

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

MAYARA GABRIELE CARVALHO DE OLIVEIRA

Avaliação do efeito das Ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de
Leishmania e macrófagos: perspectiva na identificação de novos
compostos leishmanicidas

Brasília
2019

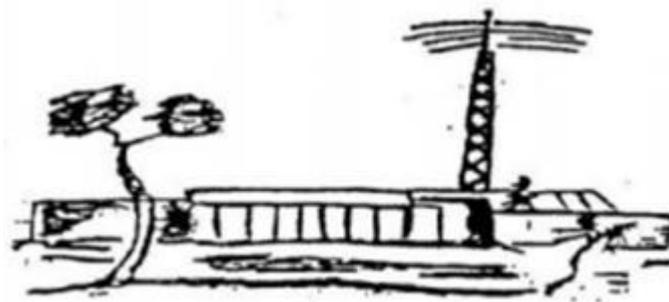
MAYARA GABRIELE CARVALHO DE OLIVEIRA

Avaliação do efeito das Ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de *Leishmania* e macrófagos: perspectiva na identificação de novos compostos leishmanicidas

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de doutor em Medicina Tropical.

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

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



Brasília

2019

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Mayara Gabriele Carvalho de Oliveira

Avaliação do efeito das Ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de *Leishmania* e macrófagos: perspectiva na identificação de novos compostos leishmanicidas

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Medicina Tropical: Biologia da Interação Parasito-Hospedeiro

DATA DA DEFESA DA TESE

22 de março de 2019

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. Ciro Martins Gomes – Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Doralina do Amaral Rabello Ramos – Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi – Centro Universitário de Brasília

Prof Dr. Hugo Alves de Sousa – Universidade de Brasília
(suplente)

DEDICATÓRIA

À eles que são meu porto seguro e incentivadores, meus pais, Francisca Gomes e José Francisco, as pessoas que mais amo. Eles que sempre estão comigo dando muito apoio e principalmente amor. Obrigada por serem esses pais maravilhosos! Essa conquista também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre está comigo e me manteve firme nos momentos mais difíceis, me mostrando que tudo é possível.

À minha orientadora Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus, por essa jornada que se iniciou no mestrado, sempre com muito animação e com soluções para problemas. Obrigada pela oportunidade de concluir não só esse trabalho, mas um sonho.

À minha co-orientadora Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges, que sempre me orientou e auxiliou nos experimentos de citometria de fluxo. Ao longo desses anos você foi amiga, co-orientadora e professora, agradeço a Deus por ter uma pessoa tão especial e fonte inspiradora como você! Obrigada por esses anos.

À Dra. Maria Imaculada Muniz-Junqueira por mostrar a importância de pesquisar doenças e de sempre buscar conhecimento.

Ao Dr. José Roberto Almeida Leite, pela oportunidade de realizar parte desse trabalho em Portugal e pela alegria na realização dos experimentos

Aos meus amigos Lucas Fraga e André Cunha que estiveram comigo nessa reta final de experimentos, me auxiliando com o citometro de fluxo e com a manutenção dos macrófagos J774. Obrigada por doarem o tempo e a alegria de vocês pra conclusão desse trabalho!

Ao meu quase irmão Danilo Corazza, que sempre esteve ao meu lado desde o início do mestrado. Passamos por muita coisa, mas sempre com disposição a ajudar um ao outro, seja na bancada seja com a companhia; Obrigada pela sua alegria! Serei eternamente grata pela sua ajuda e amizade!

À minha amiga Andréia Cascaes por me esclarecer dúvidas sobre cultivo de macrófagos J774, pelo companheirismo e por sempre estar disposta a ajudar no que for preciso.

À Dra. Thaís Minuzzi por ceder o kit de extração de DNA para a realização da qPCR.

Aos meus queridos amigos de laboratório Danilo Corazza, Lucas Fraga, André Cunha, Andréia Cascaes, Fernanda de Sá, Luciana Magalhães, Tatiana Karla Borges, Thaís Minuzzi, Márcia Cristina, Daniela Aquino, Carolina Sampaio, Nicolas Muniz, Luander, Myrna e Isabella Duarte e Vanessa Eschimidth, obrigada por todos os momentos, pelo carinho e principalmente pela amizade de vocês! Vocês são ótimos!

À minha grande amiga e eterna professora Dra. Daniella Alves, por me mostrar o amor pela pesquisa e por sempre acreditar em mim.

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

Ao Gabriel Ginani por me socorrer quando as culturas de macrófagos não tinham mais solução.

À técnica Isabella Teotônio por me ceder culturas de macrófagos J774.

Às professoras Dra. Nadjar Nitz e Dra. Mariana Hetch por cederem o uso dos reagentes e dos aparelhos para a qPCR.

À Tamires Vital por me auxiliar na realização da qPCR e por sempre estar disposta a esclarecer qualquer dúvida.

À Dra. Ana Tómas, do I3S da Universidade do Porto, por ceder o laboratório dela no para a realização dos experimentos.

À Georgina Alves, da Universidade do Porto, pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

Ao professor Dr. Peter Eaton por me orientar enquanto estive na Universidade do Porto e pela paciência em ensinar no manuseio do MFA.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, EMBRAPA por sintetizar as Ocelatinas-PT desse estudo.

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

A CAPES pela bolsa de estudos.

Ao CNPq pela bolsa de estudos para o doutorado sanduíche.

E a todos os meus amigos e parentes que me apoiaram e entenderam a minha ausência para a conclusão desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmanioses	2
1.2 Epidemiologia	4
1.3 Imunologia das Leishmanioses	5
1.4 Diagnóstico da Leishmaniose	10
1.5 Tratamento	11
1.6 Peptídeos Antimicrobianos	13
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Delineamento experimental	20
3.2. Tipo de estudo	21
3.3. Peptídeos	21
3.4. Comitê de Ética para uso de animais	21
3.5 Geração de macrófagos derivados de medula óssea	22
3.6. Células J774	22
3.7. Micro-organismos	23
3.8. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de promastigotas e amastigotas de <i>L. infantum</i>	23
3.9. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de macrófagos derivados de medula óssea	24
3.10. Avaliação morfológica de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com Ocelatinas-PT	24
3.11. Índice de Seletividade	25
3.12. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos J774	25

3.13. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	26
3.14. Determinação do efeito microbicida das Ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos J774 infectados com <i>L. amazonensis</i>	27
3.15. Avaliação molecular por PCR quantitativa (qPCR)	28
3.15.1. Extração de DNA de <i>Leishmania</i>	28
3.15.2. Detecção de DNA de <i>Leishmania</i>	28
3.15.3. Curva padrão para quantificação	29
3.16. Avaliação da viabilidade dos macrófagos J774 tratados com os peptídeos	29
3.17. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	30
3.18. Determinação da produção de óxido nítrico	30
3.19. Determinação da formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos	31
3.20. Avaliação de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo	32
3.21. Análise estatística	32
RESULTADOS	33
4.1. Determinação da concentração inibitória das ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos promastigotas e amastigotas de <i>L. infantum</i>	34
4.2. Determinação da dose tóxica das ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de macrófagos derivados de medula óssea	36
4.3. Determinação do índice de seletividade	37
4.4. Estudos morfológicos de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com Ocelatinas-PT	37
4.5. Determinação da concentração inibitória das ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	40

4.6. Determinação da concentração citotóxica das ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos J774	41
4.7. Determinação do efeito microbicida das Ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	41
4.8. Influência das Ocelatinas-PT4 e PT6 na aderência dos macrófagos J774	45
4.9. Avaliação por qPCR do efeito leishmanicida das Ocelatinas-PT4 e PT6 em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	45
4.10. Influência das Ocelatinas-PT4 e PT6 na viabilidade de macrófagos J774	46
4.11. Produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos J774 tratados ou não com Ocelatinas-PT4 e PT6	47
4.12. Influência das Ocelatinas-PT4 e PT6 na produção de óxido nítrico em macrófagos J774	50
4.13. Produção de corpúsculo lipídico por macrófagos J774 infectados e tratados com Ocelatinas-PT4 e PT6	53
4.14. Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo	55
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	70
LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I (Gráfico de resultados)	86

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo biológico das leishmânias	3
Figura 2. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos	15
Figura 3. Fluxograma dos ensaios	20
Figura 4. Eletrofotomicrografias de varredura de formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	38
Figura 5. Imagem de microscopia força atômica de formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	39
Figura 6. Rugosidade em nm medida por microscopia de força atômica na superfície das membranas celulares de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> .	40
Figura 7. Efeito microbicida da ocelatinas-PT4 e PT6 em macrófagos J774 infectados com <i>L. amazonensis</i> .	43
Figura 8. Imagem de microscopia óptica de macrófagos J774	44
Figura 9. Percentual de recuperação de macrófagos J774 aderidos em lamínulas.	45
Figura 10. Quantificação de leishmânia avaliada por qPCR	46
Figura 11. Percentual de macrófagos J774 viáveis incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos.	47
Figura 12. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por macrófagos J774 infectados ou não e tratados ou não com as Ocelatinas-PT4 e PT6.	49
Figura 13. Produção de EROs por macrófagos J774 infectados ou não e tratados ou não com as Ocelatinas-PT4 ou PT6	50
Figura 14. Produção de óxido nítrico por macrófagos J774 incubados ou não com as diferentes concentrações das Ocelatinas-PT4 ou PT6	52
Figura 15. Efeito das Ocelatinas PT4 ou PT6 na produção de corpúsculos lipídicos (CL) em macrófagos J774 infectados ou não com <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 16. Produção de corpúsculos lipídicos (CL) avaliados pela sonda BODIPY	56
Figura 17. Produção de corpúsculo lipídico (CL) pela sonda BODIPY	57

Tabela 1. Estrutura química das ocelatinas-PT (1 a 8)	21
Tabela 2. Percentual de redução da resazurina por formas promastigotas de <i>L. infantum</i> incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos.	34
Tabela 3. Percentual de redução da resazurina por formas amastigotas de <i>L. infantum</i> incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos	35
Tabela 4. Percentual de redução da resazurina por macrófagos derivados da medula óssea incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos	36
Tabela 5. Índice de seletividade das ocelatinas PT (1 a 8) para as formas promastigotas e amastigotas de <i>L. infantum</i> .	37
Tabela 6. Percentual de redução do MTT por formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos	41
Tabela 7. Percentual de redução do MTT por macrófagos J774 incubados com diferentes concentrações dos peptídeos	41
Tabela 8. Produção de EROs por macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , tratados ou não com diferentes concentrações das ocelatinas PT4 ou PT6.	48
Tabela 9. Produção de nitrito por macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , tratados ou não com diferentes concentrações das ocelatinas PT4 ou PT6.	51
Tabela 10. Produção de corpúsculos lipídicos por macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , tratados ou não com diferentes concentrações das ocelatinas PT4 ou PT6	55

LISTA DE ABREVIATURAS

CL - corpúsculo lipídico

cNOS – sintase óxido nítrico constitutiva

DNA - ácido desoxirribonucleico

DRS-01 – dermaseptina 01

ERN – espécies reativas de nitrogênio

EROs – 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

MFA - microscópio de força atômica

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NK - células Natural Killer

ON - 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 C kinase
PSN-1 – filoseptina 1
qPCR - reação em cadeia de polimerase quantitativa
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- β – fator de crescimento transformador beta
TNF- α – fator de necrose tumoral α

RESUMO

A leishmaniose ameaça atualmente 350 milhões de pessoas em 98 países ao redor do mundo e estima-se que existam 12 milhões de pessoas infectadas no mundo. O Tratamento baseia-se nos compostos antimoniais, que são um dos principais medicamentos, que apesar de eficazes apresentam toxicidade e podem provocar resistência nas leishmânias. Assim, a busca por novos compostos eficazes e de baixa toxicidade impulsiona as pesquisas. Os peptídeos antimicrobianos como as ocelatinas-PT apresentam potencial terapêutico devido a sua capacidade de interagir com as membranas das células de mamíferos causando pouco ou nenhum dano a elas e resultando em um processo de permeabilização e rompimento da membrana do micro-organismo. Por ser um princípio ativo novo faz-se necessário identificar seu efeito *in vitro* para viabilizar sua aplicação biomédica. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das ocelatinas-PT de 1 a 8 em cultivos de *Leishmania sp.* para determinar pelo índice de seletividade (IS) compostos com potencial leishmanicida e avaliar o efeito das ocelatinas selecionadas na em cultivos amastigotas de *L. amazonensis* e de macrófagos J774, infectados e não infectados. Para tal, *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* foram incubadas com diferentes concentrações de Ocelatinas-PT para determinar a concentração inibitória. Os macrófagos derivados de medula óssea e células J774.A1 foram incubadas com as ocelatinas-PT (1 a 8) para a determinação da concentração citotóxica e do IS. Depois, macrófagos J774 foram infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* para determinar pelo índice de infecção/microscopia óptica e por qPCR o efeito microbicida; por citometria de fluxo a produção de espécies reativas de oxigênio e de corpúsculos lipídicos e pelo método de Greiss a produção de óxido nítrico. Os resultados mostraram que: as ocelatinas-PT de 1 a 8 inibiram 50% as formas promastigotas de *L. infantum* e apresentaram baixa toxicidade em cultivos de macrófagos medulares e J774; as ocelatinas PT1 e PT8 causaram aumento de rugosidade, bolhas, erupções vesiculares e caveolares nas membranas de *L. infantum*; as ocelatinas PT4 e PT6 inibiram 50% das formas amastigotas de *L. infantum*, inibiram as formas amastigotas de *L. amazonensis* e apresentaram baixa toxicidade em cultivos de macrófagos J774 (CC₅₀ >512 µg/mL), reduziram de forma dose-dependente a infecção dos macrófagos J774 com *L. amazonensis*; reduziram a aderência celular com todas as concentrações, mas não de forma dose-dependente, aumentaram a produção de EROs, ON e o índice corpuscular por macrófagos infectados. No conjunto, os resultados demonstram o potencial leishmanicida e imunomodulador das ocelatinas-PT4 e PT6 para futuros ensaios *in vivo* visando a compreender seu efeito sistêmico e seu mecanismo de ação.

ABSTRACT

Leishmaniasis currently threatens 350 million people in 98 countries around the world and it is estimated that 12 million people are infected in the world. The treatment is based on antimonial compounds which is effective but toxic and may cause resistance in leishmaniasis. Thus, the search for new and effective compounds of low toxicity are crucial. Antimicrobial peptides, such as ocellatins-PT, present therapeutic potential due to their ability of interaction causing low or no damage to the mammal's membranes cells and resulting in a process of permeabilization and rupture of the microorganism membrane. Because it is a new active principle, it is necessary to identify its *in vitro* effect to enable its biomedical application. The objective of this study was to evaluate the effect of ocellatins-PT 1 to 8 on *Leishmania sp* in order to obtain the selectivity index (SI) of the compound with leishmanicide potential to evaluate the effect of the Ocellatins selected on cultures with *L. amazonensis* amastigote and J774 macrophages, uninfected and infected. For this, *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* were incubated with different concentrations of Ocellatins-PT to determine an inhibitory concentration. Bone marrow-derived macrophages and J774.A1 cells were incubated with ocellatins-PT (1 to 8) for the determination of cytotoxic activity and SI. Afterwards, macrophages were infected with amastigote forms of *L. amazonensis* to obtain the infection index / optical microscopy; by qPCR of microbicidal effect; by flow cytometry the production of reactive species of oxygen and lipid bodies and by the method of Greiss to evaluate the nitric oxide production. The results were as follows: the ocellatins-PT from 1 to 8 showed inhibited as 50% forms promastigotes of *L. infantum* and low toxicity in the culture of medullary macrophages and J774; the ocellatins-PT1 and PT8 caused increase of roughness, bubbles, vesicular eruptions and cavities in the membranes of *L. infantum*; ocellatins PT4 and PT6 inhibited 50% of the amastigote forms of *L. infantum*, inhibited as amastigote forms of *L. amazonensis* and showed low toxicity in cultures of macrophages J774 (CC₅₀ > 512 µg/mL); reduced dose-dependent infection of J774 macrophages with *L. amazonensis*; there was a reduced cell adhesion at all concentrations, but not in a dose-dependent manner, increased ROS production, ON and corpuscular index by infected macrophages. Together, the results demonstrate the leishmanicidal and immunomodulatory potential of PT4 and PT6 ocellatins for future *in vivo* assays in order to understand their systemic effect and mechanism of action.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

A leishmaniose resulta da infecção dos macrófagos por protozoários pertencentes a família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, e são infecções crônicas e não contagiosas (Kaye & Scott 2011; Majili 2012). A interação entre os parasitos e os hospedeiros resulta em infecções caracterizadas por diferentes manifestações clínicas na pele, mucosas e vísceras, e podem causar letalidade se não forem devidamente tratadas.

A leishmania possui duas formas evolutivas: amastigotas, forma sem flagelo, e a forma promastigota que é flagelada. A infecção pelas leishmânias ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea de diferentes espécies do inseto, sendo o gênero *Phlebotomus* encontrado no Velho Mundo, e o gênero *Lutzomyia* encontrado nas Américas (Ministério da Saúde 2007); As espécies capazes de transmitir a leishmaniose tegumentar são: *Lutzomyia intermedia*, *L. squamiventris*, *L. migonei*, *L. neivai*, *L. fischeri*, *L. whitmani*, *L. antunesi*, *L. ayrozai*, *L. complexa*, *L. paraensis*, *L. tuberculata*, *L. ubiquitalis*, *L. wellcomei*, *L. umbratilis*, *L. anduzei*, *L. reducta*, *L. nociva* e *L. flaviscutellata*; O principal vetor da leishmaniose visceral no Brasil é o *Lutzomyia longipalpis*, esse flebotomíneo se adaptou às áreas urbanas e está associado ao aumento do número de casos de LV relatados no Brasil (Brasil 2017). O vetor é popularmente conhecido como “mosquito palha” e possui de 1 a 3 mm de comprimento, coberto com cerdas e tem atividade predominantemente noturna. (Kaye & Scott 2011). As formas infectantes flageladas, promastigotas, são inoculadas juntamente com a saliva durante o repasto. A saliva contribui para a infecção, pois auxilia na resposta imunológica local e na vasodilatação (Ramalho-Ortigao et al. 2010). As promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos e macrófagos, e uma vez dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos, elas conseguem burlar os mecanismos de defesa e são transformadas nas amastigotas que dão início à multiplicação por divisão binária até a ruptura da célula, podendo invadir outras células, estabelecendo a infecção. Durante um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo ingere células contendo formas amastigotas, que ao chegar ao intestino do inseto diferenciam-se em promastigotas procíclicas, forma não infectante e que se divide, e posteriormente em promastigotas metacíclicas, forma infectante, que

migram para o aparelho picador do inseto, onde serão transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado (Figura 1) (Romão et al. 2007; Horikawa & Pena, 2011).

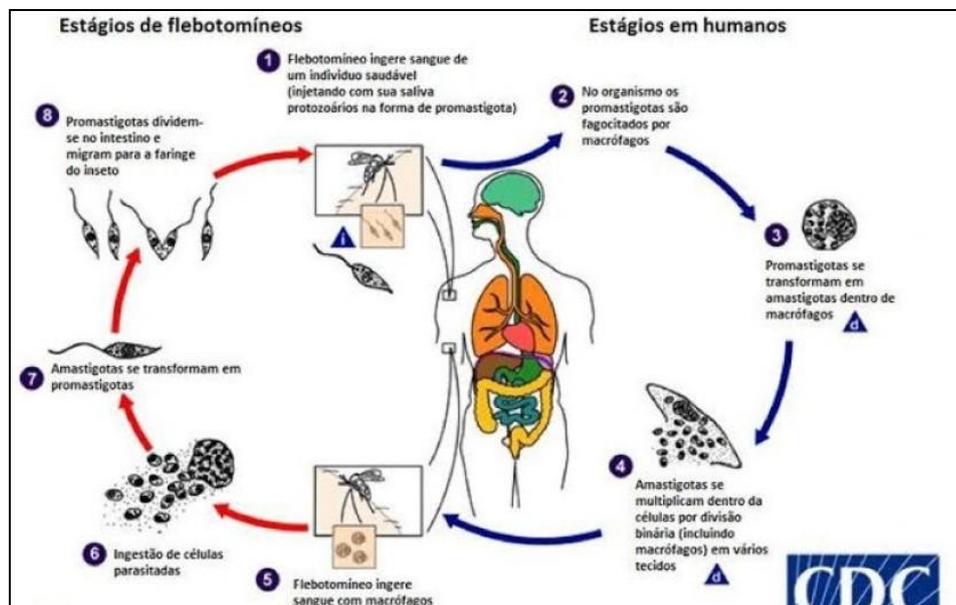


Figura 1. Ciclo biológico das Leishmanias. Fonte: Adaptado de cdc.gov.

A leishmaniose apresenta manifestações clínicas variadas, entre elas úlceras cutâneas, formas mucocutâneas e as formas viscerais que são consideradas graves. A clínica da infecção depende da espécie do parasito, da resposta imunológica e fatores genéticos do hospedeiro; todas as formas clínicas são encontradas no Brasil (Ministério da Saúde 2007).

As formas cutâneas da Leishmaniose Tegumentar, que resultam em úlceras cutâneas ou mucocutâneas, no velho mundo são causadas por *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (Leishmania) major* e *L. (Leishmania) aethiopica*. No novo mundo são causadas por *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) shawi*, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) venezuelensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) lindenberg*. Nas américas 11 espécies de *Leishmania* causam a forma cutânea em humanos, no Brasil apenas seis do subgênero *Viannia* (*L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) lindenberg* e *L. (Viannia) shawi*) e uma do subgênero *Leishmania* (*Leishmania (Leishmania) amazonensis*) infectam humanos (Ministério da Saúde 2006; Ministério da Saúde 2007; Lupi et al. 2009).

A leishmaniose cutânea apresenta três formas clínicas que são a leishmaniose cutânea localizada (LCL), a leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose cutânea difusa. A LCL é característica por apresentar úlceras com bordas elevadas de forma ovalar ou redonda, lesão granulomatosa, infiltrado linfocitário, geralmente indolor e com tendência a cura espontânea, podendo apresentar uma única lesão ou várias. No Brasil, a *L. guyanensis*, *L. amazonensi*, *L. brasiliensis* são responsáveis por essa forma clínica. A leishmaniose cutânea disseminada é uma forma rara que causa múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme e ulcerada, causada pela *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania amazonensis*. A leishmaniose cutânea difusa também é uma forma rara que apresenta nódulos não ulcerados e lesões infiltradas por todo o corpo. Ela é causada pela *Leishmania amazonensis*. A leishmaniose mucocutânea (LM) resulta da evolução da leishmaniose cutânea, apresentando lesões destrutivas localizadas nas mucosas mais frequentes no nariz, boca e garganta. As espécies que causam a LM é a *L. braziliensis* e *Leishmania guyanensis*, mas já houve relatos de *Leishmania (L.) amazonensis* como causadoras (Pires et al. 2012; Goto & Lindoso 2012; Kobets et al. 2012).

A leishmaniose visceral é causada pelas *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani*, sendo que a *L. donovani* causa a doença apenas em humanos, enquanto as outras duas espécies em humanos e outros mamíferos. Por muito tempo acreditou-se que a *L. chagasi* e a *L. infantum* fossem diferentes, mas estudos mostraram que elas são filogeneticamente semelhantes, sendo assim, agora denominadas como *L. infantum*. É considerada a mais grave das formas podendo levar a morte, e se caracteriza pela disseminação dos parasitos pelas vísceras, causando o comprometimento funcional do fígado, baço, pulmão, trato gastrointestinal e medula óssea (Maurício et al. 1999).

1.2. Epidemiologia

A leishmaniose é endêmica em 98 países e territórios, e ameaça 350 milhões de homens, mulheres e crianças ao redor do mundo, sendo o continente africano, asiático e América do Sul os mais afetados. Estima-se que haja 2 milhões de novos casos anualmente, com cerca de 12 milhões de pessoas atualmente infectadas. Desses novos casos cerca de 1,5 milhões são

de leishmaniose tegumentar e 500 mil de leishmaniose visceral, sendo relatadas mais de 50 mil mortes por ano pela forma visceral (WHO 2015).

Os dados do Ministério da Saúde (2014) mostram que o Brasil vem apresentando um forte aumento no número de casos de leishmaniose e, entre 2001 e 2010 foram identificados 248.834 casos de Leishmaniose Tegumentar (sendo 27.374 casos anuais entre 1991 e 2010), com maior densidade no Pará, Tocantins e Maranhão; Na Leishmaniose Visceral, entre 2001 e 2010, 33.315 casos foram registrados, com incidência de 1,88 casos por 100.000 habitantes. A maioria dos casos ocorreu especialmente na região nordeste que já responde por 90% dos casos de LV; o caráter periurbano da doença têm sido atribuídos à presença de cães domésticos que são os principais reservatórios dos parasitos. Tem sido observado um crescimento da endemia, com surtos epidêmicos nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte, sendo o Maranhão o estado com maior número de casos registrados entre 2001 e 2010, com notificação de 417 casos de leishmaniose tegumentar e 335 casos de leishmaniose visceral (Ministério da Saúde 2014).

Em 2017 foram registrados 17.528 casos de leishmaniose tegumentar e 4.103 casos de leishmaniose visceral no Brasil, sendo a maioria dos casos de LT registrados na região norte e os de LV na região nordeste. No Distrito Federal em 2018 foram confirmados 26 casos de leishmaniose visceral, 13 de residentes do DF e 13 de outras regiões administrativas, e 40 casos de leishmaniose tegumentar, 32 de residentes do DF e 8 de outras regiões administrativas (SeS-DF 2018).

A expansão das leishmanioses é multifatorial e 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 2015).

1.3. Imunologia das Leishmanioses

Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas de *Leishmania* são fagocitadas por macrófagos, células NK e neutrófilos (Kaye 2011). Durante o processo de infecção dos macrófagos, as formas promastigotas podem interagir com componentes do sistema do complemento. Para burlar o sistema imune, a promastigota alonga sua estrutura de 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 é uma metaloproteinase, que atua como fator de virulência, auxiliando na inativação dos componentes do sistema complemento e converte C3b em iC3b, inibindo a ação lítica de opsoninas e facilitando a sua fagocitose pelos macrófagos. Nas amastigotas a gp63 se encontra em menor quantidade, mas degrada enzimas lipossomais e exibe atividade em meios ácidos (Sharma 2009; Reis et al. 2006).

Os parasitos entram nas células por meio 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, formando o fagolisossoma que proporciona a destruição do parasito (Handman e Bullen 2002). No entanto, a molécula LPG presente na membrana das promastigotas é capaz de se ligar a bicamada lipídica fazendo com que haja uma desestruturação da membrana, o que retarda a fusão do fagolisossoma, impedindo a formação do complexo NADPH oxidase lhes possibilitando escapar da atividade lítica de células fagocitárias e lhes conferem maior resistência e sobrevivência dentro do hospedeiro (Dermine et al. 2005; Kaye 2011). A molécula LPG ainda torna a leishmânia mais resistentes ao óxido nítrico (ON) 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 desempenham ação microbicida 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).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas a partir de uma reação catalítica ligada à membrana de enzima NADPH-oxidase, que é ativada por componentes citosólicos, enquanto intermediários reativos de nitrogênio (ERNs) são produzidos pela síntese do óxido nítrico induzível (iNOS) (Han et al., 2001; Moreira, 2009). A NADPH oxidase é um complexo enzimático que quando ativado se une e forma um complexo capaz de reduzir oxigênio (O_2) em ânio superóxido (O_2^-) (Van Assche et al., 2011). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido na reação catalítica, a partir da dismutação do O_2 , é um dos oxidantes mais versáteis que existe e pode ser convertido em radical hidroxila (OH) (Mattos et al. 2003).

O óxido nítrico (ON) é um mecanismo microbicida importante dos macrófagos contra as leishmânias. Ele é uma molécula não carregada composta de sete elétrons de nitrogênio e oito elétrons de oxigênio, que pode atacar 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; Beckman e Koppenol 1996). Além disso, o ON regula a inibição celular de células T e B, produção de citocinas e adesão de leucócitos no endotélio microvascular (Veen 2001).

O ON é sintetizado no citoplasma celular, podendo migrar e chegar aos vacúolos parasitóforos e reagir com O_2^- 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 ON e do O_2^- . Esses compostos podem atravessar a membrana celular e permitir uma atividade antimicrobiana (Dusse 2003; Olekhovitch 2014). 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 (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 $IFN\gamma$, 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).

Algumas espécies de leishmânia burlam a diminuição da produção de O_2^- , inibição de NADPH oxidase, bem como por expressão de moléculas antioxidantes (Almeida 2012). 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 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 microbidas desses fagócitos (Olivier et al. 2005).

A resposta no hospedeiro vertebrado é predominantemente mediada por linfócitos T. Essas células são responsáveis pela resposta específica e pela memória ao parasito (Sharma 2009). Contudo, a resposta 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 (Reis et al. 2006).

As formas clínicas da leishmaniose dependem do gênero da Leishmânia e da resposta dos linfócitos T, que 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). A Ta17 participa da resposta, no entanto ela pode ser benéfica ou não ao hospedeiro; altos níveis de IL-17 foram relacionados a gravidade da doença em camundongos Balb/C. Já em pacientes que possuíam a forma visceral, a produção de IL-17 e IL-12 foi associada a resistência a doença, ou seja, sugerindo que elas protegeram contra a doença (Morris et al., 1992). 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.

A forma cutânea apresenta 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 & Prianti 2009; Kumar & Nylén 2012).

O papel das citocinas na leishmaniose tem sido vastamente avaliado, e sabe-se que a respostas Ta1 é importante para controlar a infecção e que o estabelecimento de um padrão inflamatório contribui para a gravidade da doença. Os mecanismos protetores ainda não estão bem estabelecidos para todos os casos de leishmaniose, mas existe um consenso que a interleucina 12 (IL-12) proveniente de células apresentadoras de antígenos e células dendríticas, possivelmente aumentada por citocinas como IL-1, IL-18, IL-23 e IL-17 dirigem a diferenciação e proliferação de células Ta1 e consequentemente o controle da infecção (Alexander & Bryson 2005). Foram relatados que há produção de IL-10 por diversas células, como: T regulatórias (TReg); Ta1, T CD8, células B, Citotóxicas Naturais (CN); dendrítica regulatória; macrófagos e neutrófilos após infecções por *Leishmania* (Kaye 2011). A IL-10 tem um papel supressor, apresentando um efeito antiinflamatório diminuindo a produção de EROS e ON, contribuindo com a sobrevivência do parasito. Ela ainda inibe a síntese de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , que são produzidas pelos macrófagos, fazendo com que essas células não expressem mais MHC de classe II impedindo que elas apresentem antígenos. Estudos mostraram que as células dendríticas liberam IL-27 e IL-12 que induzem a IL-10 em células TCD4, com isso, o próprio macrófago infectado secreta IL-10 e IL-27 mantendo a supressão da resposta (Bacelar & Carvalho 2008; Rodrigues et al. 2016).

Os corpúsculos lipídicos também têm papel importante nas infecções. Eles são organelas citoplasmáticas esféricas encontradas nos organismos

vivos e são 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 controlar a síntese e a secreção de mediadores inflamatórios para responder às infecções (Bozza 2009). Funções inflamatórias e imunorregulatórias também podem ser vistas por essas organelas, uma vez que eles contêm enzimas formadoras de eicosanóides, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. 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. (Melo 2011; Bozza 2017). Esses corpos lipídicos 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*. O acúmulo de corpúsculos lipídicos também 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 de camundongos Swiss infectados com *L. amazonensis* (Oliveira 2015).

1.4. Diagnóstico da Leishmaniose

O diagnóstico da leishmaniose é feito a partir de parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico clínico é feito observando as características da doença, porém elas podem ser confundidas com outras doenças que causem sintomas e patologias semelhantes (Masmoudí et al. 2013).

Para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar as técnicas empregadas são: intradermoreação de Montenegro (IDRM) que está presente na rotina ambulatorial e avalia a resposta celular, mas não distingue infecção da doença atual; avaliação histológica da lesão, que pode ser pouco sensível por conter poucos parasitos na lesão, sendo o diagnóstico feito pela característica do tecido; Isolamento do parasito em meio de cultura específicos a partir de amostras

coletadas, que tem apresentado sensibilidade entre 70 e 80%; Exame direto que é o de primeira escolha, principalmente em áreas com menos recurso, onde é coletada da borda o material para avaliação que será avaliado por microscopia óptica com coloração com derivados do Romanowsky (Faber et al. 2003; Brustoloni et al. 2007; Luz et al. 2009; Masmoudí et al. 2013; Ruitter et al. 2014; Skraba et al. 2014).

Para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral é realizado, assim como na Leishmaniose Tegumentar, o exame histológicos a partir da medula óssea, exame direto a partir da medula óssea (crista hiliáca e esterno) e de isolamento do parasito. A punção de baço e fígado vem sendo descartada por poder causar hemorragia nos pacientes. Diferente da Leishmaniose Tegumentar que é mediada pela resposta celular, a resposta na LV apresenta resposta humoral com liberação de anticorpos sendo possível fazer o uso de métodos sorológicos como ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), testes imunocromatográficos (teste rápido) e teste de deaglutinação direta (DAT) (Machado de Assis et al. 2012; Ready 2014; Solca et al. 2014; Ruitter et al. 2014).

Métodos moleculares vem sendo cada vez mais empregados para a identificação e diagnóstico de doenças. Na leishmaniose (tanto na tegumentar, quanto na visceral) esses métodos também vem sendo empregados para a identificação em amostras clínicas, isolados de culturas e até em flebotomíneos (Ben Abda et al. 2011; Francino et al. 2006). Um desses métodos é a reação em cadeia de polimerase (PCR) que é capaz de detectar apenas uma molécula de DNA na amostra, mostrando sua alta sensibilidade (Melo 2006). A PCR em tempo real ou qPCR vem sendo bastante utilizada por promover o monitoramento e quantificação em tempo real, além de ser uma técnica rápida (Ben Abda et al. 2011). A qPCR pode fazer avaliações qualitativas (detecções positivas ou negativas) e quantitativas (carga relativa ou absoluta), sendo que a avaliação da carga absoluta utiliza uma curva padrão contendo o DNA a ser pesquisado (Galluzzi et al. 2018). Vários estudos já mostraram a sensibilidade dessa técnica para a avaliação de kDNA, inclusive para amostras de pacientes com leishmaniose (Weirather et al. 2011; Pita-Pereira et al. 2012).

1.5. Tratamento

No Brasil o tratamento utilizando compostos antimoniais (Sb) contra a leishmaniose se iniciou na década de 40, e até hoje esses compostos vem sendo utilizados como primeira escolha para o tratamento de Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose mucocutânea (LM) e Leishmaniose visceral (LV). Apenas na Índia e na Guiana Francesa esses compostos não são utilizados para tratamento devido à resistência e falha de tratamento (Romero Guerra et al. 2001; Cappel & Keeling, 2015).

O composto utilizado no Brasil é o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) que é utilizado como primeira escolha tanto para a LC quanto pra LV. Para o tratamento da LC se utiliza a dose de 15-20mg/Kg diariamente no período de 20 dias, com administração via intravenosa ou intramuscular, na LV utiliza-se a dose de 20mg de Sb+5 kg/dia, pelas vias endovenosa ou intramuscular, diariamente entre 20 e 40 dias. Esses compostos atuam no mecanismo bioenergético nas organelas denominadas glicossomas e pela ligação com sítios sulfidrílicos, levando a morte das amastigotas. Apesar de ser o tratamento de primeira escolha, esses compostos possuem alto custo e alta toxicidade, podendo causar alterações no coração (arritimas, taquicardia, fibrilação), no pâncreas e fígado, além de artralgia e mialgia (Sundar & Chakravarty 2013; Croft & Olliaro 2011). Esses compostos também já tem demonstrado baixa eficácia devido a resistência de cepas de leishmânia, além de casos refratários ao tratamento.

Quando o uso de antimonias pentavalentes são contraindicados, o tratamento pode ser feito com outros fármacos, como a anfotericina B, que é de primeira escolha para gestantes. Esse composto pode ser na forma de desoxicolato de anfotericina B ou na forma lipossomal, que apresenta menos efeitos tóxicos, essas duas formas são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde (Brasil 2011; Brasil 2014; Ministério da saúde 2010). Essa droga seliga ao ergosterol, que é um componente da membrana da leishmânia, provocando dano estrutural gerando poros causando influxo de íons, levando a morte do parasito (Van Assche 2013). A formulação lipossomal apresenta níveis plasmáticos elevados, porém tem meia-vida curta e alto custo, sendo indicada para casos graves de leishmaniose visceral, que tiveram efeitos colaterais do Glucantime ou pelo uso de outras drogas que não tenham causado melhora ou cura. Durante o uso desse composto deve-se monitorar o coração (eletrocardiograma), fígado (transaminases e fosfatase alcalina), rins (uréia e creatinina) e o potássio sérico.

Outros fármacos de escolha são a Paromomicina e Pentamidina que tem demonstrado eficácia em alguns estudos para o tratamento da LV (Lockwood & Moore 2010; Pelissari et al. 2011). As pentamidinas são diamidinas aromáticas que podem ser utilizadas para o tratamento de leishmaniose cutânea em áreas endêmicas dos continentes africano, americano e asiático. Seu mecanismo de ação resulta no impedimento da replicação das leishmânias devido a sua ligação ao DNA do parasito. Esse composto não é bem absorvido oralmente, sendo feito por via intravenosa ou intramuscular. A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de culturas do *Streptomyces rimosus* var. *paromomicinus*, utilizado para o tratamento da LC e da LV. Esse composto se liga nas proteínas ribossômicas do parasito induzindo uma má leitura do mRNA, resultando em inibição da síntese protéica e fluidez da membrana (Barret 2012). Sua administração é intramuscular com duração de 21 dias (Sundar et al. 2007).

A miltefosina é uma alquilfosfocolina que interage com os fosfolipídios da membrana da leishmânia interferindo no metabolismo do inositol, proteína cinase C (PKC) e na ativação de fosfolipase, inibindo sinais transmembranares e a síntese da membrana celular, resultando em apoptose (Verma & Dey 2004; Iqbal et al. 2016). Esse fármaco foi desenvolvido inicialmente para o tratamento de carcinomas mamários, mas ele demonstrou efeito sobre leishmânia, sendo o primeiro composto de uso oral aprovado pela FDA para o tratamento de LC, LM e LV em pacientes com idade ≥ 12 anos (OMS 2010; Fernández et al. 2014). Na Índia a miltefosina é um dos medicamentos de primeira escolha para o tratamento de LV, sendo considerada segura para uso (Mishra, Madhubala & Singh 2013). Mas estudos *in vitro* utilizando *L. donovani* demonstraram que essa espécie de leishmânia demonstraram resistência a essa droga (Srivastava et al. 2017).

O tratamento para leishmaniose em pacientes portadores de HIV segue os mesmos critérios de terapêutica preconizada para os pacientes imunocompetentes. Pacientes imunodeprimidos não respondem bem ao tratamento para leishmaniose, sendo estimulado a pesquisa de novos compostos pela OMS.

1.6. Peptídeos Antimicrobianos

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 & 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, fazendo parte do sistema de defesa inato dos organismos vertebrados e invertebrados ou de secreções produzidas que promovem uma proteção contra uma variedade de microrganismos a que são expostos (Koczulla & Bals 2003; Tossi et al. 2000; Toke 2005; Song et al. 2012).

Os peptídeos formam um grupo de moléculas divididas em subgrupos com base na sua composição de aminoácido e estrutura secundária e comumente são catiônicos, apresentando carga positiva (carga líquida igual ou superior a +2), e também são anfipáticos ou anfifílicos, com 50% dos resíduos presentes representados por aminoácidos hidrofóbicos o que lhes conferem a capacidade de interação com as membranas das células, através da interação eletrostática com os fosfolipídeos aniônicos da membrana plasmática. (Kückelhaus et al. 2007; Leite et al. 2008; Nakatsuji & Gallo 2012).

Eles exibem atividade *in vitro* contra um grande número de micro-organismos patogênicos como bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e fungos, protozoários e vírus (Leite 2008). Em plamódios e leishmânias, esses peptídeos exibiram ação imunomoduladora em macrófagos na expressão de citocinas e espécies reativas (Hancock & Sahl 2006; Kuckelhaus et al. 2007), e são a nova aposta para tratamento de infecções.

Parte dessas moléculas foram identificadas em diversos tipos de anfíbios anuros, sendo 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. A investigação desses peptídeos aumentou após o isolamento das magaininas da rã-africana *Xenopus laevis* em 1987 por Zasloff (Prates & Bloch 2000; Nascimento et al. 2004).

Vários mecanismos de ação têm sido propostos para os peptídeos antimicrobianos (PAMs), sendo 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. Os três mecanismos mais aceitos são: poro em forma de barril, poro toroidal e tapete. No primeiro modelo as moléculas dos peptídeos se aderem à membrana e formam poros aquosos à semelhança de “barril” que pode ter seu tamanho aumentado conforme mais monômeros se inserem na membrana, no segundo modelo do tipo “toroidal”, os peptídeos α -hélice se ligam e formam complexos com os fosfolipídeos das membranas que se dobram para formar um canal iônico e no terceiro modelo do tipo “tapete”, descoberto enquanto se estudava a Dermaseptina S, forma-se um tapete de peptídeos sobre a membrana celular que causam saturação dessa superfície, com ação detergente, que vai danificar alterar o arranjo lipídico da membrana plasmática e formar micelas (Brogden 2005; Oren et al. 1999).

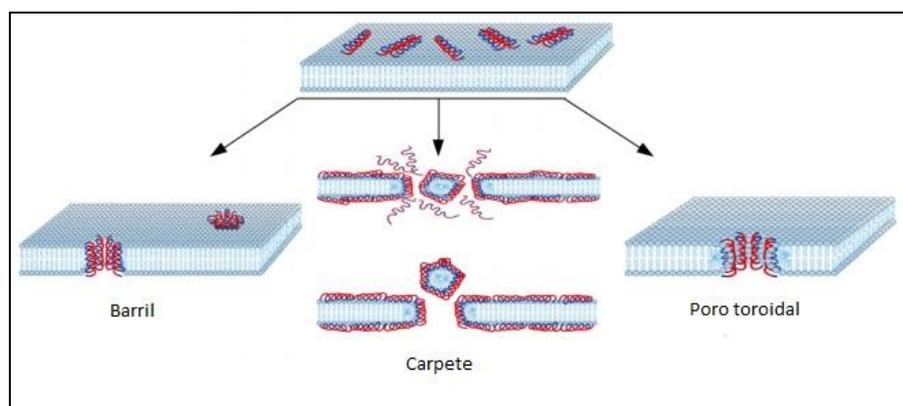


Figura 2. Mecanismo de ação dos PAM. Adaptado de Brogden (2005).

Em 2004 foi descrito pela primeira vez três ocelatinas isoladas e caracterizadas a partir da secreção da pele do anfíbio *Leptodactylus ocellatus*, hoje denominada *Leptodactylus latrans*, sendo elas as Ocelatinas 1, 2 e 3. Esses peptídeos demonstraram atividade *in vitro* contra *Escherichia coli* (Nascimento et al. 2004). As ocelatinas constituem um grupo de peptídeos catiônicos que apresentam entre 20 e 25 resíduos de aminoácidos, além de serem similares. Os peptídeos pertencentes à família das ocelatinas recebiam nomenclaturas diferentes, o que dificultava a relação entre elas, então a partir de 2008, as ocelatinas deviam conter a letra da espécie e o número de parálogos caracterizados em sua nomenclatura (Guimarães 2015). As ocelatinas apresentam normalmente atividade contra bactérias Gram-positivas

e Gram-negativas, e recentemente a ocelatina-P1 demonstrou "*in vitro*" ação contra parasitos de *P. falciparum* com um CI₅₀ de 26,71, amastigotas de *T. cruzi* com CI₅₀ de 29,90 e tripomastigotas de *T. brucei* com CL₅₀ de 4,97 (Guimarães 2015).

Outros peptídeos similares as ocelatinas foram isolados da secreção cutânea de *L. validus*, denominadas ocelatina V1, ocelatina V2 e ocelatina V3, os quais possuem baixa potência antimicrobiana quando comparados às demais ocelatinas (Marani et al. 2015).

Recentemente foram isolados peptídeos antimicrobianos da secreção da pele da rã *Leptodactylus pustulatus*, uma rã encontrada na parte central do Brasil, pertencente à família das ocelatinas foram descritos oito novos peptídeos denominados de ocelatinas-PT1 a -PT8, que diferem apenas em poucas substituições de aminoácidos. A ocelatina-PT é um peptídeo catiônico e aniônico que adota a estrutura de hélice dependente de um solvente como mecanismo de ação, que pode sofrer mudanças na sua conformação quando entra em contato com a membrana do microorganismo. Essas ocelatinas-PT já demonstraram efeito contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa* e baixa citotoxicidade para eritrócitos humanos e fibroblastos murinos (Marani et al. 2015; Bessa et al. 2018).

Para o desenvolvimento de novas drogas de origem natural ou sintética, animal ou vegetal é fundamental uma extensa investigação dos compostos na fase pré-clínica. Visto que esse peptídeo antimicrobiano é capaz de eliminar bactérias e possui baixa citotoxicidade, torna-se fundamental conhecer os efeitos desses peptídeos sobre as leishmanias e macrófagos infectados ou não.

2. OBJETIVOS

2.1. Primeiro objetivo geral

Avaliar o efeito das Ocelatinas-PT de 1 a 8 em cultivos de *Leishmania sp.* e macrófagos para buscar novos compostos para o tratamento da leishmaniose.

Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória das ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de *L. infantum*;
- Determinar a dose tóxica das ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de macrófagos derivados de medula óssea;
- Determinar o índice de seletividade dos peptídeos para selecionar aqueles com a melhor atividade leishmanicida.

2.2. Segundo objetivo geral

Avaliar o efeito das ocelatinas selecionadas na primeira etapa em cultivos amastigotas de *L. amazonensis* e de macrófagos J774, infectados e não infectados.

Objetivos específicos

- Determinar as concentrações inibitórias e citotóxicas;
- Determinar o efeito microbicida em cultivos de macrófagos infectados;
- Determinar o efeito na aderência dos macrófagos;
- Determinar o efeito na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na formação de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos aderidos e por citometria de fluxo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

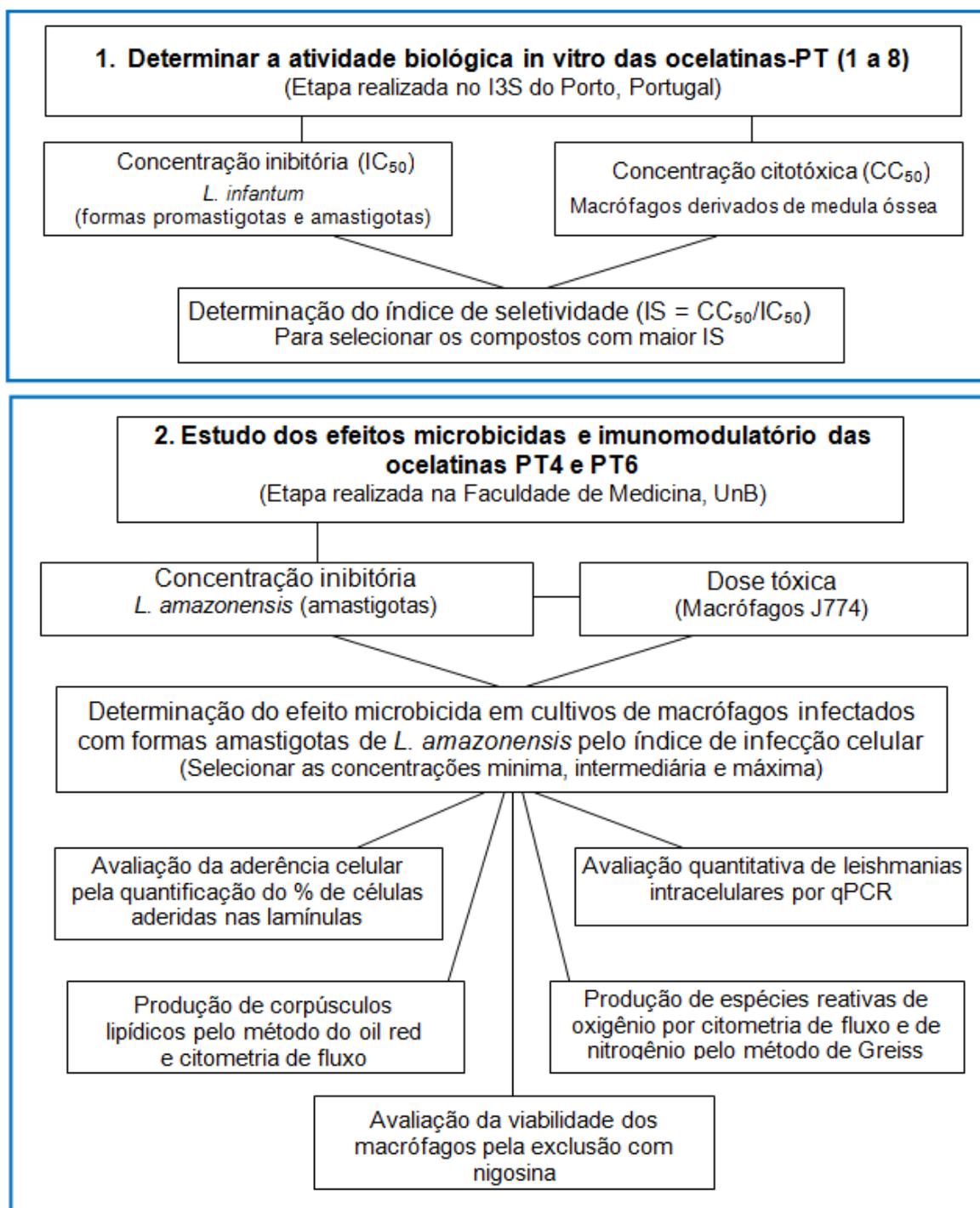


Figura 3. Fluxograma dos ensaios

3.2. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental, *in vitro*, de fase pré-clínica para determinar o efeito microbicida das Ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de protozoários do gênero *Leishmania* e macrófagos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, I3S, Universidade do Porto e Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

3.3. Peptídeos

Os peptídeos sintéticos utilizados nesse estudo, as Ocelatinas-PT de 1 a 8 (Tabela 1), foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Campos Brasília. A produção do peptídeo foi feita manualmente em dosador oral (BD Orapak) e placas porosas da EG Filtros e purificado em coluna de fase reversa Shim-pack PREP-ODS, 250x20mmI.D (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).

Tabela 1. Estrutura química das ocelatinas-PT (1 a 8)

	Sequência de aminoácidos Ocelatina-PT	Total de aminoácidos	Peso molecular
PT1	GVFDIIKDAGKQLVAHAMGKIAEKV	24	2639.1
PT2	GVFDIIKDAGKQLVAHATGKIAEKV	24	2609.0
PT3	GVIDIIKGAGKDLIAHAIGKLAEKV	24	2530.0
PT4	GVFDIIKGAGKQLIAHAMGKIAEKV	24	2595.1
PT5	GVFDIIKDAGRQLVAHAMGKIAEKV	24	2667.1
PT6	GVFDIIKGAGKQLIAHAMEKIAEKVGLNKDGN	31	3365.9
PT7	GVFDIIKGAGKQLIAHAMGKIAEKVGLNKDGN	31	3293.8
PT8	GVFDIIKGAGKQLIARAMGKIAEKVGLNKDGN	31	3312.9

3.4. Comitê de Ética para uso de animais

Os procedimentos experimentais em animais foram aprovados pelo Comitê Local de Ética em Animais do Instituto de Molecular e Biologia Celular, Universidade do Porto, Portugal e licenciada pela DGV (Diretório Geral de

Veterinária, Ministério da Agricultura, Rural Desenvolvimento e Pesca, Govt. Portugal), em 18 de maio de 2006 com referência 520/000/000/2006. Todos os animais foram tratados estrita conformidade com as boas práticas em animais, tal como definidas autoridades competentes (DGV, Lei nu1005 / 92 de 23 de Outubro) e Legislação europeia EEC / 86/609.

3.5. Geração de macrófagos derivados de medula óssea

Células da medula óssea foram isoladas de fêmur e tíbia de camundongos BALB/c com solução salina balanceada de Hank (HBSS, Gibco), e diferenciados em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM). Inicialmente, as células da medula óssea foram coletadas, centrifugadas e suspensas em Meio de Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% da solução de aminoácidos não essenciais (MEM), 50 U/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina (Gibco) e 10% de meio condicionado de células L929 (LCCM) como uma fonte de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Essas células foram cultivadas em placas de petri por 24 horas a 37°C em atmosfera com 7% de CO₂. As células não aderidas foram contadas, colocadas em placas de 96 poços (2,5-3x10⁴ células por poço) e incubadas a 37°C com 7% de CO₂. No 4º e 7º dia, o meio DMEM com 10% de LCCM foi renovado. Após 10 dias a cultura era composta por macrófagos diferenciados.

3.6. Macrófagos J774

As células utilizadas para alguns experimentos são macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67), que são macrófagos murinos obtidos de tumor reticular de ascite de camundongos *Mus musculus* fêmeas adultas BALB/cN. Essas células são mantidas criopreservadas no laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Para descriopreservar essas células, o conteúdo dos tubos foi transferido para tubos Falcon contendo 5 mL de meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de sulfato de gentamicina. Esse tubo era então centrifugado a 200 x g por 10 min e o sobrenadante desprezado. Em seguida as células eram

ressuspendidas em 6 mL de meio de cultura, transferidas para uma garrafa de cultura e mantida em estufa de 37 °C com 5% de CO₂ em ar.

3.7. Micro-organismos

Para o estudo inicial das ocelatinas-PT (1 a 8) foram utilizados cultivos promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM MA67ITMAP263). As promastigotas de *Leishmania infantum* eram mantidas a 25°C em RPMI 1640 Glutamax (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50U/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina e 20 mM de HEPES pH 7,4 (Sigma) no laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, I3S, Universidade do Porto, Portugal. Para obter as formas amastigotas axênicas, as culturas foram transferidas para estufa a 37 °C e 5% de CO₂, em meio MAA suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2 mM Glutamax (Gibco) e 0,023 mM hemin (Sigma).

Para os estudos das ocelatinas selecionadas para a segunda etapa do estudo (PT-4 e PT-6), foram utilizadas formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* da cepa MHOM/BR/PH8. A *Leishmania amazonensis* era mantida sob criopreservação no laboratório de Leishmaniose do Instituto de Medicina Tropical, da Universidade de Brasília. Para a descriopreservação, uma alíquota foi transferida para meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e mantida a 26°C até que os parasitos alcançassem a fase log de crescimento. Em seguida, a suspensão foi transferida para o meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 0,2% de sulfato de gentamicina, a 26 °C, até que os parasitos alcancem novamente na fase log de crescimento. As formas amastigotas axênicas foram obtidas transferindo-se a suspensão para a estufa a 37 °C.

3.8. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de promastigotas e amastigotas de *L. infantum*

Para avaliar o efeito leishmanicida das Ocelatinas-PT1 a PT8, formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum* foram colocados em placas de microcultivo de 96 poços sendo: (i) 3x10⁵ promastigotas por poço em meio

RPMI completo, (ii) $1,5 \times 10^5$ amastigotas axênicos por poço em MAA20. Essas placas foram incubadas com 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ou 128 $\mu\text{g/mL}$ das Ocelatinas-PT por 24h. Decorrido o tempo foi acrescentado 10 μL resazurina 2,5 mM (Sigma) e incubadas novamente por 24h. Após a incubação a fluorescência foi medida em espectrofotômetro de placa SpectraMAX GeminiXS (Molecular Devices LLC) com filtro de 560nm de excitação e 590nm de emissão.

3.9. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de macrófagos derivados de medula óssea

Para avaliar a citotoxicidade dos peptídeos foram utilizado os macrófagos derivados de medula óssea anteriormente descritos. As células foram então incubadas com as concentrações de 16, 32, 64, 128, 256 ou 512 $\mu\text{g/mL}$ dos oito peptídeos em meio DMEM suplementado por 24h a 37°C com 7% de CO_2 em ar. Decorrido o tempo, adicionou-se 10 $\mu\text{g/mL}$ de uma solução de resazurina 2,5 mM (Sigma) por poço. As células foram incubadas durante 2h e a fluorescência foi medida em espectrofotômetro de placa SpectraMAX GeminiXS (Molecular Devices LLC) com filtro de 560nm de excitação e 590nm de emissão.

3.10. Avaliação morfológica de promastigotas de *L. infantum* tratadas com Ocelatinas-PT

Foram adicionadas 2×10^6 formas promastigotas de *L. infantum* por poço em placa de 96 poços, em triplicata. Elas foram incubadas com as Ocelatinas-PT1 e PT8 na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$ a 37°C durante 24h. Esses dois peptídeos foram escolhidos por apresentarem número de aminoácidos diferentes, sendo a PT1 um peptídeo menor (24 aminoácidos) e a PT8 maior (31 aminoácidos). Acredita-se que peptídeos de tamanhos diferentes tenham ação diferente na estrutura dos micro-organismos. As culturas foram transferidas para eppendorffs e foram centrifugadas a $100 \times g$ durante 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado solução de cacodilato de sódio (100 mM; pH 7,2) por 5 minutos, após foi realizada uma fixação primária com glutaraldeído 2,5% em Na-cacodilato 100 mM, pH 7,2,

por 60 minutos. Após esse período, foram feitas duas lavagens para remover o glutaraldeído. As promastigotas foram então transferidas para as lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (10 mm de diâmetro) e estas foram deixadas em repouso durante 60 minutos. As amostras foram lavadas duas vezes com água ultrapura e as lâminas foram cobertas com solução de tetróxido de ósmio a 4°C, 1% em Na-cacodilato 100 mM, pH 7,2, para fixação secundária. Depois disso, a solução de tetróxido de ósmio foi removida por lavagem com água ultrapura e, em seguida, as amostras foram tratadas com uma série de etanol graduada de 25, 50, 75 e 100% duas vezes, 5 minutos cada. Finalmente, as amostras em etanol a 100% foram transferidas para um dispositivo de secagem de ponto crítico (CPD). Após o CPD, as amostras foram mantidas em ambiente seco. As amostras foram então divididas em duas, um conjunto dessas amostras foi revestido com Au/Pd para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV); o outro conjunto de amostras foi utilizado para análise de microscopia de força atômica (MFA) sem tratamento adicional. O MEV foi realizado usando um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta FEG 400. As imagens foram coletadas nos modos de imagem eletrônica secundária (SE) e elétrons retroespalhados (BSE). O MFA foi realizado com um microscópio de força atômica TT-AFM da AFMWorkshop. Um scanner de 50x50x17 mm foi usado, no modo de vibração. As sondas ACT da AppNano foram usadas com frequências de ressonância de aproximadamente 300 kHz. As imagens foram processadas e exibidas usando o software Gwyddion.

3.11. Índice de Seletividade

Os índices de seletividade (IS) das ocelatinas-PT (1 a 8) foram obtidos calculando-se a razão entre as concentrações capazes de inibir a viabilidade de 50% dos macrófagos derivados de medula óssea (CC₅₀) para cada composto pelas concentrações capazes de inibir o crescimento de 50% das formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Compostos que apresentaram o IS maior que 10 são considerados seguros para as células do hospedeiro (Bézivin et al. 2003).

3.12. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos J774

Para avaliar o efeito citotóxico das Ocelatinas, células J774 (1×10^5) foram distribuídas em placa de microcultivo de 96 escavações em meio DMEM acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), junto com as diferentes concentrações de Ocelatina-PT4 e PT6. Essa placa foi incubada por 2h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, decorrido o tempo de incubação, foi adicionado 10 µL de solução de 2,5-Difenil 3 Brometo de Tetrazolium (MTT) na concentração de 5 mg/mL por escavação e incubado novamente por 4h a 37°C com 5% de CO₂ em ar. Após a incubação foi adicionado 50 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e as leituras de absorbância feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 540nm (Multiskan® Titertek, Huntsville, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de redução do MTT.

3.18. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de amastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito das Ocelatinas, formas amastigotas de *L. amazonensis* (1×10^5) foram distribuídas em placa de microcultivo de 96 escavações em meio DMEM acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), junto com as diferentes concentrações de Ocelatina-PT4 e PT6. Essa placa foi incubada por 2h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, decorrido o tempo de incubação, foi adicionado 10 µL de solução de 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) na concentração de 5 mg/mL por escavação e incubado novamente por 4h a 37°C com 5% de CO₂ em ar. Após a incubação foi adicionado 50 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e as leituras de absorbância feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 540 nm (Multiskan® Titertek, Huntsville, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de redução do MTT.

3.13. Determinação do efeito das Ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de amastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito das Ocelatinas, formas amastigotas de *L. amazonensis* (1×10^5) foram distribuídas em placa de microcultivo de 96 escavações em meio DMEM acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), junto com as diferentes concentrações de Ocelatina-PT4 e PT6. Essa placa foi incubada por 2h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, decorrido o tempo de incubação, foi adicionado 10 µL de solução de 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) na concentração de 5 mg/mL por escavação e incubado

novamente por 4h a 37°C com 5% de CO₂ em ar. Após a incubação foi adicionado 50 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e as leituras de absorvância feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 540 nm (Multiskan® Titertek, Huntsville, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de redução do MTT.

3.14. Determinação do efeito microbicida das Ocelatinas PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito da Ocelatina-PT4 e PT6, as células J774 foram quantificadas e distribuída (2×10^5 células/escavação) em placa de microcultivo de 24 escavações e incubadas por 2h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, em meio DMEM (Gibco), num volume de 200 µL de meio, para a aderência dos macrófagos J774. Decorrido o tempo para a aderência das células na placa, as escavações foram lavadas com STF pH 7,2, 37°C, em seguida foram adicionadas formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (10^6), em cada escavação, e então as células foram novamente incubadas por 12h a 37°C com 5% de CO₂ em ar, em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), para a infecção dos macrófagos. 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 Ocelatina-PT4 e PT6 (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 foram selecionadas para os ensaios de funcionalidade. A escolha dessas concentrações baseia-se nos critérios de toxicidade para os macrófagos e na determinação do efeito microbicida e/ou imunomodulador de uma faixa delas. Para determinar o percentual estimado de macrófagos aderidos sobre as lamínulas foram quantificado em microscopia óptica (400 x), o total de células presentes em 10% da área da lamínula.

3.15. Avaliação molecular por PCR quantitativa (qPCR)

Macrófagos J774 foram infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados ou não com as Ocelatinas-PT4 e PT6 nas concentrações de 2, 8, 16 ou 64 µg/mL. Após a incubação com os peptídeos, esses macrófagos foram resuspendidos com STF e transferidos da placa para um eppendorf e centrifugado a 1700 rpm durante 10 minutos. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi descartado e adicionado 200 de STF, em seguida as amostras foram guardadas a -20 até a extração.

3.15.1. Extração de DNA de *Leishmania*

A extração do DNA foi realizada utilizando o "Kit DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA), conforme o protocolo: foi adicionado 20 µL de Proteinase K no eppendorf junto 200 µL do tampão AL e de etanol 100%, em seguida as amostras foram homogeneizadas com o vortex. O conteúdo dos eppendorfs foram então transferidos para uma mini coluna de rotação de 2 mL contendo um tubo de coleta e centrifugados a 6000 g por 1 minuto. O tubo de coleta das amostras foi descartado e um novo colocado, em seguida 500 µL do tampão AW1 foi adicionado e os tubos novamente centrifugados por 1 min a 6000 g. O tubo de coleta foi novamente descartado e foram adicionados 500 µL do tampão AW2, que foi centrifugado por 3 min a 20,000 g, decorrido o tempo as minis colunas foram colocadas em eppendorfs de 1,5 mL e foi adicionado no centro da coluna 100 µL de tampão AE. Os eppendorfs foram incubados por 1 min a temperatura ambiente e centrifugados a 6000 g por 1 min. Este procedimento foi realizado novamente sendo o DNA eluído da coluna em volume final de 100 µL. A quantificação da concentração de DNA de leishmânia extraído foi avaliada por espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE).

3.15.2. Detecção de DNA de *Leishmania*

A fim de se avaliar a presença de DNA de *Leishmania* nos macrófagos J774 infectados e tratados com as Ocelatinas-PT4 e -PT6, foi realizada uma PCR quantitativa (qPCR), utilizando *primers* direcionados para a região constante do minicírculo de DNA mitocondrial (kDNA) da leishmânia. Para o kDNA de *Leishmania* utilizou-se os *primers* PPF (5' GGC CCA CTA TAT TAC

ACC AAC CCC 3') e PPR (5' GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA 3') (PITA-PEREIRA *et al.*, 2012). Cada reação tinha um volume final de 20 µL, com 10 µL 1X de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, CA, USA), 0,2 µM de cada *primer* e 2 µL de amostra de DNA com concentração de 25 ng/µL. A qPCR foi feita com termociclador *Applied Biosystems™ QuantStudio 3* com as condições de ciclagem de: 94 °C durante 12 minutos e 40 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 30 segundos. Após a amplificação, a *melting curve* foi padronizada com desnaturação inicial de 95 °C durante 5 segundos, seguidos por 50 °C durante 15 segundos e 95 °C por 5 segundos. As amplificações foram realizadas em duplicata em placas de 96 poços (*Optical 96-Well Reaction Plate*, MicroAmp®) com dois controles negativos, um sem DNA (branco) e o outro com DNA de cultura de células *Hek* não infectadas e dois controles positivos de maior e menor concentração (dois pontos da curva).

3.15.3. Curva padrão para quantificação

Foi padronizada uma curva para a quantificação absoluta de parasitos a partir de concentrações estabelecidas de DNA de *L. infantum*, diluições seriadas de 1:10 (5 ng/µL; 0,5 ng/µL; 0,05 ng/µL e 0,005 ng/µL) e com eficiência de 98,6%.

Para determinar a carga parasitária nos macrófagos infectados e os tratados, foi estabelecida uma curva padrão a partir do DNA de *L. infantum*. As diluições seriadas foram de 1:10 (5 ng/µL; 0,5 ng/µL; 0,05 ng/µL e 0,005 ng/µL). A eficiência resultou em 98,6%, *Slope*: -3,355, R^2 : 0,996 e erro de: 0,082. Para os cálculos utilizou-se a equação: $y = -3,6916x + 15,601$, onde Y é o CT da amostra, X a quantidade a ser calculada do produto amplificado, -3,6916x é o coeficiente angular da reta e o 15,601 é o coeficiente linear da reta. A quantificação em cada amostra foi calculada e avaliada como positivo no mínimo de sensibilidade da curva (0,005 ng/µL), possibilitando quantificar as amostras. A quantidade de parasitos é equivalente a 50 ng de DNA em cada amostra avaliada.

3.16. Avaliação da viabilidade dos macrófagos J774 tratados com os peptídeos

Para avaliar se ocelatinas-PT4 e -PT6 podem ter ação citolítica, foi realizado um teste de viabilidade com nigrosina. Foram incubados, 2×10^5 macrófagos J774 em Eppendorf em 100 μL de meio DMEM (Gibco) com as diferentes concentrações das Ocelatinas-PT4 e -PT6 (2, 8, 16 ou 64 $\mu\text{g}/\text{mL}/100 \mu\text{L}$) e então, os cultivos foram incubados por 2 horas a 37°C . 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 hematócitos em microscopia óptica na objetiva de 400x e o resultado foi expresso em média após retirar as células que incluíram a nigrosina no citoplasma.

3.17. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) foi feita em cultivos de células J774, infectadas ou não com *L. amazonensis*. Os experimentos foram realizados em sextuplicatas, em placas de microcultivo de fundo plano e 96 escavações. Foram distribuídas 1×10^5 células por escavação em 200 μL de meio DMEM sem soro e incubadas em câmara úmida a 37°C com mistura gasosa de ar + 5% de CO_2 por 60 min para a aderência das células. Em seguida, as escavações foram lavadas com STF (0,15M, pH 7,2), a 37°C , para retirar as células não aderidas. Os macrófagos foram incubados com 5×10^5 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 , em seguida, os macrófagos foram incubados por 2 horas com diferentes concentrações de Ocelatinas PT4 e PT6 (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células foram lavadas três vezes com STF e incubadas por 30 min, nas mesmas condições descritas, com 199,5 μL de STF e 0,05 de solução estoque de DFCDA (2', 7'-diclorofluoresceína-diacetato, Sigma). As leituras das fluorescências foram feitas em citômetro Fortessa LSR II (BD Bioscience, San Jorge, CA, USA) com 485 nm de excitação e 530 nm de emissão.

3.18. Determinação da produção de óxido nítrico

Células J774 foram incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos e a produção de óxido nítrico (ON) avaliada utilizando-se reagente de Greiss, segundo técnica descrita por Green et al. (1982). Os experimentos

foram realizados em sextuplicatas, em placas de microcultivo de fundo plano e 96 escavações. Foram distribuídas 2×10^5 células por escavação em 200 μL de meio DMEM sem soro e incubadas em câmara úmida a 37°C com mistura gasosa de ar + 5% de CO_2 por 60 min para a aderência das células. Após incubação em câmara úmida a 37°C , por 60min, em atmosfera de ar+ 5% de CO_2 , as escavações foram lavadas 3 vezes com STF (0,15 M, pH 7,2), a 37°C , para retirar as células não aderidas. Os macrófagos J774 obtidos por aderência 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 , e, em seguida, incubadas, nas mesmas condições anteriores por 24h com 200 μL de Ocelatinas-PT4 e PT6 ou lipopolissacarídeo (LPS *Escherichia coli*, sorotipo 055:b5, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA; concentrações de 10 ou 20ng/mL), preparadas em meio DMEM completo. Terminada a 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 então será acrescido 100 μL de reagente de Greiss. A curva padrão foi preparada com oito diferentes concentrações (0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100nM) de nitrito de sódio (NaNO_2), em água destilada. As leituras das reações colorimétricas foram feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 540 nm (Multiskan[®] Titertek, Huntsville, EUA) e os resultados expressos em milimoles (mM) de NO.

3.19. Determinação da formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos

Para determinar a formação de corpúsculos lipídicos, as células J774 aderidas (2×10^5 células/escavação) em placa de microcultivo de 24 escavações com adição de lamínulas foram infectadas com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (10^6 /escavação), por 12h a 37°C com 5% de CO_2 em ar, em meio DMEM 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 leishmânias não ingeridas e então, as células foram novamente incubadas por 2 h com as diferentes concentrações de Ocelatina-PT. 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.

3.20. Avaliação de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo

Os macrófagos J774 foram infectados conforme descrito anteriormente (3.12), em placa de 96 poços e incubados com as concentrações de 2, 8, 16 ou 64µg/mL das Ocelatinas-PT4 e PT6 por 2 horas. Decorrido o tempo, a placa foi lavada 1x com STF pH 7,2 e incubada a 37°C com 200µL de Bodipy (Difluoro {2-[1-(3,5-Dimetil-2H-Pirrol-2-Ilideno-N)Etil]-3,5-Dimetil-1H-P, Sigma) na diluição de 1:5000 por 30 minutos. Após a incubação a placa foi lavada 1x com STF pH 7,2 e as células fixadas com 200µL de paraformaldeído a 4%. As células foram ressuspensas e a leitura foi feita em citômetro Fortessa LSR II (BD Bioscience, San Jorge, CA, USA) com 488 nm de excitação e 530 nm de emissão, usando o software BD FACSDiva™.

3.21. Análise estatística

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias, empregando-se o teste de Bartlett. Teste t pareado ou Wilcoxon foram usados para comparar duas amostras normais ou não normais, respectivamente. Para as múltiplas comparações foram utilizados os testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis, para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente. As análises e as representações gráficas foram feitas empregando-se o programa Prism® Software Package (GraphPad, USA, 1997), o intervalo de confiança foi de 95% (CI=95%) e diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da concentração inibitória das ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos promastigotas e amastigotas de *L. infantum*

Os resultados obtidos em cultivos de promastigotas de *L. infantum* mostraram que a incubação com as Ocelatinas-PT por 24 h foi capaz de inibir o crescimento dos parasitos em relação ao controle, com exceção da ocelatina-PT2. As ocelatinas-PT1, PT3 e PT5 inibiram o crescimento nas concentrações de 64 e 128 µg/mL, na comparação com o controle. As ocelatinas-PT4, PT6, PT7 e PT8 inibiram o crescimento de *L. infantum* com 32, 64 e 128 µg/mL. As concentrações capazes de inibir o crescimento de 50 % dos parasitos foram estimadas conforme demonstrado na tabela 2 e no anexo I.

Tabela 2. Percentual de redução da resazurina por formas promastigotas de *L. infantum* incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos. Representados percentual de média.

Ocelatinas	Concentrações dos peptídeos (µg/mL) (% Média ± DP)									CI ₅₀ estimado µg/mL
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	
PT1	99,0 ± 0,1	93,5 ± 6,6	109,6 ± 9,5	111,8 ± 10,9	111,3 ± 7,4	113,0 ± 9,6	107,3 ± 7,9	72,0 ± 1,9*	35,3 ± 1,9*	107,0
PT2	99,0 ± 0,1	80,1 ± 20,4	139,3 ± 49,5	139,3 ± 46,6	141,2 ± 45,9	139,0 ± 44,8	134,5 ± 41,3	132,5 ± 37,9	125,8 ± 37,8	>128,0
PT3	99,0 ± 0,1	86,2 ± 20,3	122,2 ± 39,1	127,9 ± 44,7	126,6 ± 43,8	121,9 ± 38,8	82,8 ± 22,3*	38,3 ± 10,8*	26,6 ± 8,2*	83,8
PT4	99,0 ± 0,1	92,1 ± 4,1	110,5 ± 9,2	113,6 ± 8,7	112,2 ± 6,7	92,4 ± 3,9	60,0 ± 5,5*	37,1 ± 4,3*	25,3 ± 2,0*	74,9
PT5	99,0 ± 0,1	98,6 ± 7,2	104,1 ± 2,9	103,9 ± 1,9	105,8 ± 4,1	103,9 ± 4,5	94,6 ± 6,4	65,4 ± 18,1*	32,4 ± 7,4*	97,8
PT6	99,0 ± 0,1	103,9 ± 4,1	101,5 ± 3,6	102,7 ± 2,4	103,5 ± 1,8	102,0 ± 2,2	79,8 ± 1,2	39,6 ± 4,8*	22,2 ± 2,4*	76,3
PT7	99,0 ± 0,1	103,5 ± 7,3	102,0 ± 1,4	101,3 ± 1,2	100,4 ± 2,2	95,8 ± 0,4	74,1 ± 2,3*	45,7 ± 6,2*	25,6 ± 4,6*	78,8
PT8	99,0 ± 0,1	104,7 ± 7,2	102,2 ± 1,1	103,9 ± 1,8	104,9 ± 1,9	101,9 ± 2,2	86,1 ± 5,9*	54,7 ± 6,8*	28,5 ± 6,1*	87,3

As formas amastigotas de *L. infantum* mostraram inibição do crescimento apenas com as Ocelatinas-PT4 e PT6. A ocelatina-PT4 inibiu o crescimento nas concentrações de 64 e 128 µg/mL, em comparação com o controle. Já a ocelatina-PT6 inibiu o crescimento com 128 µg/mL. As concentrações capazes de inibir o crescimento de 50 % dos parasitos foram estimadas conforme demonstrado na tabela 3 e no anexo I.

Tabela 3. Percentual de redução da resazurina por formas amastigotas de *L. infantum* incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos. Representados percentual de média.

Ocelatinas	Concentrações dos peptídeos (µg/mL) (% Média ± DP)									CI ₅₀ estimado µg/mL
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	
PT1	99,0 ± 0,1	106,1 ± 7,3	110,3 ± 10,7	108,3 ± 10,4	108,6 ± 13,1	106,1 ± 12,4	112,0 ± 14,2	107,9 ± 17,4	101,4 ± 7,2	>128,0
PT2	99,0 ± 0,1	105,2 ± 10,1	104,6 ± 1,5	110,9 ± 12,1	102,8 ± 4,0	99,5 ± 4,5	101,2 ± 2,0	104,5 ± 6,5	105,8 ± 10,2	>128,0
PT3	99,0 ± 0,1	100,2 ± 3,9	104,2 ± 5,5	106,6 ± 5,2	100,4 ± 5,5	95,9 ± 5,9	101,2 ± 4,5	105,7 ± 9,2	96,8 ± 3,5	>128,0
PT4	99,0 ± 0,1	99,5 ± 3,7	104,0 ± 4,1	102,0 ± 2,1	96,2 ± 6,0	96,8 ± 2,3	97,3 ± 5,7	85,4 ± 15,3*	35,9 ± 21,8*	114,0
PT5	99,0 ± 0,1	106,0 ± 14,1	92,6 ± 7,3	95,1 ± 8,1	92,0 ± 10,4	96,0 ± 7,0	94,4 ± 6,7	101,5 ± 4,3	95,9 ± 5,6	>128,0
PT6	99,0 ± 0,1	99,9 ± 16,8	103,7 ± 20,3	114,6 ± 11,2	113,5 ± 10,5	110,9 ± 7,2	112,3 ± 11,9	97,4 ± 19,0	38,6 ± 25,3*	128,0
PT7	99,0 ± 0,1	99,6 ± 6,4	106,9 ± 4,8	107,4 ± 2,4	104,3 ± 2,0	106,0 ± 3,9	105,4 ± 2,4	106,2 ± 4,2	70,0 ± 27,0	>128,0
PT8	99,0 ± 0,1	100,9 ± 8,2	102,7 ± 1,4	105,9 ± 3,8	100,8 ± 2,2	102,1 ± 3,5	103,9 ± 0,2	103,0 ± 3,1	92,6 ± 3,3	>128,0

4.2. Determinação da dose tóxica das ocelatinas-PT (1 a 8) em cultivos de macrófagos derivados de medula óssea

Os resultados mostraram que macrófagos derivados de medula óssea incubados com as diferentes Ocelatinas-PT não reduziram a viabilidade celular em relação ao controle, com exceção da ocelatina-PT4, que reduziu a viabilidade com 512 µg/mL. As concentrações capazes de inibir a viabilidade de 50% dos macrófagos foram estimadas conforme demonstrado na tabela 4 e no anexo I.

Tabela 4. Percentual de redução da resazurina por macrófagos derivados da medula óssea incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos

Ocelatinas	Concentrações dos peptídeos (µg/mL) (% Média ± DP)							CC ₅₀ estimado µg/mL
	0	16	32	64	128	256	512	
PT1	99,0 ± 0,1	447,6 ± 31,0	438,7 ± 12,8	446,8 ± 3,5	438,2 ± 28,8	453,9 ± 18,7	344,6 ± 42,9	>512
	99,0 ± 0,1	454,8 ± 28,3	448,4 ± 29,2	476,5 ± 59,9	463,9 ± 26,4	501,1 ± 21,6	545,1 ± 34,2	
PT2	99,0 ± 0,1	460,6 ± 15,2	491,4 ± 0,1	491,5 ± 23,7	438,2 ± 19,8	489,3 ± 12,0	363,6 ± 17,4	>512
	99,0 ± 0,1	456,4 ± 43,1	449,8 ± 16,9	464,0 ± 13,5	432,1 ± 18,6	247,8 ± 5,0	43,1 ± 3,4	
PT4	99,0 ± 0,1	426,8 ± 22,1	392,1 ± 68,3	447,8 ± 6,3	403,5 ± 79,8	462,8 ± 56,6	518,8 ± 2,4	>512
	99,0 ± 0,1	432,5 ± 63,6	405,9 ± 5,0	427,6 ± 32,6	447,0 ± 54,59	453,3 ± 45,1	265,5 ± 14,5	
PT5	99,0 ± 0,1	466,0 ± 26,5	445,6 ± 35,9	400,6 ± 17,6	443,4 ± 11,4	404,6 ± 3,3	286,7 ± 9,5	>512
	99,0 ± 0,1	448,1 ± 6,7	415,3 ± 6,5	414,4 ± 9,2	427,9 ± 14,8	430,9 ± 16,0	442,5 ± 9,5	
PT6	99,0 ± 0,1	466,0 ± 26,5	445,6 ± 35,9	400,6 ± 17,6	443,4 ± 11,4	404,6 ± 3,3	286,7 ± 9,5	>512
	99,0 ± 0,1	448,1 ± 6,7	415,3 ± 6,5	414,4 ± 9,2	427,9 ± 14,8	430,9 ± 16,0	442,5 ± 9,5	
PT7	99,0 ± 0,1	448,1 ± 6,7	415,3 ± 6,5	414,4 ± 9,2	427,9 ± 14,8	430,9 ± 16,0	442,5 ± 9,5	>512
	99,0 ± 0,1	448,1 ± 6,7	415,3 ± 6,5	414,4 ± 9,2	427,9 ± 14,8	430,9 ± 16,0	442,5 ± 9,5	
PT8	99,0 ± 0,1	448,1 ± 6,7	415,3 ± 6,5	414,4 ± 9,2	427,9 ± 14,8	430,9 ± 16,0	442,5 ± 9,5	>512
	99,0 ± 0,1	448,1 ± 6,7	415,3 ± 6,5	414,4 ± 9,2	427,9 ± 14,8	430,9 ± 16,0	442,5 ± 9,5	

4.3. Determinação do índice de seletividade

Os índices de seletividade determinados pela razão entre CC_{50} e IC_{50} mostraram que para as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* todas as ocelatinas-PT apresentaram índices inferiores a 10. Nos cultivos de promastigotas as ocelatinas-PT4 e PT6 foram as que apresentaram maior índice de seletividade, já para as amastigotas apenas as ocelatinas-PT4 e PT6 tiveram um índice igual ou maior que 4 (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de seletividade das ocelatinas PT (1 a 8) para as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*.

Ocelatinas	Índice de Seletividade (CC_{50}/CI_{50})	
	<i>L. infantum</i> (promastigotas)	<i>L. infantum</i> (amastigotas)
PT1	4,8	-
PT2	-	-
PT3	6,1	-
PT4	6,6	4,4
PT5	5,2	-
PT6	6,7	4,0
PT7	6,5	-
PT8	5,9	-

4.4. Estudos morfológicos de promastigotas de *L. infantum* tratadas com ocelatinas-PT

Para observar as alterações morfológicas das formas promastigotas incubadas com as ocelatinas, PT1 e PT8, foram obtidas imagens por microscopia de varredura de força atômica.

As imagens de MEV mostraram alterações nas membranas dos parasitos com os dois peptídeos, na comparação com o controle (Figura 4). A incubação com 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ provocou a formação de erupções vesiculares (B e C) e com 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, além das vesículas, observou-se as cavéolas profundas demonstradas nas figuras D e E.

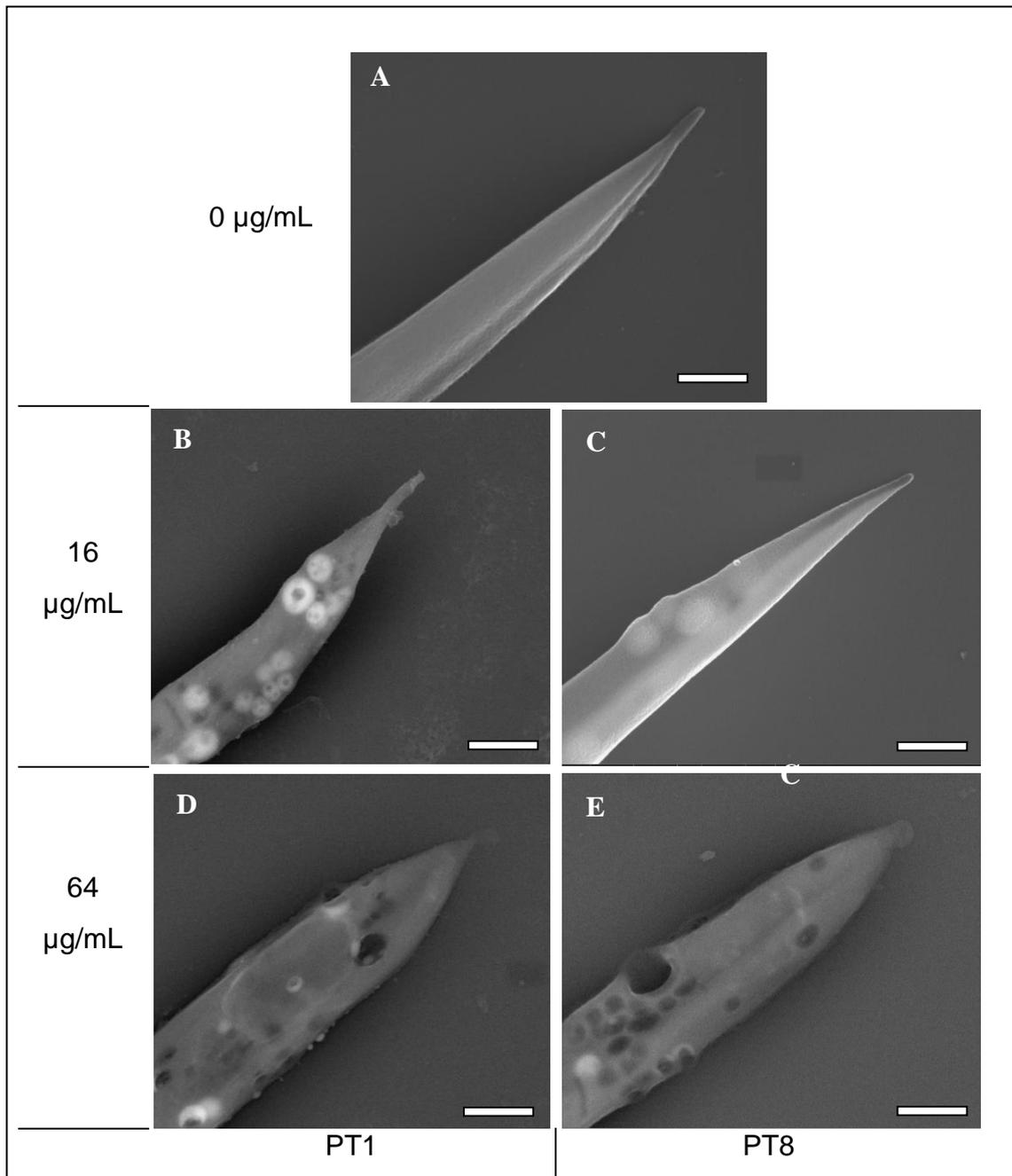


Figura 4. Eletrofotomicrografias de varredura de formas promastigotas de *L. infantum* controle (A) e tratadas com 16 (B) e 64 (D) das ocelatinas-PT1 e 16 (C) e 64 (E) da PT8. Observar as formações vesiculares em B e C e as erupções caveolares profundas em D e E. Barra de aumento = 1 μm .

Para a avaliação no MFA foram utilizadas leishmânias tratadas com 16 $\mu\text{g/mL}$ de PT1 e PT8, Assim como no MEV, foi possível observar características circulares nas duas amostras indicando a presença de formas semelhantes a bolhas. As imagens do AFM mostraram que houve mudança na textura da membrana das promastigotas tratadas quando comparadas ao controle (Figura 5).

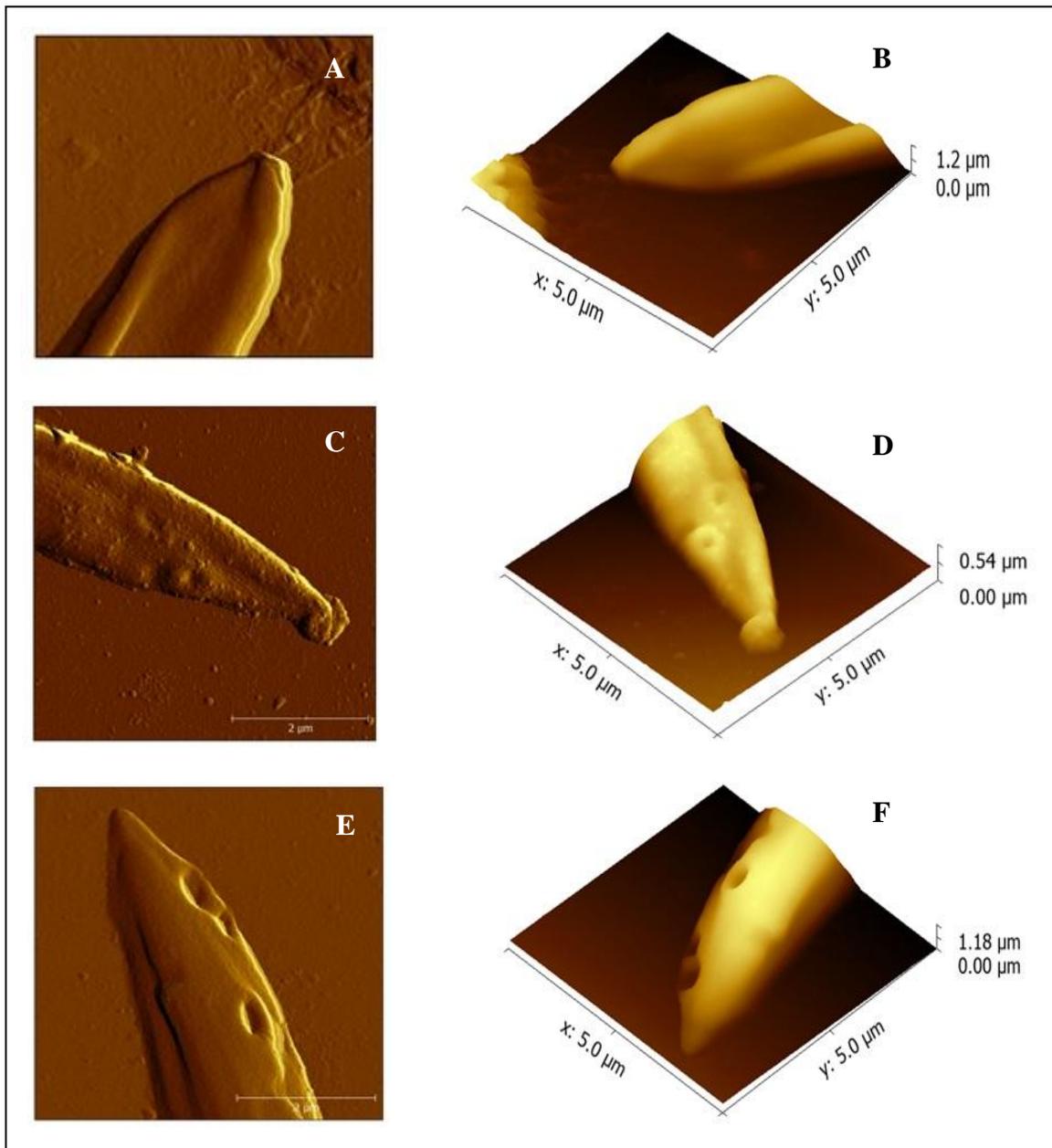


Figura 5. Imagem de microscopia de força atômica de formas promastigotas de *L. infantum* em A, B (controle) e incubadas com 16 $\mu\text{g/mL}$ da ocelatina PT1 (C, D) e com 16 $\mu\text{g/mL}$ da ocelatina PT8 (E, F). As imagens B, D e F são a representação 3D da altura dos parasitos em A, C e E, respectivamente.

Para avaliar as alterações morfológicas nas membranas dos parasitos incubadas com as ocelatinas PT1 e PT8 foram tomadas as medidas da rugosidade a partir dos dados da microscopia de força atômica. Os resultados não mostraram diferenças na rugosidade entre o controle ($3,3\pm 0,6$ nm) e as leishmânias incubadas com 16 $\mu\text{g/mL}$ da ocelatina PT1 ($4,2\pm 1,5$ nm) ou PT8 ($5,1\pm 2,2$ nm) (Teste t pareado; $p > 0,05$) (Figura 6).

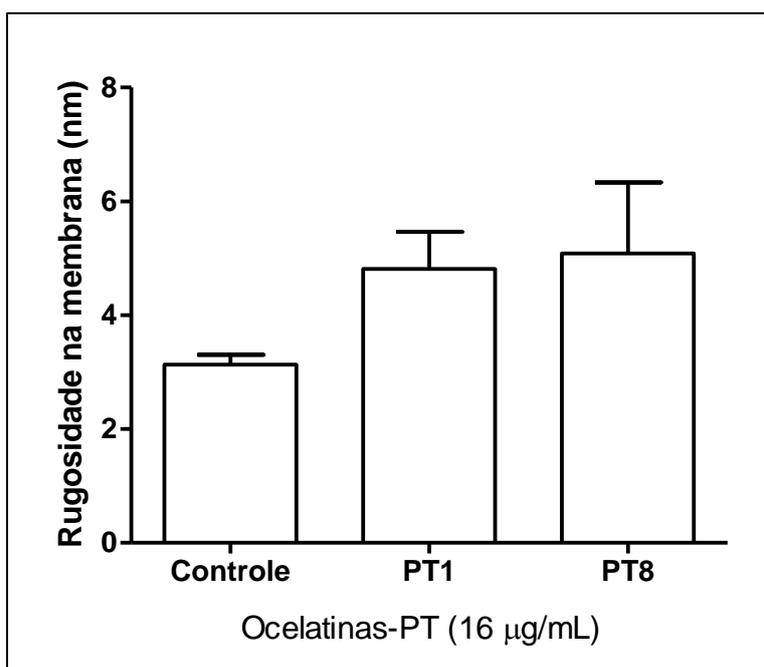


Figura 6. Rugosidade em nm medida por microscopia de força atômica na superfície das membranas celulares de formas promastigotas de *L. infantum*. O resultado das comparações entre as medidas não mostrou diferenças entre os grupos (Teste t-pareado; $p > 0,05$). Estão mostradas as médias e os desvios padrão.

4.5. Determinação da concentração inibitória das ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de amastigotas de *L. amazonensis*

Nossos resultados mostraram que, na comparação com o controle, as diferentes concentrações da ocelatina-PT4 e PT6 reduziram o percentual de viabilidade das formas amastigotas de *L. amazonensis*. A diminuição na ocelatina-PT4 ocorreu nas concentrações de 16 a 512 $\mu\text{g/mL}$, já na ocelatina-PT6 a diminuição ocorreu nas concentrações de 32 a 512 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6 e Anexo I).

Tabela 6. Percentual de redução do MTT por formas amastigotas de *L. amazonensis* incubadas com diferentes concentrações dos peptídeos

Ocelatinas	Concentrações dos peptídeos (µg/mL) (% Média ± DP)											IC50 estimado µg/mL
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
PT4	99,0 ± 0,1	118,0 ± 11,8	115,2 ± 10,1	106,9 ± 6,7	98,6 ± 3,0	79,9 ± 4,9	76,2 ± 7,7	73,3 ± 7,7	74,4 ± 7,2	73,0 ± 6,1	71,5 ± 7,4	>512
PT6	99,0 ± 0,1	103,0 ± 5,6	103,2 ± 1,3	123,3 ± 3,7	121,9 ± 0,2	121,2 ± 12,8	83,8 ± 10,1	71,3 ± 4,8	73,0 ± 7,7	68,0 ± 6,8	67,5 ± 6,7	>512

4.6. Determinação da concentração citotóxica das ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos J774

Nos ensaios de citotoxicidade, não houve redução na viabilidade dos macrófagos J774 quando incubadas com as diferentes concentrações dos peptídeos. Nossos resultados mostraram ainda que houve um possível aumento da atividade celular com os dois peptídeos testados em todas as concentrações (Tabela 7 e Anexo I).

Tabela 7. Percentual de redução do MTT por macrófagos J774 incubados com diferentes concentrações dos peptídeos

Ocelatinas	Concentrações dos peptídeos (µg/mL) (% Média ± DP)											CC50 estimado µg/mL
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
PT4	99,0 ± 0,1	132,3 ± 27,1	133,7 ± 32,4	146,8 ± 38,5	124,6 ± 18,1	116,7 ± 33,3	128,9 ± 19,3	132,7 ± 33,7	126,9 ± 29,5	124,0 ± 23,1	124,4 ± 36,3	>512
PT6	99,0 ± 0,1	143,1 ± 23,0	126,6 ± 39,7	133,4 ± 31,3	145,1 ± 34,0	135,4 ± 32,1	140,9 ± 35,2	121,5 ± 29,9	131,3 ± 29,7	126,6 ± 33,1	124,0 ± 26,6	>512

4.7. Determinação do efeito microbicida das ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*

Testamos o efeito microbicida nos cultivos de J774 infectados com *L. amazonensis* com as diferentes concentrações dos peptídeos (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ou 256 µg/mL) e os resultados mostraram que houve diminuição de forma dose-dependente do índice de infecção na Ocelatina-PT4 ($p=0,017$) e na Ocelatina-PT6 ($p=0,03$). O mesmo pode ser observado com o percentual de macrófagos infectados nas Ocelatinas-PT4 ($p=0,05$) e PT6 ($p=0,019$). A média de leishmânias endocitadas teve diminuição conforme o aumento da concentração na PT4 ($p=0,0002$), já na PT6 a diminuição não foi significativa ($p=0,13$) (Figura 7 e 8).

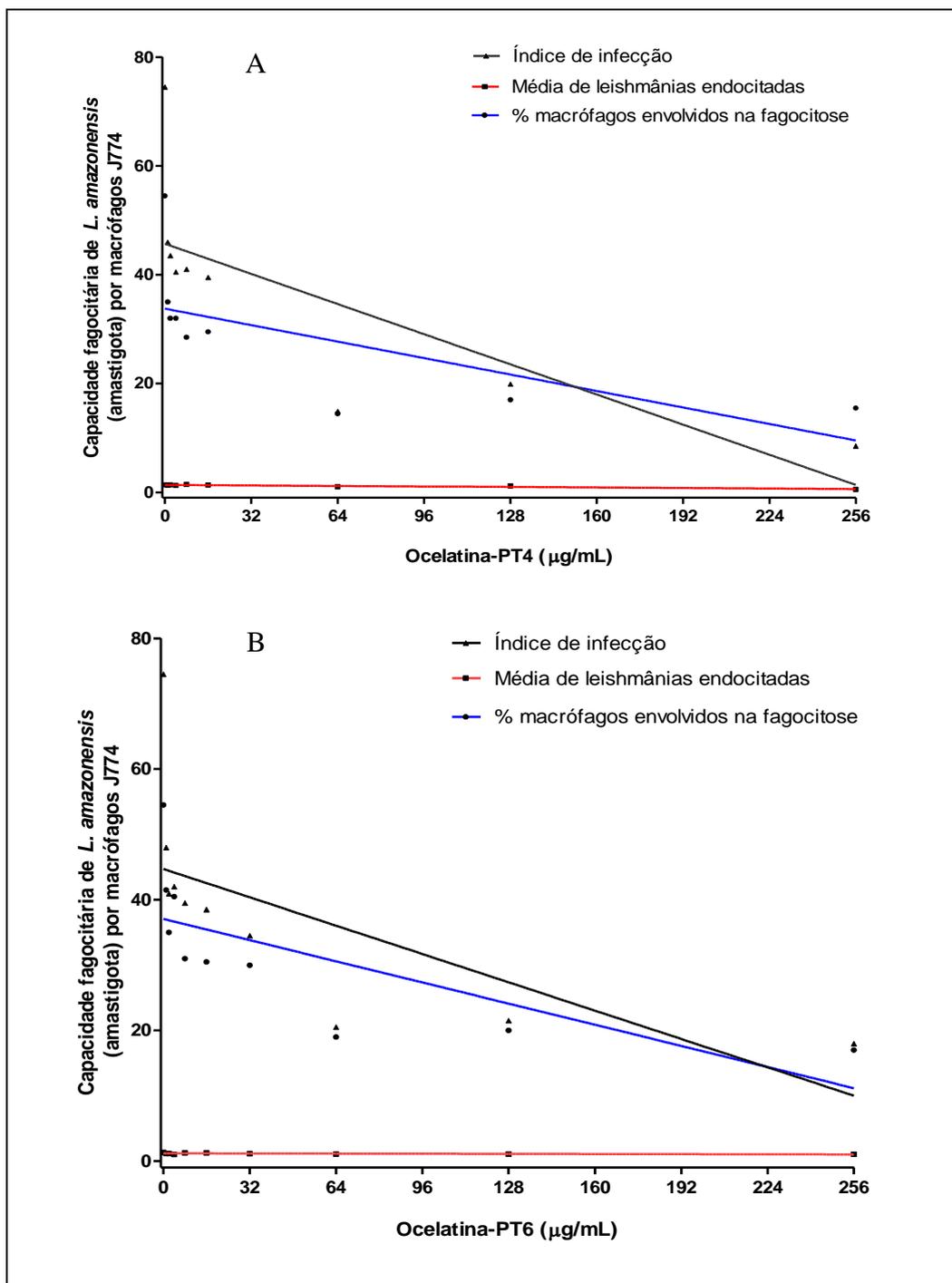


Figura 7. Efeito microbicida das ocelatina-PT4 e -PT6 em macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis*. Em A, percentual de macrófagos infectados (azul), média de leishmanias endocitadas (vermelho) e índice de infecção (preto) dos macrófagos tratados com Ocelatina-PT4; Em (B) percentual de macrófagos infectados, média de leishmanias endocitadas e índice de infecção dos macrófagos tratados com Ocelatina-PT6. Estão mostradas as regressões lineares.

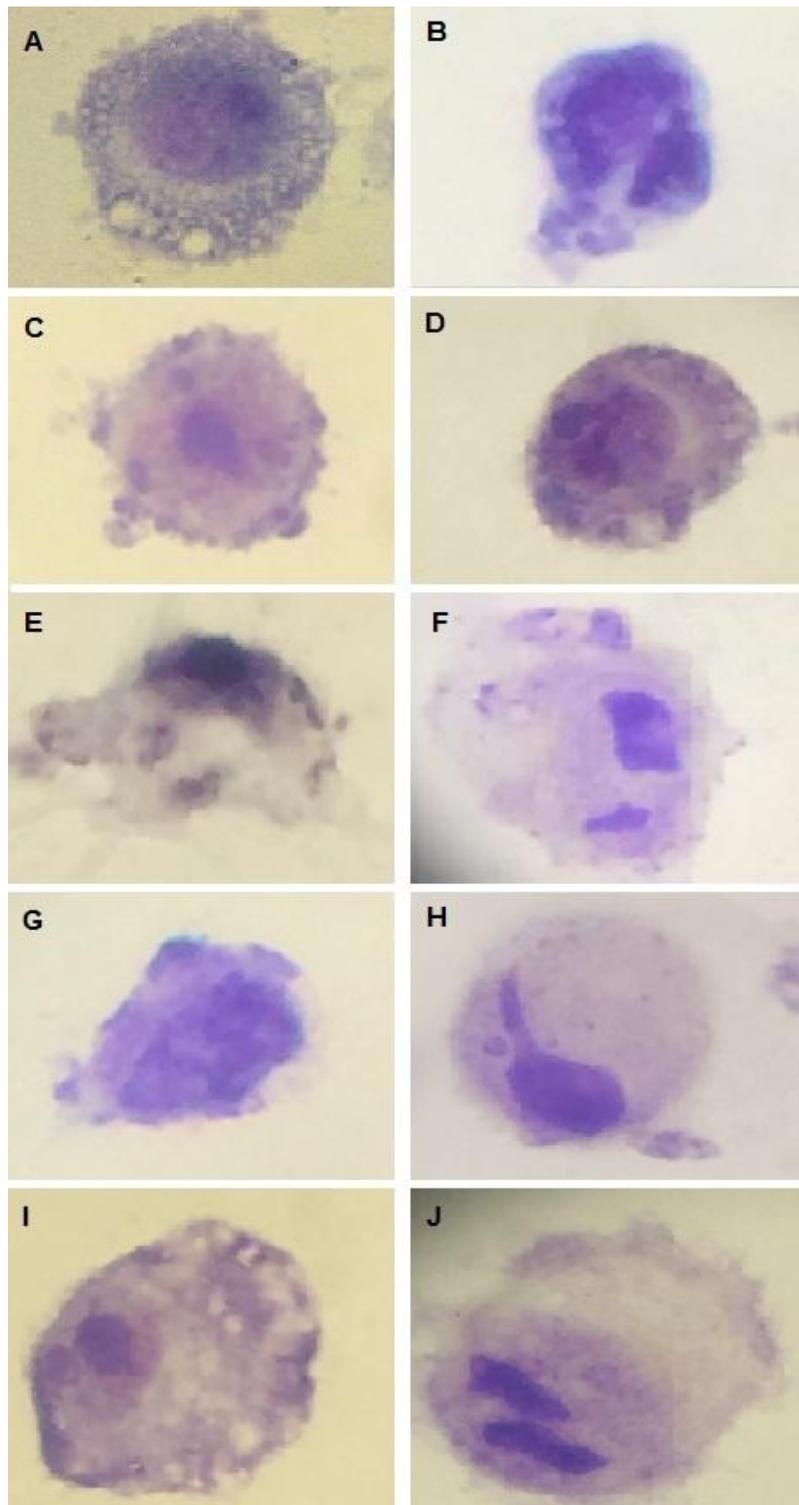


Figura 8. Imagem de microscopia óptica de macrófagos J774. Em (A), macrófago J774; Em (B) Macrófago J774 infectado com *L. amazonensis*; Mácrofagos infectados e tratados com Oc-PT4 com 2 (C), 8 (E), 16 (G) e 64 (I) µg/mL; Macrófagos infectados e tratadom com Oc-PT6 com 2 (D), 8 (F), 16 (H) e 64 (J) µg/mL. Coloração com Giemsa e visualizados em aumento de 1000x.

4.8. Influência das Ocelatinas-PT4 e PT6 na aderência dos macrófagos J774

Para avaliar a aderência dos macrófagos J774 tratados com as diferentes concentrações das Ocelatinas-PT4 e PT6, foi determinado o percentual de recuperação de macrófagos aderidos em 10% da área da lamínula.

Os resultados indicaram, na comparação com o controle diminuição na aderência celular em todas as concentrações para os dois peptídeos, contudo não houve diminuição dose-dependente para ambos, conforme analisado pela regressão linear ($p > 0,05$) (Figura 9).

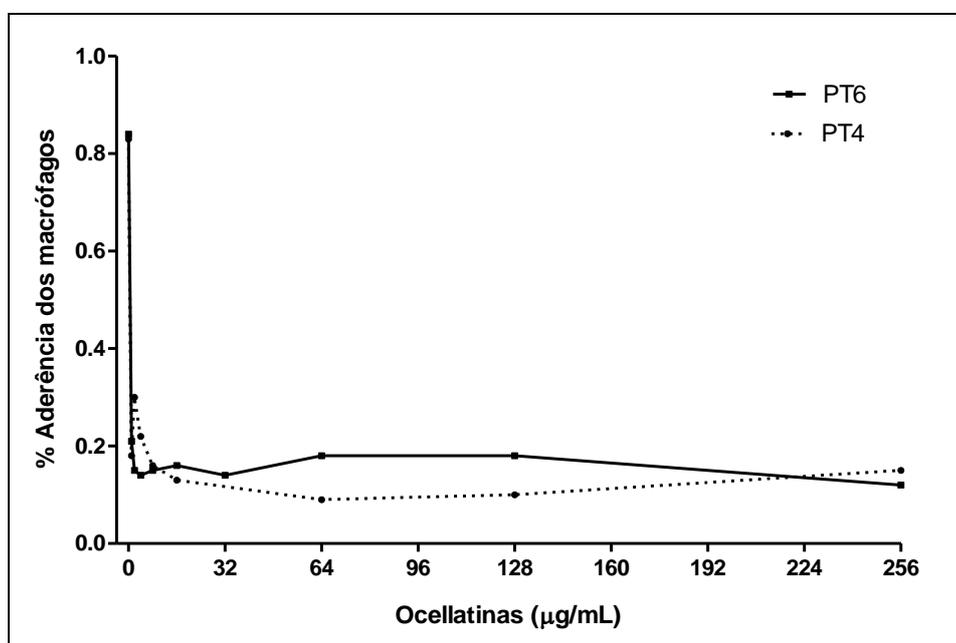


Figura 9. Percentual de recuperação de macrófagos J774 aderidos em lamínulas. Os resultados indicaram diminuição na aderência celular em todas as concentrações para os dois peptídeos, mas não de forma dose-dependente (regressão linear; $p > 0,05$).

4.9. Avaliação por qPCR do efeito leishmanicida das Ocelatinas-PT4 e PT6 em macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis* e tratados ou não com as Ocelatinas-PT4 e PT6 foram avaliados para a redução da carga parasitária utilizando o método de PCR quantitativo (qPCR).

Os resultados mostraram que todas as concentrações das Ocelatinas-PT4 e PT6 reduziram os parasitos nos macrófagos em comparação com o controle infectado (0,017 ng/μL). As diferentes concentrações de PT4 (2 = 0,013 ng/μL; 8 = 0,011 ng/μL; 16 = 0,010 ng/μL; 64 = 0,003 μg/mL) ou PT6 (2 = 0,012 ng/μL; 8 = 0,013 ng/μL; 16 = 0,010 ng/μL; 64 = 0,000 μg/mL) reduziram a carga parasitária, conforme mostrado na figura 10.

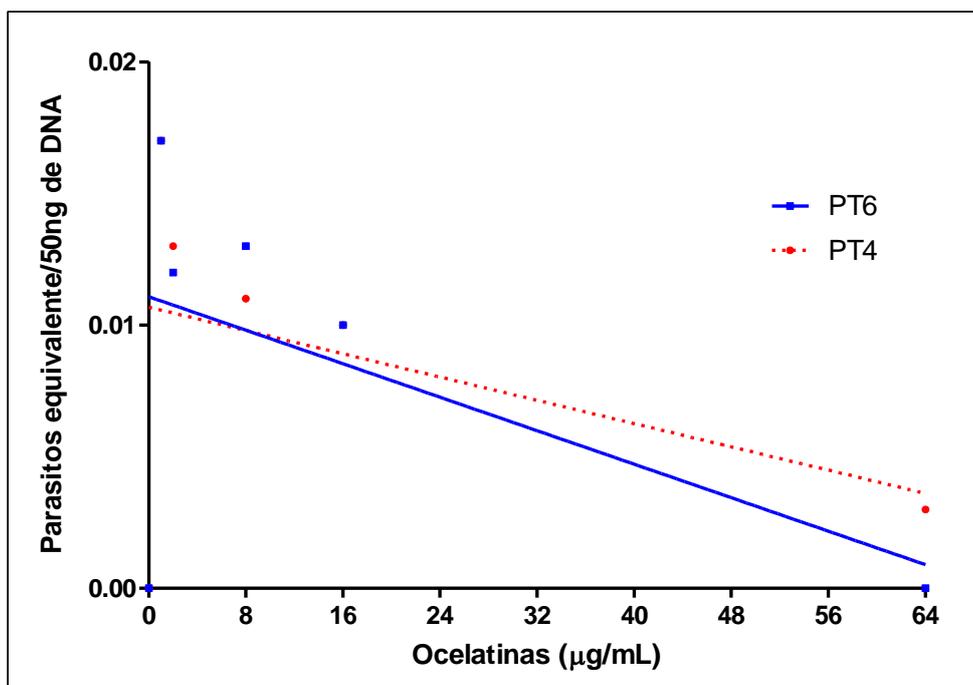


Figura 10. Quantificação de leishmânia avaliada por qPCR. Estão mostrados os percentuais individuais e as regressões lineares.

4.10. Influência das Ocelatinas-PT4 e PT6 na viabilidade de macrófagos J774

Para avaliarmos se as Ocelatinas-PT4 e PT6 podem influenciar na viabilidade celular de macrófagos J774 foi feita a incubação dessas células na presença do corante supravital nigrosina.

Os resultados mostraram pela regressão linear que as diferentes concentrações das ocelatinas PT4 ou PT6 (2, 8, 16 ou 64 μg/mL) não afetaram a viabilidade dos macrófagos J774 ($p > 0,05$) (Figura 11).

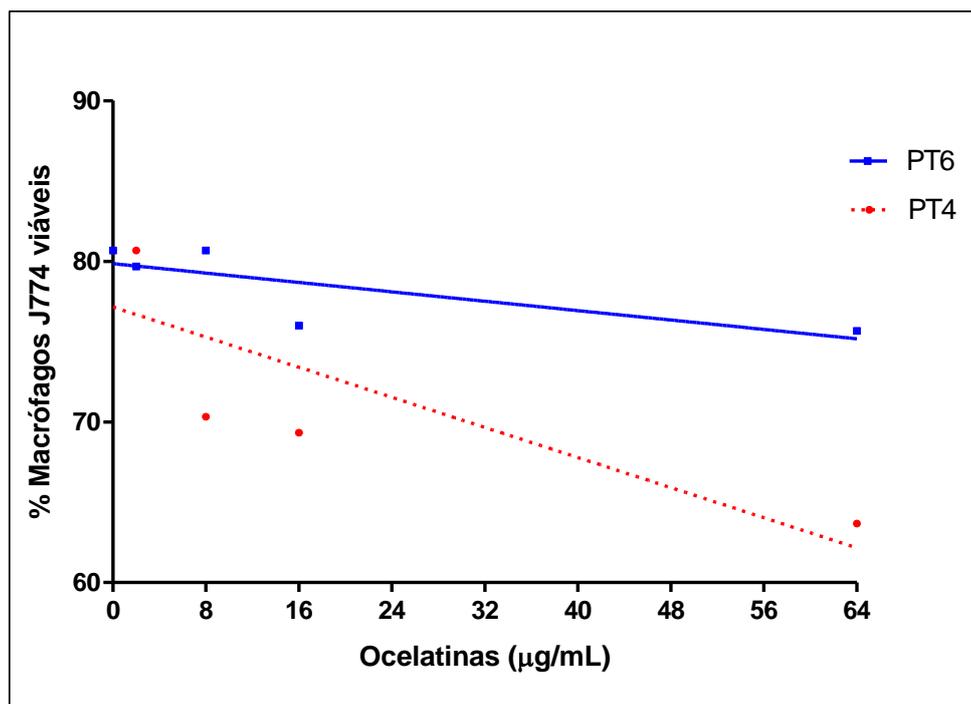


Figura 11. Percentual de macrófagos J774 viáveis incubados com diferentes concentrações dos peptídeos. Estão mostrados os percentuais individuais e as regressões lineares.

4.11. Produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos J774 tratados ou não com Ocelatinas-PT4 e PT6

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos macrófagos J774 infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações das Ocelatinas PT4 e PT6 foram realizadas marcações com sonda fluorescente (DFCDA) e análises por citometria de fluxo.

Os resultados mostraram que todas as concentrações da Ocelatina-PT4 (2, 8, 16 ou 64 µg/mL) aumentaram a produção de EROs (teste t pareado; $p < 0,05$) por macrófagos J774 não infectados; a ocelatina-PT6 não afetou a produção de EROs (Teste t pareado; $p > 0,05$) (Tabela 8, figura 12).

O tratamento dos macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* com diferentes concentrações das ocelatinas-PT4 mostrou que as maiores concentrações (16 ou 64 µg/mL) diminuiriam a produção de EROs, enquanto que as menores não afetaram essa produção na comparação com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$), no entanto, a regressão linear

mostrou redução dose-dependente na produção de EROs ($p = 0,004$) (Figuras 12 A1 e A2; 13).

A incubação de macrófagos infectados com o peptídeo PT6 mostrou que em todas as concentrações (2, 8, 16 ou 64 $\mu\text{g/mL}$) houve redução na produção de EROs (Teste t pareado; $p < 0,05$) e de forma dose-dependente como mostrou a análise pela regressão linear ($p = 0,022$) (Figuras 12 B1 e B2; 13).

Tabela 8. produção de EROs por macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis*, tratados ou não com diferentes concentrações das ocelatinas PT4 ou PT6.

Ocelatinas ($\mu\text{g/mL}$)	Macrófagos não infectados					Macrófagos infectados				
	0	2	8	16	64	0	2	8	16	64
	(Média \pm DP)					(Média \pm DP)				
PT4	250,2	274,8*	294,5*	327,0*	271,8	1465,0*	1327,0*	1264,0*	1276,0*	241,7
	\pm 14,8	\pm 15,2	\pm 55,1	\pm 22,5	\pm 106,6	\pm 113,2	\pm 199,8	\pm 183,5	\pm 82,0	\pm 83,1
PT6	250,2	288,2	332,0	334,0	309,5	1465,0*	1334,0*	1047,0*	1005,0*	595,8*
	\pm 14,8	\pm 51,4	\pm 94,8	\pm 81,7	\pm 61,7	\pm 113,2	\pm 101,8	\pm 188,4	\pm 96,1	\pm 76,8

(*) Valores que diferem do controle (macrófagos não infectados)

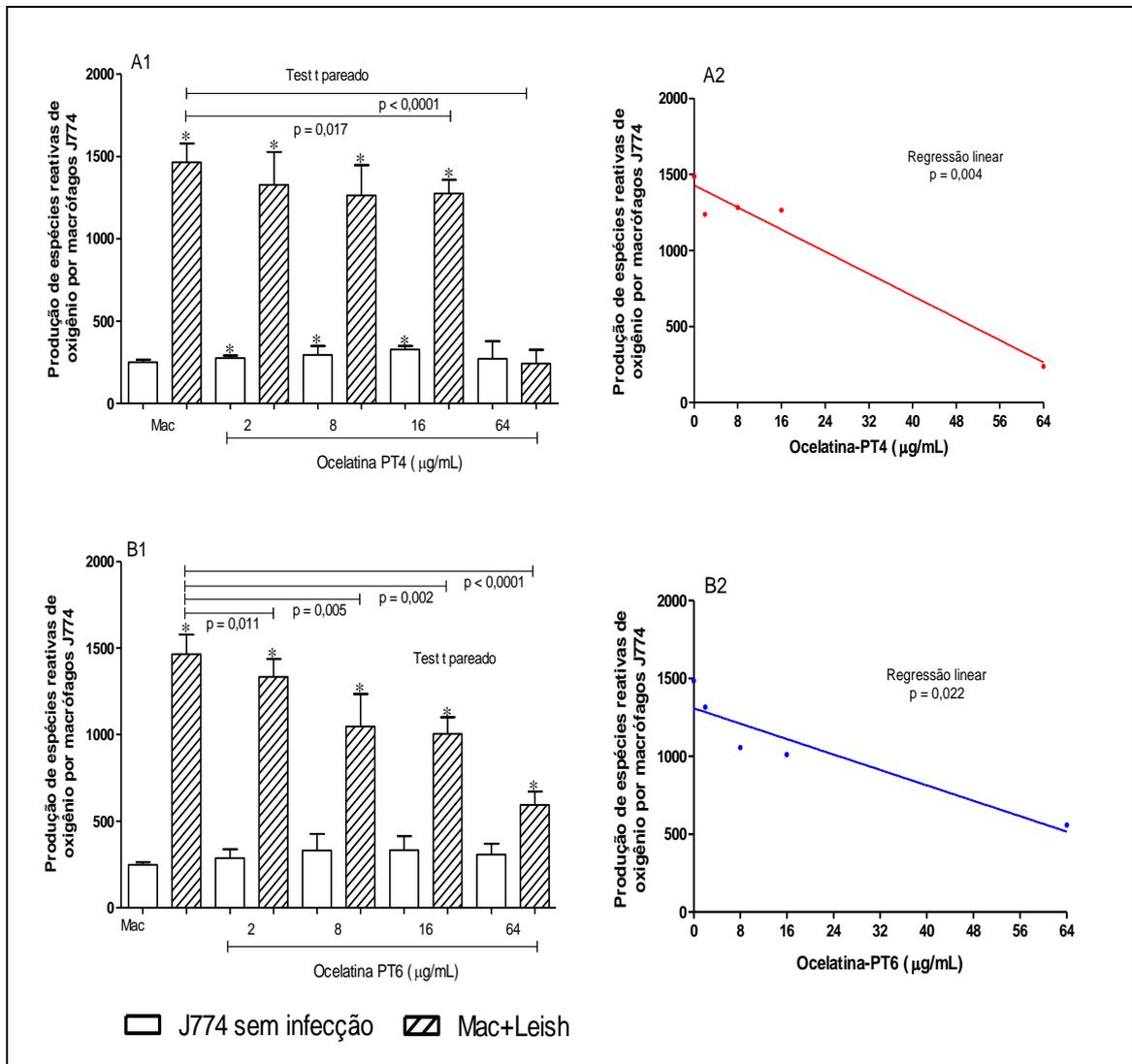


Figura 12. Produção de EROs por macrófagos J774 infectados ou não e tratados ou não com as Ocelatinas-PT4 e PT6. Em A1 a produção de EROs por macrófagos J774 infectados ou não incubados com a PT4; Em A2 a regressão linear dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com a PT4;-Em B1 produção de EROs por macrófagos infectados ou não e tratados ou não com a PT6; Em B2 a regressão linear dos macrófagos infectados e tratados com a PT6. Os resultados mostram que para a PT4 não houve aumento da produção de EROs nos macrófagos infectados e não infectados na concentração de 64 em relação ao controle (A1), e que houve redução da produção de forma dose-dependente pela regressão linear (A2). Nenhuma das concentrações da PT6 aumentou a produção de EROs nos macrófagos tratados (B1), nos macrófagos infectados e tratados houve redução dose-dependente em relação aos infectados não tratados (B2). Estão mostradas as médias e desvio padrão (A1 e B1) e a regressão linear (A2 e B2).

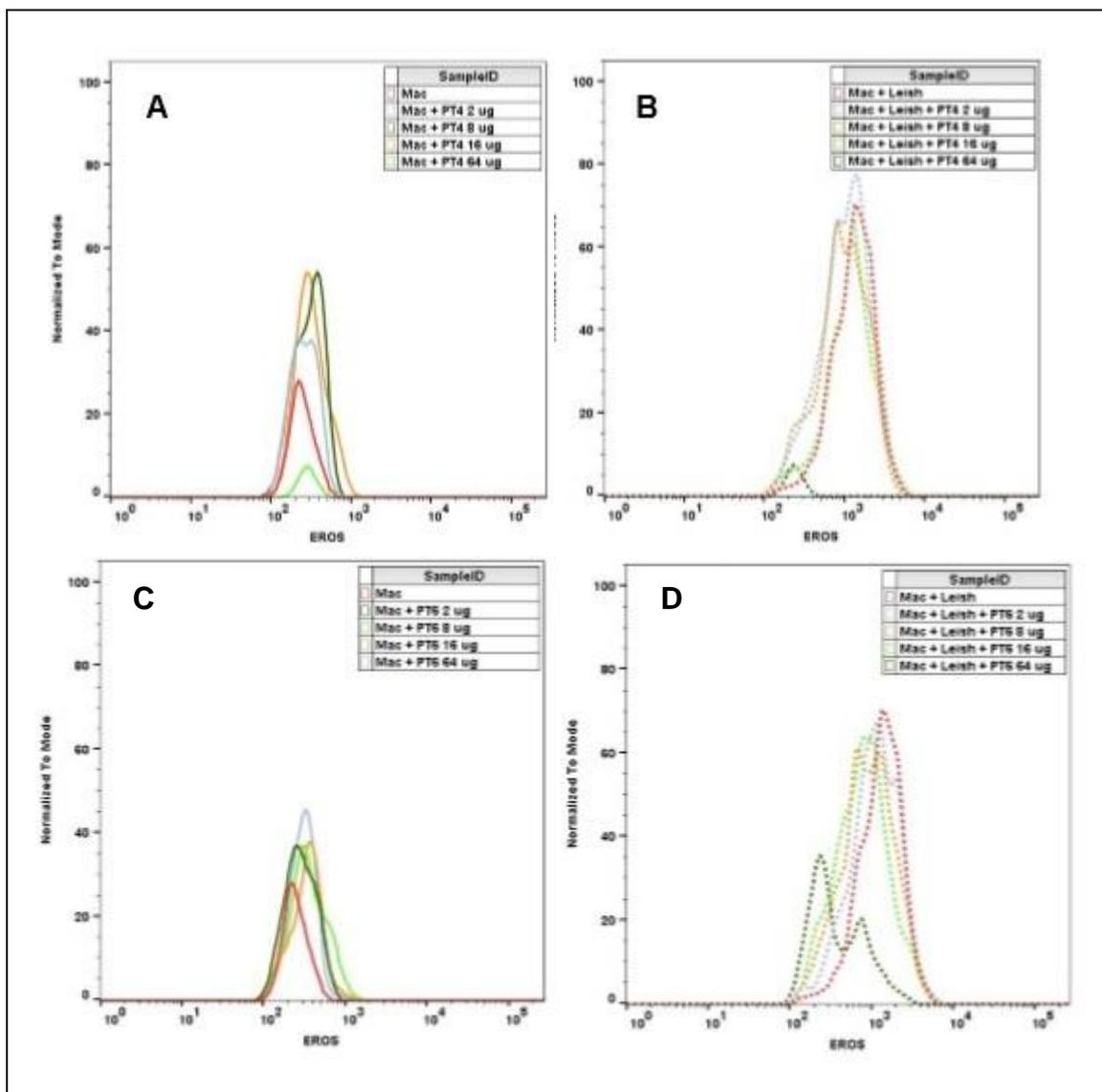


Figura 13. Produção de EROs por macrófagos J774 infectados ou não e tratados ou não com a Ocelatinas-PT4 e PT6. Em A, macrófagos tratados ou não com a PT4; Em B, macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratados ou não com a PT4; Em C, macrófagos tratados ou não com a PT6; Em D, macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratados ou não com a PT6. Os gráficos foram feitos usando a partir da intensidade média de fluorescência através do software FlowJo.

4.12. Influência das Ocelatinas-PT4 e PT6 na produção de óxido nítrico em macrófagos J774

A avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos J774 infectados ou não com *L. amazonensis*, tratados ou não com 2, 8, 16 ou 64 µg/mL de Ocelatinas-PT4 e PT6 foi feita nos sobrenadantes dos cultivos utilizando o reagente de Greiss.

Os resultados mostraram que ambas as Ocelatinas-PT4 ou PT6 aumentaram, na comparação com o controle basal, a produção de nitrito nos macrófagos infectados ou não infectados e tratados com 64 µg/mL ($p < 0,05$); também, 8 µg/mL da ocelatina PT6 aumentou a produção de nitrito em macrófagos infectados ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que a produção de nitrito por macrófagos infectados não foi alterada pelo tratamento com as diferentes concentrações dos dois peptídeos PT4 ou PT6 ($p > 0,05$) (Tabela 9, figura 14).

Tabela 9. produção de nitrito por macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis*, tratados ou não com diferentes concentrações das ocelatinas PT4 ou PT6.

Ocelatinas (µg/mL)	Macrófagos não infectados						Macrófagos infectados				
	Mac	LPS	2	8	16	64	Leish	2	8	16	64
	(Média±DP)						(Média±DP)				
PT4	5,8	6,4*	5,8	5,6	6,1	6,5*	6,7*	6,1	5,9	6,6	8,1*
	± 0,4	± 0,6	± 0,8	± 0,6	± 0,2	± 0,5	± 1,1	± 0,4	± 0,7	± 1,0	± 2,3
PT6	5,8	6,4*	5,5	5,6	5,5	6,8*	6,7*	6,2	6,3*	6,3	7,6*
	± 0,4	± 0,6	± 0,3	± 0,4	± 0,5	± 0,6	± 1,1	± 0,3	± 0,7	± 0,5	± 1,3

(*) Valores que diferem do controle (macrófagos não infectados)

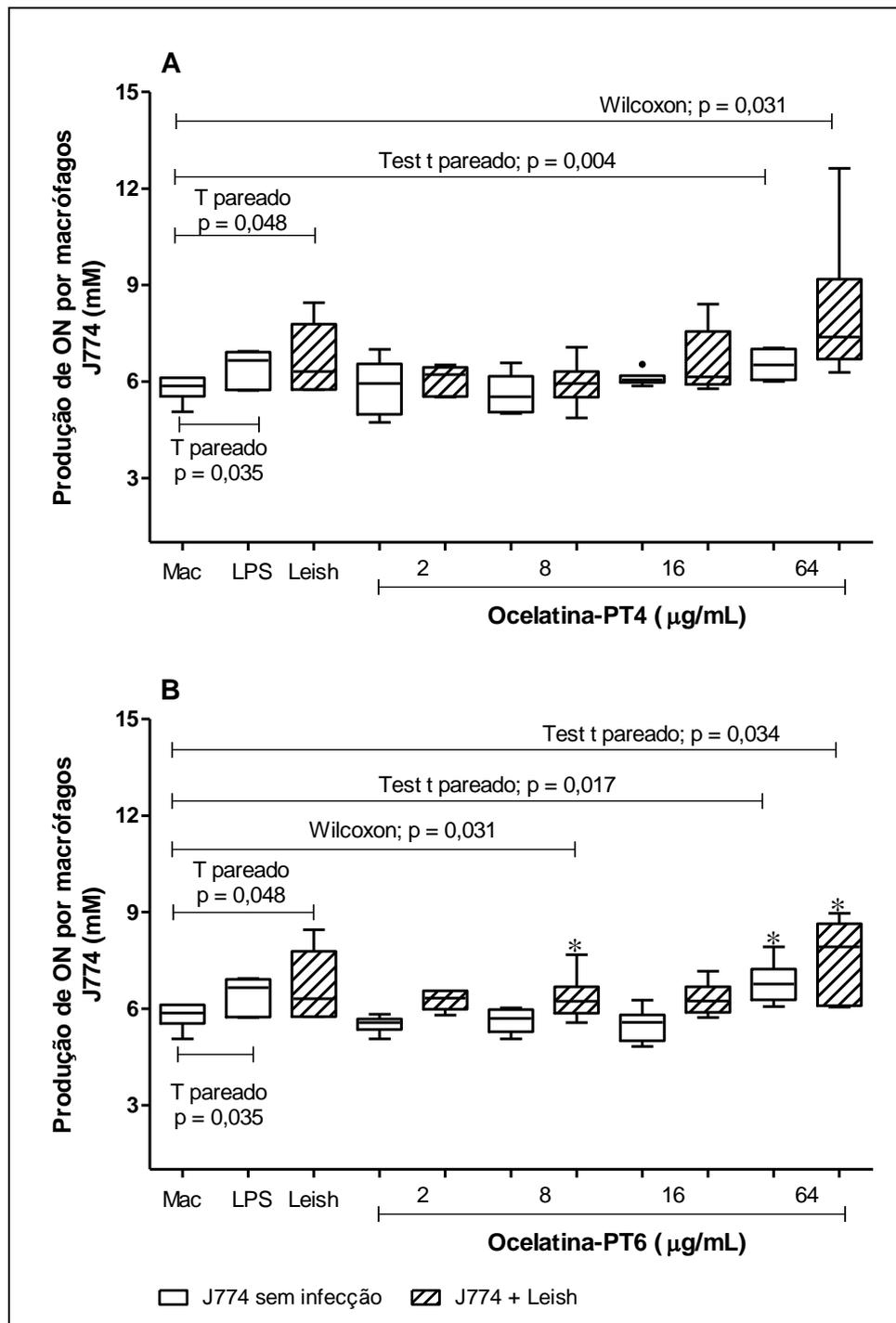


Figura 14. Produção de óxido nítrico por macrófagos J774 incubados ou não com as diferentes concentrações (2, 8, 16 ou 64 $\mu\text{g/mL}$) das Ocelatinas-PT4 (A) ou PT6 (B). Os resultados mostraram que 64 $\mu\text{g/mL}$ das ocelatinas PT4 ou PT6 aumentaram a produção de ON com ou sem a infecção, o mesmo foi observado com 8 $\mu\text{g/mL}$ da ocelatina PT6. A produção de ON por macrófagos infectados não foi afetada com as diferentes concentrações de PT4 ou PT6. Estão representadas as medianas, quartis e valores próximos e mínimos.

4.13. Produção de corpúsculo lipídico por macrófagos J774 infectados e tratados com Ocelatinas-PT4 e PT6

A formação de corpúsculos lipídicos (CL) foi avaliada em macrófagos J774 infectados ou não com *L. amazonensis*, tratados ou não com as diferentes concentrações de Ocelatinas PT4 ou PT6 pelo método de Oil Red O.

Nossos resultados mostraram que com a Ocelatina-PT4 houve aumento do índice corpuscular, média de corpúsculos lipídicos e percentual de macrófagos com corpúsculos na comparação com o controle basal, sendo a concentração de 16 µg/mL com o maior índice corpuscular, seguido da concentração de 8 µg/mL, já na comparação com os macrófagos infectados e não tratados, pode-se observar uma diminuição de corpúsculos lipídicos em todas as concentrações, principalmente nas de 2 e 64 µg/mL.

Na Ocelatina-PT6 pode-se observar um aumento do índice corpuscular, média de corpúsculos lipídicos e percentual de macrófagos com corpúsculos nos macrófagos infectados em relação ao controle basal, principalmente na concentração de 2 µg/mL, que foi observado o maior índice corpuscular entre todas as concentrações. Nos macrófagos tratados houve diminuição de CL em todas as concentrações em comparação com os macrófagos infectados e não tratados.

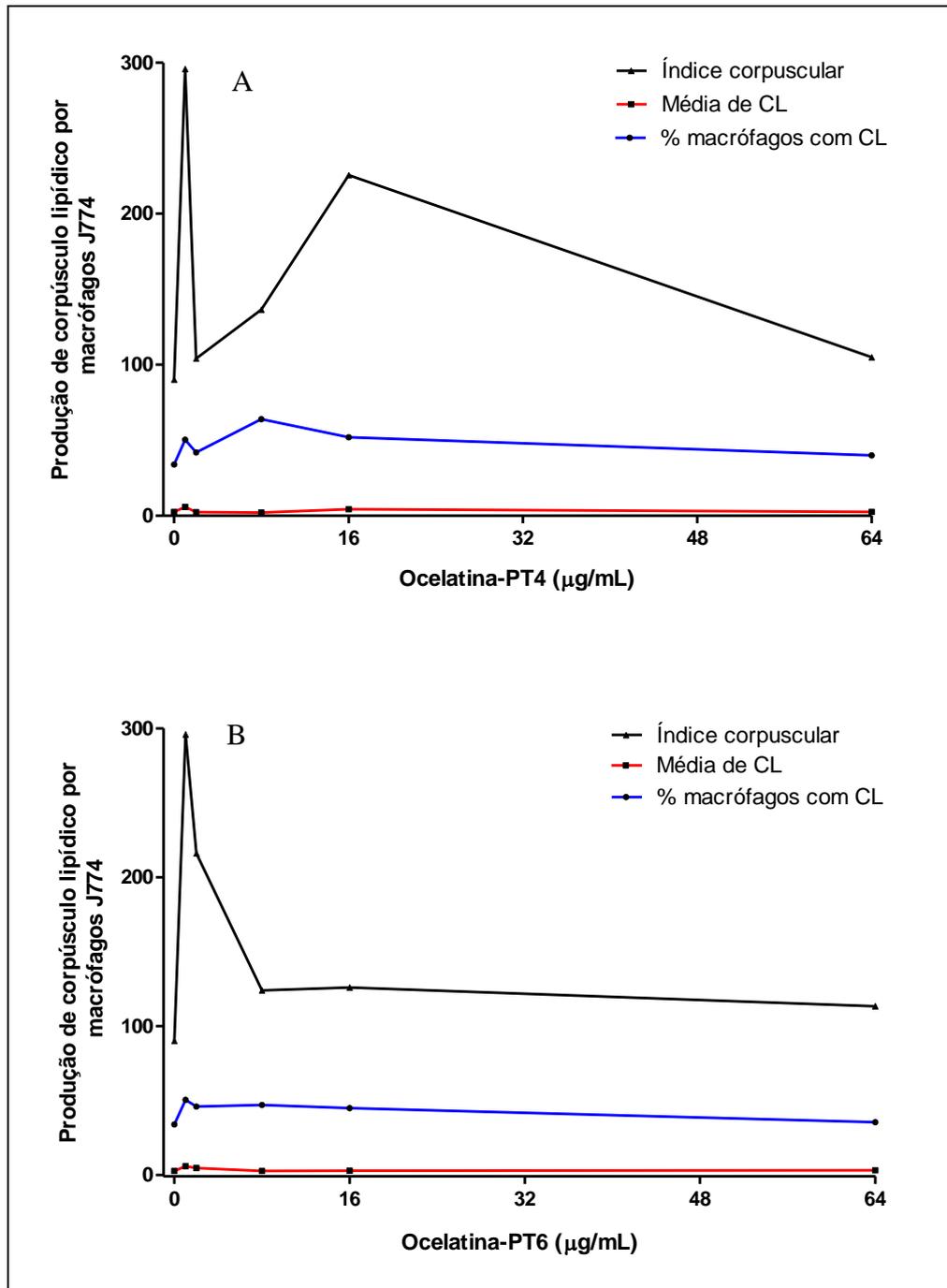


Figura 15. Efeito das Ocelatinas PT4 ou PT6 na produção de corpúsculos lipídicos (CL) em macrófagos J774 infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A, índice corpuscular, média de CL e percentual de macrófagos com CL dos macrófagos tratados com Ocelatina-PT4; em B, índice corpuscular, média de CL e percentual de macrófagos com CL dos macrófagos tratados com Ocelatina-PT6. Estão mostradas as regressões lineares.

4.14. Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo

Avaliamos também a presença de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados ou não, tratados ou não com as Ocelatinas-PT4 e -PT6 através de citometria de fluxo com a sonda BODIPY (Sigma).

Os resultados mostraram que os macrófagos tratados com a Ocelatina-PT4, quando comparados com o controle basal, tiveram aumento na produção de fluorescência, indicando maior número de CL ($p < 0,05$), em relação aos macrófagos infectados todas as concentrações testadas tiveram menor produção de CL (Tabela 10; Figura 16 e 17).

Na Ocelatina-PT6 quando comparado às células não infectadas houve maior produção de corpúsculos lipídicos no controle infectado, assim como nas células tratadas com 8 e 64 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 16 e 17).

Quando comparado aos macrófagos infectados o tratamento com diferentes (2, 8, 16 ou 64 $\mu\text{g/mL}$) concentrações dos peptídeos PT4 ou PT6 revelou uma menor produção de corpúsculos lipídicos nos macrófagos infectados ($p < 0,05$).

Tabela 10. produção de corpúsculos lipídicos por macrófagos infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis*, tratados ou não com diferentes concentrações das ocelatinas PT4 ou PT6.

Ocelatinas ($\mu\text{g/mL}$)	Macrófagos infectados					
	Mac	Leish	2	8	16	64
	(Média \pm DP)					
PT4	26,0	44,9*	38,3*	39,0*	37,2*	35,1*
	\pm 4,3	\pm 7,8	\pm 6,9	\pm 7,1	\pm 2,1	\pm 6,7
PT6	26,0	44,9*	28,0	31,5*	31,1	30,7*
	\pm 4,3	\pm 7,8	\pm 2,9	\pm 4,1	\pm 1,0	\pm 1,6

(*) Valores que diferem do controle (macrófagos não infectados). Em cinza estão destacados os valores que diferem do controle infectado

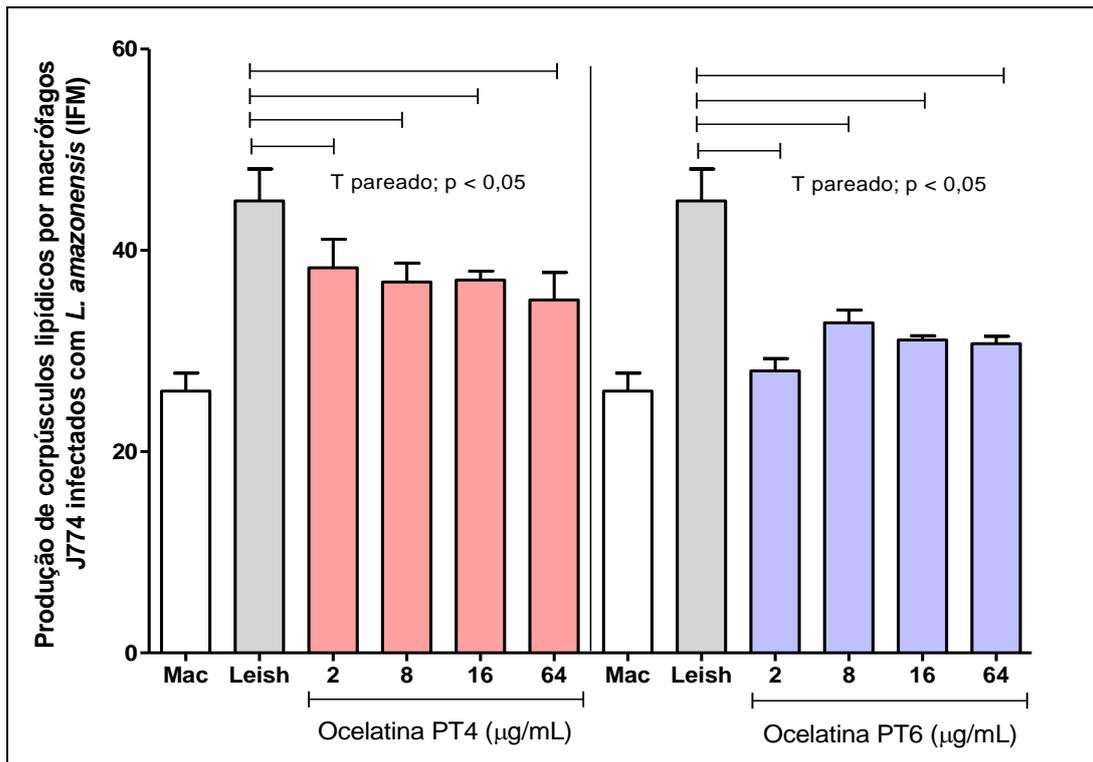


Figura 16. Produção de corpúsculos lipídicos (CL) avaliados pela sonda BODIPY. Macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis* ou não, e tratados ou não com as Ocelatinas-PT4 (Rosa) e PT6 (Azul). Todas as concentrações da PT4 produziram mais CL que os macrófagos, enquanto na PT6 o aumento foi visto apenas em 8 e 64 µg/mL. Quando comparadas aos macrófagos infectados, todas as concentrações dos dois peptídeos tiveram menor produção de CL.

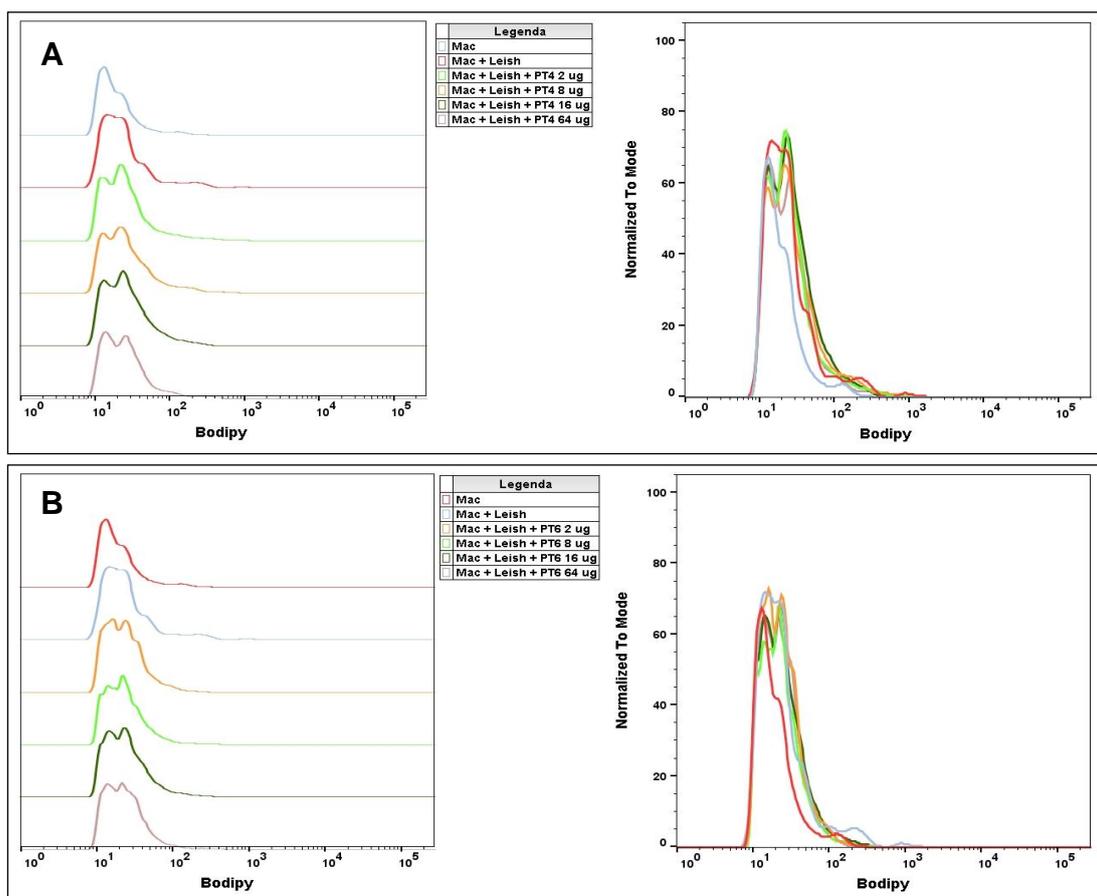


Figura 17. Produção de CL pela sonda BODIPY. Em (A), a intensidade de fluorescência média (IFM) dos macrófagos infectados ou não e tratados com as Ocelatinas-PT4; Em (B), a intensidade de fluorescência média (IFM) dos macrófagos infectados ou não e tratados com as Ocelatinas-PT6.

5. DISCUSSÃO

A descoberta de novas substâncias terapêuticas para a leishmaniose é necessária, pois os de de escolha para o tratamento da leishmaniose apresentam resistência em algumas espécies de *Leishmania* e toxicidade aos indivíduos como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, entre outros (Rodrigues et al. 2006; Choi et al. 2012; Souza et al. 2018).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgiram como uma nova proposta de tratamento para a Leishmaniose, visto que os parasitos estão adquirindo resistência aos medicamentos atuais. Os PAMs catiônicos podem agir diretamente na membrana celular dos microorganismos por meio de seus componentes de membrana aniônicos e diferenças de potencial transmembrana ou podem também agir indiretamente pela interação com as células do sistema imune inato do hospedeiro, modulando as vias de sinalização ou até mesmo causando apoptose (García et al. 2017); tem sido descrito que a probabilidade do microrganismo desenvolver resistência com essa moléculas é reduzida quando comparado a antibióticos (Marani et al. 2015).

Para analisar o efeito das Ocelatinas-PT foram utilizados cultivos flagelados ou não de *Leishmania* e de macrófagos derivados da medula óssea ou J774. Na primeira fase do estudo identificou-se em cultivos promastigotas *L. infantum* o índice de seletividade das ocelatinas-PT de 1 a 8 para selecionar os compostos de melhor atividade para o estudo seguinte. Assim, na segunda fase avaliou-se, em cultivos infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis*, o efeito microbicida das ocelatinas PT4 ou PT6, bem como sua influência na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na formação dos corpúsculos lipídicos.

Nossos resultados mostraram que as ocelatinas-PT analisadas, com exceção da ocelatina-PT2, possuem efeito leishmanicida em cultivos promastigotas de *L. infantum* nas concentrações de 32 a 128 µg/mL. Esse efeito microbicida também foi observado em cultivos de bactérias *E. coli* para as Ocelatinas-PT1 a PT8; similarmente, o peptídeo PT2 não foi efetivo contra essas bactérias (Marani et al. 2015). O potencial dos peptídeos antimicrobianos tem sido amplamente observado, sobretudo, pelo seu efeito nas membranas celulares dos microorganismos. Como exemplos disso, Zapa et al. (2009) observaram lise total das formas promastigotas de *L. infantum* quando incubaram

por 45 minutos com Dermaseptina-01 (peptídeo de *Phyllomedusa azurea*). O peptídeo CM11 inibiu de forma dose-dependente o crescimento de formas amastigotas de *L. major* (CI₅₀ = 9,8 µM) (Khalili et al. 2018) e a incubação do peptídeo BLIS 16 por 72 horas inibiu 100% das formas promastigotas de *L. infantum* (CI₅₀ = 2,9 µg/mL) (Barcelos 2018).

Os peptídeos antimicrobianos possuem carga positiva (catiônicos), o que lhes permitem interagir com a membrana da leishmânia que é aniônica e assim, alteram a fonte de energia do parasito e aumentam o fluxo de água e de íons, resultando em degeneração hidrópica e destruição celular (Shai 2001). Embora o mecanismo de interação dos peptídeos antimicrobianos seja variado e não totalmente esclarecido, acredita-se que eles atuem inserindo-se entre os fosfolípidos das membranas dos micro-organismos, causando aumento da permeabilidade pelo influxo de íons, que pode resultar na desestruturação total e formação de micelas à partir da membrana rompida (Shai 2001; Brogden 2005).

Nossos resultados utilizando as microscopias confirmam as alterações causadas pelos peptídeos, visto que foram observadas alterações morfológicas das formas promastigotas de *L. infantum* após tratamento com a Ocelatina-PT1 e a Ocelatina-PT8. Em ambas as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e força atômica (MFA), foi possível observar mudanças mais localizadas nas promastigotas após tratamento com as Ocelatinas-PT. No MEV observamos na menor concentração erupções vesiculares e na maior, vesículas e grandes orifícios nas membranas, alguns passando profundamente o interior da célula. No MFA foi possível ver rugas visíveis na membrana, grandes protuberâncias semelhantes a bolhas. Parece provável que estes sejam o resultado da micelização de lipídios de membrana também observada em concentrações mais baixas, e claramente representa uma completa destruição da estrutura da membrana principalmente na concentração mais alta do peptídeo, justificando a diminuição da viabilidade das promastigotas com o aumento das concentrações das Ocelatinas-PT. Eaton et al. (2014), também avaliou a morfologia por MFA de promastigotas de *L. infantum* tratadas com Dermaseptina-01 e observou considerável rugosidade da membrana, encurtamento e arredondamento das células. Após o tratamento de promastigotas de *L. infantum* com o peptídeo BLIS

P16, foi possível observar em imagens de MEV, rupturas da membrana celular e fratura no flagelo (Bacelos 2018).

Quando as Ocelatinas-PT de 1 a 8 foram incubadas com formas amastigotas de *L. infantum*, apenas as Ocelatinas-PT4 e PT6 inibiram o crescimento dos parasitos.

A forma promastigota do gênero *Leishmania* apresenta várias classes de macromoléculas como o Glicosilfosfatidilinositol (GPI), que funciona como ponte para outras glicoproteínas como a proteína de superfície de promastigota (PSP), lipofosfoglicano (LPG ou LFG), glycoinositole-fosfolipídeos (GIPLs) e proteofosfoglicano (PPG ou PFG). O LPG é encontrado em toda a superfície das promastigotas incluindo o flagelo, aumenta a espessura da membrana do protozoário protegendo-o do sistema do complemento do hospedeiro. Nas amastigotas a quantidade de moléculas de LPG ou PPG são baixas ou até mesmo inexistentes (Tachado et al. 1999; Sacks & Kamhawi 2001; Barron & Turco 2006; Scott 2011). Um estudo feito por Eggimann et al. (2015), mostrou que promastigotas modificadas de *L. mexicana* sem a presença de PPG na membrana foram menos susceptíveis a ação de peptídeos antimicrobianos (PAMs), indicando que os componentes da membrana de formas amastigotas podem ser mais resistentes aos peptídeos.

A citotoxicidade é um obstáculo para a aplicação biológica, assim é fundamental no desenvolvimento de novas drogas a determinação da citotoxicidade da molécula *in vitro* (Krewski et al. 2010). Dessa forma, foram avaliados o efeito de diferentes concentrações das oito Ocelatinas-PT em macrófagos derivados de medula óssea. Os resultados mostraram que os peptídeos têm baixa toxicidade para macrófagos (CC₅₀>489µg/mL). Semelhantemente, o estudo de Marani et al. (2015) observou baixa toxicidade das Ocelatinas-PT em cultivos de eritrócitos e fibroblastos murinos (NIH-3T3). Sabe-se que as membranas celulares dos mamíferos são compostas principalmente de fosfolipídios neutros ou pouco positivos, sendo que a maior parte desses lipídios é voltada para o interior da bicamada e, dessa forma, ocorre menor interação com essas membranas e conseqüentemente menor toxicidade (Zaslhoff 2002).

A partir dos resultados de concentração inibitória e concentração citotóxica, calculamos o índice de seletividade das Ocelatinas-PT. Podemos observar que os

peptídeos podem ser 4,8 a 6,7 vezes menos tóxicos para os macrófagos derivados de medula óssea do que para as promastigotas de *L. infantum* e menos 4 a 4,4 vezes menos tóxicos do que para as formas amastigotas. A diferença no Índice de Seletividade (IS) das duas formas de leishmânia pode ter sido causada pela diferença nos componentes da membrana dos parasitos e pela a composição lipídica, que pode torná-las mais resistentes a perturbações lipídicas (Zhang & Beverley 2010). Mesmo apresentando IC₅₀ mais alto, resultando em um IS abaixo do ideal, deve-se ressaltar que nos testes *in vitro* são usados soro fetal bovino e soluções salinas com alta concentração nos meios de cultura, podendo resultar em inativação dos peptídeos (Mcdermott 2004; Nguyen et al. 2010).

A partir dos resultados do teste leishmanicida, selecionamos as Ocelatinas-PT4 e PT6 para os experimentos com as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e macrófagos J774. Depois de testadas com as concentrações de 1 a 512 µg/mL das duas Ocelatinas-PT em cultivos amastigotas de *L. amazonensis* foi possível observar que a viabilidade das leishmânias tratadas com a Ocelatina-PT4 diminuiu a partir da concentração de 16 µg/mL. Na Ocelatina-PT6 a inibição foi a partir da concentração de 32 µg/mL, indicando atividade contra as amastigotas de *L. amazonensis*. Quando comparamos os resultados de *L. amazonensis* com *L. infantum*, observamos que para as amastigotas de *L. amazonensis* a inibição do crescimento foi menor. Como os nossos resultados, quando incubada DRS-01 com formas amastigotas de *L. major* e *L. panamensis*, pode ser visto efeito leishmanicida, porém ela foi mais eficaz nas formas amastigotas da *L. major* (Pérez-Cordero 2011). Mesmo com as diferenças bioquímicas das membranas das diferentes espécies de leishmânias sendo pequenas, essas diferenças podem ter afetado a ação de drogas e de peptídeos (Ferguson 1997; Pérez-Cordero 2011).

Para avaliar a citotoxicidade dos macrófagos J774, incubamos eles com as diferentes concentrações das Ocelatinas-PT4 e PT6, e observamos que todas as concentrações dos dois peptídeos testados não apresentaram diminuição da viabilidade celular (CC₅₀ >512). Assim como nos nossos resultados para macrófagos derivados de medula óssea e para os de células de Marani et al. (2015), podemos ver um aumento da atividade dos macrófagos e baixa citotoxicidade, indicando que esses peptídeos podem contribuir com a resposta

dos macrófagos, uma vez que os peptídeos antimicrobianos estão relacionados a uma variedade de ações imunomoduladoras (Hancock & Sahl 2006).

O efeito microbicida das Ocelatinas-PT4 e PT6 em cultivos de macrófagos J774 infectados com formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* mostrou que houve diminuição de forma dose-dependente do índice de infecção. Semelhante aos nossos resultados, macrófagos peritoneais de camundongos Swiss incubados com filosseptina-1 (PSN-1) também reduziram de forma dose-dependente amastigotas de *L. amazonensis* intracelulares (Aquino 2014). A dermaseptina-01 também reduziu o índice de infecção de macrófagos peritoneais de Swiss infectados com *L. amazonensis* (Oliveira 2015).

Os resultados mostraram que houve diminuição de forma dose-dependente do índice de infecção. A diminuição da infecção pode ter sido ocasionada pela interação do peptídeo com a membrana do parasito resultando em alterações levando a morte, como visto nas promastigotas de *L. infantum* no MEV e MFA. Os PAMs podem se inserir entre os fosfolipídeos da membrana do parasito, aumentando a permeabilidade e formando micelas a partir da membrana rompida (Brogden 2005). Estudos com os peptídeos antimicrobianos filosseptina-1 e dermaseptina-01 mostraram resultados semelhantes na diminuição da infecção de macrófagos (Aquino 2014; Oliveira 2015).

Métodos moleculares vem sendo cada vez mais empregados para a identificação e diagnóstico de doenças. Na leishmaniose esses métodos também vem sendo empregados para a identificação em amostras clínicas, isolados de culturas e até em flebotomíneos (Ben Abda et al. 2011; Francino et al. 2006). Um desses métodos é a reação em cadeia de polimerase (PCR) que é capaz de detectar apenas uma molécula de DNA na amostra, mostrando sua alta sensibilidade (Melo 2006). A PCR em tempo real ou PCR quantitativa vem sendo bastante utilizada por promover o monitoramento e quantificação em tempo real, além de ser uma técnica rápida (Ben Abda et al. 2011). A qPCR permite fazer avaliações qualitativas (detecções positivas ou negativas) e quantitativas (carga relativa ou absoluta) pela avaliação da carga absoluta via curva padrão a partir do DNA a ser pesquisado (Galluzzi et al. 2018). Vários estudos já mostraram a sensibilidade dessa técnica para a avaliação de kDNA, inclusive para amostras de pacientes com leishmaniose (Weirather et al. 2011; Pita-Pereira et al. 2012). A partir da sensibilidade da qPCR para amostras

contendo leishmânia, foi feita uma qPCR dos macrófagos J774 infectados e dos tratados com as Ocelatinas-PT4 e PT6, resultando na comprovação da eliminação da carga parasitária com 64 µg/mL para ambos os peptídeos. Essa redução de parasitos pode ter ocorrido pela ativação dos macrófagos com essas concentrações, bem como pela interação do peptídeo com o parasito. Os PAMs podem interagir com a membrana alvo após uma hora causando rompimento da estrutura e liberando DNA, além desse mecanismo de ação, foi proposto que os peptídeos também podem ter como alvo o DNA de microorganismo (Wimley 2010).

Macrófagos J774 foram incubados com as Ocelatinas-PT4 e PT6 e sua viabilidade avaliada pelo método da nigrosina. Os resultados mostraram que os macrófagos incubados com as Ocelatinas-PT continuaram viáveis mostrando que esses peptídeos não possuem efeitos tóxicos. Na análise por MTT de macrófagos J774 o mesmo pode ser visto, já que todas as concentrações dos dois peptídeos apresentaram um CC50 estimado acima da maior concentração testada (CC50>512).

Os primeiros peptídeos descritos da família das Ocelatinas apresentaram efeito lítico contra eritrócitos humanos (Nascimento et al. 2004), mas esse efeito não foi observado para as Ocelatinas-PT1 a PT8 e a Ocelatina-F que apresentaram baixa atividade hemolítica (Marani 2015; Jiang et al. 2018). Sabe-se que o grau de helicidade e da anfipacidade dos peptídeos podem aumentar a toxicidade em células que possuem carga neutra como as de mamíferos (Yeaman & Yount 2003). Além disso, foi relatado que as interações hidrofóbicas podem influenciar a composição de membranas levando a hemólise (Tan et al. 2014). Mas como nos achados de Marani et al. (2015) e nos nossos de MTT, a baixa citotoxicidade desses peptídeos se confirmaram.

Pelo percentual de macrófagos aderidos em lamínulas foi observado que as células infectadas e as tratadas com as Ocelatinas-PT4 e PT6 diminuíram a aderência em relação ao controle, mas não de forma dose-dependente, quando comparado as células controle. Já em macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss* infectados com *L. amazonensis* e tratados com Dermaseptina-01, foi possível observar que houve diminuição da aderência pelo peptídeo de forma dose-dependente (Oliveira 2015). A infecção

por leishmânias com os fagócitos podem causar diminuição da aderência celular, Carvalho et al. (2004), observou em macrófagos J774 a diminuição da adesão celular ao tecido conjuntivo causadas pela infecção com leishmânias. Em outro estudo, foi possível verificar que a adesão após a infecção com *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis* também ocorreu em células peritoneais de camundongos. Ainda foi possível observar que a carga parasitária e o estado de ativação celular também podem influenciar na aderência celular (Pinheiro et al. 2006). Esses achados sugerem que as leishmânias podem ter diminuído a aderência dos macrófagos J774.

Durante a ativação celular os macrófagos são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ON) para a eliminação de patógenos. Nosso trabalho avaliou a produção dessas espécies reativas por macrófagos J774 infectados ou não infectados, e tratados ou não com as Ocelatinas-PT4 e PT6.

Nossos resultados mostraram que macrófagos J774 incubados com as concentrações de 2, 8 e 16 µg/mL da Ocelatina-PT4 tiveram aumento da produção de EROs quando comparadas ao controle basal, enquanto que nas concentrações da PT6 não houve diferença significativa na produção. Quando os macrófagos foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com a PT4, foi possível ver um aumento significativo da produção dessas espécies reativas nas concentrações de 2, 8 e 16 µg/mL em comparação ao controle basal, enquanto que na PT6 o aumento foi significativo em todas as concentrações avaliadas. Quando comparamos os macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com Oc-PT4 e PT6, observamos que a diminuição na produção de EROs foi com todas as concentrações.

Aquino (2014) observou em seus resultados que macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. amazonensis* e incubados com PSN-1, não tiveram aumento da produção de peróxido de hidrogênio quando comparado ao controle, enquanto que na concentração de 64 µg/mL teve diminuição da produção nas células não infectadas e infectadas em relação ao controle; Tripathi (2014), incubou neutrófilos humanos com LL-37, que é um peptídeo, mas ele não afetou a produção de H₂O₂ em relação ao controle basal.

As EROs são essenciais para o controle de infecções e são produzidas no fagolisossoma dos macrófagos pela a atividade do complexo NADPH oxidase.

Citocinas como IFN- γ e TNF- α aumentam a atividade de NADPH oxidase que produz radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO), hipoclorito (OCl^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Brune et al. 2013; Van Assche 2011). Nos macrófagos infectados e tratados com as Ocelatinas-PT4 e PT6 os peptídeos também podem ter ativado vias de produção de EROs para o controle da infecção. A proteína C quinase (PKC) é uma família de proteínas que sinalizam funções microbicidas como EROs, mas também podem inibir a produção de EROs em PMN (Ammar 1998). A PT4 na concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ pode ter diminuído a ação da PKC, resultando em queda de produção das EROs.

O Óxido nítrico (ON) é produzido nos macrófagos pela expressão de Óxido Nítrico-Sintase induzível (iNOS), que provoca uma reação entre L-arginina, oxigênio e NADPH para sua atividade (Laskin 2012). A produção de óxido nítrico foi avaliada em macrófagos J774 e os resultados mostram que quando incubados com as Ocelatinas-PT4 na concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$, os macrófagos não infectados e infectados apresentaram um aumento de produção de ON em relação ao controle basal. Com a Ocelatina-PT6 também foi visto um aumento de produção de ON nos macrófagos infectados ou não na concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ e nos infectados e tratados com 8 $\mu\text{g/mL}$. Oliveira (2015), observou aumento da produção de ON nas maiores concentrações de DRS-01 testadas, já Kuckelhaus et al. (2007), observou que nas menores concentrações de PSN-1 houve diminuição da produção de ON.

O ON tem um papel importante no controle de parasitos como leishmânias, e estímulos como citocinas pró-inflamatórias aumentam a produção de ON nos macrófagos. Quando tratados com doadores de ON, camundongos Balb/C infectados por *L. major* apresentaram diminuição da quantidade de leishmânia nos macrófagos e no tamanho da lesão (Van Assche 2011). As amastigotas podem diminuir a produção de ON em macrófagos (Van Assche 2011), e a interação com as Ocelatinas-PT, exceto na concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ da PT4 e de 8 e 64 $\mu\text{g/mL}$ da PT6, podem ter alterado vias dos macrófagos como a diminuição da produção de citocinas, já que o TNF- α é crucial para a rápida indução da iNOS em macrófagos (Tripathi et al. 2008). Nas concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ das duas Ocelatinas-PT foi visto que na qPCR a carga parasitária foi drasticamente reduzida chegando até a não ter a presença de DNA do parasito e

o responsável por essa diminuição pode ter sido o ON. Holzmuller et al. (2002), demonstrou que o ON pode levar a morte de *L. amazonensis* pela degradação de da proteína intracelular levando a fragmentação de DNA nuclear do parasito.

Os resultados mostraram que a infecção por *L. amazonensis* aumentou o índice corpuscular e o percentual de macrófagos com corpúsculo lipídico em relação ao controle. Quando tratadas com a Ocelatina-PT4 e avaliadas pelo *Oil Red O*, os macrófagos J774 apresentaram aumento em relação ao controle basal, porém nenhuma das concentrações teve o índice corpuscular superior ao controle infectado. Quando comparada a citometria de fluxo, os macrófagos tratados com a PT4 tiveram aumento significativo da produção de corpúsculos lipídicos (CL) em relação ao controle basal e menor produção em relação aos infectados, contudo, a produção de CL nos macrófagos infectados divergiu dos resultados de *Oil Red O*. Macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss* infectados com *L. amazonensis* foram incubados com a DRS-01, e foi possível ver um aumento do índice corpuscular de forma dose-dependente nas concentrações testadas (Oliveira 2015). Nossos resultados mostram, a partir do índice corpuscular e dos resultados da citometria de fluxo, que houve aumento da produção de CL pelos macrófagos tratados, esse aumento de CL indica que o peptídeo pode interferir nas vias da biogênese do CL, alterando as citocinas e a formação de ecosanóides nessas células, uma vez que os CL estão ligados a síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Bozza et al. 2009), fazendo então com que essas células produzissem CL. Na concentração de 64 µg/mL pode ser visto pela qPCR e pela fagocitose que o número de leishmanias internas diminuiu, podendo justificar a diminuição de CL nessa concentração. Rabhi et al. (2016) infectou macrófagos com leishmânias vivas e mortas por calor e demonstraram que os macrófagos com as leishmânias mortas não produziram Fosofolipase A2 (PLA2), Prostaglandina E2 (PGE2) e Ciclooxygenase-2 (COX2), diminuindo a produção de CL pelo parasito.

Na Ocelatina-PT6 pelo método de *Oil Red O* foi observado aumento de CL em relação ao basal, mas nenhuma das concentrações ultrapassaram o índice corpuscular dos macrófagos infectados e não tratados. Na concentração de 2 µg/mL foi visto um aumento do índice corpuscular e média de CL em relação as outras concentrações do peptídeo. Na avaliação por citometria de fluxo apenas as concentrações de 8 e 64 µg/mL apresentaram aumento significativo na

produção de CL na comparação com o controle basal. Quando comparado o controle infectado com os macrófagos tratados, os resultados foram semelhantes aos do *Oil Red O*, onde todas as concentrações diminuíram a produção de CL. Aquino (2014), observou um aumento do índice corpuscular na menor concentração de PSN-1 quando incubada com macrófagos infectados com *L. amazonensis* e avaliado pelo método do *Oil Red O*. Nossos resultados com *Oil Red O* indicam que a concentração de 2 µg/mL possa modular os macrófagos, diminuindo a produção de CL, e conseqüentemente citocinas ou eicosanóides. Nas concentrações de 8 e 64 µg/mL, houve produção de CL pelo método *Oil Red O* com diminuição do índice corpuscular, já pela análise com BODIPY foi visto aumento de CL em relação ao basal, sugerindo que nessas concentrações o estímulo do peptídeo para a biogênese de CL seja maior até mesmo pela maior atividade de ON, indicando ativação de vias da inflamação. O processo de fixação pode perturbar a estrutura dos CL em adipócitos (Zehmer et al. 2009), além de que as gotículas lipídicas possuem diversos tamanhos, fazendo com que a visualização dessas gotículas pela microscopia óptica seja dificultada. A citometria de fluxo promove a análise de características físicas de partículas através de um feixe de luz permitindo uma análise quantitativa, além de ser uma técnica com grande sensibilidade (Sousa et al. 2013; Pedral-Sampaio et al. 2016). O BODIPY é um corante lipofílico fluorescente que emite luz verde em contato com laser, podendo ser analisado por citometria de fluxo ou microscópio confocal (Zehmer et al. 2009), permitindo maior confiança no resultado. Esse resultado sugere que o aumento de CL nas concentrações de 8 e 64 µg/mL sugere que o estímulo do peptídeo para a biogênese de CL seja maior pelo aumento de produção de ON nessas concentrações, indicando ativação de vias da inflamação, além de possível produção de eicosanóides, uma vez que o aumento de dessas gotículas está associada a geração de eicosanóides (Borges et al. 2016).

Na comparação com os macrófagos infectados e não tratados, os tratados tiveram menor produção de CL, indicando que as Ocelatinas-PT4 e PT6 possam modular a biogênese dos CLs, alterando assim a resposta inflamatória. Os CLs tem papel importante na eliminação de patógenos intracelulares, porém também podem ser fonte de energia para a sobrevivência para os mesmos. Apesar da formação de CL depender da célula e da espécie da leishmânia, nosso trabalho

mostrou que em comparação com células basais, as infectadas produziram um número maior de CL. Parasitos de leishmânia podem utilizar o CL produzido pelas células do hospedeiro para sua síntese lipídica levando a sua resistência, mostrando que a diminuição de CL pode não ser negativa para o hospedeiro (Lecoeur et al. 2013; Rabhi et al. 2016).

As Ocelatinas-PT4 e PT6 influenciaram na produção de EROs, ON e na formação de CL por vias ainda não esclarecidas, indicando que esses peptídeos podem ter efeitos moduladores na resposta imune dos macrófagos. Quando comparado os dois peptídeos, pode-se observar que a Ocelatina-PT6 apresentou um desempenho melhor que a PT4, pelo aumento da atividade dos macrófagos e a possível pulverização do DNA de leishmânia na maior concentração testada.

Sugere-se então novos ensaios a fim de se entender melhor os mecanismos que possam levar a modulação da resposta por esses peptídeos. Quantificação de citocinas, avaliação das vias inflamatórias e as de apoptose seriam necessárias para melhor compreensão do mecanismo de ação das Ocelatinas-PT4 e PT6. Como os efeitos por esses peptídeos foram comprovados pelos nossos resultados, se sugere a continuidade nas pesquisas para se desenvolver um novo medicamento para o tratamento da leishmaniose.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

1. As Ocelatinas-PT de 1 a 8 inibiram 50% as formas promastigotas de *L. infantum* nas concentrações maiores que 32 µg/mL;
2. As Ocelatinas PT4 e PT6 inibiram 50% das formas amastigotas de *L. infantum* com concentrações \geq a 114 µg/mL;
3. As Ocelatinas-PT apresentaram baixa toxicidade em cultivos de macrófagos medulares e J774;
4. As concentrações de 16 e 64 µg/mL das Ocelatinas PT1 e PT8 causaram aumento de rugosidade, bolhas, erupções vesiculares e caveolares nas membranas de *L. infantum*;
5. As Ocelatinas PT4 e PT6 inibiram as formas amastigotas de *L. amazonensis* com 16 µg/mL ou 32 µg/mL, respectivamente e apresentaram baixa toxicidade em cultivos de macrófagos J774 (CC50 >512 µg/mL);
6. As diferentes concentrações das Ocelatinas-PT4 e PT6 reduziram de forma dose-dependente a infecção dos macrófagos J774 com *L. amazonensis*; por microscopia óptica e a carga parasitária por qPCR;
7. As Ocelatinas-PT4 e PT6 reduziram a aderência celular com todas as concentrações, mas não de forma dose-dependente;
8. Macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis* e tratados com a Ocelatinas-PT4 (2, 8 e 16 µg/mL) ou PT6 (2, 8, 16 ou 64 µg/mL) aumentaram a produção de EROs;
9. As maiores concentrações das Ocelatinas PT4 e PT6 (16 e 64 µg/mL) causaram aumento da produção de ON pelos macrófagos infectados com *L. amazonensis*, enquanto apenas a maior concentração (64 µg/mL) da PT6 causou aumento de ON nos macrófagos não infectados;
10. As diferentes concentrações das Ocelatinas-PT4 e PT6 aumentaram o índice corpuscular em macrófagos J774 infectados com *L. amazonensis* pelo método de Oil Red;

11. Todas as concentrações da Ocelatina-PT4 e as concentrações de 8 e 64 µg/mL da PT6, aumentaram a produção de corpúsculos lipídicos pela análise de citometria de fluxo.

Os resultados obtidos demonstram o efeito leishmanicida das Ocelatinas-PT em cultivos promastigotas e amastigotas, baixa toxicidade em cultivos de macrófagos, efeito microbicida comprovado pela eliminação da carga parasitária e atividade imunomoduladora da resposta efetora dos macrófagos J774 pela sua influência na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como na formação dos corpúsculos lipídicos. No conjunto, os resultados mostraram o potencial leishmanicida e imunomodulador das Ocelatinas-PT4 e PT6 para futuros ensaios *in vivo* visando a compreender seu efeito sistêmico e seu mecanismo de ação.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

O aumento da resistência por vários microorganismos e a toxicidade de alguns fármacos fez com que a busca por novos compostos que tenham atividade contra diversos patógenos fosse necessária. As principais qualidades para o desenvolvimento de novos fármacos são que eles não sejam tóxicos, não apresentem efeitos adversos e sejam mais eficazes contra o patógeno.

Os peptídeos antimicrobianos já demonstraram possuir características ideais para o uso como fármaco, pois eles apresentam atividade contra microorganismos (bactérias, fungos, vírus e parasitos), baixa citotoxicidade e efeitos imunomoduladores. Esses peptídeos estão presentes no sistema imune inato de diversos organismos, desde plantas até animais vertebrados e invertebrados, e podem ser isolados e sintetizados a partir desses organismos. Vários medicamentos como os da leishmaniose apresentam citotoxicidade, em contrapartida, os PAM apresentam baixa citotoxicidade por interagirem com as membranas aniônicas das leishmânias causando instabilidade das mesmas formando poros levando a morte do parasito.

Um dos fatores limitantes para o uso desses peptídeos como fármacos é o alto custo de síntese, o que inviabilizaria a produção deles em larga escala pela indústria farmacêutica. Porém esses peptídeos podem diminuir patógenos e até mesmo modular a resposta de macrófagos como visto nesse estudo em concentrações baixas sendo possível diminuir o custo de produção. Eles também podem ser usados como potencializadores de efeito, principalmente por conseguirem estimular células como macrófagos. Alguns peptídeos já estão em fase pré-clínica de testes como o Xoma 629, que vem demonstrando eficácia contra a acne (Kindrachurch et al. 2010).

Foi descritos diversos mecanismos de ação para esses peptídeos e como eles podem imunomodular a resposta celular. Esse mecanismo vem sendo a aposta para uso desses peptídeos, desde as concentrações mais baixas. Nas Ocelatinas-PT ainda não se sabe ao certo quais mecanismos podem ser ativados, sendo necessárias mais pesquisas.

Os PAMs já mostraram sua eficácia, seja para uso como antimicrobiano, seja para modulador de resposta do sistema imune. Devido a esses efeitos positivos, o estudo com essas moléculas vem aumentando e demonstrando sua importância como possíveis novos fármacos. As Ocelatinas-PT4 e PT6 mostraram seu potencial contra amastigotas e promastigotas de *L. infantum*, diminuindo a viabilidade desses parasitos e contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, eliminando essas formas a partir das concentrações mais baixas testadas e aumentando o efeito microbicida nos macrófagos. Esses achados precisam ser melhor esclarecidos para futuras aplicações desses peptídeos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander J, Bryson K. T helper (h) 1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters* 99, 17-23, 2005.
2. 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* 34, 492–498, 2012.
3. Ammar B, Perianin A, Mor A, Sarfati G, Tissot M, Nicolas JP, Giroud M. Dermaseptin, a peptide antibiotic, stimulates microbicidal activities of polymorphonuclear leukocytes. *Biochemichal Biophys. Res. Commun* 247, 870–875, 1998.
4. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection, *Indian Journal of Medical Research* 119, 238-258, 2004.
5. Bacellar O e Carvalho EM. Imunopatogênese da leishmaniose visceral. *Gazeta Médica da Bahia* 74, n. 1 , 2008.
6. Barcelos DHF. Avaliação do potencial leishmanicida de bacteriocinas, (Dissertação de Mestrado), Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo; 2018.
7. Barreto RL, Correia CRD, Muscará MN. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova* 28, 1046-1054, 2005.
8. Barron TL e Turco SJ. Quantitation of *Leishmania* lipophosphoglycan repeat units by capillary electrophoresis. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1760, 710–714, 2006
9. Beckman JS e Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Physiological Society* 96, 0363-6143, 1996.
10. Ben Abda I, Monbrison F, Bousslimi N, Bouratbine KA, Picot S. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London* 105, n. 1, 17-22 , 2011.
11. Bessa LJ; Eaton P; Dematei A; Placido A; Vale N; Gomes P; Delerue-Matos, C; Leite, JRSA; Gameiro, P. Synergistic and antibiofilm properties of ocellatin peptides against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol* 13(2), 151–163, 2018.
12. Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies – biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 540-551, 2009.

13. Bozza PT, Melo RCN, Bandeira-Melo, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacology & Therapeutics* 113, 30-49, 2007.
14. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3, 238-250, 2005.
15. Brune B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, von Knethen A, Weigert A. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid. Redox Signal* 19, 595–637, 2013.
16. Brustoloni YM, Lima RB, da Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, de Oliveira AL, Pirmez C. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 497-500, 2007.
17. Carvalhal DG, Barbosa Jr A, Hermida MDR, Clarencio J, Pinheiro Jr N, Veras PST, dos-Santos WLC. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: Application to disclose a specific inhibitory effect of leishmania infection. *Exp Parasitol* 107, 3-4, 189-199, 2004.
18. Carvalho LP, Passos ST, Jesus AR. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia* 75, 57-65, 2005.
19. 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* 53, 345-355, 1984.
20. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 39, 343-350, 2003.
21. Dermine JF, Goyette G., Houde M, Turco SJ, Des-Jardins M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiology* 7, 1263-1270, 2005.
22. Eaton P, Bittencourt CR, Costa Silva V, Veras LM, Costa C H, Feio M J, Leite J R. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) cells. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 10, 483, 2014.
23. Eggimann G. et al. The role of phosphoglycans in the susceptibility of *Leishmania mexicana* to the temporin family of anti-microbial peptides. *Molecules* 20, 2, 2775–2785, 2015.
24. Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Kneegt-Junk KJ, Hofwegen H, van der Wal AC, Kager PA. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 49(1), 70-4, 2003.

25. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 11, 273, 2018.
26. Guimarães AB. Síntese química e avaliação das propriedades antibacterianas e antiparasitárias de análogos de peptídeos antimicrobianos de anuros, (Tese de Doutorado), Brasília: Universidade de Brasília; 2015.
27. Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51, 241-246 , 2009
28. Goto H e Lauletta JAL. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 26(2), 293-307, 2012.
29. Hancock RE e Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 24, 1551 – 1557, 2006.
30. Handman E e Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology* 18, 332-333 , 2002.
31. Holzmüller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, Lemesre JL. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infection and immunity*, 3727–3735, 2002.
32. Horikawa MM e Peña MS. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. *Revista da Biologia* 6, 32-37, 2011.
33. Ilgoutz SC e McConville MJ. Function and Assembly of the *Leishmania* Surface Coat. *Int. J. Parasitol* 31, 9,899–908, 2001.
34. Khalili S, Mohebbali M, Ebrahimzadeh E, Shayan P, Mohammadi-Yeganeh S, Moghaddam MM, Elikae S, Akhoundi B, Sharifi-Yazdi MK. Antimicrobial activity of an antimicrobial peptide against amastigote forms of *Leishmania major*. *Veterinary Research Forum* 9, 323 - 328, 2018.
35. Kaye P e Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature reviews, Microbiology* 9, 604 – 615, 2011.
36. Kindrachuk L, Nijnik A, Hancock RE. Host defense peptides: Bridging antimicrobial and immunomodulatory activities. *Comprehensive Natural Products II*. Oxford: Elsevier, 175-216, 2010.
37. Kückelhaus SAS, Toxicidade e atividade antiparasitária da filosseptina-1, um peptídeo de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia), (Tese de doutorado), Brasília: Universidade de Brasília; 2007.

38. 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* 123, 11-16, 2009.
39. Kumar R e Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* 3(251), 1-10 , 2012.
40. Kobets T, Grekov I, Lipoldová M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Current Medicinal Chemistry* 19, 1443-1474, 2012.
41. Koczulla AR e Bals R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* 63(4), 389-406, 2003.
42. Laskin D, Malaviya R, Venosa A, Gow A, Heck D, Laskin J. Role of reactive nitrogen species (RNS) generated via inducible nitric oxide synthase in vesicantinduced lung injury and inflammation. *Nitric Oxide* 27, S44, 2012.
43. 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* 70, 826-835, 2002.
44. 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* 151, 336-343, 2008.
45. 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* 7, e2276, 2013.
46. Lupi O, Bartlett BL, Haugen RN, Dy LC, Sethi A, Klaus SN, Pinto JM, Bravo F, Tyring SK. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. *Journal of the American Academy of Dermatology* 60, 897-925, 2009.
47. Luz ZM, Carneiro M, Schall V, Rabello A. The organization of health services and visceral leishmaniasis: an integrated intervention to improve diagnosis and treatment. *Cad Saude Publica* 25, 1177-1184, 2009.
48. Machado A, Liria CW, Proti PB, Remuzgo C, Miranda MTM. Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. *Química Nova* 27(5), 781-789, 2004.

49. Machado de Assis TS, Rabello A, Werneck GL. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trop Med Int Health*. doi: 10.1111/j.1365- 3156.2012.03064.x., 2012.
50. Manjili HK, Jafari H, Ramazani A, Davoudi N. Anti-leishmanial and toxicity activities of some selected Iranian medicinal plants. *Parasitology Research*, DOI 10,1007/s00436-012-3059-7, 2012.
51. Marani MM, Dourado FS, Quelemes PV, Araújo AR, Perfeito MLG, Barbosa EA, Vêras LMC, Coelho ALR, Andrade EB, Eaton P, Longo JPF, Azevedo RB, Delerue-Matos C, Leite JRSA. Characterization and Biological Activities of Ocellatin Peptides from the Skin Secretion of the Frog *Leptodactylus pustulatus*. *Journal of Natural Products*, 2014.
52. Masmoudí A, et al. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *Journal of Dermatological Case Reports* 2, 31-41, 2013.
53. Mattos IL, Shiraishi KA, Braz AD, Fernandes JR. Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação. *Química Nova* 26, 373-380, 2003.
54. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 119, 237-246 , 1999.
55. Mcdermott AM. Defensins and other antimicrobial peptides at the ocular surface. *The ocular surface* 2, 4, 229–247 , 2004.
56. Melo FL. Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em pcr para a detecção de *Schistosoma Mansoni*, (Tese de Doutorado), Recife: Fundação Oswaldo Cruz; 2006.
57. Melo RCN, D'Avila H, Wan H, Bozza PT, Dvorak AM. Lipid Bodies in inflammatory cells: Structure, function, and current imaging techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59, 540-556, 2011.
58. Ministério da Saúde, Brasil 2008, Acesso:
cbpv.org.br/foruns/leishmaniose-situacao_atual_no_brasil.doc
59. Ministério da Saúde, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil 2007; 2: 7-189.
60. Ministério da Saúde, Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil 2006; 1: 120p
61. Ministério da Saúde, Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil 2014; 1: 120p
62. 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* 46, 367–375, 2009.

63. Morris L, Troutt AB, Handman E, Kelso A. Changes in the precursor frequencies of IL-4 and IFN-gamma secreting CD4+ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology* 149(8), 2715-21, 1992.
64. Mutiso JM, Macharia JC, Gicheru MM, Ozwara H. Immunology of leishmaniasis. *Scientia Parasitologica* 14, 51-61, 1582-1366 , 2013.
65. Nascimento ACC, Zanotta LC, Kyaw CM, Schwartz ENF, Schwartz C, Sebben A, Castro MS. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *The Protein Journal* 23(8), 501–8, 2004.
66. Teruaki N e Gallo RL. Antimicrobial peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal Investigation Dermatology* 132(3), 887-895, 2012.
67. Nguyen LT, Chau JK, Perry NA, Boer L, Zaat SAJ, Vogel HJ. Serum Stabilities of Short Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide Analogs. *PLoS ONE* 5, 9, 12684, 2010.
68. Olekhovitch R, Ryffel B, Müller AJ, Bousso P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. *The Journal of Clinical Investigation* 124(4), 1711–1722, 2014.
69. 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* 18, 293-305, 2005.
70. Oliveira MGC. Estudo do efeito leishmanicida da dermaseptina-01, um peptídeo antimicrobiano de *Phyllomedusa azurea*, (Dissertação de Mestrado), Brasília: Universidade de Brasília; 2015.
71. Oliveira MGC, Alves AGG, Sousa C, Marani MM, Plácido A, Vale N, Delerue-Matos C, Gameiro P, Kuckelhaus SAS, Tomas AM, Leite JRSA, Eaton P. Ocellatin-PT antimicrobial peptides: High-resolution microscopy studies in antileishmania models and interactions with mimetic membrane systems. *Biopolymers* 105, 873-886, 2016.
72. Oren Z e Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47,451-463, 1998.
73. Pérez-Cordero JJ, Lozano JM, Cortés J, Delgado G. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides* 22, 32(4), 683-90, 2011.
74. Pinheiro NFJR, Hermida MD, Macedo MP, Mengel J, Bafica, dos-Santos WL. *Leishmania* infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 74, 7, 3912-3921, 2006.

75. Pires AM, Costa GC, Gonçalves EGR, Alvim AC, Nascimento FRF. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. *Rev. Ciênc. Saúde* 14, 1, 30-39, 2012.
76. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, Brazil RP, Britto C. SYBR green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasit. Vectors* 5, 15, 2012.
77. Prates MV & Bloch Jr C. Peptídeos antimicrobianos. *Revista biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 17, 30-36, 2000.
78. Rabhi S, Rabhi I, Trentin B, Piquema D, Regnault B, Goyard S, Lang T, Descoteaux A, Enninga J, GuizaniTabbane L. Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *Leishmania major* macrophage infection. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0148640, 2016.
79. Ramalho-Ortigao M, Saraiva E, Traub-Cseko YM. Sandy fly-*Leishmania* interactions: relationships are not necessarily easy. *The Open Parasitology Journal* 1, 195-204, 2010.
80. Reis LC, Maria Brito EF, Souza MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical* 35 (2), 103-115, 2006.
81. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Rodrigues JE. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors* 9,118, 2016.
82. 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* 3, 1, 2007.
83. Rodrigues AM, Hueb M, Santos TARR, Fontes CJF. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. *Rev Soc Bras Med Trop* 39, 139-145, 2006.
84. Roque NR. Biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por componentes da parede celular de *M.tuberculosis* e BCG e a sua interação com organelas da via endocítica, (Dissertação de Mestrado), Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2011.
85. Sacks D e Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology* 55, 453–83, 2001.
86. Sahl HG. Optimizing antimicrobial host defense peptides. *Chemistry & Biology* 13, 1015-1017, 2006.

87. Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *Indian Journal of Medical Research* 123, 245-266, 2006.
88. Serezani CHC, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *Journal of Immunology* 177(5), 3201-8, 2006.
89. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66, 236–248, 2002.
90. Sharma U e Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology* 47, 412-423, 2009.
91. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol* 3(6), 147-54, 2014.
92. Ru S, Rong-Bian W, Hong-Yu L, Dong-Feng W. Isolation and Characterization of an Antibacterial Peptide Fraction from the Pepsin Hydrolysate of Half-Fin Anchovy (*Setipinna taty*). *Food and Bioprocess Technology* 5, 1979- 1989 , 2012.
93. Ruitter CM, van der Veer C, Leeflang MM, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and metaanalysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol* 52(9), 3147-55, 2014.
94. Skraba CM, et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 78, 4, 411-417, 2014.
95. Solcà MS, Bastos LA, Guedes CE, Bordoni M, Borja LS, Lorangeira DF, da Silva Estrela Tuy PG, Amorim LD, Nascimento EG, de Sá Oliveira GG, Dos-Santos WL, Fraga DB, Veras PS. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS One* 9, e103635, 2014.
96. Souza F, Oliveira A, Silva A, Calabrese K. In vitro activity of *Morinda citrifolia* Linn. fruit juice against the axenic amastigote form of *Leishmania amazonensis* and its hydrogen peroxide induction capacity in BALB/c peritoneal macrophages et al. *BMC Res Notes* 11, 492, 2018.
97. Tachado SD, Mazhari-Tabrizi R, Schofield L. Specificity in signal transduction among glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Parasite Immunology* 21, 12, 609–617, 1999.
98. Tossi A, et al. Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides. *Peptides Science* 55, 4-30, 2000.

99. Toke O. Antimicrobial Peptides: New Candidate in Fight Against Bacterial Infections. Wiley InterScience 80, 717-735, 2005.
100. Tripathi S, Bruch D, Kittur DS. Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and function. BMC Complement. Altern. Med 8, 1, 2008.
101. Tripathi S, Verma A, Kim E, White MR, Hartshorn KL. LL-37 modulates human neutrophil responses to influenza A virus. Journal of Leukocyte Biology 96,1-8, 2014.
102. Van Assche T, Deschacht M, da Luz R.A, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. Free Radical Biology and Medicine 51, 337-351, 2011.
103. van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. Int immunopharmacol 1(8),1491-1500, 2001.
104. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415, 389-395, 2002.
105. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Research 37, 933-937, 2012.
106. Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. Serial quantitative PCR assay for detection, speciesdiscrimination and quantification of Leishmania spp. in human samples. J. Clin. Microbiol 49, 3892–3904, 2011.
107. Wilson ME e Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Infection and Immunity 6, 363-369,1988.
108. Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptides action with the interfacial activity model. ACS Chemical Biology 5, 10, 905–917, 2010.
109. World Health Organization, 2007, Leishmaniasis, Available at:
<http://www,who,int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/leishmaniasis,pdf>,
110. World Health Organization, 2012, Leishmaniasis, Available at:
http://www,who,int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index,html
111. World Health Organization, 2016, Control of leishmaniasis, Available at:
http://www,who,int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index,html

ANEXO I

Gráficos de resultados

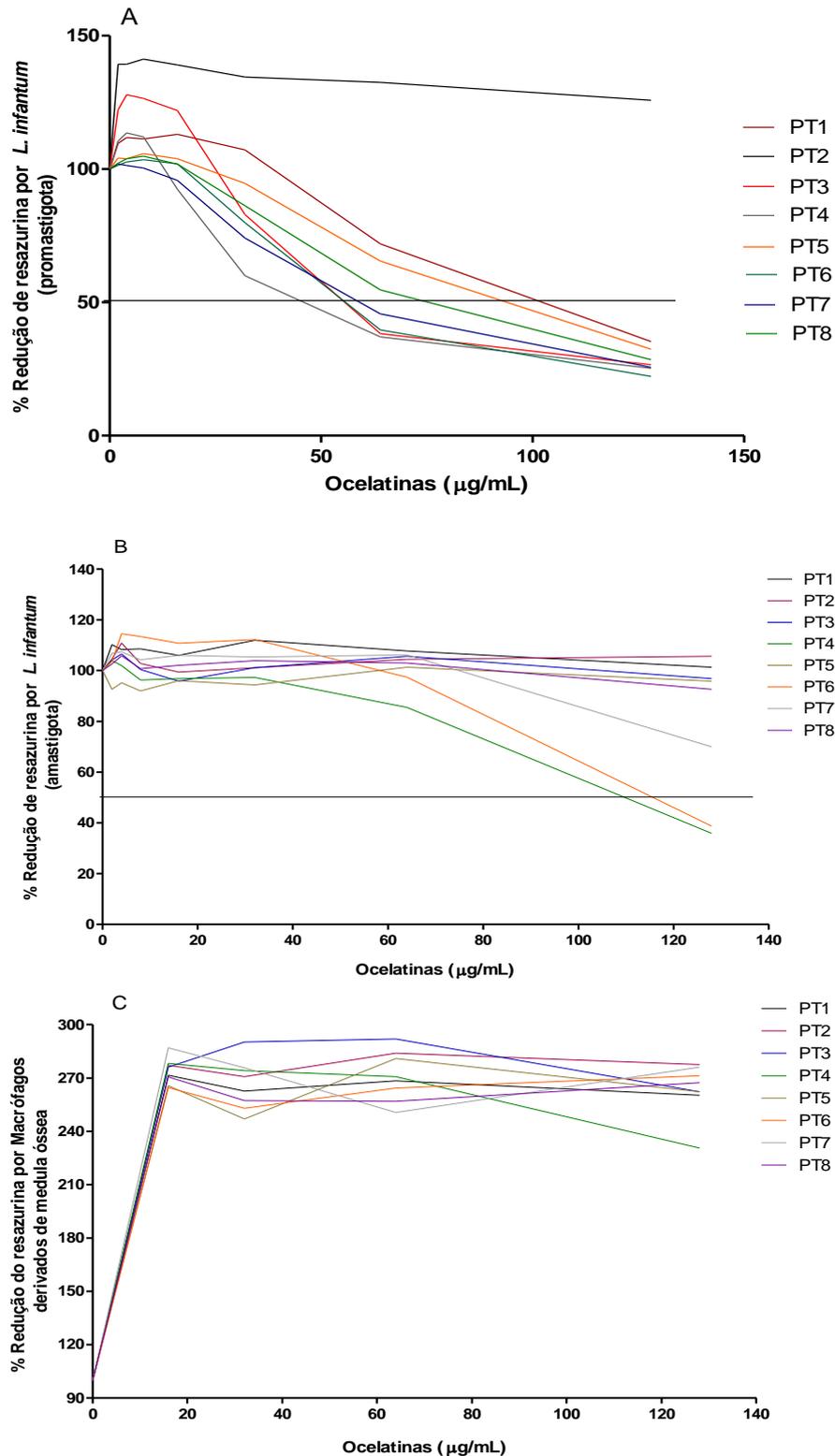


Figura 18. Redução de resazurina. Em (A), redução de resazurina por promastigotas de *L. infantum* tratadas com as Ocelatinas-PT1 a PT8; Em (B), redução de resazurina por amastigotas de *L. infantum* tratadas com as Ocelatinas-PT1 a PT8; Em (C), macrófagos derivados de medula óssea tratados com Ocelatinas-PT1 a PT8. Estão mostrados as regressões lineares.

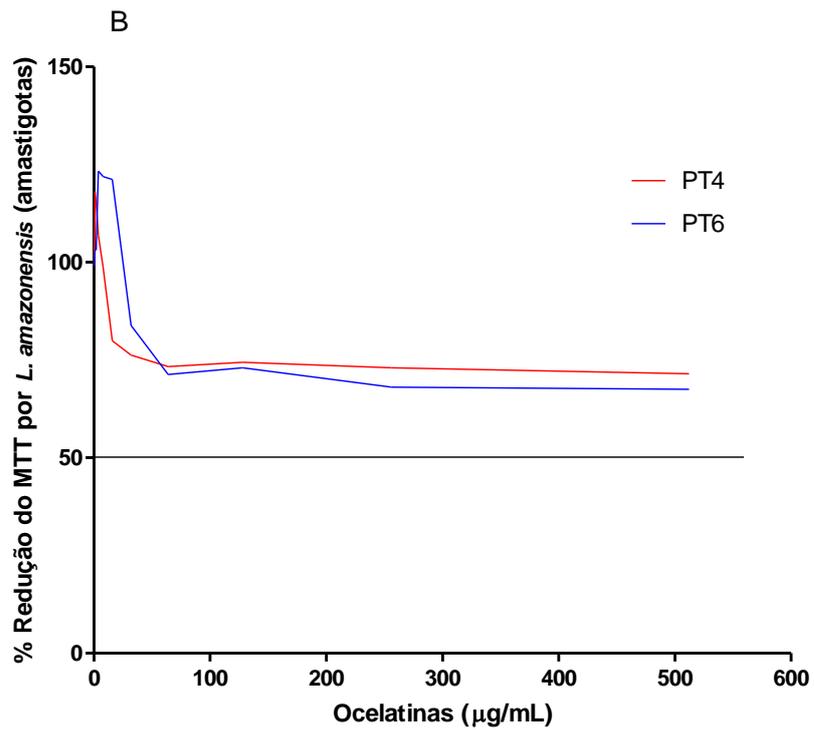
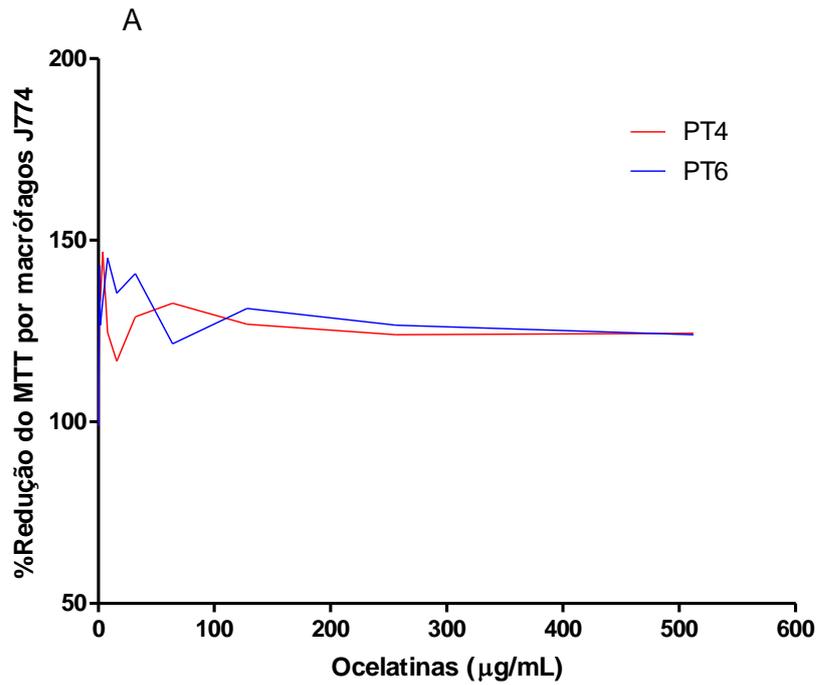


Figura 19. Redução do MTT. Em (A), redução do MTT por macrófagos J774 tratados com as Ocelatinas-PT4 e PT6; Em (B), redução do MTT por amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com as Ocelatinas-PT4 e PT6. Estão representadas as regressões lineares.