocytic capacity and the microbicide for the production of hydrogen peroxide (Pick Method) and nitric oxide (Method Greiss) and to assess its effect on the viability of macrophages (stained with acridine orange) and cells (deletion method with nigrosine). The results, analyzed by paired t tests showed that the dermaseptina-01: 1) reduced the infection rate of macrophages in all tested concentrations (paired t-test, $p < 0.05$) in a dose-dependent pattern; 2) all concentrations reduced the percentage of macrophage adhesion when compared to the control (paired t, $p < 0.01$); 3) reduced the percentage of viable cells at concentrations of 1 ($p < 0.005$) and 16 ($p < 0.021$) mg/mL , while the concentration of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ did not affect cell viability ($p > 0.05$); 4) decreased viability in macrophage cultures at concentrations of 1, 4 or 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0.009$); 5) inhibit hydrogen peroxide production in the presence or absence of infection with the concentrations of 1, 4 and 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$); 6) increased the nitric oxide production when concentrations 4:16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were used ($p < 0.05$); 7) increased in a dose-dependent pattern the corpuscular index by increasing the number of corpuscles in the cytoplasm of macrophages ($p < 0.05$). Together, the results demonstrate that dermosseptina was able to reduce the infection by *L. amazonensis*, possibly due to the enhancing the microbicidal capacity and modulating macrophage functions, without however causing the death of these cells. These data indicate the potential of dermaseptina-01 against leishmaniasis and point to future biomedical applications of this peptide.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose acomete atualmente 350 milhões de pessoas em 88 países ao redor do mundo e estima-se que 2 milhões de novos casos ocorram anualmente, o que totaliza 12 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2012). Essa doença comumente está associada à desnutrição, condições precárias de habitação, analfabetismo e a deficiência do sistema imunológico. Outros fatores importantes para a ocorrência da doença são as mudanças ambientais, como desmatamento, e a proximidade do homem as áreas de floresta, onde se encontram os vetores responsáveis pela doença (WHO 2007).

A leishmaniose resulta da infecção dos macrófagos por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Majili 2012). Esses parasitos são transmitidos durante o repasto de diferentes espécies do inseto, vetor popularmente conhecido como “mosquito palha”, que é um flebotomíneo pertencente ao gênero *Lutzomyia* (*L. flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermédia*, *L. wellcome* e *L. migonei*) (Ministério da Saúde, 2006; Ministério da Saúde, 2007); a interação entre os parasitos e os hospedeiros resulta em infecções caracterizadas por diferentes manifestações clínicas.

As formas cutâneas da Leishmaniose Tegumentar, que resultam em úlceras cutâneas auto-limitadas ou mucocutâneas, são causadas por 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* em humanos, sendo seis do subgênero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*) e uma do subgênero *Leishmania* (*Leishmania (L.) amazonensis*) (Ministério da Saúde 2006; Ministério da Saúde 2007; Lupi et al. 2009). A forma denominada Leishmaniose Visceral (LV) causada pela *Leishmania (L.) chagasi* é considerada a mais grave da doença e se caracteriza pela disseminação dos parasitos pelas vísceras, causando o comprometimento funcional do fígado, baço, pulmão, trato gastrointestinal e medula óssea.

Os dados do Ministério da Saúde (2006, 2011) mostram que o Brasil vem apresentando um forte aumento no número de casos de leishmaniose e, somente entre 2001 e 2010 foram identificados 248.834 casos de Leishmaniose Tegumentar e 33.315 casos da Leishmaniose Visceral, esta última, especialmente na região nordeste que já responde a 90% dos casos de LV; o caráter urbano e periurbano

da doença têm sido atribuídos à presença de cães domésticos que são os principais reservatórios dos parasitos.

Como dito, a infecção de macrófagos pelas leishmânias durante o repasto do vetor é o ponto de partida para o estabelecimento da doença. As formas infectantes flageladas denominadas promastigotas são inoculadas e fagocitadas pelos fagócitos teciduais, como neutrófilos e macrófagos, e uma vez dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos essas formas, que possuem glicoproteínas em sua membrana que as ajudam a burlar o sistema imunitário do hospedeiro, são transformadas nas amastigotas que dão início à multiplicação por divisão binária; assim as formas amastigotas rompem a célula e podem invadir outras células estabelecendo a infecção. Durante um novo repasto sanguíneo o fletobomíneo ingere células contendo formas amastigotas, que ao chegar ao intestino do inseto diferenciam-se em promastigotas procíclicas e posteriormente em promastigotas metacíclicas que migram para o aparelho picador do inseto, onde serão transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado (Romão et al. 2007; Horikawa e Pena 2011) (Figura 1).

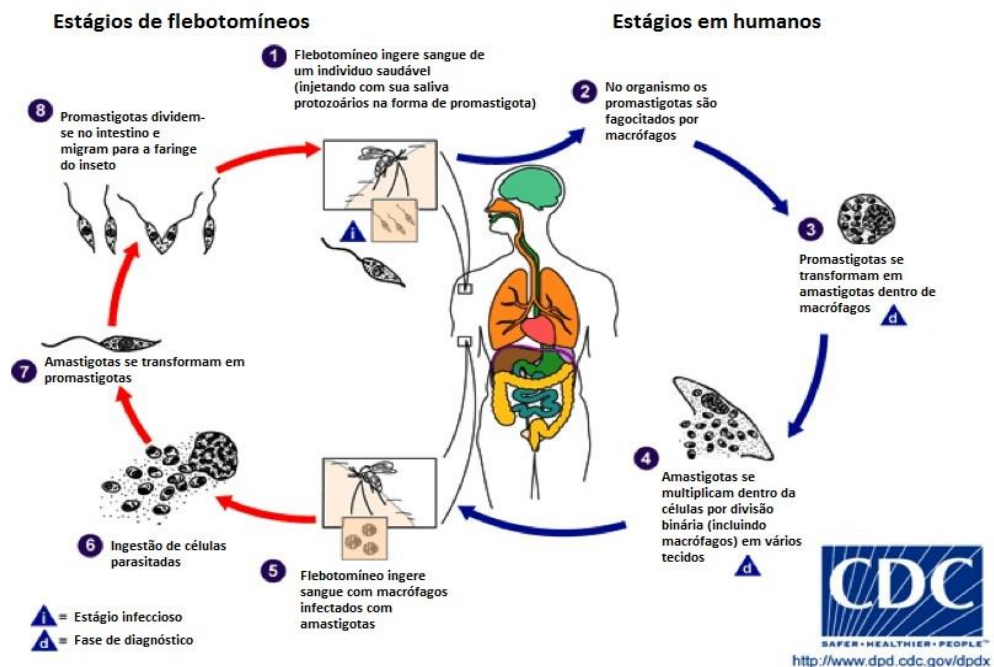


Figura 1. Ciclo da *Leishmania* sp.

1.1. Mecanismos de infecção e de escape na leishmaniose

Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas de *Leishmania* invadem macrófagos, células NK e neutrófilos (Kaye 2011). Ainda não se sabe qual célula é responsável para interação inicial com o parasito, mas estudos recentes têm sugerido que os neutrófilos são as primeiras células a serem infectadas, sendo assim, chamadas de cavalo de tróia (Peters et al. 2008), enquanto outros autores sugerem que os macrófagos são os primeiros a terem contato com o parasito (Nylén e Akuffo 2009).

Durante o processo de infecção dos macrófagos as formas promastigotas podem interagir com componentes do sistema do complemento. Foi demonstrado *in vitro* que 90% das leishmânias de *L. major* foram eliminadas pelo complexo de ataque a membrana formado pelo complexo C5b a C9 nos 3 primeiros minutos da infecção (Dominguez 2003). Para burlar o sistema imune, a promastigota alonga sua estrutura lipofosfoliglicano (LPG), alterando sua membrana e impedindo a inserção do complexo C5b-C9 (MAC) do sistema complemento do hospedeiro, o que dificulta a ligação do complexo MAC do sistema complemento ao parasito (Awatashi 2004). A *Leishmania* possui em sua membrana uma glicoproteína chamada GP63 que auxilia a inativação dos componentes do sistema complemento e converte C3b em iC3b, isso constitui um dos mecanismos de escape, pois inibe a ação lítica de opsoninas e facilita a sua fagocitose pelos macrófagos (Sharma 2009; Reis et al. 2006).

Os parasitos entram nas células através de receptores celulares, entre eles os receptores para padrões moleculares de patógenos (PAMP), CR3 e CR1, receptores Fc e manose-fucose (Wilson 1988; Laufs et al. 2002). Após o reconhecimento, ocorre a formação de um vacúolo, onde se encontra o parasito e logo após a fusão do fagossoma com o lisossoma forma-se o fagolisossoma que proporciona a destruição do parasito (Handman e Bullen 2002). No entanto, a molécula LPG presente na membrana das promastigotas retarda a fusão do fagolisossoma, lhes possibilitando escapar da atividade lítica de células fagocitárias e lhes conferem maior resistência e sobrevivência dentro do hospedeiro (Kaye 2011). *In vitro*, foi demonstrado que as formas promastigotas de *L. major* podem

ser rapidamente fagocitadas pelos neutrófilos, mas sobrevivem dentro do seu fagossoma e adquirem a forma amastigota e, depois de induzirem à apoptose nos neutrófilos são fagocitadas por macrófagos; dessa maneira, a promastigota burla o sistema imune e chega com segurança até o fagossoma do macrófago (Kaye 2011).

Dentro dos fagócitos como, por exemplo, os macrófagos, a *Leishmania* sofre ação das hidroxilas e dos ânions superóxidos. A presença da LPG torna a leishmânia mais resistentes ao óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ao pH ácido do fagolisossoma. (Olivier et al. 2005; Reis et al. 2006; Sharma 2009).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio liberadas no fagolisossoma parecem desempenhar uma ação microbicida importante durante a infecção, contudo, o efeito microbicida destes pode-ser neutralizado quando as leishmânias secretam peroxidoxinas e superóxido dismutase, durante a geração de radicais livres (Olivier et al. 2005). Além disso, ocorre aumento da sobrevivência das leishmânias também pelo fato dos macrófagos infectados produzirem TGF- β e IL-10, que são citocinas capazes de inibir ou desativar as funções microbicidas desses fagócitos (Olivier et al. 2005).

Os macrófagos podem destruir patógenos nos estágios iniciais da infecção, sem a ativação da resposta imunitária adaptativa, isso foi visto em parasitos de *L. major* que foram encontrados em macrófagos deficientes em iNOS após 72 h da infecção, demonstrando que o NO é produzido pelo macrófago sem ter sido ainda ativado pelo IFN γ produzido pelos Ta1, inibindo o crescimento do parasito (Wei et al. 1995).

Nos humanos e em modelos experimentais, a imunidade é predominantemente mediada por linfócitos T. Essas células são responsáveis pela resposta específica e pela memória ao parasito (Sharma 2009). Contudo, a resposta adaptativa celular dependerá da espécie da *Leishmania*, variação genética no hospedeiro mamífero, localização, tamanho e número de picadas, o tamanho do inóculo recebido e da saliva do flebotomíneo (Mutiso 2013). Assim, vários tipos de antígenos processados dentro dos macrófagos e que são

apresentados às células T CD4, determinam a formação de uma resposta do T auxiliar 1 (Ta1) ou T auxiliar 2 (Ta2) (Reis et al. 2006).

Os linfócitos Ta1 e Ta2 liberam citocinas que irão definir o percurso da doença. A Ta1 secreta citocinas pró-inflamatórias, sendo a principal o IFN γ , que induz a produção de óxido nítrico nas células fagocitárias, e a Ta2 secreta citocinas como IL-4 e IL-10, que além de promoverem a resposta humoral, possuem capacidade anti-inflamatória inibindo a ativação do fagócito (Sharma 2009). Os linfócitos citotóxicos naturais (NK) também participam da resposta, produzindo IFN γ e IL-5, contribuindo no controle da infecção em pacientes assintomáticos (Saha 2006); na ausência de controle da infecção a doença então se instala.

As formas clínicas da leishmaniose são: cutânea, cutânea difusa, cutâneo-mucosa, disseminada, e visceral. Todas essas formas dependem do gênero da Leishmânia e da resposta dos linfócitos T. A forma cutânea apresenta RNA mensageiro de citocinas tipo 1 como a IL-2, IFN- γ e TNF- α . Na forma cutânea difusa os indivíduos diminuem ou não produzem resposta do Ta1, observando-se uma resposta Ta2 com produção de IL-4 e IL-10, e baixa produção de IFN- γ e de IL-2. A forma cutâneo-mucosa tem alta resposta de Ta1 e altos níveis de IFN- γ e TNF- α . A forma disseminada apresenta um padrão de resposta Ta1 com alta expressão de IL-10. As lesões apresentam infiltrado mononuclear e baixas concentrações de IFN- γ e TNF- α (Carvalho 2005; Reis et al. 2006; Ministério da Saúde 2007 e 2011). Já na leishmaniose visceral os indivíduos infectados produzem altos níveis de citocinas tanto Ta1 quanto Ta2 e reduzida produção de IFN- γ e de IL-12 (Goto e Prianti 2009; Kumar e Nylén 2012).

Diferente dos humanos, os camundongos apresentam um paradigma Ta1 e Ta2 que está relacionado à resposta de resistência ou suscetibilidade. Os linfócitos T de linhagens de murinos apresentam esse paradigma sendo a *Leishmania major* o principal modelo dessa resposta (Mills 2000). Nos modelos animais resistentes a leishmaniose cutânea, a resposta é predominantemente do tipo Ta1 (Oghumu 2010). Camundongos C57BL-6 infectados com Leishmânia apresentam resposta Ta1, associada à produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α , e está ligada à cura espontânea da lesão, enquanto camundongos BALB/c, apresentam resposta tipo 2,

caracterizada pela produção de IL-4 e IL-5 e está associada à susceptibilidade à infecção e proliferação do parasita (Carvalho 2005). Já camundongos Swiss, controlam a infecção através da resposta Ta1, secretando IL-2, IFN- γ e TNF- α (Kiige et al. 2014).

1.2. Os mecanismos microbicidas na leishmaniose

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são encontradas nos sistemas biológicos e são geradas a partir de uma reação catalítica ligada à membrana de enzima NADPH-oxidase, que é ativado por componentes citosólicos, enquanto intermediários reativos de nitrogênio (ERNs) são produzidos pela síntese do óxido nítrico induzível (iNOS) (Han et al. 2001; Moreira 2009). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzido numa reação catalítica, a partir da dismutação do O₂, é um dos oxidantes mais versáteis que existe e pode ser convertido em radical hidroxila (OH) (Mattos et al. 2003; Assche et al. 2011).

Os macrófagos possuem uma série de mecanismos de defesa contra patógenos, incluindo a produção de EROs e um ERNs (Moreira, 2009) que mostram eficácia na eliminação de formas promastigotas de leishmânias (Das 2001; Moreira 2009), como demonstrado para *L. donovani*, em que o peróxido de hidrogênio leva à degradação do DNA e ativa a via das caspases causando a morte por apoptose (Wilson et al. 1994; Das et al. 2001). Diante desse mecanismo microbicida, as leishmânias têm desenvolvido estratégias para se contrapor às espécies reativas e a resistência desses parasitos depende do estágio logarítmico ou estacionário em que se encontram; formas pomastigotas metacíclicas se mostraram mais resistentes quando comparadas com as formas procíclicas (Wilson et al. 1994).

Sabe-se que as leishmânias possuem em suas membranas glicoproteínas que conseguem inibir a indução da enzima iNOS do macrófago (óxido nítrico sintase indutível) via diminuição da resposta mediada pelo IFN γ , além de diminuir a queima oxidativa pela inibição da atividade de proteína quinase C (PKC), enzima essa que participa da produção de radicais de oxigênio (Moreira 2009). Alves et al.

(2014), demonstrou que macrófagos de camundongos BALB/c não eliminaram eficazmente as formas promastigotas de *L. amazonensis*, evidenciando a incapacidade desses fagócitos de erradicar a infecção pela produção de reativos de oxigênio. Também, macrófagos de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* produziam quantidades inferiores de EROs, quando comparadas com células infectadas com *L. major*, o que sugere que a produção de EROs é modulada na dependência da espécie do parasito e que a produção adequada das espécies reativas é fundamental no controle da infecção (Almeida 2012).

Os estudos apontam para a importância do óxido nítrico como mecanismo microbicida dos macrófagos contra as leishmânias. O óxido nítrico (NO) é uma molécula não carregada composta de sete elétrons de nitrogênio e oito elétrons de oxigênio, e na sua forma original, é um gás que possui solubilidade moderada em água e se concentra em ambientes lipofílicos, como membranas e partes hidrofóbicas de proteínas (Barreto 2005; Beckman e Koppenol 1996). A meia-vida do NO é estimada entre 5 a 10 segundos *in vitro*, especialmente frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como oxigênio molecular (O₂) e ânion superóxido (O₂⁻). Ele ainda ataca metalo-proteínas que contém cobre e ferro, liberando seus íons metálicos e ocasionando a formação de radicais hidroxila e oxigênio molecular, que possuem elevado potencial oxidante (Barreto 2005). A produção de NO pela iNOS desempenha um papel fundamental contra infecções por bactérias intracelulares e parasitas (Dusse 2003; Olekhovitch 2014). Além disso, o NO regula a inibição celular de células T e B, produção de citocinas e adesão de leucócitos no endotélio microvascular (Veen 2001).

A produção de NO é mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e resulta na oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina que é convertida em L-citrulina. Sabe-se que existem duas categorias de NOS, a constitutiva (cNOS) envolvida na sinalização celular e a induzível (iNOS ou NOS2) produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (Dusse 2003). Quando ocorre síntese da iNOS, a produção continua até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam esgotados ou ocorra a morte celular (Dusse 2003). O NO é sintetizado no citoplasma celular, podendo migrar e chegar aos vacúolos parasitóforos e reagir com O₂⁻ resultando na formação de

peroxinitrito (ONOO^-), um oxidante de proteínas. O ONOO^- pode se protonar na presença de íon hidrogênio (H^+), originando um radical reativo e tóxico, o hidroxil (HO), aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O_2^- . Esses compostos podem atravessar a membrana celular e permitir uma atividade antimicrobiana (Dusse 2003; Olekhovitch 2014).

Os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e citocinas inflamatórias, podem induzir a secreção de NO e espécies reativas de oxigênio; *in vitro*, moléculas como o lipopolissacarídeo (LPS) associado com $\text{IFN}\gamma$ ou $\text{TNF-}\alpha$ desencadeiam expressão de iNOS em macrófagos.

As leishmânias conseguem burlar o estresse oxidativo com a gp63 presente em sua membrana, inibindo ativação de enzimas lisossomais quando ocorre a fusão do lisossoma com o fagossoma (Sorensen et al. 1994). Algumas espécies de leishmânia burlam com a diminuição da produção de O_2^- , inibição de NADPH oxidase, bem como por expressão de moléculas antioxidantes (Almeida 2012). Na presença de N-metil-L-arginina, um inibidor de iNOS, a atividade leishmanicida diminuí e a sobrevivência do parasita aumenta, indicando que o NO produzido por macrófagos pode inibir a replicação do parasita (Diaz 2002). Sabe-se também que as formas amastigotas são capazes de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos na comparação com as promastigotas (Channon 1984).

Além da produção de EROs as células de todos os organismos, desde plantas até células de mamíferos (Bozza 2009), possuem pequenas quantidades de corpos lipídicos com tamanho bem pequeno. Esses corpos lipídicos são organelas citoplasmáticas esféricas constituídas de lipídios e uma monocamada de fosfolipídios que podem aumentar de tamanho e número em resposta a diversas respostas inflamatórias e infecciosas, como artrite inflamatória, síndrome respiratória aguda, sepse bacteriana, entre outras (Bozza 2007; Bozza 2009). Esses corpúsculos lipídicos funcionam como plataformas de sinalização em leucócitos ativados para regular o metabolismo lipídico e tráfico; controlam a síntese e a secreção de mediadores inflamatórios; para responder às infecções; para orquestrar alérgica inflamação; e, portanto, aparece como alvo atraente

candidato para a intervenção terapêutica de tanto inata e immunopathologies adquiridos.

As proteínas que compõem os corpúsculos lipídicos incluem proteínas estruturais, quinases, enzimas metabólicas, proteínas da família Rab e pequenas GTPases; em conjunto esses componentes funcionam como sinalizadores dos leucócitos ativados. Funções inflamatórias e imunorregulatórias também podem ser vistas por essas organelas, uma vez que eles contenham enzimas formadoras de eicosanóides, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (Bozza 2007; Melo 2011). Sabe-se que após 1 hora de infecção de macrófagos pelo bacilo da tuberculose é possível identificar a formação de corpos lipídicos os quais aumentam de número decorridos até quinze dias de infecção (Melo 2011); esses corpos lipídicos também podem ser vistos em pacientes com hanseníase virchowiana, durante a fase aguda da infecção com *Trypanosoma cruzi* (Melo 2011), em infecções por *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium Falciparum* e *P. berghei*.

Como demonstram os estudos, o acúmulo de corpúsculos lipídicos pode ser identificado na leishmaniose, como nas células dendríticas de camundongos C57BL/6 infectadas *in vitro* por *L. amazonensis* (Lecoeur et al. 2013) e em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* (D'Avila 2008; Melo 2012; Aquino 2014). Apesar desses achados não se sabe ao certo se a infecção pelas leishmânias é capaz de estimular o acúmulo de corpos lipídicos nos macrófagos.

1.3. A terapêutica na leishmaniose

Alternativas terapêuticas à leishmaniose tem sido o alvo de estudos de diferentes grupos de pesquisa. Isso decorre da constatação de que os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose, apesar de serem eficazes no controle da doença apresentam toxicidade aos indivíduos e podem levar a mecanismos de resistência, em função do uso prolongado de baixas concentrações desses fármacos como já observado com os antimonialis pentavalentes e a anfotericina B (Lima et al. 2007; Macedo-Silva 2013). Além disso, seus efeitos colaterais como calafrio, febre, anemia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia

dificultam e reduz a adesão o tratamento dos pacientes (Lima 2007). Diante disso, a busca por novos fármacos pode contribuir para o controle da doença e nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAM) têm atraído à atenção de diferentes grupos de pesquisa por exibirem atividade contra diferentes classes de agentes infecciosos, como bactérias, fungos e protozoários (Kuckelhaus et al. 2007; Kuckelhaus et al. 2009). Ao contrário dos medicamentos comumente utilizados no tratamento da leishmaniose os peptídeos apresentam potencialidades medicamentosas por serem moléculas pequenas que apresentam baixa resistência e por possuírem um mecanismo de ação rápido; as sequências de aminoácidos desses peptídeos são indefinidas e não apresentam alguns epítomos para reconhecido, evitando sua destruição e resistência (Zasloff 2002).

Peptídeos são biomoléculas que contém de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos, mais quimicamente versáteis que as proteínas e que apresentam funções diversificadas (Machado et al. 2004). O termo peptídeo antimicrobiano se refere a um peptídeo com propriedades antimicrobianas (Wang e Wang 2009) e no amplo sentido da palavra, o termo se refere a todos os peptídeos microbicidas ou que inibem o crescimento dos micro-organismos; esses peptídeos resultam da clivagem de grandes proteínas sintetizadas ou não por via ribossomal (Koczulla e Bals 2003).

Os PAM são encontrados em todos os seres vivos e constituem os mecanismos inatos de defesa, desde as plantas até em mamíferos (Bachère et al. 2000). Essas moléculas foram identificadas em diversos tipos de anfíbios anuros as quais possuem efeito microbicida contra plamódios e leishmânias, bem como ação imunomoduladora em macrófagos na expressão de citocinas e espécies reativas (Hancock e Sahl 2006; Kuckelhaus et al. 2007).

O primeiro peptídeo isolado dessa classe de animais foi a bombinina em 1969, proveniente da secreção cutânea do *Bombina variegata*. Esse peptídeo demonstrou atividade antibacteriana e hemolítica, dando começo então, aos estudos de peptídeos com atividade microbicida provenientes de diferentes origens (Prates e Bloch, 2000). Peptídeos como a bombinina (Prates e Bloch 2000), Magainina (McGwire e Kulkarni 2010), cabrina 1.9, caerina 1.1 e maculatina 1.1)

(Rollins-Smith 2009), filosseptina-1 (Leite et al. 2005) e dermaseptina-01 (Brand et al. 2006) têm sido alvo de estudos na última década.

Os peptídeos formam um grupo de moléculas divididas em subgrupos com base na sua composição de aminoácido e estrutura secundária e comumente são catiônicos e anfifílicos, o que lhes conferem a capacidade de interação com as membranas das células (Kückelhaus et al. 2007; Leite et al. 2008).

Na a interação do peptídeo com o patógeno, acredita-se que tem início a permeabilização da membrana do mesmo. Em que pese a forma como se dá essa interação não tenha sido ainda esclarecida foram propostos modelos de interação baseado na estrutura primária e secundária dos peptídeos que levam à extrusão de citoplasma e conseqüentemente a morte do micro-organismo.. No primeiro modelo as moléculas dos peptídeos formam poros à semelhança de “estacas de barril”, no segundo modelo do tipo “toroidal”, os peptídeos formam complexos com os fosfolipídeos das membranas que se dobram para formar um poro toroidal e no terceiro modelo do tipo “carpete”, forma-se um carpete de peptídeos sobre a membrana celular, com ação detergente, que vai danificar a membrana plasmática e formar micelas (Brogden 2005). Acredita-se que essa interação seja mais expressiva com as membranas celulares dos patógenos do que com as dos mamíferos, sobretudo pela maior presença de fosfolipídeos aniônicos e ausência do colesterol (Oren e Shai 1998; Feder et al. 2000).

Considerando o potencial biotecnológico dos peptídeos antimicrobianos, nosso grupo de pesquisa tem estudado um peptídeo sintético pertencente à família das dermaseptinas, a dermaseptina-01, inicialmente obtido da perereca *Phylomedusa azurea*, e que demonstrou, *in vitro*, potente atividade antibacteriana e baixa toxicidade para células peritoneais de camundongos (Brand et al. 2006).

As dermaseptinas possuem como características comuns o fato de possuírem de 28 a 34 aminoácidos, serem lineares, catiônicas, formarem α -hélices quando associadas com bicamadas lipídicas e são moléculas anfipáticas; embora apresentem uma parte conservada em suas moléculas, a variação molecular observada nesses peptídeos lhes permite apresentar efeitos contra diferentes micro-organismos sem demonstrar danos significativos nas células de mamíferos

(Silva et al. 2008; Zampa et al. 2009). Esses peptídeos já mostraram que possuem ação *in vitro* contra *S. mansoni*; alterações da superfície tegumentar, aumento da taxa de mortalidade e redução da atividade motora foram induzidas pela DRS-01 (Moraes 2011). Efeitos importantes, também foram observados *in vitro* sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* (Moraes 2011).

Considerando as dificuldades no controle da leishmaniose, que residem, sobretudo na toxicidade e nos mecanismos de resistência gerados pelas drogas de escolha, além do potencial microbicida dos peptídeos antimicrobianos, esse estudo buscou determinar o efeito da dermaseptina-01 em cultivos de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* visando a futuras aplicações farmacológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da dermaseptina-01 em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados com *Leishmania amazonensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a influência de diferentes concentrações de DRS-01 no tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis*;
- Determinar o efeito de diferentes concentrações de DRS-01 na aderência dos macrófagos peritoneais;
- Determinar a influência da DRS-01 na viabilidade de células e de macrófagos peritoneais;
- Determinar a produção de peróxido de hidrogênio, de óxido nítrico e a formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos peritoneais na presença da DRS-01.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

Neste estudo avaliou-se o efeito microbicida (DRS-01) nas formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, sua toxicidade nas células peritoneais de camundongos Swiss e seu efeito na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na formação dos corpúsculos lipídicos por macrófagos peritoneais, conforme demonstrado no organograma abaixo (figura 1).

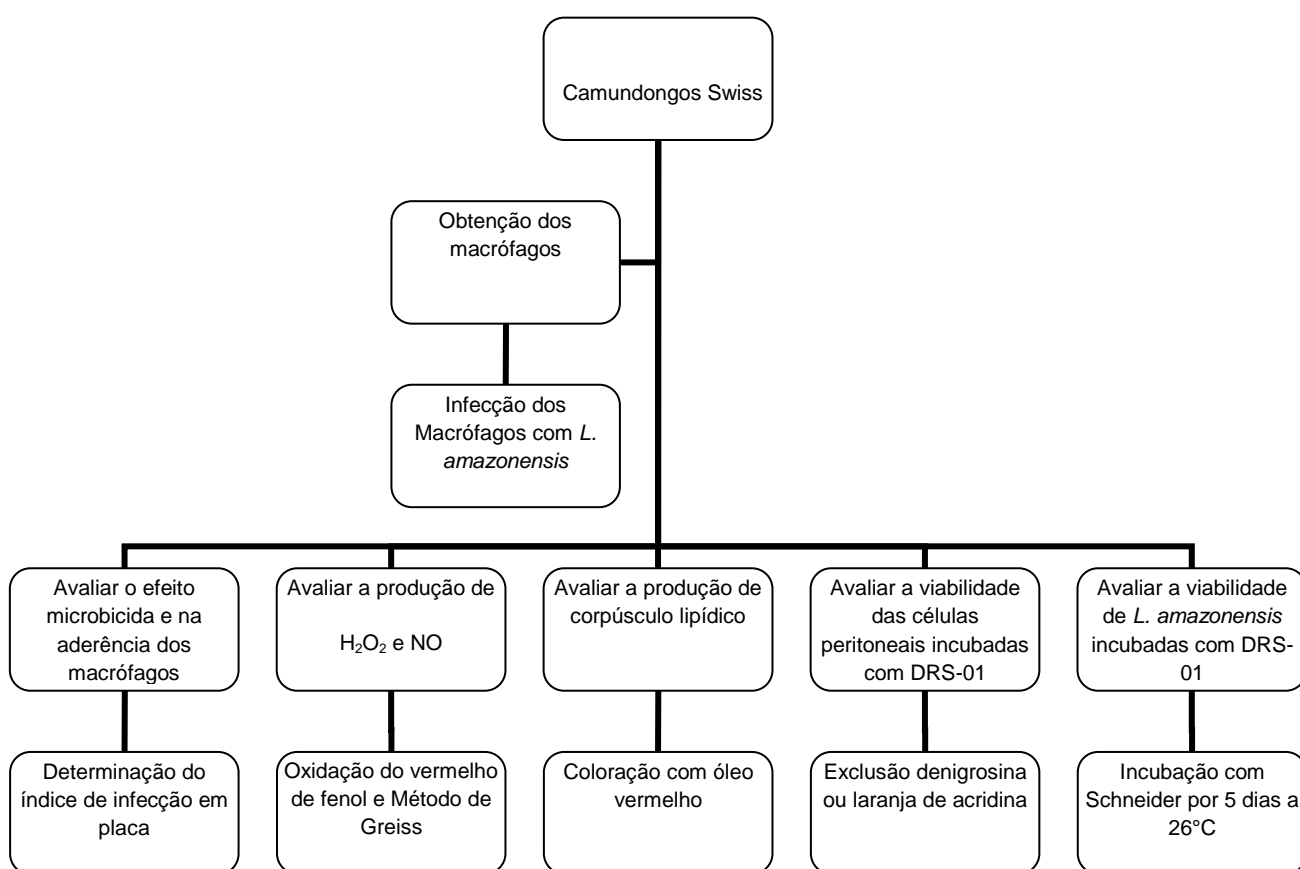


Figura 2. Fluxograma dos ensaios *in vitro*

3.2. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental, *in vitro*, de fase pré-clínica para determinar o efeito microbicida da dermaseptina-01 em cultivos de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

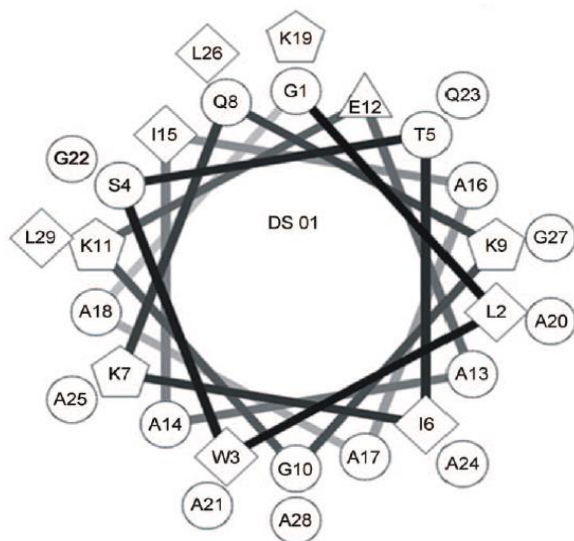
3.3. Animais e procedimentos éticos

Os animais utilizados nos ensaios foram camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, não isogênicos, com idades entre 8 a 16 semanas e pesando de 28 a 35g. Essa linhagem foi selecionada por ser susceptível à infecção pela *Leishmania*, por apresentar mecanismos de controle da doença semelhante ao observado na população humana e por apresentar grande variabilidade genética. Os camundongos eram provenientes do alojamento de animais da Faculdade de Medicina. Os camundongos eram mantidos a temperatura ambiente, em gaiola forrada com maravalha estéril e trocada duas vezes por semana, ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração balanceada e água potável *ad libitum*.

O projeto de pesquisa desenvolvido nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília em 07 de junho de 2013. Os critérios adotados para a experimentação e manutenção dos animais (Lei Arouca nº 11.794/2008) foram rigorosamente cumpridos durante a execução desse estudo.

3.4. Peptídeo

O peptídeo sintético utilizado nesse estudo, a Dermaseptina-01 (DRS-01), foi gentilmente cedido pelo Núcleo de Biodiversidade da Universidade Federal do Piauí, Campos Parnaíba. A produção do peptídeo foi feita no sistema Pioneer da Applied Biosystems (Foster, EUA) (Merrifield 1963) e purificado em coluna de fase reversa C18 218 TP 1022 (Vydac, Columbia, EUA) do sistema HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão); seu grau de pureza foi avaliado pelo sistema MALDI/TOF-MS (PerSeptive Biosystems, Framingham, EUA) e MALDI TOF-TOF MS Ultraflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) (Figura 2).



GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH₂

Ala (A) – alanina
 Asn (N) – asparagina
 His (H) – histidina
 Leu (L) – leucina
 Ser (S) – Serina
 Ile (I) – isoleucina
 Lys (K) – lisina
 Gli (G) - glicina
 Trp (W) - triptofano
 Thr (T) – treonina
 Glu (E) - glutamato
 Gln (Q) - glutamina

Figura 3. Estrutura do peptídeo antimicrobiano DRS-01, em que os pentágonos, quadrados, círculos e triângulos representam os resíduos, que são catiônicos, alifáticos e carregados negativamente. O eixo da α -hélice, que consistem em 3,6 resíduos, projeta as cadeias laterais de aminoácidos (Morales 2011).

3.5. Micro-organismo

Os micro-organismos utilizados nesse estudo foram leishmânias da espécie *Leishmania amazonensis* da cepa MHOM/BR/PH8, que já pertenciam ao acervo da Universidade e por ser uma espécie de fácil manipulação. As leishmânias eram mantidas sob criopreservação no laboratório de Leishmaniose do Instituto de Medicina Tropical, da Universidade de Brasília. Os espécimes eram rapidamente descriopreservados e uma alíquota era transferida para meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) estéril e mantida a 26°C até que os parasitos alcançassem fase log de crescimento. Depois, a suspensão era transferida para o meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 0,2% de sulfato de gentamicina e mantida a 26 °C, até que os parasitos atingissem novamente na fase log de crescimento. Para a infecção dos macrófagos foram obtidas as formas amastigotas axênicas pela transferência dos cultivos promastigotas para a estufa a 37 °C por 96 horas, conforme demonstrado por Aquino (2014).

3.6. Obtenção dos macrófagos peritoneais

As células peritoneais de camundongos Swiss submetidos à eutanásia em câmara contendo CO₂, eram obtidas pela lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) sem soro fetal bovino (meio incompleto), pH 7,2, a 4°C. Depois de coletadas, as células peritoneais eram centrifugadas a 400g por 10 min, ressuspensas com 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) sem soro fetal bovino (meio incompleto), quantificadas em hematocítmetro (Câmara de Neubauer) e mantidas sob refrigeração em tubos plásticos graduados de 15 mL (LAbTech, Melbourn, Inglaterra) até o início dos experimentos. Em seguida, as células peritoneais, (2×10^5 células) foram distribuídas em placa de microcultivo de 24 escavações contendo lamínulas redondas para a aderência. Decorridas 2 h de incubação em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) incompleto (sem adição de soro fetal bovino), em estufa a 37°C com 5% de CO₂ em ar, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C estéril para a remoção das células não aderidas e a obtenção dos macrófagos (>99% conforme Kuckelhaus et al. 2009).

3.7. Determinação do efeito da DRS-01 no tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito da DRS-01, os macrófagos obtidos conforme descrito no item 3.4 (n=6) foram incubados com 10^6 formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*/escavação com 5% de CO₂ em ar a 37°C para a infecção dos macrófagos. Para padronizar o tempo no qual a maioria dos macrófagos estivesse infectada com a leishmânia, duas placas foram previamente incubadas por 12 ou 15 horas com base nos estudos de Aquino, (2014), ao que resultou o tempo de 12 horas o mais apropriado. Logo, após 12 horas de incubação, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C estéril para a remoção das leishmânias não fagocitadas. Decorrida essa incubação, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF pH 7,2, 37°C estéril e incubadas com diferentes concentrações de DRS-01 (0,06; 0,13; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 ou 64,0 µg/mL), após as

escavações foram secas, fixadas com metanol, coradas com solução de Giemsa a 10% e avaliadas com microscopia óptica (1000x).

O efeito de diferentes concentrações foi avaliado pela determinação do índice de infecção em 200 macrófagos, que é expresso como produto da média de leishmânias ingeridas pelo percentual de macrófagos infectados. A partir desse experimento as concentrações de 1, 4 ou 16 µg/mL de DRS-01 foram selecionadas para os ensaios de funcionalidade. A escolha dessas concentrações baseou-se nos critérios de toxicidade para os macrófagos e na determinação do efeito microbicida e/ou imunomodulador de uma faixa delas, sendo 1 µg/mL a menor, 4 µg/mL a intermediária e 16 µg/mL a maior concentração. Para determinar o percentual estimado de macrófagos aderidos sobre as lamínulas foram quantificadas, em microscopia óptica (400 x) o total de células presentes em 10% da área da lamínula.

3.8. Determinação da sobrevivência das leishmânias após o tratamento

Para determinar a eficácia do tratamento com o peptídeo, os macrófagos peritoneais infectados com 10^6 formas amastigotas de *L. amazonensis*, incubados por 2 horas, em placa de 24 escavações, com as diferentes concentrações de DRS-01 (1, 4 ou 16 µg/mL), e lavados com STF, pH 7,2 conforme descrito no item 3.5, foram novamente incubados em meio Schneider (Sigma), pH 6,7, suplementado com 40 µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino estéril, a 26 °C, durante 5 dias, segundo o método descrito por Khouri et al. (2010) e modificado por Alves et al. (2014). Este meio é adequado para a sobrevivência das leishmânias, mas o pH baixo e a temperatura são incompatíveis com a sobrevivência dos macrófagos. Para a contagem das leishmânias em câmara de Neubauer, uma alíquota de 0,2mL do meio de cultura foi retirada de cada escavação e os resultados foram expressos em percentual de leishmânias/mL.

3.9. Determinação da viabilidade das células peritoneais após tratamento com o peptídeo

Para avaliar se a DRS-01 possui ação citolítica sobre as células peritoneais, um teste de viabilidade foi realizado com nigrosina. Para tal, 2×10^5 células foram colocadas em Eppendorfe em 200 μL meio RPMI 1640, pH 7,2 (Sigma). Em seguida foram adicionadas as diferentes concentrações de DRS-01 (1, 4 e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}/100 \mu\text{L}$) e então, os cultivos foram incubados por 2 horas. Após a incubação, uma alíquota de cada cultivo foi diluída (5x) em uma solução de 5% de nigrosina em STF, pH 7,2. A partir desta diluição foram contadas em hematocítmetro em microscopia óptica na objetiva de 400x e o resultado foi expresso em média após retirar as células que incluíram a nigrosina no citoplasma.

3.10. Determinação da viabilidade dos macrófagos infectados e incubados com a DRS-01

Os macrófagos peritoneais obtidos por aderência conforme descrito no item 3.4, em placa de 24 escavações contendo lamínulas para a aderência, foram infectados ou não com 10^6 formas amastigotas de leishmânias/500 μL por 12 horas, lavados com STF a 37°C para remover as leishmânias não fagocitadas e tratadas ou não com as diferentes concentrações de DRS-01 (1, 4 ou 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 2h. Em seguida, as escavações foram novamente lavadas com STF a temperatura ambiente e então, 250 μL de uma solução de 5 mg/mL de laranja de acridina (Merck®, Alemanha) foi adicionada à cada escavação. Decorridos 20 minutos para que o corante pudesse interagir com os macrófagos, as escavações foram lavadas duas vezes com STF, pH 7,2 a temperatura ambiente e as células foram fixadas por 30 min com paraformaldeído a 4% em STF, pH 7,2 e lavadas por duas vezes com STF, pH 7,2. Em seguida as lamínulas foram removidas das escavações e montadas sobre lâminas de microscopia contendo uma gota de STF, pH 7,2 como meio de montagem e suas extremidades foram seladas com esmalte incolor e acondicionadas até a análise da viabilidade em microscopia confocal. Conforme Christofletti (2010), células contendo o núcleo esverdeado foram consideradas viáveis e células avermelhadas mortas.

3.11. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi realizada segundo o método de Pick e Keisari (1981). Os macrófagos peritoneais obtidos por aderência conforme descrito no item 3.4 (n=8), em placa de 96 escavações sem adição de lamínula para a aderência, foram infectados ou não com 10^6 formas amastigotas de leishmânias/200 μ L por 12 horas e então, lavados com STF a 37°C para remover as leishmânias não fagocitadas. Em seguida, os macrófagos peritoneais foram incubados por 60 min, nas mesmas condições descritas, com 140 μ L de solução de vermelho fenol com 85 U de peroxidase (Sigma) adicionada de DRS-01 (1, 4 ou 16 μ g/mL); uma solução de acetato de forbol miristato (PMA) com 20nM ou 40nM ou Interferon (10ng/mL), em vermelho de fenol com peroxidase, foram utilizados como controles positivos. Durante a incubação foi preparada uma curva padrão contendo oito diferentes concentrações (0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100 nM) de H₂O₂, para um volume final de 140 μ L tampão fosfato suplementado com 0,5 mM de vermelho de fenol e 19 U/mL de peroxidase tipo II (Sigma). A reação foi interrompida pela adição de 10 μ L NaOH 1N e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro de placa com filtro de 620nm (Multiskan[®] Titertek, Huntsville, EUA). Os resultados foram expressos em micromoles (μ M) de H₂O₂.

3.12. Determinação da produção de óxido nítrico

Para avaliar a produção de óxido nítrico, macrófagos peritoneais (n=8) foram incubados com diferentes concentrações da DRS-01 e a produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada utilizando-se reagente de Greiss. Os experimentos foram realizados em placas de microcultivo de fundo plano de 96 escavações sem a adição de lamínulas. Os macrófagos peritoneais obtidos por aderência conforme descrito no item 3.4 foram incubados com 10^6 formas amastigotas de leishmânias por 12 horas para a infecção dos macrófagos e depois de lavados 3 vezes com STF, 0,15 M, pH 7,2, estéril a 37°C, as células foram incubadas por 24 h com diferentes concentrações de DRS-01 (1, 4 ou 16 μ g/mL/200 μ L) ou 20 ng/mL lipopolissacarídeo (LPS *Escherichia coli*, sorotipo 055:b5, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) ou 10ng/mL de Interferon; as soluções foram preparadas em meio RPMI 1640, pH 7,2, acrescido de soro fetal bovino. Ao final da incubação, as placas

foram submetidas à centrifugação a 400xg por 10 min e em seguida, 100 µL do sobrenadante de cada escavação foi transferido para outra placa e nesta foi acrescido 100 µL de reagente de Greiss. A curva padrão foi preparada com oito diferentes concentrações de nitrito de sódio (NaNO₂) 0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100nM, em água MiliQ. As leituras das reações colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro de placa com filtro de 540 nm (Multiskan® Titertek, Huntsville, EUA) e os resultados expressos em milimoles (mM) de NO.

3.13. Determinação da formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos

Para determinar a formação de corpúsculos lipídicos, os macrófagos peritoneais (n=6) obtidos por aderência (2x10⁵ células/escavação) em placa de microcultivo de 24 escavações com adição de lamínulas (item 3.4) foram infectados com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (10⁶/escavação), por 12h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após a incubação, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF a 37°C para a remoção das Leishmanias não ingeridas e então, as células serão novamente incubadas por 2 h com as diferentes concentrações de DRS-01 (1, 4 ou 16 µg/mL/200 µL). As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min, lavadas com STF pH 7,2 e álcool isopropílico a 60% e coradas com Oil Red® por 15 min, lavadas com água destilada e depois coradas com hematoxilina e montadas em meio gelatinoso. A quantificação dos corpúsculos lipídicos foi feita analisando-se 200 células/lamínula em microscopia óptica na objetiva de 1000x e em seguida determinou-se o índice corpuscular.

3.14. Análise Estatística

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a variabilidade pelo teste de Bartlett. Para a comparação entre duas amostras pareadas, normais ou não normais foram utilizados os teste t pareado ou Wilcoxon, respectivamente foram usados para comparar. As análises e as representações gráficas foram feitas empregando-se o programa Prism®

Software Package (GraphPad, USA, 1997). Diferenças de $p < 0,05$ serão consideradas significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Influência da DRS-01 no tratamento de macrófagos peritoneais infectados como *L. amazonensis*

O efeito microbicida da DRS-01 sobre formas amastigotas de leishmânias foi avaliado incubando-se macrófagos peritoneais infectados com diferentes concentrações do peptídeo (0,06; 0,13; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 ou 64,0 µg/mL) (Figura 3 e 4).

Tabela 1. Avaliação do índice de infecção por *L. amazonensis* em relação ao controle não tratado.

Parâmetros avaliados		Média (± DP)	Mediana (quartis)
Controle	Não infectado	-	-
	Infectado	2085±183,1	2097 (1911 – 2199)
Dermaseptina-01 (µg/mL)	0,06	526±63,1	531,7 (475,3 – 580,6)
	0,13	412,2±21,4	407,9 (394,9 – 434,6)
	0,25	324,1±73,6	319,3 (256,9 – 385,9)
	0,5	149±83,3	146,7 (70,8 – 212,1)
	1	287,6±68,9	303,2 (230,1 – 342,6)
	2	126,4±16,2	119,8 (113,8 – 145,2)
	4	64,2±12,2	65,4 (51,6 – 76,5)
	8	18,5±7,3	15 (13,5 – 26,3)
	16	6,0±1,9	6,3 (4,0 – 7,0)
	32	3,8±1,4	4 (2,3 – 4,5)
64	1,3±0,8	1 (0,8 – 2,3)	

Os resultados, analisados pelo teste t pareado, mostraram que incubação dos macrófagos peritoneais com as diferentes concentrações de DRS-01 diminuiu a média±DP do índice de infecção por *L. amazonensis* em relação ao controle não tratado (Tabela 1).

Semelhantemente, quando analisados pelo teste t pareado, o percentual de macrófagos infectados também foi reduzido em todos os cultivos tratados com a DRS-01, em relação à média±DP do controle de 28,5±1,8 para 12,8±1,3 com 1 µg/mL, 7,5±0,8 com 4 µg/mL ou 2,4±0,4 com 16 µg/mL (teste t pareado, p<0,001) (Figura 3A).

Quanto à média de leishmânias ingeridas por macrófagos, os resultados mostraram que todos os cultivos tratados com a DRS-01 apresentaram redução no número de leishmânias ingeridas na comparação com o controle não infectado (73,2±4,3) para 22,2±3,8 com 1 µg/mL, 8,5±0,8 com 4 µg/mL ou 2,4±0,44 com 16 µg/mL (teste t pareado, p<0,001) (Figura 3B).

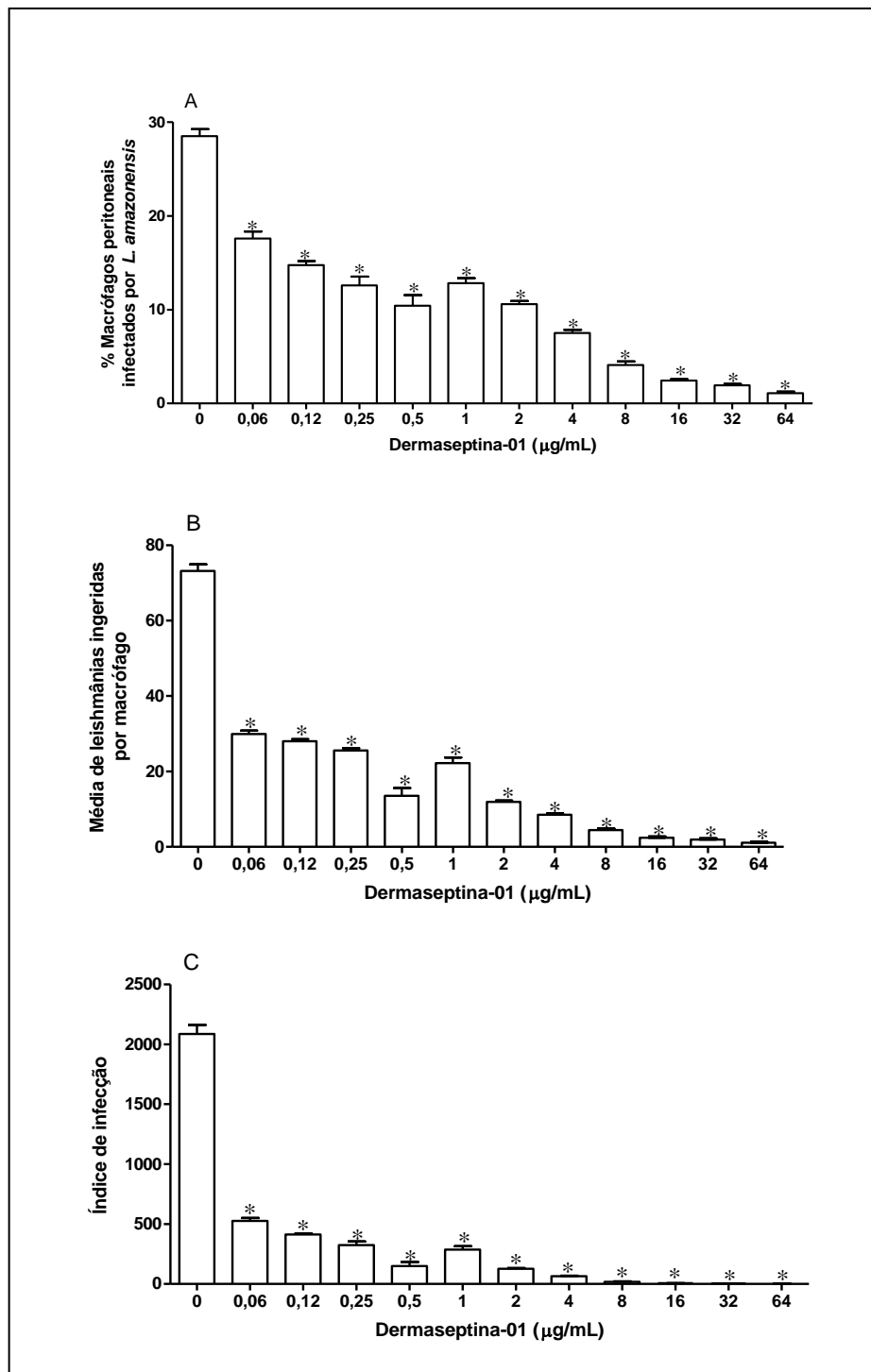


Figura 4. Efeito da DRS-01 em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=6) infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais obtidos por aderência (2×10^5 células/escavação) foram incubados por 12 h com 10^6 formas amastigotas de leishmânias para a infecção. Depois de lavadas, os cultivos foram tratados com diferentes concentrações de DRS-01 (0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 ou 64,0 µg/mL) por 2 h. Em A, percentual de macrófagos infectados, em B, média de leishmânias ingeridas por macrófagos e em C, índice de infecção. Os resultados, analisados pelo teste t pareado, mostraram que todas as concentrações de DRS-01 reduziram tanto o índice de infecção dos macrófagos ($p=0,001$) (C), quanto o percentual de macrófagos infectados ($p=0,001$) (A) e o número de leishmânias ingeridas ($p=0,001$) (B), sendo que as concentrações de 16,0; 32,0 ou 64,0 µg/mL as que mais reduziram os três parâmetros. Resultados representados em médias e desvios padrão.

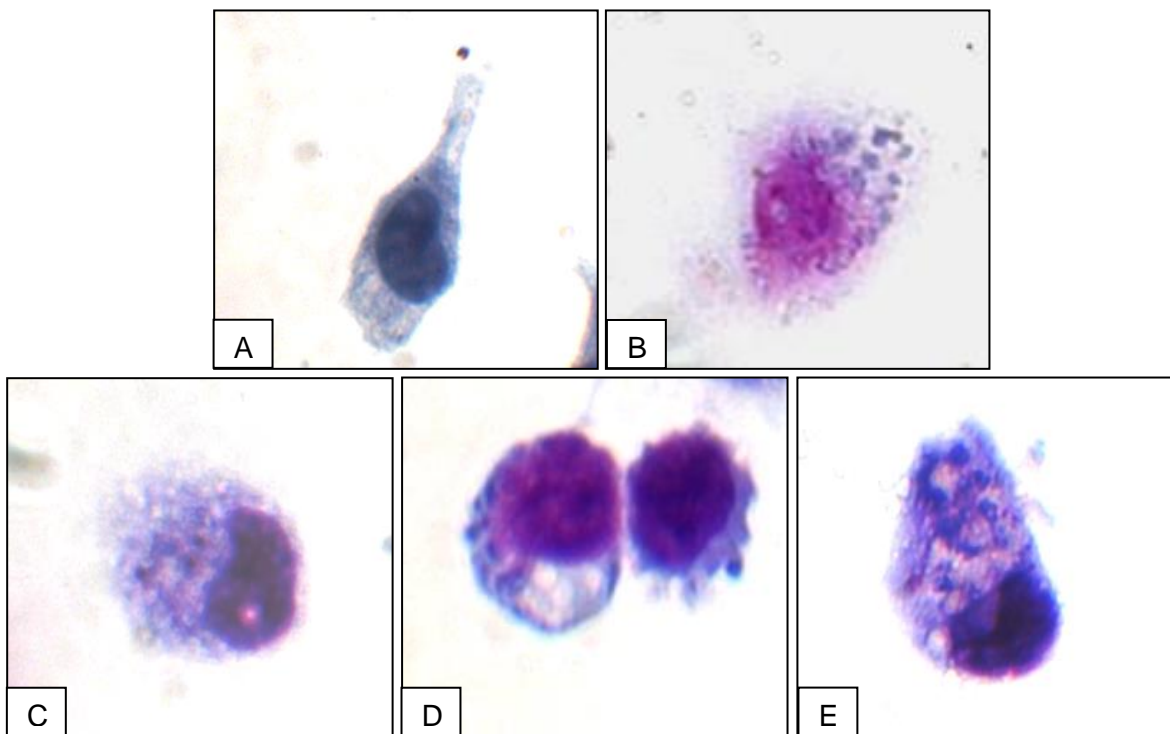


Figura 5. Fotomicrografias de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=6) controle não infectado (A), infectados com *L. amazonensis* (B) e tratados com 1 (C), 4 (D) ou 16 (E) µg/mL DRS-01. Coloração Giemsa 10%, aumento 1000x.

4.2. Influência da DRS-01 na aderência dos macrófagos peritoneais

Para avaliar a influência da DRS-01 na aderência das células peritoneais, preponderantemente macrófagos, foi determinado o percentual de células aderidas, infectadas ou não, em 10% da área das lamínulas.

Os resultados indicaram que todas as concentrações do peptídeo reduziram o percentual de macrófagos aderidos em comparação com o controle (Teste t-pareado, $p < 0,01$) (Tabela 1, Figura 5).

Tabela 2. Percentual de células, preponderantemente macrófagos, infectados ou não e tratados ou não com diferentes concentrações de DRS-01.

Parâmetros avaliados		Média (\pm DP)	Mediana (quartis)
Controle	Não infectado	98,5 \pm 0,9	98,6 (97,8 – 99,3)
	Infectado	84,0 \pm 12,6 *	85,7 (72,1 – 95,0)
Dermaseptina-01 (μ g/mL)	0,06	70,0 \pm 5,5 *	68,9 (64,8 – 76,13)
	0,13	62,8 \pm 3,7 *	60,3 (60,3 – 67,2)
	0,25	53,9 \pm 1,3	54,2 (52,8 – 54,8)
	0,5	33,8 \pm 1,7 *	33 (32,3 – 35,5)
	1	39,8 \pm 4,7 *	41,4 (35,4 – 43,0)
	2	39,2 \pm 1,8 *	40 (37,7 – 40,3)
	4	37,2 \pm 3,4 *	37,7 (34,5 – 40,2)
	8	36,8 \pm 4,2 *	37,4 (32,5 – 41,0)
	16	33,8 \pm 5,7 *	34,0 (28,7 – 38,2)
	32	26,7 \pm 2,2 *	27,3 (25,5 – 28,18)
64	24,3 \pm 1,3 *	24,2 (23,3 – 25,2)	

(*) valores diferentes do controle basal, macrófagos não infectados, quando analisados pelo teste t-pareado ($p < 0,01$)

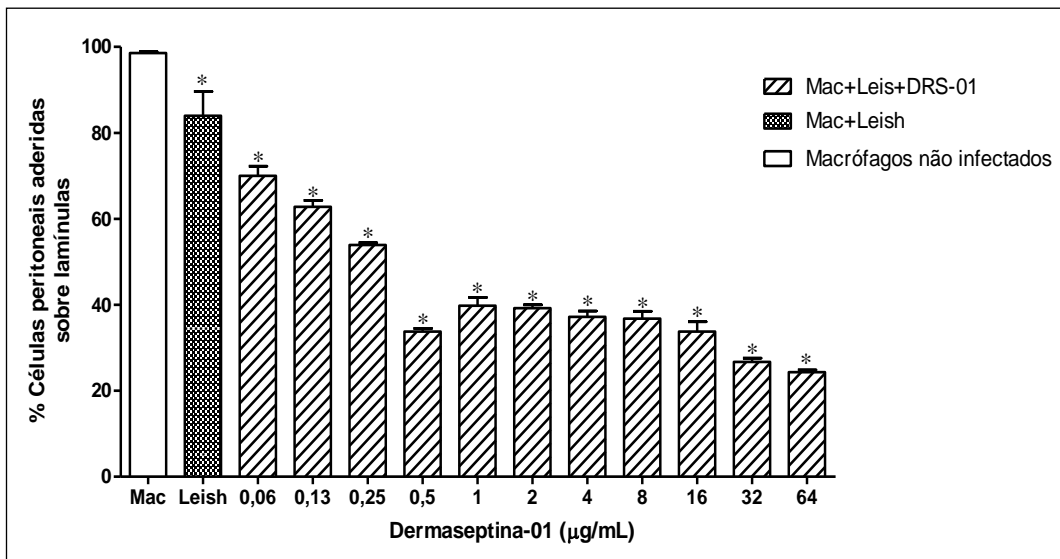


Figura 6. Percentual de células, preponderantemente macrófagos, de camundongos Swiss (n=6) aderidos sobre as laminulas. Macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram tratados com as diferentes concentrações de DRS-01 por 2 h. O efeito do peptídeo sobre a aderência foi obtido pela quantificação dos macrófagos em 10% da área da lamínula. Os resultados indicaram que a infecção ou o tratamento com as diferentes concentrações maiores de DRS-01 reduziram o % de células aderidas na comparação com o controle (teste t pareado, $p < 0,01$). Os resultados estão representados como Média±DP.

4.3. Influência da DRS-01 na viabilidade de células peritoneais

Para verificarmos se o tratamento com os peptídeos influencia a viabilidade, as células peritoneais foram incubadas por 2 horas com a DRS-01 e então, foram quantificadas as células vivas ou mortas pela exclusão da nigrosina.

Os resultados, analisados pelo teste t-pareado, mostraram que quando comparado o controle não tratado ($95,7 \pm 2,0$) com 1 ($75,0 \pm 9,9$) ou 16 ($80,7 \pm 8,8$) µg/mL de DRS-01 a viabilidade das células peritoneais diminuíram (Teste t-pareado, $p < 0,05$). Já a concentração de 4 µg/mL ($90,1 \pm 7,1$) não alterou a viabilidade celular ($p = 0,106$).

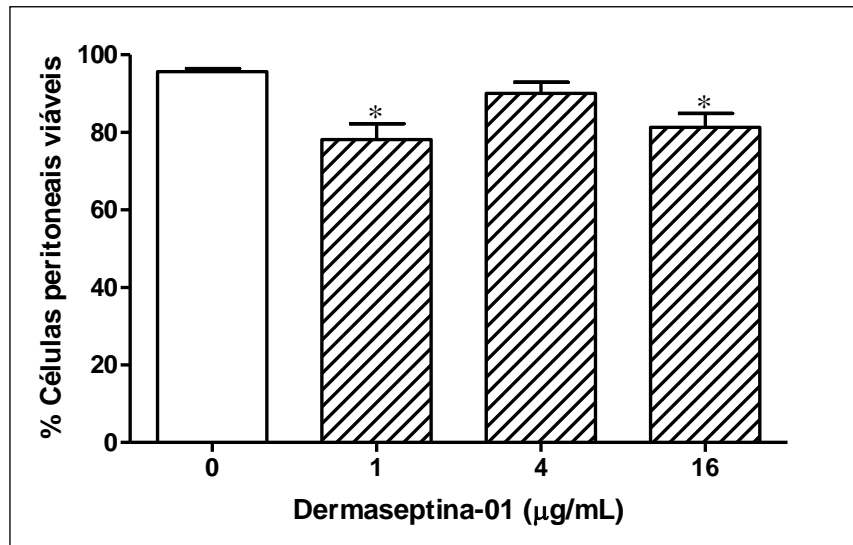


Figura 7. Efeito da DRS-01 na viabilidade de células peritoneais de camundongos Swiss (n=6). As células peritoneais (2×10^5 células) foram incubadas por 2 h com diferentes concentrações de DRS-01 (0, 1, 4, 16 $\mu\text{g/mL}$) e o efeito do peptídeo na viabilidade celular foi obtido pela quantificação das células vivas ou mortas, pela exclusão de nigrosina em microscópio óptico no aumento de 400x. Os resultados indicaram que as concentrações de 1 ($p < 0,005$) e 16 ($p < 0,021$) $\mu\text{g/mL}$ de DRS-01 reduziram o percentual de macrófagos viáveis na comparação com o controle (teste t pareado), enquanto 4 $\mu\text{g/mL}$ não afetou a viabilidade celular na comparação com o controle ($p > 0,05$). Os resultados estão representados como Média \pm DP.

4.4. Influência da DRS-01 na viabilidade de macrófagos peritoneais

Para verificarmos se o tratamento com os peptídeos influencia a viabilidade, as células peritoneais foram incubadas por 2 horas com a DRS-01 e então, foram quantificadas as células vivas ou mortas laranja de acridina.

Os resultados foram analisados pelo teste t-pareado, avaliando a média e desvio padrão dos macrófagos não infectados, infectados e infectados e tratados com as concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ ou 16 $\mu\text{g/mL}$ de DRS-01. Quando comparado ao controle não infectado ($94,8 \pm 1,6$), os macrófagos infectados ($89,3 \pm 3,1$) reduziram a sua viabilidade ($p = 0,009$), o mesmo foi observado para as preparações tratadas com 1 ($90,1 \pm 1,8$), 4 ($81,3 \pm 1,6$) ou 16 ($88,0 \pm 1,6$) $\mu\text{g/mL}$ de DRS-01 ($p < 0,01$) (Figura 7 e 8).

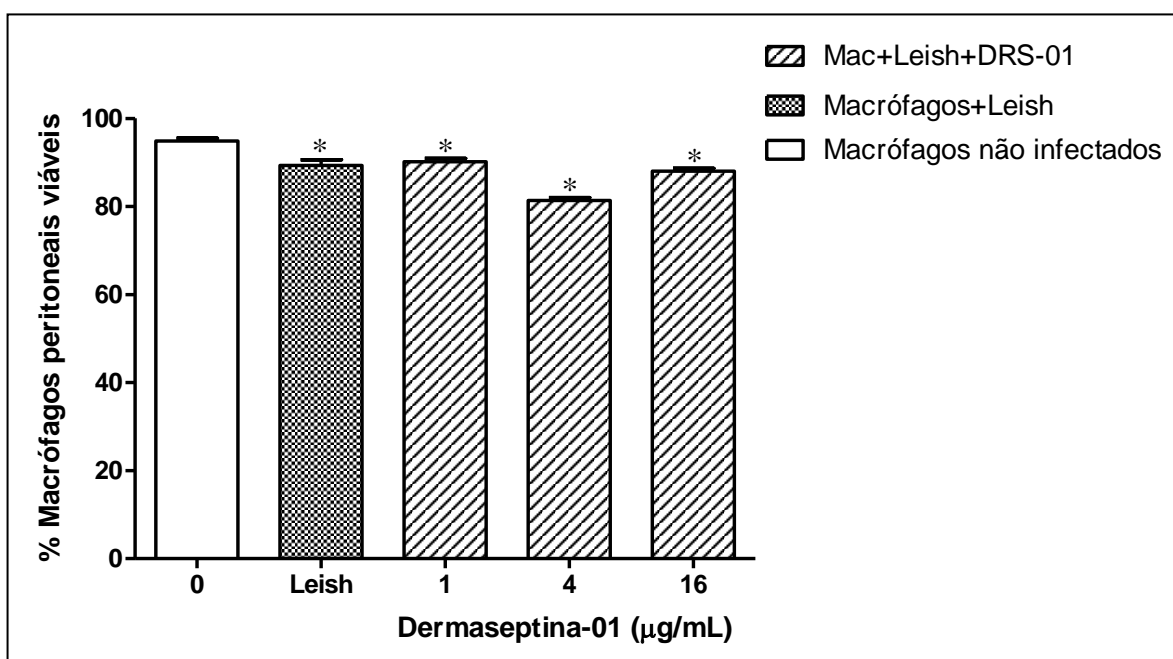


Figura 8. Efeito da DRS-01 na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=6) infectados com *L. amazonensis*. Os macrófagos (2×10^5 células) infectados foram incubados por 2 h com diferentes concentrações de DRS-01 (0, 1, 4, 16 µg/mL) e o efeito do peptídeo na viabilidade dos macrófagos foi obtido pela quantificação de 100 macrófagos vivos ou mortos em laranja de acridina no microscópio Axiophot no aumento de 400x. Os resultados indicaram que a leishmânia reduziu a viabilidade dos macrófagos quando comparado ao controle não infectado (teste t pareado, $p=0,009$). As concentrações de 1, 4 ou 16 µg/mL de DRS-01 também reduziram o percentual de macrófagos viáveis na comparação com o controle não infectado ($p<0,01$). Os resultados estão representados como Média±DP.

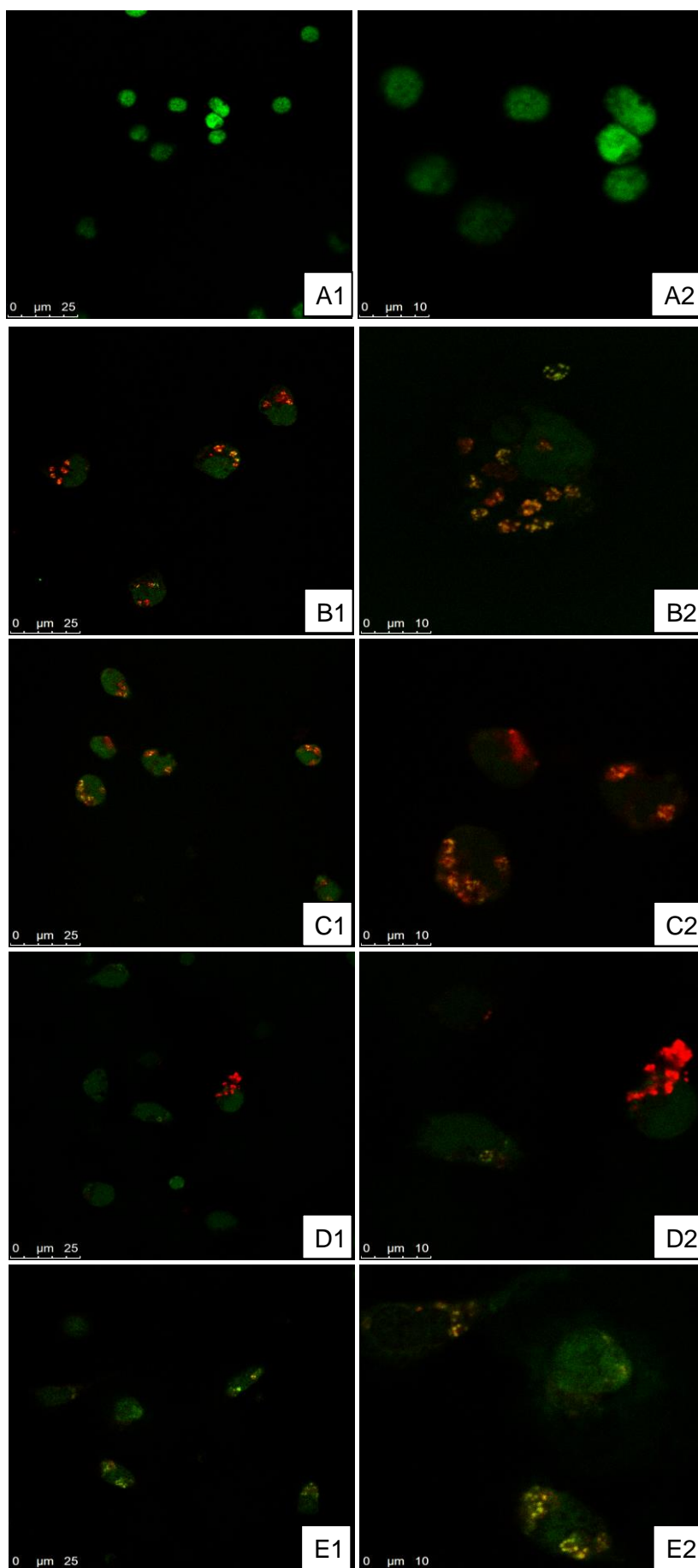


Figura 9. Fotomicrografia de macrófagos corados com laranja de acridina para identificar células viáveis (verde) e não viáveis (laranja-avermelhadas), infectados ou não e na presença ou não da DRS-01, mostrando macrófagos não infectados (A1 e A2); macrófagos infectados com *L. amazonensis* (B1 e B2); macrófagos infectados e tratados com 1ug (C1 e C2); macrófagos infectados e tratados com 4ug (D1 e D2); macrófagos infectados e tratados com 16ug (E1 e E2). As imagens foram obtidas em microscópio confocal Leica SP5. Pin hole 95,5 Airy, 1 frame average, 1 line average, com zoom de 2X (coluna da esquerda) e 5X (coluna da direita). As barras indicam 25 ou 10 μm de tamanho.

4.5. Influência da DRS-01 na sobrevivência de *L. amazonensis* após tratamento dos macrófagos infectados

Para verificarmos se o tratamento com as diferentes concentrações de DRS-01 era capaz de eliminar as leishmânias em cultivos de macrófagos infectados, as células foram re-incubadas por mais cinco dias em meio de cultura seletivo para as leishmânias.

Os resultados, analisados pelo teste de Wilcoxon, mostraram que na comparação com a mediana do controle (1,5%) os cultivos tratados com 4 (0,0%) ou 16 (0,0%) $\mu\text{g/mL}$ de DRS-01 apresentaram redução nas medianas do percentual de sobrevivência das leishmânias ($p=0,035$); o tratamento com 1 $\mu\text{g/mL}$ (1,0%) do peptídeo não afetou o percentual de sobrevivência na comparação com o controle ($p=0,098$) (Figura 9).

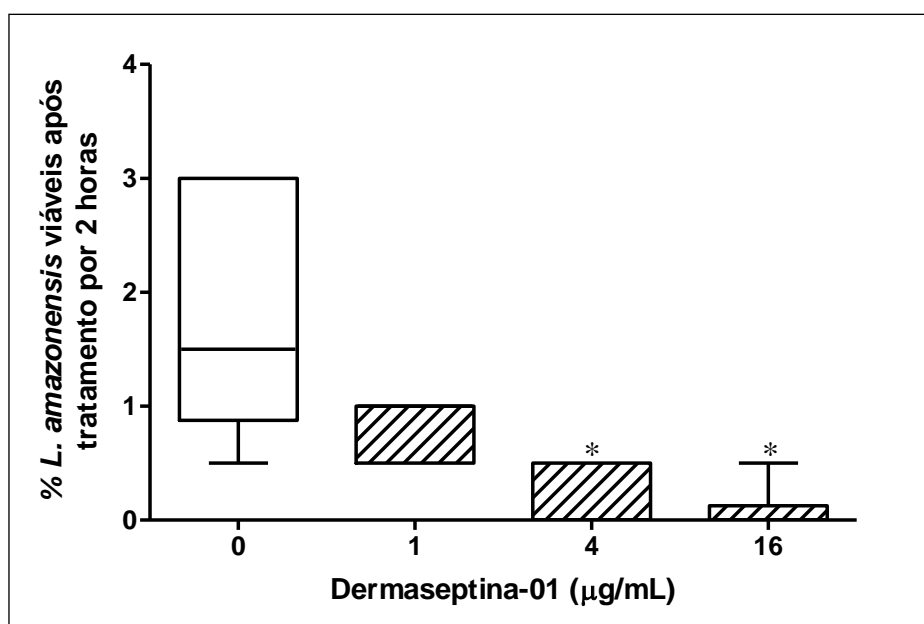


Figura 10. Percentual de sobrevivência de *L. amazonensis* após o tratamento com diferentes concentrações de DRS-01 (0, 1, 4, 16 $\mu\text{g/mL}$) em cultivos de macrófagos de camundongos Swiss ($n=6$) infectados. A re-incubação dos cultivos por cinco dias, em meio de cultura seletivo para as leishmânias, mostrou que 4 ou 16 $\mu\text{g/mL}$ de DRS-01 reduziram o percentual de sobrevivência das leishmânias ($p=0,035$), enquanto que o tratamento com 1 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo não afetou o percentual de sobrevivência na comparação com o controle ($p=0,098$) (Teste de Wilcoxon). Os resultados estão representados como Mediana, quartis, valores máximos e mínimos.

4.6. Influência da DRS-01 na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais

Para verificar a capacidade de produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações de DRS-01, foi utilizado o método da oxidação do vermelho de fenol na presença da peroxidase.

Os resultados, analisados pelo teste d Wilcoxon, mostraram que a mediana da produção de peróxido de hidrogênio foi inibida na presença das diferentes concentrações de DRS-01 em macrófagos infectados (1, 4 ou 16 $\mu\text{g/mL}$ = 0,0 μM de H_2O_2) (Figura 9A) ou não infectados (1, 4 ou 16 $\mu\text{g/mL}$ = 0,0 μM de H_2O_2) (Figura 9B), na comparação com a produção basal (1,3 μM de H_2O_2) ($p < 0,05$).

Os resultados indicaram também que a produção basal de H_2O_2 (1,3 μM) não foi afetada na presença dos estímulos com PMA (1,3 μM), INF (1,1 μM) ou da infecção pela *L. amazonensis* (2,0 μM) (Teste t-pareado, $p > 0,05$) (Figura 10).

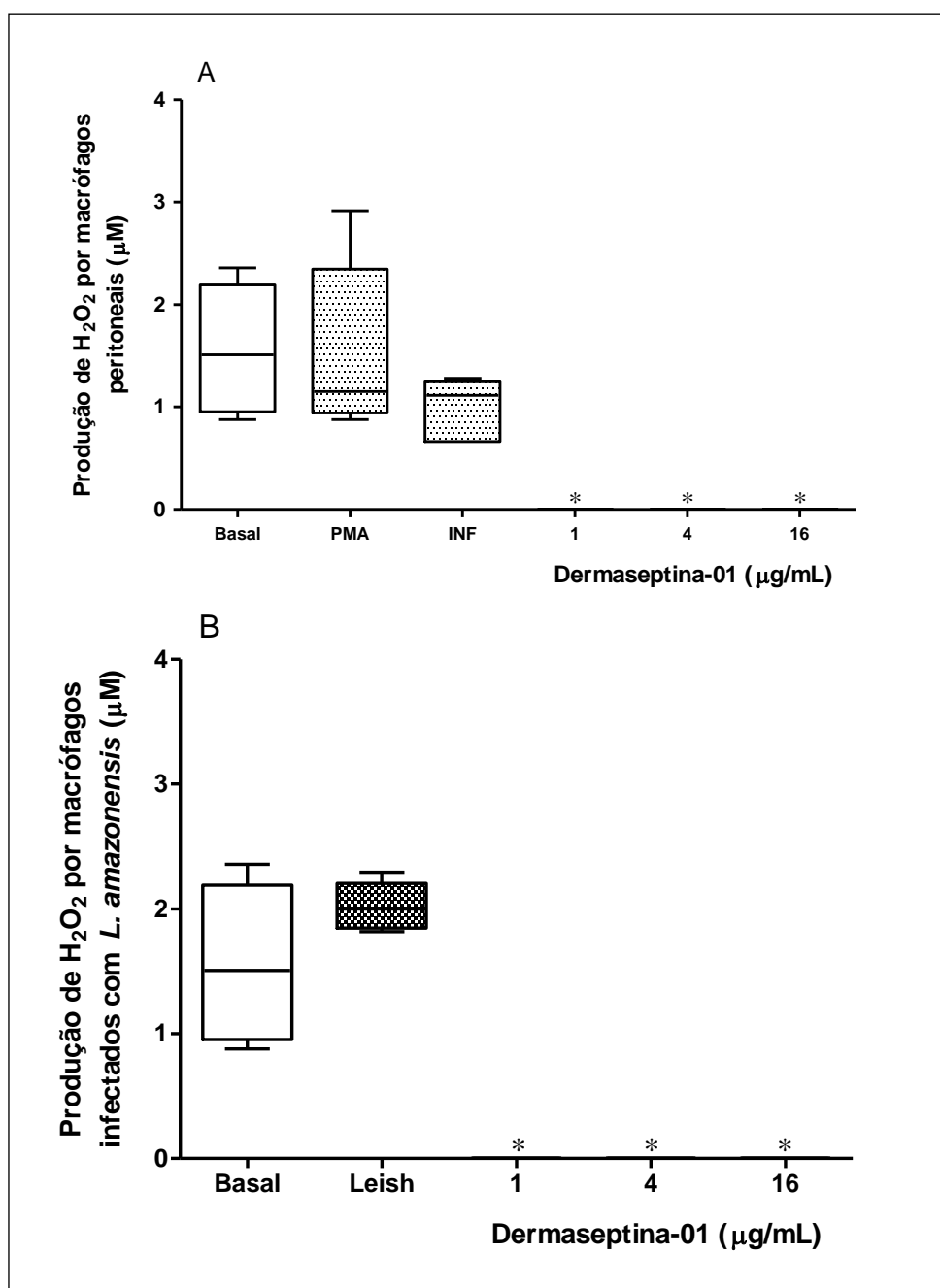


Figura 11. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados ou não com diferentes concentrações de DRS-01 (1,4 ou 16 µg/mL). Em A, macrófagos não infectados e estimulados com PMA, IFN e com o peptídeo e em B, macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados ou não com a DRS-01. Os resultados mostraram que a produção basal de H₂O₂ não foi afetada com os estímulos com PMA, IFN ou com a infecção (teste t-pareado, p>0,05), mas foi inibida na presença das diferentes concentrações de DRS-01 (Wilcoxon, p>0,05). Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

A comparação entre as média±DP mostrou que não houve diferença na produção de H₂O₂ de macrófagos não infectados e infectados quando tratados com as concentrações de DS-01 (teste de Wilcoxon, p>0,05).

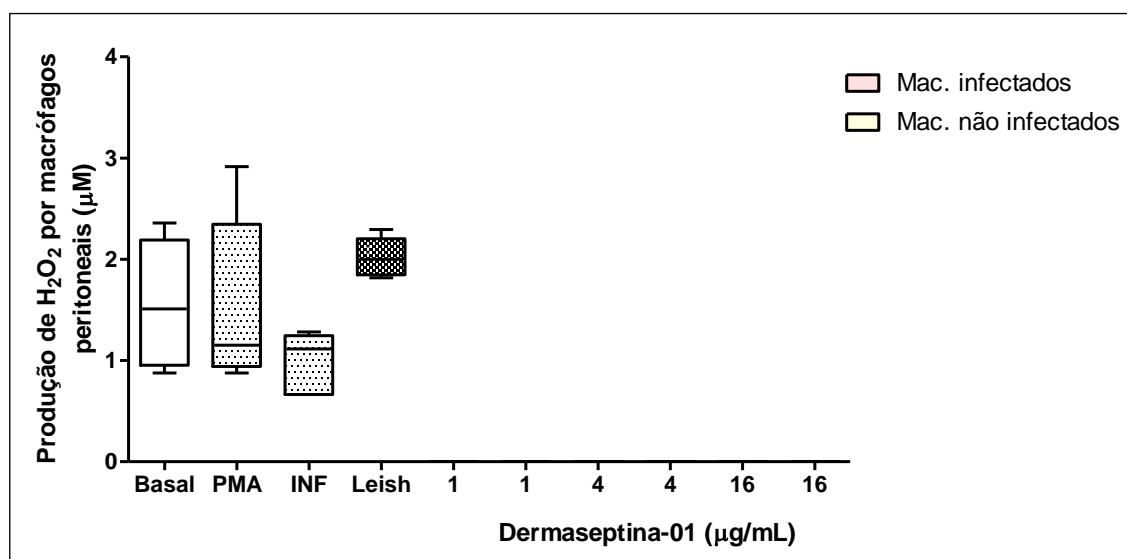


Figura 12. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8), infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações da DRS-01 (1, 4 ou 16 µg/mL). Os resultados mostraram que a produção basal não foi afetada com PMA, INF ou com a infecção (Teste t-pareado, p>0,05). O tratamento com o peptídeo inibiu a produção de H₂O₂, na presença ou não da infecção (Wilcoxon, p>0,05) e não foram diferentes entre si (Wilcoxon, p>0,05). Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos.

4.7. Influência da DRS-01 na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais

A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos, infectados ou não com *L. amazonensis* e incubados por 24 horas, com ou sem DRS-01, foi avaliada no sobrenadante de cultivos utilizando-se o reagente de Greiss.

Os resultados, analisados pelo teste t-pareado, mostraram que a média±DP da produção basal de NO por macrófagos peritoneais não infectados (63,2±3,1 mM) foi aumentada na presença do estímulo com 20 ng/mL de LPS (66,8±3,2 mM), o mesmo ocorreu nas preparações incubadas com 4 (67,1±1,6 mM) ou 16 µg/mL (69,8±4,0 mM) (p<0,05), mas não foi afetada com o estímulo

com INF ($65,4 \pm 2,3$ mM) ou com $4 \mu\text{g/mL}$ de DRS-01 ($67,1 \pm 1,6$ mM) ($p > 0,05$) (Figura 12 A).

Nos cultivos infectados os resultados, também analisados pelo teste t-pareado, mostraram que a infecção aumentou a produção de NO ($67,0 \pm 2,5$ mM) na comparação com o controle basal ($63,2 \pm 3,1$ mM) e, semelhantemente aos cultivos não infectados, 4 ($67,6 \pm 1,2$ mM) ou 16 ($66,7 \pm 1,8$ mM) $\mu\text{g/mL}$ de DRS-01 causaram aumento na produção de NO por macrófagos infectados com *L. amazonensis*, na comparação com o controle ($p < 0,05$) (Figura 12 B).

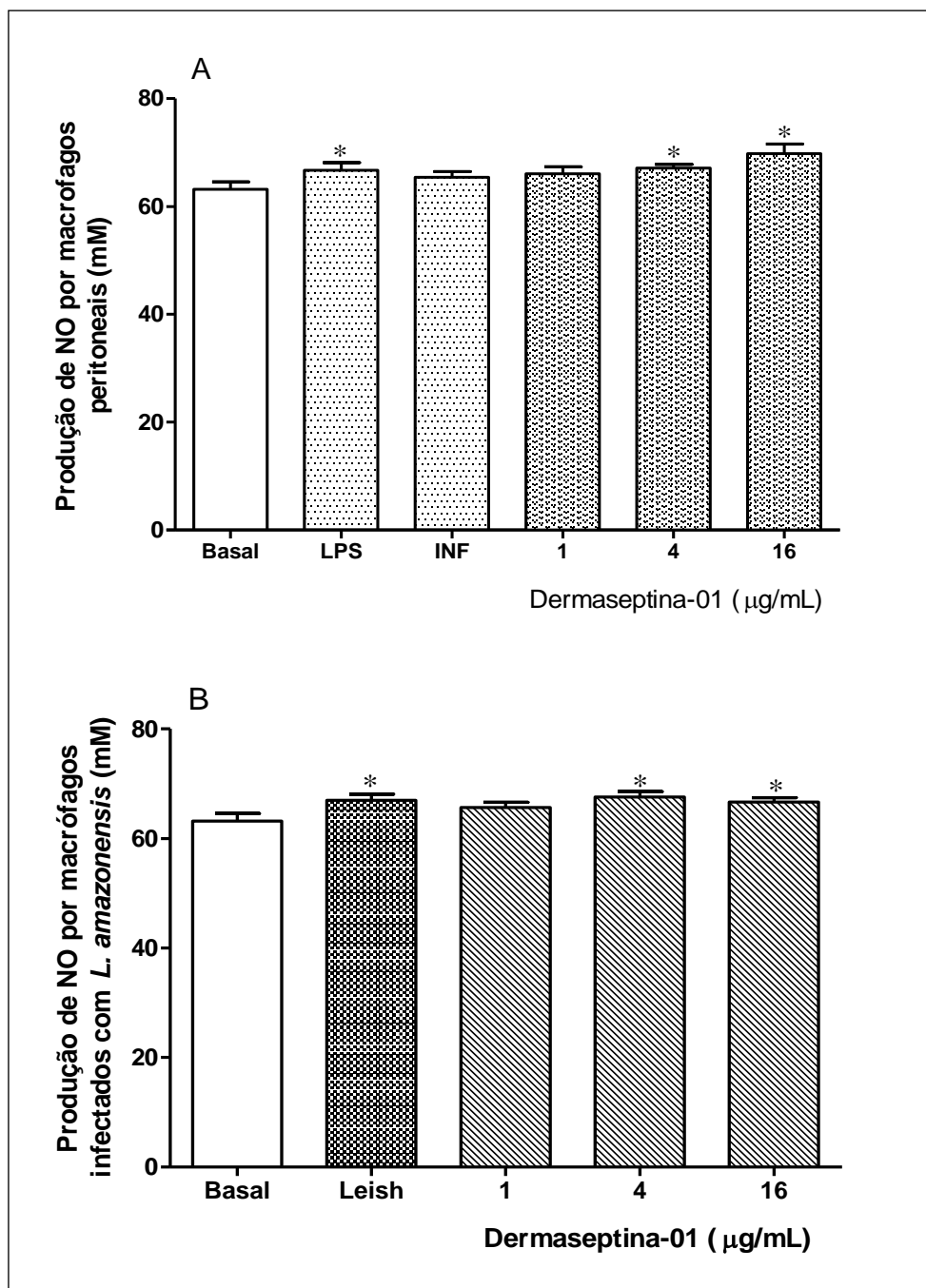


Figura 13. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8) incubados ou não com diferentes concentrações da DRS-01 (1, 4 ou 16µg/mL). Em A, macrófagos não infectados e estimulados com LPS, IFN e com a DRS-01 e em B, macrófagos infectados e tratados ou não com a DSR-01. Os resultados, analisados pelo teste t pareado, mostraram que a produção basal de NO foi menor que o estímulo com LPS e com as concentrações de 4 e 16µg/mL de DRS-01; o mesmo ocorreu com os cultivos infectados, a infecção pela leishmânia associada ou não com o tratamento com a DRS-01 aumentou a produção de NO nas concentrações de 4 e 16µg/mL, na comparação com a produção basal. Estão representados as médias e os desvios padrão.

A comparação entre as média±DP mostrou que, não há diferenças significativas na produção de NO entre os macrófagos não infectados e infectados quando tratados com as diferentes concentrações de DRS-01 (1, 4 ou 16 µg/mL) (Figura 13).

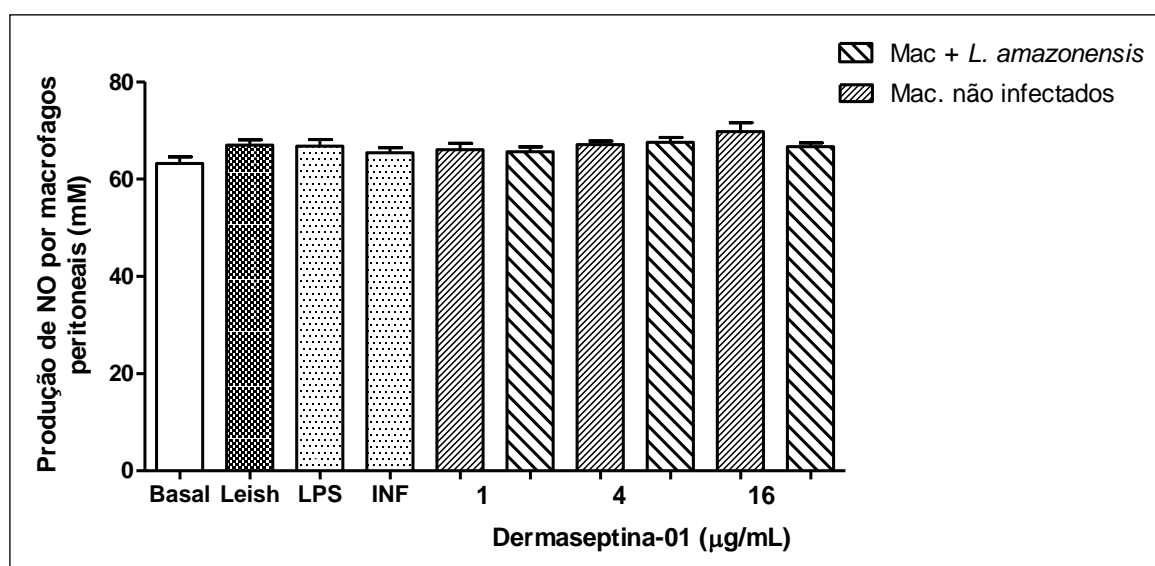


Figura 14. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=8), infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações da DRS-01 (1, 4 ou 16 µg/mL). Os resultados mostraram que a produção basal de NO foi menor nos cultivos estimulados com a infecção ou LPS ou ainda na presença de 4 ou 16 µg/mL de DRS-01, com ou sem infecção (Teste t-pareado, $p < 0,05$); a adição de 1 µg/mL de DRS-01 ou INF não afetou a produção de NO por macrófagos peritoneais (Teste t-pareado, $p > 0,05$). Estão representados as médias e os desvios padrão.

4.8. Influência da DRS-01 na formação do corpúsculo lipídico por macrófagos peritoneais

A formação do corpúsculo lipídico por macrófagos foi avaliada pela determinação do índice corpuscular em cultivos de macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis*, tratadas ou não de diferentes concentrações de DRS-01, pelo método de coloração com óleo vermelho.

A. Controle basal x infecção e o tratamento

Os resultados mostraram para os dados analisados que a infecção pela *L. amazonensis* e o tratamento com as diferentes concentrações de DRS-01 aumentam o percentual de macrófagos que apresentam corpúsculos e a média de

corpúsculos/macrófago (Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$), bem como o índice corpuscular (Teste t-pareado) na comparação com os cultivos não infectados conforme demonstrado na tabela 3 e figura 14.

Tabela 3. Influência da DRS-01 na formação dos corpúsculos lipídicos avaliada pelo Índice corpuscular.

Parâmetros avaliados	Macrófagos não infectados	Macrófagos infectados	Dermaseptina-01 ($\mu\text{g/mL}$)		
			1	4	16
Índice corpuscular	0,1	3.053,0*	7.326,0*	13.288,0*	14.990,0*
Macrófagos com CL (%)	0,1	19,5*	28,8*	41,0*	45,5*
Média CL/célula	0,2	155,0*	253,4*	360,9*	423,0*

(*) Valores diferentes do controle basal

B. Infecção x tratamento

Para avaliar se o tratamento com a DRS-01 influencia a expressão de corpúsculos lipídicos por cultivos infectados com *L. amazonensis* comparou-se os parâmetros analisados, desses com os tratados.

Para o percentual de macrófagos que expressam os corpúsculos lipídicos os resultados mostraram que nos cultivos infectados não tratados esse percentual foi menor (19,5%) na comparação com 1 (28,8%) (Teste t-pareado; $p < 0,001$) e com 4 (41,0%) ou 16 (45,5%) $\mu\text{g/mL}$ de DRS-01 (Wilcoxon, $p < 0,05$) (Figura 14 A).

Quanto à média de corpúsculos lipídicos por macrófago, os resultados indicaram que o tratamento com 1 (253,4) ou 4 (360,9) $\mu\text{g/mL}$ (Teste t-pareado, $p < 0,05$) ou 16 (423,0) $\mu\text{g/mL}$ de DRS-01 (Wilcoxon; $p < 0,05$) foi maior do que nos cultivos infectados com a leishmânia (155,0) (Figura 14 B).

O índice corpuscular, avaliado pelo produto do percentual de macrófagos contendo corpúsculos e a média de corpúsculos, mostrou que o tratamento com as diferentes concentrações de DRS-01 aumentou esse índice na comparação com os cultivos infectados (3.053,0) para 7.326,0 com 1 $\mu\text{g/mL}$, para 13.288,0 com 4 $\mu\text{g/mL}$ e para 14.990,0 com 16 $\mu\text{g/mL}$ (Teste t-pareado, $p < 0,05$) (Figura 14 C).

C. Avaliação do padrão dose-resposta da DRS-01 na formação dos corpúsculos lipídicos

Para avaliar se a expressão de corpúsculos lipídicos por cultivos infectados com *L. amazonensis* obedece a um padrão dose-resposta comparou-se os resultados dos parâmetros analisados nesses cultivos.

Os resultados da comparação entre as diferentes concentrações de DRS-01 mostraram para o índice corpuscular que 1 µg/mL de DRS-01 causou a formação de menos corpúsculos lipídicos do que 4 ou 16 µg/mL do peptídeo (Teste t-pareado, $p < 0,05$), isso se deu pelo maior percentual de macrófagos que expressaram CL com 4 (Teste t-pareado, $p < 0,05$) ou 16 (Wilcoxon, $p < 0,05$) µg/mL, bem como pela maior média de corpúsculos por macrófago observada para as maiores concentrações do peptídeo (4 ou 16 µg/mL) (Teste t-pareado, $p < 0,05$) (Figuras 14 A,B,C e 15). Em conjunto, os resultados mostraram um padrão dose-resposta na formação dos corpúsculos lipídicos em função do aumento da concentração da DRS-01.

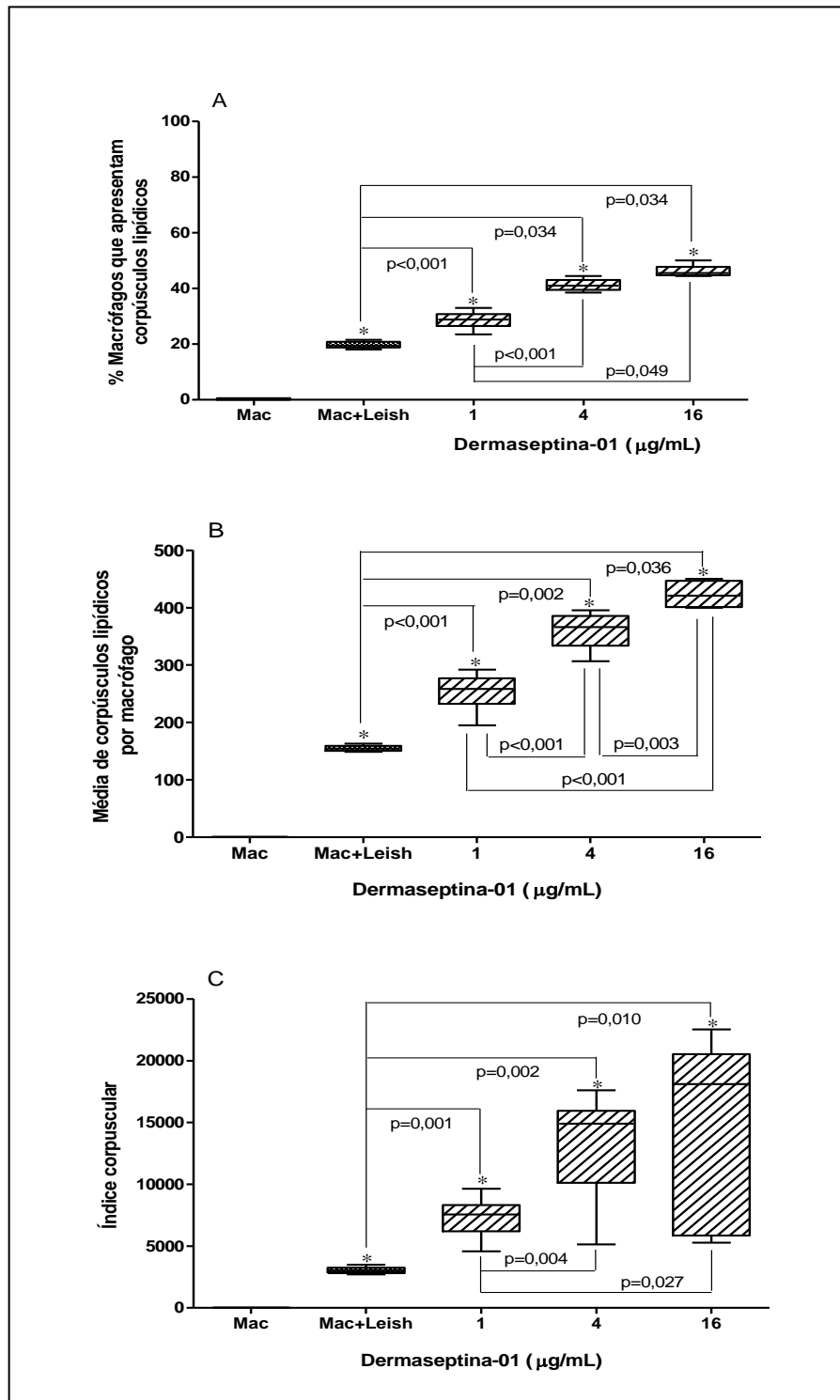


Figura 15. Efeito da DRS-01 na formação de corpúsculos lipídicos (CL) em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (n=6) infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Em A, percentual de macrófagos contendo corpúsculos lipídicos, em B média de corpúsculos por macrófagos e em C, índice corpuscular. Os resultados mostraram que a infecção pela leishmânia e as concentrações de DRS-01 aumentaram a mediana do índice corpuscular, o percentual de células contendo CL e da média de corpúsculos por macrófagos em comparação com o controle basal, evidenciando o padrão dose-resposta do peptídeo na formação desses. Estão representadas as medianas, quartis e valores máximos e mínimos.

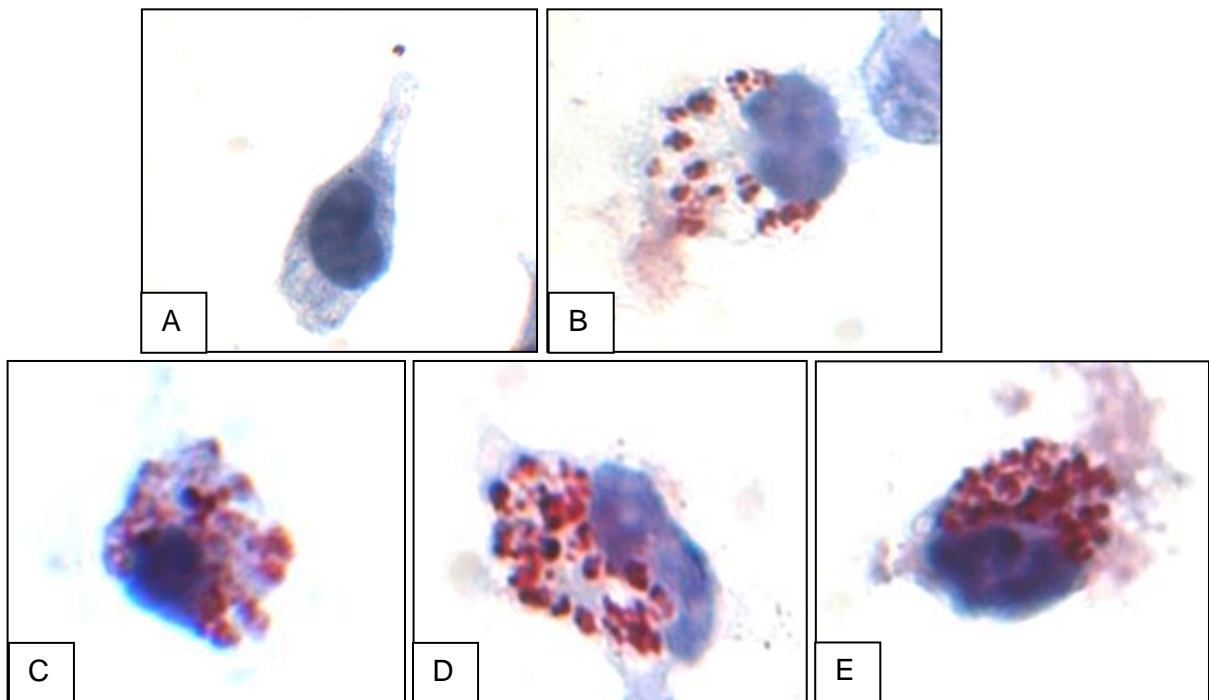


Figura 16. Fotomicrografias de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com DRS-01. As células depois de infectadas com as leishmânias e tratadas com o peptídeo (1, 4 ou 16 µg/mL) foram coradas com óleo vermelho para demonstrar a presença ou não de corpúsculos lipídicos, como mostrado para macrófago não infectado (A), macrófago infectado (B) macrófago infectado e tratado com 1 (C), 4 (D) ou 16 (E) µg/mL de DRS-01. Os resultados mostraram aumento do índice corpuscular nos cultivos tratados com as diferentes concentrações do peptídeo de forma dose-resposta, na comparação com o controle infectado. As fotomicrografias foram obtidas em microscopia óptica com aumento de 1000x.

5. DISCUSSÃO

A DRS-01 surgiu como uma nova proposta de tratamento para a Leishmaniose, visto que os parasitos estão adquirindo resistência aos medicamentos atuais. A DRS-01 já mostrou em trabalhos anteriores sua eficácia contra bactérias e fungos, e até mesmo contra protozoários. Logo, com o intuito de verificar o efeito desse peptídeo antimicrobiano sobre as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, esse trabalho avaliou os efeitos da DRS-01 em cultivos de macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

O presente trabalho comparou a capacidade microbicida, viabilidade dos macrófagos, produção de radicais de oxigênio e nitrogênio e produção de corpúsculo lipídico em células de camundongos *Swiss* não infectadas ou infectadas com formas amastigotas de *L. amazonensis*, tratadas ou não com a DRS-01. Os macrófagos foram escolhidos por serem as células alvo das leishmânias durante a infecção e os resultados demonstraram que as diferentes concentrações de DRS-01 afetam o índice de infecção dos macrófagos e influencia seus mecanismos de defesa.

As concentrações da DRS-01 reduziram o índice de infecção de macrófagos nas três concentrações escolhidas para os ensaios (1, 4 ou 16 µg/mL) em 87%, 97% ou 99,7%, respectivamente, pois reduziu o número de leishmânias ingeridas por macrófagos e o percentual de macrófagos infectados. Zapa et al. (2009), obtiveram o mesmo resultado que o nosso quando utilizaram DRS-01 para eliminar formas promastigotas de *L. chagasi*, em que após 45 minutos de incubação, houve lise total das leishmânias; também, por 2 horas e 6 horas cultivos de *L. chagasi* incubados com 64 e 128 µg/mL de DRS-01 tiveram seu crescimento inibido. Com formas amastigotas de *L. major* e *L. panamensis*, a DRS também demonstrou efeito leishmanicida, porém ela foi mais eficaz nas formas amastigotas da *L. major* (Pérez-Cordero 2011).

Embora o mecanismo de interação dos peptídeos antimicrobianos não tenha sido esclarecido acredita-se que as dermaseptinas, bem como outros peptídeos atuem inserindo-se entre os fosfolípidos das membranas celulares, causando aumento da permeabilidade, que pode resultar na desestruturação total

desta e a formação de micelas à partir da membrana rompida (Shai 2001; Brogden 2005). A observação dos macrófagos infectados, por microscopia óptica, evidenciou leishmânias disformes e com membranas celulares descontínuas nas preparações incubadas com as diferentes concentrações de DRS-01; esse achado pôde ser comprovado no ensaio para avaliar a sobrevivência das leishmânias em cultivos acrescido com meio de cultura seletivo para elas. Logo, considerando esses achados é possível que a morte das formas amastigotas resulte de uma interação das subunidades do peptídeo com seus fosfolipídeos causando assim seu rompimento.

O peptídeo interage com a membrana do parasito e pode alterar a fonte de energia do micro-organismo aumentando o fluxo de água e de íons, resultando em degeneração hídrica e destruição celular (Shai 2001). Nossos resultados demonstraram a eficiência da DRS-01 para destruir formas amastigotas intracelulares de forma dose-dependente a partir das concentrações mais baixas do peptídeo.

Para avaliar se a DRS-01 poderia ser tóxica para as células, diferentes concentrações do peptídeo (1, 4 ou 16 µg/mL) foram incubadas com células de camundongos Swiss e a viabilidade avaliada pela nigrosina. Nossos resultados mostraram que todas as concentrações do peptídeo diminuíram a viabilidade celular quando comparadas ao controle. As concentrações de 1 ou 16 µg/mL, demonstraram maior diminuição na viabilidade do que a concentração de 4 µg/mL. Leite et al. (2008), incubou DRS-01 por 4 horas com células de camundongos Swiss e mostrou redução de 20% da viabilidade dessas células, já com a DDK e DDL, outras dermaseptinas, a viabilidade foi reduzida em 35% e 55%.

Os efeitos tóxicos de peptídeos antimicrobianos relacionados à sua interação com as membranas celulares de mamíferos foram demonstrados para outros peptídeos, como a dermasseptina B2, que perturba a integridade da membrana celular de ovário de hamster chinês, mesmo em baixas concentrações (Joanne et al. 2009). Outros estudos mostraram que, quando células foram

sujeitas a maiores concentrações de PAM e por tempo prolongado, houve perturbação da integridade da membrana celular (Joanne et al., 2009). Pérez-Cordero (2011), também observou toxicidade da DRS ao incubar células dendríticas de humanos com altas concentrações do peptídeo. Em altas concentrações de PSN-1 também foi possível ver restos celulares, indicando toxicidade dos peptídeos (Kuckelhaus et al. 2007).

As dermaseptinas são peptídeos lineares, catiônicos, anfipáticos e formam α -hélices quando associadas com bicamadas lipídicas (Zampa et al. 2009; Moraes 2011). Já a membrana celular dos mamíferos contém fosfolípidos neutros com cargas positivas localizadas (Williamson & Schlegel 1994), o que pode dificultar a interação com peptídeos catiônicos. Mesmo com essa pouca afinidade entre a célula e o peptídeo alguns peptídeos tem demonstrado alta afinidade com membranas de fosfolípidos, como a dermaseptina B, que tem alta carga positiva (Shai 2001). A dermasseptina B possui N-terminal altamente hidrofóbico, essa região terminal poderia facilitar a ligação com a membrana resultando em ruptura da mesma (Shai 2001). A DRS-01 também possui em sua estrutura um N-terminal o que poderia ter facilitado a ligação desse peptídeo com a membrana celular, aumentando a permeabilidade celular resultado em maior ruptura de células.

Sabe-se que os PAM possuem diferentes efeitos nas células de mamíferos, dentre essas destacam-se a ativação ou inibição de vias celulares relacionadas à expressão de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias e quimiocinas. Esse estudo mostrou que a menor (1 $\mu\text{g/mL}$) e a maior (16 $\mu\text{g/mL}$) concentração do peptídeo reduziram a viabilidade de células peritoneais, enquanto que a concentração intermediária (4 $\mu\text{g/mL}$) não afetou essa viabilidade; esses resultados sugerem que a menor concentração de DRS-01 pode ter estimulado vias celulares que culminam com a apoptose e a maior pode ter refletido a toxicidade do peptídeo nas células peritoneais, enquanto que a intermediária apresentou um equilíbrio entre a resposta de imunomodulação sem contudo afetar a viabilidade celular.

Para determinar a viabilidade dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* utilizou-se a coloração com laranja de acridina. Os resultados encontrados foram semelhantes aos da avaliação das células não infectadas e tratadas com DRS-01, porém, os macrófagos infectados e tratados com 4 µg/mL apresentaram maior diminuição da viabilidade quando comparado as concentrações de 1 ou 16 µg/mL. Alves (2014) também avaliou a viabilidade de macrófagos infectados com *L. amazonensis* usando a coloração por laranja de acridina e observou que não houve diferença na viabilidade entre as células infectadas e tratadas com antiretrovirais, das células não infectadas e tratadas.

Como discutido acima, a DRS-01 interage com as membranas celulares e por ser catiônico é atraído pela estrutura aniônica da leishmânia e consequente eliminação do parasito. É possível que a interação peptídeo-célula, nas concentrações testadas da DRS-01 possa ter causado nenhum ou baixo dano à estrutura celular dos camundongos, como avaliado nos ensaios com a nigrosina e com a laranja de acridina, no entanto, a redução da viabilidade observada para as diferentes concentrações, na comparação com o controle não infectado, leva à especulação que o peptídeo tenha ativado vias de apoptose nos macrófagos, principalmente a concentração de 4 µg/mL que em contato com o parasito pode ter aumentado a resposta celular e causado o rompimento da membrana. Isso pode explicar também a diminuição de células aderidas sobre as lamínulas.

Tem sido demonstrado que as membranas celulares dos mamíferos são compostas principalmente de fosfolípidios neutros ou pouco positivos, sendo que, a maior parte desses lipídios é voltada para o interior da bicamada, enquanto que os micro-organismos comumente exibem cargas negativas (Zasloff 2002). Após interação do peptídeo com a membrana do micro-organismo e a formação de poros ocorre a perturbação do gradiente eletroquímico, afetando a respiração celular e causando a lise celular (Bechinger e Lohner 2006). Esse mecanismo explica como a DRS-01 pode ter interagido com a leishmânia eliminando-a sem destruição das células. Esses achados demonstram a afinidade dos peptídeos pelas leishmânias e pode explicar o efeito microbicida da DRS-01 determinada nesse estudo.

À luz dos nossos resultados especula-se que, ao interagir com a membrana celular e com o envelope membranoso do vacúolo parasitóforo a DRS- também interagiu com a membrana das leishmânias e depois de permeabilizar suas membranas causou sua destruição. Kulkarni (2011) fez marcações com FITC e DAPI em macrófagos de camundongos J774 com *L. amazonensis* e *L. major* tratados ou não com o peptídeo antimicrobiano CAMP (Cathelicidina) e visualizou que nos macrófagos tratados com o peptídeo, o mesmo foi capaz de envolver as leishmânias, sugerindo que houve interação do peptídeo com o parasito dentro do vacúolo parasitóforo.

Também avaliamos o percentual de macrófagos aderidos em lamínulas e observamos que as células infectadas com *L. amazonensis* e todas as concentrações da DRS-01 diminuíram o percentual de aderência. Os nossos resultados mostraram a redução da aderência pelo peptídeo foi de forma dose-dependente à semelhança dos achados para a filosseptina-1 (PSN-1) nos estudos de Kuckelhaus et al. (2007), em que quanto maior a concentração da DRS-01 menor foi o número de macrófagos aderidos. Nossos achados sugerem que pode ter havido diminuição dos receptores para aderência dos macrófagos devido à interação com os peptídeos, sobretudo nas maiores concentrações em que há maior disponibilidade de moléculas do peptídeo. Essa diminuição pode ser um fator limitante sobre o efeito microbida, uma vez que na concentração de 16 µg/mL o número de células aderidas era menor.

Para verificar a ação da DRS-01 sobre as amastigotas de *L. amazonensis*, após a incubação de células infectadas com as concentrações do peptídeo, foi adicionado 1 mL do meio de cultura Schneider para recuperação de leishmânias vivas. Nossos resultados mostraram que a DRS-01 teve eficiência na eliminação das amastigotas nas concentrações de 4 (0,0%) e 16 (0,0%) µg/mL quando comparado ao controle, já a concentração de 1 µg/mL não demonstrou diferença significativa quando comparada ao controle. O mesmo efeito da DRS-01 foi visto com a *L. chagasi*, que também foi incubada com meio de cultura após incubação com o peptídeo e inibiu o crescimento do parasito (Zapa et al., 2009). *L. mexicana* também foi incubada por 3 dias com meio de cultura após tratamento com

dermaseptina e não houve crescimento dos parasitos, mostrando eficiência do peptídeo (Hernandez, 1992).

A dermaseptina S tem baixa ligação com as células dos mamíferos, mas alta afinidade com membranas de carga negativa (Shai, 2001), como a leishmânia, levando a destruição do parasito. Nossos resultados confirmam que a DRS-01 elimina leishmânia intracelular em maiores concentrações, demonstrando a atividade leishmanicida do peptídeo e que na menor concentração o peptídeo pode não ter interagido com eficiência na membrana da leishmânia, resultando em menor eliminação do parasito.

As células fagocitárias produzem espécies reativas como resposta a infecções, dentre elas o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO). Nossos resultados mostraram que tanto a infecção por *L. amazonensis* quanto as maiores concentrações de DRS-01 (4 ou 16 $\mu g/mL$) aumentaram a produção de NO, mas quanto ao peróxido sua produção foi inibida pelas diferentes concentrações de DRS-01.

Para avaliar a influência da DRS-01 sobre a produção de peróxido de hidrogênio, diferentes concentrações do peptídeo foram incubadas com células infectadas ou não com *L. amazonensis*. Não houve produção dessa espécie reativa na presença do peptídeo tanto nas células não infectadas, quanto nas infectadas. Em outros trabalhos, a DRS-01 quando incubada com células polimorfonucleares produziu baixas quantidades de O_2^- (Ammar 1998). Kuckelhaus et al. (2007) e Aquino (2014) relataram uma diminuição na produção do peróxido de hidrogênio em cultivos infectados com *L. amazonensis* e incubados com a PSN-1. Similarmente, Tripathi (2014) incubou neutrófilos humanos com um peptídeo catiônico LL-37 não foi capaz de afetar a produção de H_2O_2 na comparação com a produção basal.

Sabe-se que o H_2O_2 é formado a partir da dismutação de íon superóxido (O_2^-) produzindo uma enzima NADPH oxidase e oxigênio normalmente nas células, porém sua produção pode ser aumentada em células fagocitárias como

uma resposta a uma infecção (Pick e Keisari 1980; Hampton 1997). Sabe-se que a morte de parasitos como *L. braziliensis* e *L. amazonensis* é dependente de O_2^- (Khouri et al. 2010) que é um precursor das espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (HO) e Hipoclorito (HOCl). Quando essas moléculas combinam com NO, produzem peroxinitrito ($ONOO^-$) que eliminam parasitos como a leishmânia (Almeida 2012).

Tem sido mostrado que a dermasseptina estimula a atividade microbicida de neutrófilos, aumentando a produção de reativos de oxigênio (Ammar et al. 1998). Almeida (2012) em um de seus experimentos constatou que a leishmânia pode não liberar quantidades significativas de O_2^- , principalmente promastigotas de *L. amazonensis*. Isso sugere que a DRS-01 em associação com a leishmânia possa ter inibido ou diminuído a liberação de O_2^- resultando na inibição da produção de peróxido de hidrogênio.

A dermasseptina também pode estimular a proteína C quinase (PKC), que possui inibidores que podem não produzir espécies reativas de oxigênio em PMN, elevando os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} (Ammar 1998). A PKC é uma enzima que participa da produção de radicais de oxigênio (Moreira 2009), e apesar do estímulo de PKC por parte do peptídeo, a interação da DRS-01 com a célula pode ter ocasionado a inibição dessa proteína fazendo com que essas espécies reativas não fossem produzidas nos macrófagos.

Trabalhos têm demonstrado que a atividade microbicida contra as formas intracelulares da leishmânia é mediada principalmente pelo óxido nítrico (James, 1995). A produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais foi analisada e os resultados mostraram que a infecção, bem como as maiores concentrações de DRS-01, aumentaram a produção de NO na comparação com a produção basal. Em células dendríticas infectadas com *L. panamensis*, a DRS aumentou a produção de NO (Pérez-Cordero 2011). Aquino (2014) demonstrou aumento da produção de NO em todas as concentrações de PSN-1 avaliadas. Já Kuckelhaus et

al. (2007), observou diminuição do NO com uma menor concentração do peptídeo PSN-1.

O óxido nítrico é uma molécula microbicida, mas que atua também nos mecanismos de apoptose, reparação de tecidos e inflamação (Seabra 2015). Durante a infecção os macrófagos são ativados por citocinas pro-inflamatórias como o IFN γ e TNF- α , que estimulam a produção de iNOS, gerando NO que é tóxico para amastigotas de leishmânia (Stebut 2007; Sharma & Singh 2009).

Nossos resultados demonstram que as concentrações de 4 ou 16 $\mu\text{g/mL}$ do peptídeo estimularam a produção de NO, enquanto a menor concentração não afetou essa produção. Esse achado pode estar relacionado à possível interferência da DRS-01 nas vias celulares dos macrófagos, por exemplo, na produção de citocinas anti-inflamatórias com reflexos na redução da produção de NO, no entanto, isso precisa ser avaliado em estudos futuros.

A avaliação de corpúsculos lipídicos também fez parte deste trabalho, uma vez que esses corpúsculos estão relacionados à resposta inflamatória contra os micro-organismos intracelulares. Os resultados mostraram que a infecção por *L. amazonensis* causou aumento no índice corpuscular, na média de corpúsculos presentes nos macrófagos e o percentual de macrófagos que expressavam corpúsculos. As células infectadas e tratadas com a DRS-01 aumentaram o índice corpuscular, o percentual de macrófagos que expressavam corpúsculos lipídicos e o índice corpuscular conforme ia aumentando a concentração do peptídeo. O aumento desse índice também foi observado por Aquino (2014), em macrófagos infectados com *L. amazonenses* e tratados com 2 $\mu\text{g/mL}$ de PSN-1.

Corpúsculos lipídicos podem ser caracterizados como depósitos de produtos derivados de lipídios exógenos (Dvorak et al. 1983). O ácido araquidônico pode ser encontrado nos corpúsculos lipídicos e sugerem que estas estruturas podem sintetizar eicosanóides. Além disso, corpúsculos lipídicos podem também ser sítios de armazenamento de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na

patogênese da sepse, como TNF- α e fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) (Pacheco et al. 2002).

Os corpúsculos lipídicos também podem ser precursores lipídicos de enzimas como peroxidases (Dvorak et al. 1992), mostrando então relação com o H₂O₂ uma vez que a produção dos corpos lipídicos depende de NADPH-oxidase. Como nossos resultados mostraram que a droga inibiu a produção do peróxido de hidrogênio, os lipídios ajudaram a ativar NADPH-oxidase, através de várias subunidades de NADPH-oxidase dependente de ácido araquidônico perto do fagossoma, sugerindo que o conteúdo liberado elimina agentes infecciosos (D'Avila 2008; Melo 2012). Isso sugere que o aumento da formação dos corpúsculos lipídicos pela droga, pode ter contribuído para maior liberação de NADPH-oxidase para ajudar na eliminação das formas amastigotas intracelulares; e que o aumento gradativo na formação de corpúsculos sugere que o peptídeo pode interferir na formação de citocinas pelos macrófagos.

Nossos resultados mostraram que a DRS-01 foi eficaz na eliminação de *L. amazonensis*, pois houve diminuição da infecção principalmente nas maiores concentrações. O peptídeo também afetou a produção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a formação dos corpúsculos lipídicos, indicando modulação da resposta imunológica. Sabe-se que os PAM podem modular a resposta imune inata e modificar a resposta imune adaptativa. Dentre essas alterações na resposta, está incluída a modulação de expressão do gene, expressão de quimiocinas, inibição da pró-inflamatória e produção de citocinas (Kulkarni 2011).

Portanto, sugere-se a realização de novos ensaios para compreender a interação do peptídeo com a célula para se obter melhor resposta sobre o possível efeito imunomodulatório causado pela DRS-01. Quantificação de citocinas, SOD e O₂⁻, mediadores de inflamação, expressão de gene são essências para a compreensão dos mecanismos utilizados pelo peptídeo. O tratamento com a DRS-01 pode colaborar com a eliminação das leishmanioses, então se sugere a continuidade das pesquisas com esse peptídeo, pois até o momento ele se

mostrou um composto eficiente para o desenvolvimento de uma nova droga para o tratamento da leishmaniose.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem as seguintes conclusões:

- As diferentes concentrações (0,06; 0,13; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 ou 64,0 µg/mL) da DRS-01 reduziram o índice de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, de forma dose-dependente, em percentuais que variaram de 74% a 99,9%, com 0,06 ou 64 µg/mL;
- As três diferentes concentrações (1, 4 ou 16 µg/mL) da DRS-01 reduziram o percentual de macrófagos infectados com *L. amazonensis* aderidos nas lamínulas;
- As diferentes concentrações de DRS-01 (1 ou 16 µg/mL) diminuíram a viabilidade das células peritoneais, exceto a concentração intermediária do peptídeo 4 µg/mL;
- As três diferentes concentrações de DRS-01 (1, 4 ou 16 µg/mL) causaram redução na viabilidade dos macrófagos peritoneais na comparação com células não infectadas;
- As maiores concentrações de DRS-01 (4 ou 16 µg/mL) causaram redução no percentual de sobrevivência de *L. amazonensis*, mas não a menor concentração (1 µg/mL) quando re-incubadas em meio seletivo para as leishmânias;
- A produção de peróxido de hidrogênio foi inibida na presença das diferentes concentrações de DS-01 (1, 4 ou 16 µg/mL) em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*;
- As maiores concentrações de DRS-01 (4 ou 16 µg/mL) causaram aumento na produção de NO por macrófagos peritoneais, infectados ou não com *L. amazonensis*, mas a menor concentração (1 µg/mL) não afetou a sua produção;
- O tratamento com as diferentes concentrações de DRS-01 (1, 4 ou 16 µg/mL) aumentam o índice de corpúsculos lipídicos, pois aumentam o percentual de macrófagos que apresentam corpúsculos e a média de corpúsculos/macrófago;

- A formação dos corpúsculos lipídicos nos cultivos infectados com *L. amazonensis* e tratados com a DRS-01 obedecem a um padrão dose-resposta em função do aumento da concentração do peptídeo.

Os resultados obtidos com a DRS-01 demonstram o efeito microbicida desse peptídeo em cultivos de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* e sua influência em mecanismos celulares relacionados ao controle da infecção e na expressão de receptores relacionados à aderência celular. Em conjunto, os resultados demonstram o potencial leishmanicida da DRS-01 e apontam para a aplicação biomédica desse peptídeo antimicrobiano.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Por serem altamente eficazes na resposta contra diversos e diferentes tipos de microrganismos, os peptídeos antimicrobianos podem ser promissores no uso contra as doenças infecciosas. Já foi demonstrada sua eficácia com bactérias, fungos, protozoários, helmintos e até mesmo vírus.

Os peptídeos são encontrados em células procarióticas e eucarióticas e fazem parte da resposta imune inata e adaptativa desses organismos. Os peptídeos catiônicos têm a capacidade de interagir com a membrana aniônica dos micro-organismos formando poros em sua membrana resultando na morte do patógeno. Por apresentar baixa ou nenhuma toxicidade a células de mamíferos, esses peptídeos são a nova aposta para a produção de medicamentos.

O desenvolvimento de novos medicamentos que não causem reações adversas, não seja tóxico, e que não desenvolvam resistência ao patógeno combatido, são qualidades ideais para a produção de drogas eficazes. Por isso, a aplicação de peptídeos antimicrobianos no combate micro-organismos, tem sugerido uma promissora forma de tratamento. Porém, para sintetizar esses peptídeos mesmo em pequenas quantidades requer um grande investimento, o que não seria tão vantajoso para a indústria farmacêutica. Mas como foi demonstrado nesse estudo, em concentrações bem baixas o peptídeo já foi capaz de eliminar parasitos intracelulares, criando a possibilidade de se utilizar concentrações menores ou até mesmo combinar esses peptídeos com outros fármacos para potencializar o efeito.

Mesmo com esse alto custo pra sintetizar, alguns peptídeos já saíram da fase de testes pré-clínica e chegaram até a fase clínica. Um exemplo é o Xoma 629, que está na fase clínica II e vem demonstrando eficiência contra a acne (Kindrachuch et al 2010). Esses estudos demonstram a viabilidade dos investimentos em peptídeos como nova proposta de tratamento.

A DRS-01 possui potencial para destruir formas amastigotas intracelulares, diminuindo o percentual de infecção, no entanto, esse peptídeo também foi capaz de diminuir a aderência dos macrófagos nas lamínulas. Isso constituiu um fator de

limitação do estudo referente à determinação do efeito microbicida e na aderência dos macrófagos e, considerando que grande parte das células foi liberada para a suspensão, foi impossível determinar o efeito da DRS-01 nessas células. Logo, sugere-se que uma nova abordagem seja realizada para determinar o efeito microbicida em células em suspensão, uma possibilidade é a utilização de citometria de fluxo.

A eficiência desses peptídeos demonstra o seu potencial para a aplicação como medicamento, seja ele como antibiótico ou até mesmo modulador do sistema imunitário, incentivando que o estudo com essas propriedades deva continuar. E a DRS-01, assim como outros peptídeos, mostra o seu potencial contra *Leishmania amazonensis* reduzindo o parasito a partir de concentrações em nanogramas e demonstrando possível modulação a resposta do macrófago. Ensaio a cerca das respostas imunitárias serão iniciadas para melhor compreensão da ação do peptídeo e possível aplicação futura em testes de fase clínica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida TF, Palma LC, Mendez LC, Noronha-Dutra AA, Veras PST. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite Immunology*, 2012; 34, 492–498.
- Alves EAR, Miranda MG, Borges TK, Magalhães KG, Muniz-Junqueira MI. Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by *Leishmania* in macrophages: The role of NFκB and PPARγ. *International Immunopharmacology*, 2014; (24): 314-324.
- Ammar B, Perianin A, Mor A, Sarfati G, Tissot M, Nicolas P, et al. Dermaseptin, a peptide antibiotic, stimulates microbicidal activities of polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 247:870–875.
- Aquino DS. Avaliação do efeito microbicida da filosseptina-1 nas formas amastigotas de *Leishmania amazonensis in vitro* (Dissertação de mestrado). Brasília: Universidade de Brasília; 2014.
- Awasthi A, Mathur R K, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*, 2004; 119:238-258.
- Barker HC, Kinsella N, Jaspe A, Friedrich T, O'Connor CD. Formate protects stationary-phase *Escherichia coli* and *Salmonella* cells from killing by a cationic antimicrobial peptide. *Molecular Microbiology*, 2000. 35:1518–1529.
- Barreto RL, Correia CRD and Muscará MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova*, 2005; 28: 1046-1054.
- Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides, *BBA. Biomembranes*, 2008. (1758)1529–1539
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Physiological Society*, 1996; 0363-6143/96.
- Boman HG. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 1991. 65: 205–207.

- Bozza, PT.; Magalhães, KG.; Weller, PF. Leukocyte lipid bodies – biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009. p. 540-551.
- Bozza, PT.; Melo, R.C. N.; Bandeira-Melo, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacology & Therapeutics*, 2007. 113, 30-49.
- Brand GD, Leite JRSA, Silva LP, Albuquerque S, Prates MV, Azevedo RB, Carregaro V, Silva JS, Sá VCL, Brandão RA, Bloch Júnior C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti *Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2002. 277: 49332–49340.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005. v.3, p.238-250.
- Carvalho LP, Passos ST, Jesus AR. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia*, 2005; 75(1):57-65.
- Castro MS, Ferreira TCG, Cilli EM, Crusca JRE, Giannini-Mendes MJS, Sebben A, Ricart CAO, Sousa MV, Fontes W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted tree frog”). *Peptide Journal*, 2009. 30: 291 – 296.
- Chadbourne FL, Raleigh C, Ali HZ, Denny PW, Cobb SL. Studies on the antileishmanial properties of the antimicrobial peptides temporin A, B and 1Sa. *Journal of Peptide Science*, 2011. 17: 751-755.
- Channon JY, Roberts MB, Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology* ,1984;53,345-355.
- Colon, J. M. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell Tissue Research* 2010. 343: 201 – 212.

- Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC. Aspectos moleculares e celulares da imunidade inata. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010. 50(4):434-61
- Dominguez M, Moreno I, Aizpurua C, Torano A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes and Infection*, 2003; 5: 507–513.
- Das M, Mukherjee SB and Shaha C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Cell Science*, 2001; 114: 2461-2469.
- D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International Immunopharmacology*, 2008; 8, 1308–1315.
- Diaz NL, Fernandez M, Figueira E, Ramirez R, Monsalve IB, Tapia FJ. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2003. 28, 288–293.
- Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2003; 39: 343-350.
- Dvorak AM. Biochemical contents of granules and lipid bodies – two distinctive organelles found in basophils and mast cells. *Blood cell biochemistry: basophil and mast cell degranulation and recovery*. New York: Plenum Press, 199.(2)27-66.
- El Amri C, Lacombe C, Zimmerman K, Ladram A, Amiche M, Nicolas P, Bruston F. The Plasticins: Membrane Adsorption, Lipid Disorders, and Biological Activity. *Biochemistry*, 2006, 45, 14285-14297
- Feder R, Dagan A, Mor A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequence of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 4230 – 4238.

- Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2009; 51(5): 241-246.
- Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European Journal of Biochemistry*, 1996. 238: 325–332.
- Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*, 1997. (414) 552-556
- Han YJ, Kwon YG, Chung HT, Lee SK, Simmons RL, Billiar TR, Kim YM. Antioxidant Enzymes Suppress Nitric Oxide Production through the Inhibition of NF- κ B Activation: Role of H₂O₂ and Nitric Oxide in Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Macrophages. *Biology and Chemistry*, 2001; 5 (5), 504–513.
- Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new antiinfective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 2006; 24: 1551 – 1557.
- Handman E and Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 2002; 18: 332-334.
- Hernandez C, Mor A, Dagger F, Nicolas P, Hernandez A, Benedetti EL, Dunia I. Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin. *European Journal of Cell Biology*, 1992. 59(2):414-424
- Horikawa MM, Peña MS, Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. *Revista da Biologia*, 2011. 6b: 32-37
- Hucke C, Mackenzie CR, Adjogble KD, Takikawa O, Daubener W. Nitric oxidemediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and Immunity* 2004; 72: 2723 – 2730.

James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Review*, 1995; 59: 533-47.

Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006. 19:491–511.

Joanne P, Galanth C, Goasdoué N, Nicolas P, Sagan S, Lavielle S, Chassaing G, El Amri C, Alves ID. Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009. 1772–1781.

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

Khouri R, Novais F, Santana G, Oliveira CI de, Santos MAV dos, *et al.* DETC induces Leishmania parasites killing in human *in vitro* and murine *in vivo* models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. *Plos One*, 2010; 5(12): e14394.

Kiige SG, Mutiso JM, Laban LT, Khayeka-Wandabwa C, Anjili CO, Ingonga J, Gicheru MM. F1 Cross-Breed Between Susceptible BALB/c and Resistant Swiss mice Infected with *Leishmania major* Exhibit an Intermediate Phenotype for Lesion Sizes and Type 1 Cytokines but Show Low Level of Total IgG Antibodies. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2014. 79, 283–29.

Kindrachuck L, Nijnik A, Hancock RE. Host defense peptides: Bridging antimicrobial and immunomodulatory activities. *Comprehensive Natural Products II*. Oxford: Elsevier, 2010. 175-216.

Kückelhaus SAS. Toxicidade e atividade antiparasitária da filosseptina-1, um peptídeo de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). (Tese de doutorado). Brasília: Universidade de Brasília; 2007.

Kückelhaus SAS, Leite JRSA, Junqueira MIM, Sampaio RN, Bloch Júnior C, Tosta CE. Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial

- peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). *Experimental Parasitology*, 2009. 123: 11-16.
- Kulkarni MM, Barbi J, McMaster WR, Gallo RL, Satoskar AR, McGwire BS. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous *Leishmania* infection. *Cellular Microbiology* 2011; 13: 913 – 923.
- Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 2012; 3(251): 1-10.
- Koczulla, A. R. and Bals, R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs*, 2003. 63(4):389-406.
- Laufs H, Muller K, Fleisher J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and Immunity*, 2002. 70: 826-835.
- Leite JRSA, Brand GD, Silva LP, Kückelhaus SAS, Bento WRC, Araújo ALT, Martins GR, Lazzari AM, Bloch Júnior C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2008. 151: 336-343.
- Lecoeur H, Giraud E, Prévost MC, Milon G, Lang T. Reprogramming Neutral lipid metabolism in mouse dendritic leucocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Plos Neglected Tropical Disease*, 2013; 7(6): e2276.
- Lillard JW, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, Mcghee JR. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999; 96: 651 – 656.
- Lima EB, Porto C, Motta JOC, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2007. 82(2):111-24.

Lofgren, SE. Atividades antimicrobiana, antiparasitária e hemolítica de peptídeos antimicrobianos isolados de animais aquáticos. Dissertação de Mestrado, Florianópolis, 2007.

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

Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JCF. In Vitro Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *Plos One*, 2013; 8(12): e83247.

Machado A, Liria CW, Proti PB, Remuzgo C, Miranda MTM. Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. *Química Nova*, 2004. 27(5): 781-789.

Manjili, HK.; Jafari H.; Ramazani A.; Davoudi N. Anti-leishmanial and toxicity activities of some selected Iranian medicinal plants. *Parasitology Research*, 2012. DOI 10.1007/s00436-012-3059-7.

Mattos IL, Shiraishi KA, Braz AD, Fernandes JR. Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação. *Química Nova* 2003; 26, (3): 373-380.

McGwire BS, Kulkarni MM. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental Parasitology*, 2010; 126, 397–405.

Melo RCN, D'Avila H, Wan H, Bozza PT, Dvorak AM, et al. Lipid Bodies in inflammatory cells: Structure, function, and current imaging techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2011; 59: 540-556.

Melo RCN, Dvorak AM. Lipid Body–Phagosome Interaction in Macrophages during Infectious Diseases: Host Defense or Pathogen Survival Strategy? *Plos Pathogens*, 2012; 8(7): e1002729.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 2000; 164:6166-6173.

Ministério da Saúde, Brasil 2008.

cbpv.org.br/foruns/leishmaniose-situacao_atual_no_brasil.doc

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

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil 2006; 1: 120p.

Moraes J, Nascimento C, Miura LMCV, Leite JRSA, Nakano E, Kawano T. Evaluation of the in vitro Activity of Dermaseptin 01, a Cationic Antimicrobial Peptide, against *Schistosoma mansoni*. *Chemistry & Biodiversity*, 2011; 8, 548-558.

Moreira W, Leblanc E, Ouellette M. The role of reduced pterins in resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates in the protozoan parasite *Leishmania*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2009; 46, 367–375.

Mutiso J M, Macharia JC , Gicheru MM, Ozwara H. Immunology of leishmaniasis. *Scientia Parasitologica*, 2013.14(2):51-61, 1582-1366.

Nylén S and Akuffo H. Tracing immunity to human leishmaniasis. *Future Microbiology*, 2009; 4(2): 241–254

Oghumu S, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 2010.126; 389–396.

Olekhovitch R, Ryffel B, Müller A J, Bouso P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014; 124(4):1711–1722.

- Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion Mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005;18 (2): 293-305.
- Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 2005. 17:359–365.
- Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 1998. 47:451-463.
- Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *Journal Immunology* 2002; 169: 6498 – 6506.
- Pérez-Cordero JJ, Lozano JM, Cortés J, Delgado G, Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides* 2011. 22;32(4):683-90.
- Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2006. 4:529–536.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 2008; 321:970–974.
- Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic immunoassay reader. *Journal Immunological Methods*, 1981; 46: 211-226.
- Prates MV, Bloch Jr C. Peptídeos antimicrobianos. *Revista biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 2000; 17: 30-36.
- Reis LC, Maria Brito EF, Souza MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*, 2006. 35 (2): 103-115.

- Rollins-Smith LA. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009; 1788: 1593-1599.
- Romão PRT; Dias RO, Cruz KK, Marques FCS, Monteiro MC. *Leishmaniose: Resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape*. Revista de pesquisa e extensão em saúde, 2007, vol. 3, No 1.
- Sahl HG. Optimizing antimicrobial host defense peptides. *Chemistry & Biology*, 2006. 13:1015-1017.
- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *Indian Journal of Medical Research*. 2006; 123: 245-266
- Seabra AB, Justo GZ , Haddad PS. State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 2015.
- Shai, Y., 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66, 236–248.
- Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2009; 47: 412-423.
- Silva LP, Leite JRSA, Brand GD, Regis WB , Tedesco AC, Azevedo RB, Freitas SM, Bloch Jr C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2008. 151, 329–335.
- Sorensen AL, Hey AS, Kharazmi A. *Leishmania major* surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 1994; 102: 265 – 271.

- Stebut E von. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *European Journal of Dermatology*, 2007; 17(2): 115-22.
- Tripathi S, Verma A, Kim E, White MR, Hartshorn KL. LL-37 modulates human neutrophil responses to influenza A virus. *Journal of Leukocyte Biology*, 2014. 96:1-8.
- van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int immunopharmacol*, 2001; 1(8):1491-1500.
- Zampa M.F., et al. Leishmanicidal Activity and Immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. *Nanomedicine: NBM*, 2009; 5:352–358
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002. 415:389-395.
- Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 2012. 37: 933-937.
- Wei X Q, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 1995; 375: 408–411.
- Williamson P, Schlegel RA. Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells. *Molecular Membrane Biology* 1994; 11: 199 – 216.
- Wilson ME, Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity*, 1988. 6:363-369.
- Wieczorek M, Jensen H, Kindrachuk J, Scott WRP, Elliot M, Hilpert K, Cheng JTJ, Hancock REW, Straus SK. *Chemistry & Biology Article*, 2010. 17: 970 – 980.

World Health Organization. 2007. Leishmaniasis. Available at:
<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/leishmaniasis.pdf>.

World Health Organization. 2012. Leishmaniasis. Available at:
http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index.html

Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.
Pharmacological Review, 2003. 55:27– 55.

ANEXO I
Comitê de Ética



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 07 de junho de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO MECANISMO MICROBICIDA DA FILOSSEPTINA-1 E DERMASEPTINA-01 NAS FORMAS AMASTIGOTAS DE LEISHMANIA AMAZONENSIS.", UnBDOC n.º 51022/2013, sob responsabilidade da Professora Selma Aparecida Souza Kuckehaus foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. José Raimundo Corrêa
Coordenador da CEUA

ANEXO II

Reagentes

Líquido de Türk

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

Solução de nigrosina 0,05%

Nigrosina	0,05 g
Tampão fosfato	100 mL

Filtrar e colocar em frasco âmbar

Estocar a 4°C

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bicarbonato de sódio 7,5%

Pesar 7,5 g de bicarbonato de sódio

Dissolver em 100 mL de água bidestilada

Filtrar com filtro 0,02 µm

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

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

b) Solução de uso:

58

Peroxidase (85unidades)	200 µL
-------------------------	--------

Vermelho de fenol _____ 200 µL
Tampão fosfato _____ 9,6 mL

Solução de Greiss

a) Solução estoque:

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

Sal sulfanilamida (Sigma) _____ 500 mg

H₃PO₄ a 5% _____ 25 mL

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

NEED 0,2%

N-1-naphtylethylenediamine (Sigma) _____ 50 mg

Água bidestilada _____ 25 mL

b) Solução de uso:

Sulfanilamida 2% _____ 10 mL

NEED 0,2% _____ 10 mL

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

Óleo Vermelho (Oil Red O®)

a) Solução Estoque:

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

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

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

b) Uso:

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

Deixar descansar por 10 minutos em temperatura ambiente.

Filtrar com filtro de 0,22µm

Paraformaldeído 40% (Estoque):

Paraformaldeído _____ 4g

H₂O destilada _____ 10ml

Misturar e aquecer a 65°C sem deixar ferver

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

Deixar esfriar e guardar sob refrigeração a 4°C

Paraformaldeído 4% (Uso):

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

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

Álcool Isopropílico a 60%:

Álcool isopropílico _____ 60 mL

Diluir em 40 mL de água destilada.

Laranja de acridina (Estoque):

Laranja de acridina _____ 50mg
Água destilada _____ 50 mL
Passar no filtro no 1 (papel Whatman);
Manter protegido de luz à 4°C.

ANEXO III
Tabelas de resultados

Tabela 4. Efeito microbicida da DRS-01 nas formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos. Percentual de macrófagos infectados.

Grupos	Macrófagos infectados (%)			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	28,7	13,5 – 15,6	25,5 – 30,5	28,5±1,8
1 µg/mL	12,5	12,1 – 14,1	11,0 – 14,5	12,8±1,2
4 µg/mL	7,2	6,9 – 8,5	6,5 – 8,5	7,5±0,8
16 µg/mL	2,5	2,0 – 2,6	2,0 – 3,0	2,4±0,3

n=6

Tabela 5. Efeito microbicida da DRS-01 nas formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos. Média de Leishmânias.

Grupos	Média de Leishmanias (%)			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	73,0	69,5 – 76,5	68,0 – 79,5	73,2±4,2
1 µg/mL	23,7	18,8 – 25	15,5 – 25	22,2±3,7
4 µg/mL	8,7	7,5 – 9,1	7,5 – 9,5	8,5±0,8
16 µg/mL	2,5	2,0 – 2,62	2,0 – 3,0	2,4±0,4

n=6

Tabela 6. Efeito microbicida da DRS-01 nas formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos. Índice de infecção.

Grupos	Índice de Infecção			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	2097	1911 – 2199	1870 – 2385	2085±183,1
1 µg/mL	303,2	230,1 – 342,6	170,5 – 362,5	287,6±68,9
4 µg/mL	65,4	51,6 – 76,5	48,8 – 76,5	64,2±12,2
16 µg/mL	6,3	4,0 – 7,0	4,0 – 9,0	6,0±1,9

n=6

Tabela 7. Viabilidade de células peritoneais de camundongos Swiss infectados com *L. amazonensis* e incubados com DRS-01.

Grupos	Viabilidade das células em nigrosina			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	95,6	93,8 – 97,5	93,8 – 97,5	95,6±2,0
1 µg/mL	75	70,3 – 88,2	67,5 – 93,8	78,1±9,9
4 µg/mL	90	82,6 – 97,5	82,5 – 97,5	90,0±7,1
16 µg/mL	80,6	74,0 – 88,2	71,3 – 93,8	81,3±8,8

n=6

Tabela 8. Viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados com *L. amazonensis* e incubados com DRS-01.

Grupos	Viabilidade dos macrófagos infectados com laranja de acridina			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	89,5	86,5 – 92,2	85,0 – 93,0	89,3±3,1
1 µg/mL	90	88,7 – 91,5	88,0 – 93,0	90,1±1,8
4 µg/mL	81,5	76,7 – 83,0	79,0 – 83,0	81,3±1,6
16 µg/mL	88,5	86 – 89,2	86,0 - 90	88,0±1,6

n=6

Tabela 9. Sobrevida de *L. amazonensis* após o tratamento com 1, 4 ou 16 de DRS-01.

Grupos	Sobrevida de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com DRS-01			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	1,5	0,9 – 3	0,5 – 3	1,7±1,1
1 µg/mL	1	0,5 – 1	0,5 – 1	0,8±0,2
4 µg/mL	0	0 – 0,5	0 – 0,5	0,1±0,2
16 µg/mL	0	0 – 0,1	0 – 0,5	0,1±0,2

n=6

Tabela 10. Produção de corpúsculo lipídico em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*. Percentual de macrófago com corpúsculo lipídico.

Grupos	% de macrófago com corpúsculo lipídico			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	19,5	18,7 – 20,7	18 – 21,5	19,6±1,2
1 µg/mL	28,7	26,5 – 30,7	23,5 – 33,0	28,5±3,1
4 µg/mL	41,0	39,5 – 43,0	38,5 – 44,5	41,2±2,1
16 µg/mL	45,5	44,7 – 47,7	44,5 – 50,0	46,1±2,2

n=6

Tabela 11. Produção de corpúsculo lipídico em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*. Média de corpúsculo lipídico.

Grupos	Média de corpúsculo lipídico			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	154,8	150,5 – 158,9	149,0 – 163,0	155±4,9
1 µg/mL	258,3	232,5 – 277,0	195,0 – 292,0	253,4±32,8
4 µg/mL	366,0	333,8 – 385,5	306,5 – 395,5	360,9±33,1
16 µg/mL	420,8	401,3 – 447,0	400,0 – 450,5	423±24,4

n=6

Tabela 12. Produção de corpúsculo lipídico em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*. Índice corpuscular.

Grupos	Índice corpuscular			
	Mediana	Quartis	Extremos	Média ± DP
Controle	3042	2803 – 3259	2718 – 3505	3053±276,7
1 µg/mL	7556	6199 – 8325	4583 – 9636	7325±1661
4 µg/mL	14905	10132 – 15947	5126 – 17600	13288±4410
16 µg/mL	18114	5856 - 20527	5280 - 22525	14990±7409

n=6

Tabela 13. Produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados ou não com *L. amazonensis* e estimulados ou não com PMA e INF- γ .

Grupos de tratamento		Mediana	Quartis	Extremos	Média \pm DP
Controle	Não infect	1,3	0,9 – 1,9	0,8 – 2,0	1,3 \pm 0,5
	Infectado	2,0	1,8 – 2,2	1,8 – 2,3	2,0 \pm 0,2
Estímulo	PMA	1,5	1,0 – 2,6	1,0 – 2,9	1,7 \pm 0,8
	INF- γ	1,1	0,6 – 1,2	0,6 – 1,3	0,9 \pm 0,3
Macrófagos não infectados	1 μ g/mL	-	-	-	-
	4 μ g/mL	-	-	-	-
	16 μ g/mL	-	-	-	-
Macrófagos infectados	1 μ g/mL	-	-	-	-
	4 μ g/mL	-	-	-	-
	16 μ g/mL	-	-	-	-

n=8

Tabela 14. Produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados ou não com *L. amazonensis* e estimulados ou não com LPS e INF- γ .

Grupos de tratamento		Mediana	Quartis	Extremos	Média \pm DP
Controle	Não infect	64,1	60,1 – 65,8	59,0 – 67,0	63,2 \pm 3,1
	Infectado	67,7	64,4 – 69,1	63,8 – 70,0	66,9 \pm 2,5
Estímulo	LPS	66,7	64,2 – 69,3	63,6 – 71,9	66,7 \pm 3,1
	INF- γ	65,1	63,4 – 67,5	62,8 – 68,7	65,4 \pm 2,2
Macrófagos não infectados	1 μ g/mL	67,0	63,1 – 68,5	62,1 – 68,9	66 \pm 2,8
	4 μ g/mL	66,5	65,7 – 68,7	65,7 – 69,0	67,1 \pm 1,5
	16 μ g/mL	67,5	66,5 – 74,2	66,1 – 74,5	69,8 \pm 4,0
Macrófagos infectados	1 μ g/mL	65,3	63,9 – 97,4	63,7 – 69,3	65,6 \pm 2,2
	4 μ g/mL	67,4	65,7 – 69,5	64,3 – 70,1	67,5 \pm 2,2
	16 μ g/mL	67,4	65,0 – 67,9	63,7 – 68,4	66,6 \pm 1,8

n=8