



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - UNB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR
GRUPO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE FUNGOS PATOGÊNICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**O PEPTÍDEO TOAP-2 INTERFERE COM A ATIVIDADE
PRÓ-INFLAMATÓRIA DE LPS EM FAGÓCITOS MURINOS**

Philippe Spezia Silva

Orientadora: Dra. Ildinete Silva-Pereira

Brasília – DF

MARÇO DE 2020

PHILIPPE SPEZIA SILVA

**O PEPTÍDEO TOAP-2 INTERFERE COM A ATIVIDADE
PRÓ-INFLAMATÓRIA DE LPS EM FAGÓCITOS MURINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Orientadora: Dra. Ildinete Silva-Pereira

Brasília – DF
MARÇO DE 2020

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à minha família, a qual me proporcionou uma educação de qualidade desde minha infância e sempre me apoiou em todos os meus objetivos. Tenho convicção de que meu ingresso na faculdade, a conquista do diploma e a aprovação no mestrado só foram possíveis graças a esse apoio. Agradeço ao meu Pai, à minha Mãe e à minha Irmã. Especialmente, gostaria de agradecer aos meus avós maternos, por todas as lembranças felizes da infância e da adolescência. Infelizmente, vocês não estão mais comigo, mas carrego seus ensinamentos no coração até hoje e, provavelmente, os carregarei pelo resto de minha vida. Obrigado Vô, obrigado Vó.

Agradeço à minha orientadora, professora Ildinete Silva-Pereira, primeiramente pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, mas também pelos ensinamentos, conselhos, momentos de descontração e, principalmente, pela paciência. Quando ingressei no programa eu não sabia o quanto aprenderia como profissional e como pessoa. Foi um prazer ter uma mentora cujo conhecimento só é superado pela humildade.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço à Calliandra e Fernanda, por terem me acompanhado no começo mestrado e me ensinado o máximo possível no curto período que tivemos de convivência. Agradeço ao Fabián, que também me ensinou durante esse curso intensivo, mas esteve presente nos 2 anos seguintes, me aconselhando e me ajudando sempre que precisava. Agradeço ao Jhones, cuja ajuda foi essencial para a execução dos últimos experimentos. Agradeço à Patrícia, cujo auxílio fora essencial na elaboração dos desenhos experimentais. Finalmente, agradeço à Lara, João, Stefânia, Larissa e Hugo, juntamente aos colegas antes mencionados e a outros que não mencionei, pelo ótimo ambiente de trabalho que nós construímos. Obrigado pelos ensinamentos e pelas risadas.

Agradeço ao grupo do Laboratório LIA, que permitiram o uso de suas instalações e que contribuíram para este trabalho, por meios de dicas e sugestões.

Gostaria agradecer aos amigos que o programa me proporcionou, pessoas que não trabalharam diretamente comigo, mas cuja presença nos corredores tornavam os dias mais alegres: obrigado Jacyelle, Renato, Mariana, Ronny e Carolina.

Agradeço aos meus amigos, que tiveram paciência com meus sumiços e que sempre me apoiavam e riam quando eu dizia que “tinha que cuidar das minhas células”. Seria impossível nomear todos sem encher estas páginas, portanto, citarei apenas alguns: Luis, obrigado pelos

artigos, pelo incentivo, pela companhia e por sua experiência em pesquisa, demonstrada pelos seus conselhos. Obrigado Mateus, Victor, Thais, Gabriel, Daniela, Nina, Jhonny e Tchela, por todas as memórias que construímos nesses anos de amizade.

Agradeço à Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pelas oportunidades e pelo conhecimento a mim proporcionado. Por fim, pelo apoio financeiro, agradeço ao CNPq, FAP-DF e a CAPES.

Resumo

O aumento no número de casos de aquisição de resistência de fungos e bactérias contra fármacos atuais, em associação com a diminuição no número de medicamentos aprovados que apresentem novos mecanismos de ação, vem estimulando a procura por tratamentos alternativos para doenças infecciosas. Os avanços tecnológicos na síntese de peptídeos, reduzindo os seus custos, renovaram o interesse da indústria farmacêutica sobre essas moléculas. Peptídeos antimicrobianos (AMP) são pequenas moléculas evolutivamente conservadas, presentes no sistema imune de todos os grupos de organismos, com atividade microbicida e imunomodulatória. Acredita-se que a regulação das respostas inflamatórias seja a principal função dessas moléculas em organismos vertebrados. Neste trabalho, foram avaliadas as propriedades imunomodulatórias de ToAP-2, um AMP catiônico sem pontes dissulfeto derivado da peçonha do escorpião *Tityus obscurus*, sobre macrófagos tipo M1 (BMM) e células dendríticas (BMDC) derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6. Os ensaios realizados mostraram que ToAP-2 não alterou a fagocitose de leveduras de *Cryptococcus neoformans* por BMMs e BMDCs após 30 min ou 2 h de infecção. Da mesma maneira, ToAP-2 também não afetou a atividade fungicida de BMMs, determinada em ensaios de contagem de unidades formadoras de colônia. Também analisamos a secreção de MCP-1, IL-6 e TNF- α no sobrenadante de BMMs e BMDCs estimulados com apenas ToAP-2, ou com o peptídeo e o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* por 6 h ou 24 h. ToAP-2 reduziu significativamente a secreção dessas citocinas, indicando uma possível interação, direta ou indiretamente, com LPS. Para investigar essa hipótese, células de *E. coli* e *C. neoformans* foram expostas à suas respectivas concentrações inibitórias mínimas de ToAP-2 na presença de diferentes concentrações de LPS em diluição seriada variando de 100 a 0,78 $\mu\text{g/mL}$. Observamos que ToAP-2 perdeu sua atividade antifúngica e antimicrobiana na presença de LPS (a 100 e 12.5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), corroborando a hipótese de que ToAP-2 possa interagir diretamente com LPS.

Abstract

The rise in antimicrobial resistance by fungi and bacteria against current drugs, as well as the diminishing numbers of drugs with novel mechanisms being approved, has encouraged the search for alternative treatment options. The technological improvements on peptide synthesis reduced its costs and renewed the interest of pharmaceutical companies in these molecules. Antimicrobial peptides (AMP) are evolutionary conserved molecules in the immune system of all groups of organisms with both antimicrobial and immunomodulatory activities. It is thought that the primary role of AMPs in vertebrates is the regulation of inflammation. In this study, we evaluated the immunomodulatory properties of ToAP-2, a cationic non-disulfide-bridged peptide derived from the scorpion *Tityus obscurus*' venom, on bone marrow derived M1-like macrophages/dendritic cells (BMM/BMDC) from C57BL/6 mice. The experiments revealed that ToAP-2 had no effect on the phagocytosis of the yeast *Cryptococcus neoformans* by neither BMM or BMDC after 30 min or 2 h of infection. Similarly, ToAP-2 had no effect on yeast killing by BMM, as determined by colony formation units experiments. We also evaluated the production of MCP-1, IL-6 and TNF- α by BMMs or BMDCs after stimulation with ToAP-2 alone, or in combination with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) for 6 h or 24 h. ToAP-2 significantly reduced these cytokine levels, suggesting a possible direct or indirect interaction with LPS. To address this hypothesis, we performed experiments where *E. coli* and *C. neoformans* were exposed to their respective minimum inhibitory concentration of ToAP-2 in presence of different concentrations of LPS (100 to 0,78 $\mu\text{g/mL}$). We observed that ToAP-2 lost its antifungal and antibacterial properties in the presence of LPS concentrations of 100 and 12,5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These results corroborate a possible physical interaction between both molecules.

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismos de inibição da ação dos fármacos em bactérias e fungos.....	15
Figura 2. Modelos do mecanismo de ação de AMPs sobre membranas de bactérias.....	18
Figura 3. Múltiplos efeitos de HDPs no organismo.....	21
Figura 4. Métodos de obtenção de peptídeos.....	28
Figura 5. Análise das forças, oportunidades, fraquezas e ameaças (FOFA) de peptídeos naturais.....	31
Figura 6. Estrutura do peptídeo ToAP-2.....	38
Figura 7. Citotoxicidade de ToAP-2.....	39
Figura 8. Esquema representativo para a coleta de toda a carga fúngica presente em cada poço.....	51
Figura 9. Fotografia de BMMs em 30 min de infecção com <i>C. neoformans</i> , coradas com o kit Panótico.....	58
Figura 10. ToAP-2 não modula a atividade de internalização de leveduras de <i>C. neoformans</i> por BMMs ou BMDCs.....	60
Figura 11. ToAP-2 não afetou a porcentagem de BMMs ou BMDC com leveduras internalizadas.....	61
Figura 12. O tratamento com ToAP-2 não afeta a atividade fungicida de BMMs.....	62
Figura 13. ToAP-2 reduz a secreção de MCP-1, IL-6 e TNF- α por BMMs e BMDCs estimuladas com LPS por 24 h.....	64
Figura 14. ToAP-2 reduz a secreção de IL-6 e TNF- α por BMMs e BMDCs estimulados com LPS por 6 h.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Atividades, alvos e células produtoras de HDPs.....	23
Tabela 2. Peptídeos terapêuticos e suas indicações.....	33
Tabela 3. Descrição da composição dos grupos experimentais para a avaliação influência de ToAP-2 na capacidade fungicida de BMMs.....	50
Tabela 4. Descrição detalhada dos grupos de tratamento para a quantificação de citocinas secretadas por BMMs e BMDCs após 24 h.....	53
Tabela 5. Descrição detalhada dos grupos de tratamento para a quantificação de citocinas secretadas por BMMs e BMDCs após 12 h.....	53
Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) de ToAP-2 e PMB contra <i>E. coli</i>	68
Tabela 7. A adição de LPS ULT interfere com as atividades antibacteriana e antifúngica de ToAP-2.....	70

Lista de Abreviaturas

° C - Graus Celsius

% - Porcentagem

s - Segundo

min – Minuto

h – Hora

mm – Milímetro

µm – Micrômetro

nm - Nanômetro

mL - Mililitro

µL – Microlitro

kg - Quilograma

g – Grama, força g

mg – Miligrama

µg – Micrograma

ng – Nanograma

M – Molar

mM - Milimolar

µM – Micromolar

aa - Aminoácidos

AMP – Peptídeo antimicrobiano (do inglês: antimicrobial peptide)

BMM – Macrófagos M1 derivados da medula

BMDC – Células dendríticas derivadas da medula

Ca²⁺ - Cálcio

CO₂ – Dióxido de carbono

cDNA – DNA complementar ao mRNA

CIM – Concentração inibitória mínima

COMBACTE – Combatendo resistência bacteriana na Europa (do inglês: combating bacterial resistance in Europe)

DBP – Peptídeos com pontes dissulfeto (do inglês: disulfide-bridged peptides)

DC – Células dendrítica

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: Dulbecco's modified Eagle medium)

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês: deoxyribonucleic acid)

DO – Densidade óptica

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: enzyme-linked immunosorbent assay)

ELP – Peptídeo tipo elastina (do inglês: Elastin-like polypeptide)

FDA – Food and Drug Administration

GLP-1 – Peptídeo tipo glucagon 1 (do inglês: glucagon-like peptide 1)

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

GST – Glutathione S-transferase

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HD – Alfa-defensina humana (do inglês: human α -defensin)

HDB – Beta-defensina humana (do inglês: human β -defensin)

HDP – Peptídeo de defesa do hospedeiro (do inglês: host defense peptide)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês: human immunodeficiency vírus)

HNP – Peptídeos de neutrófilos humanos (do inglês: human neutrophil peptides)

IB – Instituto de Biologia

IC – Intervalo de confiança

IDR – Reguladores da defesa inata (do inglês: innate defense regulators)

IF – Índice de fagocitose

IL – Interleucina

IP-10 – Proteína 10 induzida por interferon gama (do inglês: interferon gamma-induced protein 10)

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico

LPS – Lipopolissacarídeo

LPS ULT – Lipopolissacarídeo ultrapuro, específico para TRL4

MAb – Anticorpo monoclonal

MBP – Proteína de ligação a maltose (do inglês: maltose-binding protein)

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos (do inglês: monocyte chemoattractant protein)

mDC – Células dendríticas maduras

Mg²⁺ - Magnésio

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: major histocompatibility complex)

MI – Meio de infecção: RPMI-1640 suplementado + *C. neoformans*, MOI = 2

MIP-1 α – Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (do inglês: macrophage inflammatory protein 1 alpha)

MIP-1 β – Proteína inflamatória de macrófago 1 beta (do inglês: macrophage inflammatory protein 1 beta)

MOI – Multiplicidade de infecção (do inglês: multiplicity of infection)

mRNA – RNA mensageiro

Na⁺ - Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NADPH – Forma reduzida do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NDBP – Peptídeos sem pontes dissulfeto (do inglês: non-disulfide-bridged peptides)

NF- κ B – Fator nuclear κ B

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: peripheral blood mononuclear cell)

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês: buffered phosphate saline)

pDC – Célula dendrítica plasmocitóide

PAMP – Padrão molecular associado a patógenos (do inglês: pathogen associated molecular pattern)

PMN – Polimorfonuclear

PRR – Receptores de reconhecimento padrão (do inglês: pattern recognition receptors)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês: ribonucleic acid)

RNA-Seq – Sequenciamento de RNA

RPMI – Meio de cultura do Instituto Memorial de Roswell Park (do inglês: Roswell Park Memorial Institute culture medium)

SFB – Soro fetal bovino

TFE – Trifluoretanol

Th₁ – Linfócito T auxiliar 1 (do inglês: t helper cell 1)

TLR – Receptor tipo “toll” (do inglês: toll-like receptor)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: tumor necrosis factor alpha)

UFC – Unidades formadoras de colônia

Sumário

1. Introdução.....	14
1.1 Peptídeos como agentes antimicrobianos.....	14
1.2 Peptídeos como agentes imunomoduladores.....	20
1.3 Síntese de peptídeos.....	28
1.4 O mercado de peptídeos.....	30
1.5 Bioprospecção de peptídeos em peçonha.....	34
1.6 O peptídeo ToAP-2 – trabalhos prévios do grupo.....	37
2. Justificativa.....	40
3. Objetivos.....	42
4. Materiais e Métodos.....	43
4.1 Soluções e meios de cultura.....	43
4.2 Síntese química de ToAP-2.....	43
4.3 Condições de cultivo de microrganismos.....	44
4.3.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	44
4.3.2 <i>Escherichia coli</i>	44
4.4 Animais.....	45
4.5 Obtenção de células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea.....	45
4.6 Avaliação dos efeitos de ToAP-2 na capacidade de fagocitose de leveduras de <i>C. neoformans</i> por BMMs e BMDCs.....	47
4.7 Avaliação do possível efeito de ToAP-2 na capacidade fungicida de BMMs.....	49
4.8 Avaliação da atividade de ToAP-2 na modulação da produção de citocinas e quimiocinas por BMMs e BMDCs.....	52
4.9 Determinação da concentração inibitória mínima de ToAP-2 contra <i>E.coli</i>	55
4.10 Avaliação dos efeitos de LPS ULT sobre a concentração inibitória mínima de ToAP-2 contra <i>E.coli</i> e <i>C. neoformans</i>	55

4.11 Análise Estatística.....	57
5. Resultados e Discussão.....	58
5.1 ToAP-2 não altera o índice de fagocitose de leveduras de <i>C. neoformans</i> por BMMs e BMDCs.....	58
5.2 ToAP-2 não interfere com a atividade fungicida de BMMs.....	62
5.3 ToAP-2 interfere com a secreção de citocinas por BMMs e BMDCs estimulados com LPS.....	63
5.4 A presença de LPS ULT afeta a atividade antimicrobiana de ToAP-2 contra <i>E. coli</i> e <i>C. neoformans</i>	68
6. Conclusões e Perspectivas.....	71
7. Referências Bibliográficas.....	73
8. Anexos 1.....	80

1. Introdução

1.1 Peptídeos como agentes antimicrobianos

O uso indiscriminado de antimicrobianos e de antifúngicos (tanto na medicina, quanto na agricultura) contribuíram para a seleção de linhagens resistentes de diversas espécies de bactérias e fungos aos fármacos disponíveis. A aquisição de resistência deve-se principalmente ao mecanismo de ação sítio-dirigido desses fármacos que, apesar da eficácia inicial, os tornam susceptíveis à ela por diferentes mecanismos, abordados na Figura 1 (WATKINS e BONOMO, 2016; WIEDERHOLD, N. P, 2017; FISHER et al., 2018; REYGAERT, W. 2018). O resultado são linhagens multirresistentes que representam uma grande ameaça para a população, principalmente em ambientes hospitalares. Apesar do perigo que elas representam e da urgência para novos medicamentos, o número de novos fármacos aprovados reduziu nos últimos anos (WATKINS e BONOMO, 2016; FISHER et al., 2018).

A diminuição no número de antimicrobianos e antifúngicos aprovados pelos órgãos de regulamentação deu-se pelos elevados custos de pesquisa e desenvolvimento, incrementados pelas exigências dos mesmos quanto à sua eficiência e ao seu mecanismo de ação (se é semelhante ou novo), em comparação com fármacos já comercializados (KATZ et al., 2006). Em adição, a aquisição de resistência pelos microrganismos afeta diretamente no retorno do investimento de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco, influenciando na decisão da empresa farmacêutica em dar continuidade, ou não, ao desenvolvimento do medicamento (WATKINS e BONOMO, 2016).

Em 2012, a agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA, do inglês: *Food and Drug Administration*), diminuiu alguns de seus requerimentos para a aprovação de novos antimicrobianos; concomitantemente, na Europa, fora lançado o projeto COMBACTE (do inglês: *Combating Bacterial Resistance in Europe*) para incentivar e acelerar o desenvolvimento de novos fármacos. Em meio a este cenário de diminuição de exigências para novas moléculas e o fomento à pesquisa voltado ao desenvolvimento de novos medicamentos, o interesse pelos peptídeos antimicrobianos ressurgiu (FOX, J. L. 2013).

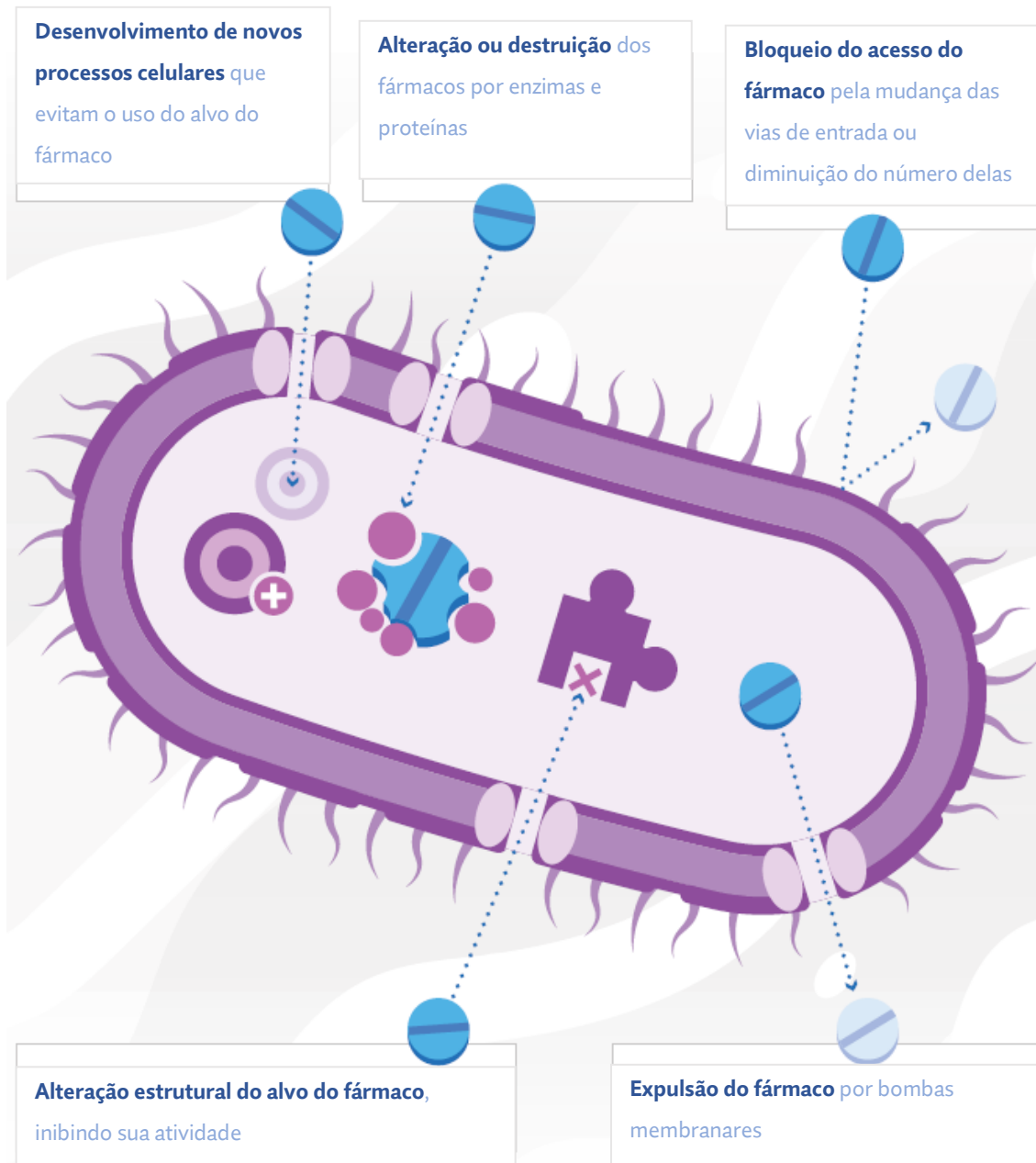


Figura 1 – Mecanismos de inibição da ação dos fármacos em bactérias e fungos. Retirado e adaptado do site <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html> (acessado no dia 06/12/2019, às 21 h e 26 min).

Peptídeos antimicrobianos (AMP, do inglês *antimicrobial peptide*) são pequenas moléculas presentes no sistema imune inato de todos os organismos complexos (HANCOCK e DIAMOND, 2000; JENSSEN et al. 2006; revisado por GUILHELMELLI et al. 2013; MANSOUR et al., 2014). Esses peptídeos também podem ser encontrados em secreções de anfíbios (LADRAM e NICOLAS, 2016) e nas glândulas de veneno e de peçonha de animais (PRIMON-BARROS e JOSÉ MACEDO, 2017). Os AMPs provêm da clivagem de peptídeos precursores (ZASLOFF M. 2002) e sua forma ativa, em sua maioria, varia entre 10 e 50 resíduos de aminoácidos (LAI e GALLO, 2009; NAKATSUJI e GALLO, 2012), podendo ter atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária, dentre outras (revisado por GUILHELMELLI et al. 2013; MANSOUR et al., 2014).

Essas moléculas são agrupadas com base na sua composição de aminoácidos, tamanho e em sua estrutura, podendo ser classificadas em 5 grandes grupos: (1) peptídeos aniônicos; (2) peptídeos catiônicos lineares que adotam uma estrutura secundária α -hélice em ambientes que mimetizam membranas biológicas; (3) peptídeos catiônicos ricos em aminoácidos específicos (Triptofano, Histidina, Prolina e ou Glicina); (4) peptídeos aniônicos e catiônicos que possuem Cisteína e formam pontes dissulfeto e (5) peptídeos catiônicos e aniônicos que são fragmentos de proteínas maiores (BROGDEN K. A. 2005). Há também outros grupos menores, como peptídeos aromáticos e peptídeos derivados de proteínas ligantes de oxigênio, que também são importantes no sistema imune de vertebrados, invertebrados e plantas, porém com baixa atividade antimicrobiana (HARRIS et al., 2009).

Os AMPs anfipáticos e catiônicos endógenos são classificados como peptídeos de defesa do hospedeiro (HDP, do inglês *host defense peptides*) e foram inicialmente caracterizados por suas atividades antibacteriana e antifúngica. Os HDPs podem ser encontrados na mucosa intestinal, fagolisossomos, grânulos de neutrófilos e em sítios de infecção (VANDAMME et al., 2012; MANSOUR et al., 2014). São produzidos e secretados por queratinócitos, neutrófilos, células dendríticas (DC) e demais células do sistema imune (LAI e GALLO, 2009). A classificação dos HDPs, assim como sua participação no sistema imune, serão abordadas na próxima seção.

Existem três modelos que descrevem o mecanismo de ação dos AMPs com atividade antibacteriana, que apresentam como um alvo a membrana e causam sua permeabilização: o modelo carpete (*Carpet model*), o modelo toroidal (*Toroidal model*) e o modelo barril (*Barrel-stave model*). Pelo modelo carpete (Figura 2a), os peptídeos se depositam paralelamente na membrana, cobrindo-a. Quando a área coberta se expande, os peptídeos conseguem atravessar a membrana e sequestrar partes dela, formando o poro. Pelo modelo toroidal, (Figura 2b) os peptídeos agregam-se e posicionam-se verticalmente dentro da membrana, dobrando-a e formando os poros, mas sem quebrar a continuidade da região hidrofílica dos grupos polares. Pelo modelo barril (Figura 2c), os peptídeos inserem-se verticalmente na membrana, tal como pelo modelo toroidal, mas os poros formados quebram a continuidade da região hidrofílica (BROGDEN, K. A. 2005).

A polaridade da membrana está diretamente relacionada com a capacidade de atuação dos AMPs catiônicos sobre ela. Quanto maior a carga negativa no exterior da membrana, maior a probabilidade de os peptídeos aproximarem-se por atração eletrostática. Não obstante, a permeabilização da membrana não é única maneira pela qual AMPs são bactericidas. Uma vez no citoplasma, AMPs podem: (1) se ligar ao DNA diretamente; (2) inibir a síntese de mRNA, DNA e proteínas; (3) inibir a ação enzimática; e (4) inibir a síntese da parede celular (ZASLOFF, M. 2002; BROGDEN, K. A. 2005).

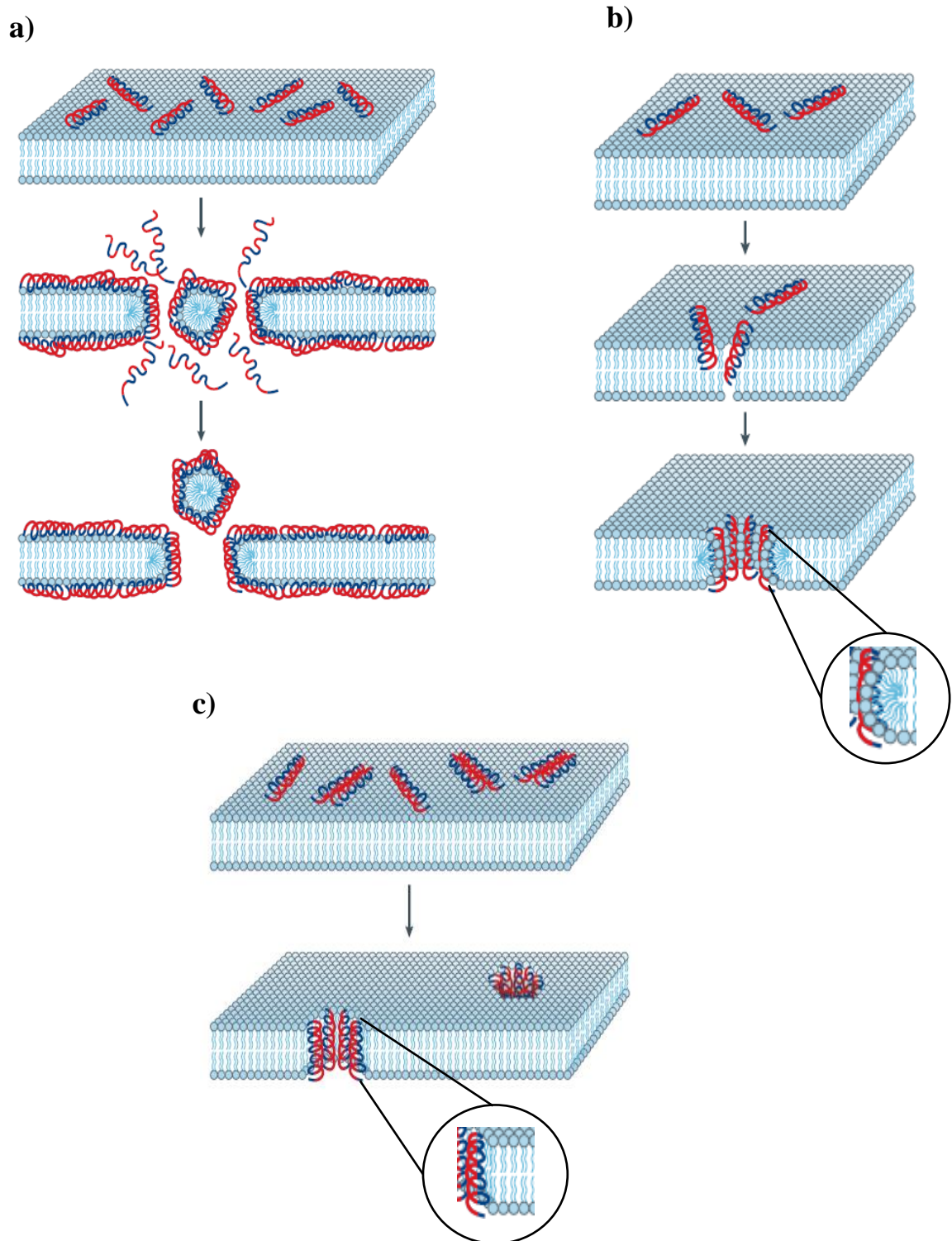


Figura 2 – Modelos do mecanismo de ação de AMPs sobre membranas de bactérias. (a) Modelo carpete. (b) Modelo toroidal. (c) Modelo barril. Regiões hidrofílicas do peptídeo estão coloridas em vermelho, enquanto as regiões hidrofóbicas estão coloridas em azul. Figura adaptada de BROGDEN et al., 2005.

Os AMPs possuem uma vantagem relevante contra os antimicrobianos atuais: a baixa aquisição de resistência pelos patógenos. Como o principal alvo da maioria dos AMPs é a membrana plasmática dos microrganismos, não uma proteína ou um metabólito específico, um microrganismo teria que realizar mudanças estruturais nos componentes de sua membrana plasmática para tornar-se completamente resistente aos peptídeos (ZASLOFF, M. 2002; LAI e GALLO, 2009). Corroborando essa ideia, o grupo de YU et al. (2018) sugere, pela elaboração de modelos matemáticos para a farmacocinética de AMPs, que a seleção de microrganismos resistentes em tratamentos com doses sub-letais é muito menor quando comparados à antimicrobianos convencionais.

Menor, mas não inexistente. Por exemplo, dados da literatura relatam que bactérias gram-negativas comensais na nossa microbiota removem um grupo fosfato presente no lipopolissacarídeo (LPS) de sua membrana externa, diminuindo a carga negativa resultante e, conseqüentemente, limitando a atuação dos peptídeos sobre ela (ZASLOFF, M. 2002; BROGDEN, K. A. 2005; LAI e GALLO, 2009; CULLEN et al., 2015).

Em uma revisão, MORAVEJ et al. (2018) aglutina diversos mecanismos já descritos na literatura, pelos quais bactérias inibem a ação de AMPs: a neutralização da carga da membrana, mudando sua composição lipídica e, assim, alterando sua fluidez, e a produção e secreção de proteases, são dois exemplos. Entretanto, o mesmo artigo destaca que as vantagens do amplo espectro de ação desses peptídeos, da possibilidade das terapias combinatórias e da modificação da sua sequência de aminoácidos, mantém a posição de AMPs catiônicos como moléculas de grande valor para a pesquisa voltada ao desenvolvimento de fármacos mais eficazes.

1.2 Peptídeos como agentes Imunomoduladores

Peptídeos de defesa do hospedeiro

Em contrapartida ao que inicialmente se pensava, em condições biológicas, os HDPs encontravam-se em concentrações muito abaixo das necessárias para matar qualquer microrganismo invasor. Salvo em alguns locais como a mucosa intestinal (MANSOUR et al., 2014) e grânulos de neutrófilos (VANDAMME et al., 2012), onde há um maior acúmulo dos peptídeos. Em um experimento feito por BOWDISH et al. (2005) o HDP humano LL-37, um peptídeo catiônico α -helicoidal, não foi capaz de reduzir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ou *Salmonella typhimurium* à 100 $\mu\text{g/mL}$, em meio de cultura DMEM. Para fins comparativos, o CIM deste peptídeo para uma variedade de bactérias varia de 1 a 30 $\mu\text{g/mL}$ em meios de cultura para bactérias. A justificativa dada para este exemplo, e para outros citados no artigo, é que a alta concentração de íons catiônicos, monovalentes e bivalentes (Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}), nas condições fisiológicas e nos meios de cultura de células de mamífero, interferem com as propriedades antimicrobianas dos HDPs catiônicos.

Sabe-se, hoje, que HDPs possuem múltiplos efeitos em diferentes tipos celulares, incluindo efeitos pró- e anti-inflamatórios em células do sistema imune (Figura 3). O efeito resultante do HDP dependerá (1) da presença de outros HDPs e/ou citocinas no microambiente; (2) da sua concentração e (3) da célula alvo. Esses peptídeos são considerados membros essenciais do sistema imune, servindo como uma ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo (MANSOUR et al., 2014; HANCOCK et al., 2016).

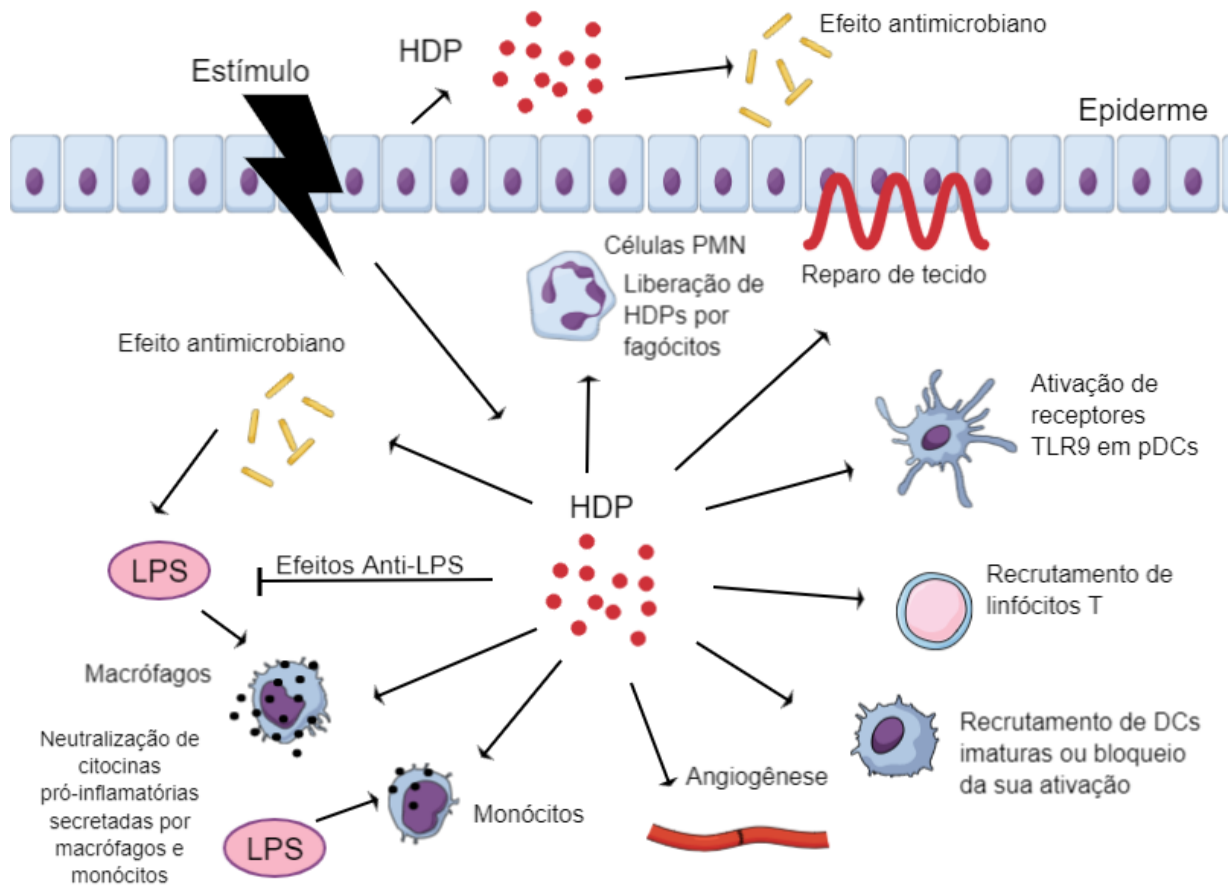


Figura 3 – Múltiplos efeitos de HDPs no organismo. DC: Célula dendrítica; pDC: Células dendrítica plasmocitóide; PMN: células polimorfonucleares. Adaptada de LAI e GALLO, 2009.

As duas classes principais de HDPs são as defensinas e as catelecidinas. Ambas abrangem peptídeos anfipáticos e catiônicos, mas diferem quanto à suas estruturas secundárias (HANCOCK et al., 2016).

Defensinas são peptídeos ricos em resíduos de Cisteína, o que permite a formação de pontes dissulfeto e, conseqüentemente, de estrutura secundária folha- β , além de α -hélice. As defensinas de mamíferos podem ser subdivididas em duas famílias: α - e β -defensinas, baseando-se no padrão de conexões entre os resíduos de Cisteína. A família das α -defensinas abrange os peptídeos de neutrófilos humanos 1 a 4 (HNP, do inglês *human neutrophil peptide*) e as α -defensinas humanas 5 e 6 (HD, do inglês *human α -defensin*). Já a família das β -defensinas são denominadas β -defensinas humanas (HDB, do inglês *human β -defensins*). Há também uma terceira família de defensinas que adotam uma estrutura cíclica: as θ -defensinas, mas não há representantes dessa família em seres humanos (HAZLETT e WU, 2011; HANCOCK et al., 2016).

As funções das defensinas variam de uma para a outra a depender de seu alvo, da sua concentração e da presença de citocinas ou de outros HDPs: quimiotáxica, pró- e anti-inflamatória, pró- e anti-angiogênica, ativação de DCs, supressão de tumores e antiviral. Em sua revisão, HANCOCK et al. (2016) traz mais a fundo essa multiplicidade de função que as diferentes defensinas possuem.

As catelecidinas não possuem pontes dissulfeto e adotam uma estrutura secundária de α -hélice. Os seres humanos possuem apenas 1 representante dessa classe: a LL-37. Seu nome se deve aos dois resíduos de Lisina presentes no início da sequência do peptídeo funcional, e pelo seu tamanho (37 aa), após a clivagem do peptídeo precursor hCAP-18 (170 aa). Sua forma ativa possui carga resultante +6, essencial para sua atividade antimicrobiana e para suas propriedades imunomoduladoras. Apesar de ser o único representante de seu grupo em humanos, este peptídeo é o que foi mais estudado na literatura (VANDAMME et al., 2012).

LL-37 é produzida e secretada por células epiteliais e por células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos e células dendríticas. Ela é capaz de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , ao ser adicionada antes, concomitantemente ou após o estímulo de macrófagos com LPS e ácido lipoteicoico (MANSOUR et al., 2014). Essa atividade foi atribuída à capacidade de LL-37 de ligar-se à LPS e impedir sua interação com o receptor tipo toll 4 (TLR4, do inglês *Toll Like Receptor*) (SCOTT et al., 2000). Ao passar dos anos, uma miríade de efeitos de LL-37 foram descritos, dentre eles, lista-se: (1) o balanço das respostas pró e anti-inflamatórias (LAI e GALLO, 2009; VANDAMME et al., 2012); (2) a quimiotaxia de células efectoras (DE YANG et al., 2000); (3) a promoção de diferenciação celular (DAVIDSON et al., 2004); (4) o efeito direto sobre a imunidade adaptativa (DE YANG et al., 2000; HURTADO e AU PEH, 2010); (5) o estímulo à regeneração celular (CARRETERO et al., 2008); (6) a promoção de autofagia (YUK et al., 2009) e de apoptose (BARLOW et al., 2010); e (7) angiogênese (KOCZULLA et al., 2003; PFOSSER et al., 2010). Assim como para as defensinas, o efeito resultante de LL-37 vai depender de sua concentração, do tipo celular com o qual interage e do cenário de citocinas e outros HDPs naquela região (VANDAMME et al., 2012; MANSOUR et al., 2014; HANCOCK et al., 2016). A Tabela 1 traz o padrão de expressão de HDPs humano, assim como seus alvos e suas funções.

Tabela 1- Atividades, alvos e células produtoras de HDPs. Tabela adaptada de HANCOCK et al., 2016.

Células produtoras	Alvo	Atividade
<i>Catelecidina LL-37</i>		
<ul style="list-style-type: none"> - Células Epiteliais - Macrófagos - Monócitos - DCs - Neutrófilos - Células NK - Mastócitos 	Neutrófilos	<ul style="list-style-type: none"> - Quimiotática via FPRs - Anti-apoptótica
	Monócitos	<ul style="list-style-type: none"> - Expressão de quimiocinas (CXCL8, MCP-1 e CCL2) e citocinas anti-inflamatórias - Diferenciação para macrófagos pró-inflamatórios
	Células B	Expressão de quimiocinas
	Células T	Expressão de quimiocinas
	Eosinófilos	Quimiotática via FPRs
	Macrófagos	Suprime a resposta TNF
	Epitélio das vias aéreas	Pró-apoptótica
	DC plasmocitóide (pDC)	<ul style="list-style-type: none"> - Detecção de ilhas CpG - Expressão de citocinas anti-inflamatórias
	DCs maduras (mDC)	Expressão de quimiocinas e de citocinas anti-inflamatórias
	Queratinócitos	<ul style="list-style-type: none"> - Produção de quimiocinas, migração celular e reparo de tecido - Anti-apoptótica
	Mastócitos	Quimiotática e liberação de histamina
	Células cancerígenas	<ul style="list-style-type: none"> - Fator de crescimento - Supressão tumoral
	Bactérias	Antimicrobiana
	Biofilme	Antimicrobiana
Fungos	Antifúngica	
Parasitas	Antiparasitária	
<i>α-defensinas – HPN1, 2, 3 e 4</i>		
<ul style="list-style-type: none"> - Neutrófilos - Monócitos - Linfócitos - Epitélio gastrointestinal 	DCs imaturas	Quimiotática
	Macrófagos	Quimiotática
	Mastócitos	Quimiotática
	Células epiteliais do pulmão	<ul style="list-style-type: none"> - Produção de citocinas (CXCL8, MCP-1 e GM-CSF) - Proliferação celular
	Fibroblastos	<ul style="list-style-type: none"> - Expressão de colágeno e reparo de tecido - Reduz a produção de collagenase

Células produtoras	Alvo	Atividade
	Células endoteliais	- Anti-angiogênica - Apoptótica
	Plaquetas	- Ativação - Apoptose
	Células cancerígenas	Antitumoral (HNP1)
	Bactérias	Antimicrobiana
	<i>Candida</i>	Antifúngica
	Vírus	Antiviral
<i>α-defensinas – HD5 e 6</i>		
- Células de Paneth - Epitélio reprodutivo feminino - Epitélio das vias aéreas	Macrófagos	Quimiotática (HD5)
	Mastócitos	Quimiotática (HD5)
	Epitélio intestinal	- Ativação de NF- κ B - Produção de quimiocina - Mantem homeostase intestinal
	Células TCD ⁺	Produção de citocinas e quimiocinas
	Bactérias	Antimicrobiana (HD5)
	Vírus	Aumenta a infectividade de, ou inibe a infecção por, HIV (HD5)
<i>β-defensinas – HDB1, 2, 3 e 4</i>		
- Células epiteliais - Monócitos - Macrófagos - DCs	Células PMB	Aumenta a produção de citocinas (HDB2)
	DCs imaturas	Quimiotática
	Células T	Quimiotática
	Neutrófilos	Quimiotática (HBD2)
	Macrófagos e mDCs	Expressão de CD80, CD86 e CD40
	Epitélio intestinal	Migração células e reparo do tecido
	Queratinócitos epidermais	- Produção de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1 e CCL20) - Migração e proliferação
	Células cancerígenas	- Supressão tumoral (HDB1) - Quimiotaxia para macrófagos associados a tumores (HDB3) - Promove a replicação (HDB4)
	Células endoteliais linfáticas	Quimiotática
	Epitélio oral	Reduz a infectividade de HIV
	Tecido vascular	Angiogênica
	Bactérias	Antimicrobiana
	Vírus	Antiviral, inibe a replicação de HIV

Peptídeos reguladores da defesa imune inata

Inspirado por essa grande variedade de efeitos que HDPs podem induzir a depender do contexto de seu micro-ambiente (Figura 3 e Tabela 1), foi criada uma classe de peptídeos sintéticos: reguladores de defesa inata (IDR, do inglês *Innate Defense Regulators*). Essa classificação acomoda peptídeos miméticos de defensinas e catelecidinas do sistema imune inato de diferentes organismos (HANCOCK et al., 2012).

HANCOCK et al. (2012) traz em seu artigo uma estratégia para a produção de novos IDRs, resumida a seguir. Inicialmente, há uma seleção dos candidatos, combinando sequências de HDPs conhecidos ou a partir de sequências aleatórias e com a ajuda de ferramentas de bioinformática correlacionando estrutura e função, são propostos IDRs candidatos. Em seguida, os peptídeos passam por um processo de seleção *in vitro* que busca por atividades imunomodulatórias. Os melhores candidatos passam para uma nova fase de testes *in vivo*. Confirmada sua eficácia, procura-se determinar o mecanismo de ação desses miméticos sintéticos. Esta última etapa é essencial para alimentar o algoritmo utilizado *in silico* na seleção inicial e melhorá-lo.

Um exemplo desses peptídeos sintéticos é o IDR-1018, um peptídeo catiônico derivado da batenecina, um HDP bovino de 12 aa. Selecionado a partir de sua capacidade de estimular a produção da proteína quimiotática de monócitos 1 e 3 (MCP-1 e -3) por células sanguíneas mononucleadas periféricas humanas (PBMC do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) *ex vivo*. IDR-1018 é capaz de influenciar a diferenciação de macrófagos para um perfil intermediário M1-M2 e de estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10). Este peptídeo também provou ter propriedades cicatrizantes dose dependentes superiores às de LL-37. Apesar de possuir baixa atividade antimicrobiana direta, IDR-1018 interfere com a formação de biofilmes e, atrelando essa característica às suas propriedades imunomodulatórias, torna-se um candidato para o tratamento de infecções complexas (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014; MANSOUR et al., 2015).

Diversos autores advogam que o uso de peptídeos imunomoduladores seria mais eficaz em terapias combinatórias (1) com outros agentes anti-infectivos, como antimicrobianos já disponíveis (MANSOUR et al., 2014; CZAPLEWSKI et al., 2016; HANCOCK et al., 2016; KOSIKOWSKA e LESNER, 2016; KANG et al., 2017; SILVA e GOMES, 2017); (2) com peptídeos capazes de inibir a formação de biofilme (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014; MANSOUR et al., 2015; SHAHROUR et al., 2019); (3) como adjuvantes para o

desenvolvimento de vacinas (MANSOUR et al., 2014; UHLIG et al., 2014; KANG et al., 2017); e (4) em associação à membranas e/ou tecidos sintéticos para ajudar no processo de cicatrização de ferimentos (CARRETERO et al., 2008; MANGONI et al., 2016; LIU et al., 2019).

Problemas em modular o sistema imune

Duas revisões recentes por KANG et al. (2017) e KOSIKOWSKA *et al* (2016) trazem um número de patentes referentes a peptídeos que, em conjunto, cobrem um período de 11 anos (2003-2015). O objetivo de ambos os artigos é destacar a variedade de IDRs e de AMPs no mercado. O processo de caracterização dos AMPs inicia com a determinação das propriedades antimicrobianas, seguido por possíveis modificações estruturais para melhorar sua atividade antimicrobiana e/ou diminuir sua toxicidade. Em alguns casos, como os das oreochromicinas, peptídeos obtidos da tilápia (*Oreochromis niloticus*), também fora caracterizado a atividade imunomodulatória. Esses peptídeos se ligam à LPS e apresentam atividade adjuvante em vacinas ao estimular a polarização de linfócitos T auxiliares células efectoras do tipo Th₁ (do inglês: *t helper type 1*), caracterizadas pela produção de interferon-gama e TNF- α , que resulta na ativação de macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos, além de estimular a produção de imunoglobulina IgG (RAUTAJOKI, K. J. et al., 2008). Ambos os artigos concluem de maneira semelhante, enaltecendo a importância das pesquisas de AMPs como antimicrobianos e como moduladores da resposta imune. Entretanto, há a ressalva de que a terapia imunomodulatória ainda está na sua infância.

Ao trabalhar com moduladores da resposta imune, dificultar-se-ia a aquisição de resistência por bactérias, uma vez que eles atuariam de maneira indireta, utilizando o sistema imune do hospedeiro ao invés de ter um alvo específico no microrganismo (HANCOCK et al., 2016). Como dito anteriormente, a aquisição de resistência contra AMPs ainda é possível (ZASLOFF et al., 2002; BROGDEN, K. A. 2005; LAI e GALLO 2009; CULLEN et al., 2015; MORAVEJ et al., 2018), por conseguinte, investigar suas propriedades imunomodulatórias e usá-las para terapias anti-infecciosas, locais ou sistêmicas, pode ser uma alternativa interessante (HANCOCK e SAHL, 2006; EASTON et al., 2009; LAI e GALLO, 2009; MANSOUR et al., 2014; CZAPLEWSKI et al., 2016; KOSIKOWSKA e LESNER, 2016; KANG et al., 2017; SILVA e GOMES, 2017).

Não obstante, modular o sistema imune é uma tarefa de extrema dificuldade, em virtude da complexidade inerente desse sistema, onde uma única molécula (citocina, HDP, agonista etc.) pode atuar de maneira oposta a depender do contexto micro-ambiental. Para evitar reações

adversas, modulando o sistema imune inato de maneira segura e eficaz, é necessário um amplo estudo sobre os efeitos do HDP, IDR ou AMP a ser utilizado. É de suma importância a caracterização precisa do mecanismo de ação desses peptídeos para o desenvolvimento de um fármaco de qualidade (LAI e GALLO, 2009; VANDAMME et al., 2012; MANSOUR et al., 2014; NEUMANN et al., 2014; HANCOCK et al., 2016).

Endotoxinas também podem ter mais de um efeito no organismo. O LPS, por exemplo, é tipicamente associado à ativação de receptores TLR4 e a subsequente translocação nuclear do fator nuclear κ B (NF- κ B), seguida da produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias (SUN e SHANG, 2015; TANDON et al., 2018). Sabe-se, entretanto, que existem múltiplas vias sinalizadoras que são ativadas por esta mesma endotoxina, como a Rho GTPase Rac, envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio (BROWN et al., 2007).

Pela via de sinalização de NF- κ B ser mais estudada, até o momento, e por possuir papel central em respostas pró-inflamatórias, diferentes autores argumentam que, apesar da sua complexidade, é um dos melhores alvos para a modulação do sistema imune (O'NEILL, L. A. J. 2006; BROWN et al., 2007; HANCOCK et al., 2012).

1.3 Síntese de peptídeos

Uma vez determinada sua atividade e comprovada sua eficácia como um fármaco, a empresa farmacêutica deve escolher o melhor método para a sua síntese e subsequente purificação. Essas etapas são essenciais para o processo de fabricação em larga escala, pois correspondem à maior parte dos gastos. Atualmente, existem quatro maneiras de se obter um peptídeo: (1) síntese química em solução ou (2) em fase sólida, (3) microrganismos recombinantes e (4) extração da fonte natural, se existente (Figura 4) (UHLIG et al., 2014).



Figura 4 – Métodos de obtenção de peptídeos. Síntese química em fase solução (a) e em fase sólida (b). Expressão em microrganismos recombinantes (c). Obtenção a partir de fontes naturais (d). Adaptada de UHLIG et al., 2014.

A primeira forma de produção de peptídeos sintéticos foi a síntese em solução, em 1920, pela pesquisadora Emily Fischer, onde dois aminoácidos, um com a região N-terminal bloqueada e o outro com a região C-terminal bloqueada eram postos em solução. Por ativação da região C-terminal livre do primeiro aminoácido, um dipeptídeo era sintetizado. Entretanto, esse processo é extremamente demorado e inviável para peptídeos com sequências maiores (SACHDEVA, S. 2017). A segunda forma de síntese desenvolvida foi a fase sólida sequencial, inicialmente por MERRIFIELD R. B. (1963), que foi aprimorada no decorrer dos anos.

Resumidamente, o primeiro resíduo de aminoácido é fixado pela sua região N-terminal em um polímero. Os demais resíduos são adicionados, em ciclos, à região C-terminal do último aminoácido da sequência fixada. Cada ciclo corresponde a uma sequência de tratamentos químicos que culmina na adição de apenas um resíduo. Este processo de síntese é caro, mas com o melhoramento da tecnologia e a automatização, houve uma diminuição significativa nos gastos (VLIEGHE et al., 2010).

Quando um peptídeo-fármaco chega às fases finais de pesquisa e/ou às prateleiras, a demanda por ele pode aumentar consideravelmente. O número de doses para o tratamento e a quantidade de pacientes impactam diretamente no custo de produção. A necessidade de produção em larga escala pode tornar o peptídeo economicamente inviável para a empresa, devido ao aumento expressivo no custo de produção. A síntese em fase sólida, apesar de ideal para as fases iniciais de pesquisa, dificilmente é capaz de manter uma produção economicamente viável em larga escala, principalmente para sequências maiores que 35 resíduos de aminoácidos (WIBOWO e ZHAO, 2019). O aumento no número de ciclos aumenta a probabilidade de erros na sequência, além de aumentar a quantidade de reagentes químicos, que, oferecem risco ao meio ambiente (LATHAM, P. W. 1999; WIBOWO e ZHAO, 2019). Não obstante, a criatividade das empresas para aprimorar as técnicas de síntese para seus produtos ajuda a contornar as limitações da síntese química, como fizera a empresa Timeris para o seu peptídeo T-20 (Fuzeon, com 36 aa), aprovado em 2003 pela FDA para o tratamento de HIV. Para diminuir os custos de produção, foi utilizada uma estratégia já conhecida de síntese “híbrida”. Nela, fragmentos diferentes do peptídeo são sintetizados por síntese em fase sólida, isolados e purificados. Em seguida, esses fragmentos são ligados por técnicas de síntese em solução (LATHAM, P. W. 1999; SACHDEVA, S. 2017).

Os recentes avanços nas técnicas de expressão recombinante e no escalonamento da produção, tornaram a produção de peptídeos em microrganismos recombinantes mais atraentes para peptídeos cuja síntese química é desafiadora. A revisão de WIBOWO e ZHAO (2019) traz as estratégias abordadas para melhorar o rendimento das produções em bateladas e a subsequente purificação de AMPs: (1) fusão de marcadores de afinidade aos peptídeos, como glutationa S-transferase (*tag* GST), polipeptídeo tipo elastina (*tag* ELP do inglês *elastin-like polipeptide*), cauda de histidina e proteína de ligação à maltose (*tag* MBP – do inglês *maltose-binding protein*); e a (2) adição sítios de clivagem. Em vários casos, observa-se a combinação dessas duas estratégias, uma vez que os marcadores de afinidade muitas vezes alteram a estrutura do peptídeo para facilitar sua purificação, comprometendo, desta maneira, sua

atividade e tornando necessária a clivagem desse marcador. A remoção do marcador pode ser feita quimicamente ou enzimaticamente. Devido à diversidade estrutural dos peptídeos, não existe uma metodologia universal. A empresa ou o grupo de pesquisa deve procurar pela melhor estratégia de acordo com as características de seu peptídeo.

1.4 O mercado de peptídeos

Vivemos um momento no qual a rigidez dos órgãos de regulamentação sobre a eficácia, qualidade e segurança de fármacos baseados em formulações já conhecidas prejudicaram a aprovação de novos medicamentos. O aumento nas exigências, apesar de transmitir confiança para a população, aumenta drasticamente o tempo de pesquisa e, conseqüentemente, o custo de pesquisa e desenvolvimento. Nesse cenário a indústria farmacêutica se vê em um momento de urgente necessidade de inovação e acredita-se que a pesquisa com peptídeos seja a saída (VLIEGHE et al., 2010; FOX, J. L. 2013; UHLIG et al., 2014; FOSGERAU e HOFFMANN 2015; SACHDEVA, S. 2017).

É importante mencionar que apesar de uma área de grande interesse, a pesquisa com peptídeos ainda é desafiadora, uma vez que o caminho que um peptídeo-fármaco precisa percorrer para a sua aprovação é fastidioso e muitas vezes envolve modificar sua estrutura original para melhorar suas propriedades físico-químicas (VLIEGHE et al., 2010; UHLIG et al., 2014; FOSGERAU e HOFFMANN, 2015). O trabalho de FOSGERAU e HOFFMAN (2015) traz uma análise FOFA sobre peptídeos como agentes terapêuticos (Figura 5).

Em 2016, 24 cientistas da academia e da indústria se juntaram e escreveram uma revisão sobre as alternativas aos antimicrobianos, com o objetivo de construir um portfólio com as áreas que julgaram serem as melhores para investimentos pelo setor de saúde de por empresas farmacêuticas. 19 alternativas foram selecionadas e as 10 melhores foram analisadas mais a fundo, dentre elas, encontram-se os AMPs (para efeito antimicrobiano direto), HDPs (para efeitos antimicrobianos indiretos) e peptídeos anti-biofilme. Entretanto, mais pesquisas básicas são necessárias para essas três áreas (CZAPLEWSKI et al., 2016).

<p>Forças</p> <ul style="list-style-type: none"> • Boa eficácia, segurança e tolerância • Alta seletividade e potência • Menos tempo de pesquisa até atingir o mercado • Menores taxas de atrito • Protocolos sintéticos bem estabelecidos • Baixa aquisição de resistência por microrganismos (AMP e HDP) 	<p>Oportunidades</p> <ul style="list-style-type: none"> • Descoberta de novos peptídeos, incluindo a fragmentação de proteínas • Bibliotecas especializadas e sequências otimizadas • Desenvolvimento da fórmula • Rotas de entrega do fármaco diferentes da parenteral • Peptídeos multifuncionais e conjugados
<p>Fraquezas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Instabilidade físico-química • Tendência a hidrólise e oxidação • Agregação • Baixa meia-vida e rápida eliminação • Normalmente não é um medicamento oral 	<p>Ameaças</p> <ul style="list-style-type: none"> • Imunogenicidade • Novas descobertas na genômica, proteômica e medicina personalizada • Expiração de patentes • Custo de produção e retorno de investimento • Aumento na eficácia e na estabilidade de novos fármacos

Figura 5 – Análise das forças, oportunidades, fraquezas e ameaças (FOFA) de peptídeos naturais. Adaptada de FOSGERAU e HOFFMAN, 2015.

As propriedades antimicrobianas ainda possuem prioridade nos testes farmacológicos iniciais. A busca por alternativas à antimicrobianos, como exemplificada acima pelo trabalho de CZAPLEWSKI et al. (2016), é o foco da indústria farmacêutica, apesar de ela estar se diversificando. Como os autores comentam, a dificuldade da diversificação do alvo (no caso, o microrganismo) dos fármacos é o risco econômico atrelado a ela. Portanto, observa-se que as empresas focam no tratamento de infecções populares, aumentando a probabilidade de retorno do investimento, o que estagna o processo de inovação. Esta linha de raciocínio é também abordada por KOLA e LANDIS (2004). Ambos discutem sobre a necessidade de se melhorar as etapas iniciais do desenvolvimento, inovando com segurança. CZAPLEWSKI et al. (2016) vai além, sugerindo a criação de times multidisciplinares, juntando profissionais da indústria e da academia, assim como parcerias entre grandes e pequenas empresas durante os desenhos

experimentais e os primeiros resultados, quando ainda se sabe pouco do produto e sobre seu futuro no mercado.

Com uma boa estratégia de desenvolvimento, uma empresa pode reduzir significativamente seus gastos, graças às diferentes metodologias para a modificação estrutural, produção e purificação desenvolvidas por grupos ao redor do mundo (LATHAM, P. W. 1999; VLIEGHE et al., 2010; WIBOWO e ZHAO, 2019). A cada ano temos novos peptídeos sendo catalogados e estudados quanto às suas propriedades farmacológicas, demonstrando não somente viabilidade, como também o potencial desta área (UHLIG et al., 2014; LAU e DUNN, 2018). A Tabela 2 traz alguns exemplos encontrados em revisões sobre o cenário de pesquisa e desenvolvimento dessas moléculas.

Existe uma grande variedade de bancos de dados com acesso livre para o estudo de peptídeos, como o [PeptideAtlas](#), [LAMP2](#) e [PepBank](#). Estes são apenas alguns exemplos que estão presentes no domínio [SATBdb](#), um banco de dados com links para 24 servidores de predição de peptídeos e 48 bancos de dados diferentes (em funcionamento), com ênfase em peptídeos terapêuticos.

Tabela 2 – Peptídeos terapêuticos e suas indicações. Baseada nos trabalhos de FOX J. K. 2013, CZAPLEWSKI et al., 2016 e KASPAR e REICHERT, 2018.

Empresa	Peptídeo	Descrição	Indicação
FOX J. L. 2013			
Dipexium Pharma	Pexiganan acetato	AMP linear de 22 aa	Úlcera de pé diabético
Lytix Biopharma	LTX-109	Tripeptídeo sintético	Colonização nasal por <i>S. aureus</i> multiresistente
Iminex	IMX924	IDR de 5 aa	Infecção com bactérias gram-positivas e negativas
CZAPLEWSKI et al., 2016			
Roche	POL7080	Peptídeo sintético cíclico de 14 aa	Infecções com <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Novacta Biosystems	NVB302	Lantibiótico tipo B	Infecções com <i>Clostridium difficile</i>
KASPAR e REICHERT, 2018			
Merck Serono	Cilengitide	Pentapeptídeo cíclico sintético	Glioblastoma
Novartis	Pasireotide	Hexapeptídeo cíclico sintético	Doença de Cushing
Novo Nordisk	Semaglutide	Peptídeo linear de 37 aa similar à GLP-1	Diabetes Tipo 2
Bristol-Myers Squibb	Exenatide	Peptídeo mimético de incretina de 39 aa	Diabetes Tipo 2

1.5 Bioprospecção de peptídeos em peçonha

Há uma urgência para a descoberta de alternativas aos antimicrobianos, devido ao aumento de casos de infecções por superbactérias (WATKINS e BONOMO, 2016). Concomitantemente, tivemos os avanços nas técnicas de produção de peptídeos sintéticos e o aumento no número de peptídeos sendo testados como fármacos pelas empresas farmacêuticas (VLIEGHE et al., 2010; UHLIG et al., 2014). Este cenário contribuiu para um aumento na bioprospecção de AMPs na natureza.

A peçonha de animais são fontes ricas em moléculas bioativas. O processo de evolução desses animais contribuiu para a construção de uma biblioteca de potentes toxinas, enzimas e peptídeos que, muitas vezes, possuem uma alta seletividade (PRIMON-BARROS e JOSÉ MACEDO, 2017; CHEN et al., 2018). Entretanto, quando isoladas e administradas em baixas doses, algumas dessas moléculas perdem sua toxicidade e atuam de maneira terapêutica (PERUMAL SAMY, R. 2017; PRIMON-BARROS e JOSÉ MACEDO, 2017; CHEN et al., 2018). Como exemplo, a toxina CaTx-II da cascavel *Crotalus adamanteus*, além de um potente antimicrobiano, ela também promove a recuperação de tecidos em camundongos, quando aplicada topicamente (SAMY et al., 2014). Dentre alguns dos efeitos observados de peptídeos na peçonha, lista-se: antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anticancerígeno, analgésico e imunomodulador (HMED et al., 2013; ALMAAYTAH e ALBALAS, 2014; ORTIZ et al., 2015; CHEN et al., 2018). Dessa maneira, AMPs da peçonha de cobras, caracóis-cone, aranhas e escorpiões, dentre outros animais, têm sido cada vez mais procurados e caracterizados (PRIMON-BARROS e JOSÉ MACEDO, 2017; CHEN et al., 2018).

Escorpiões são artrópodes que vivem na terra há quase 400 milhões de anos. Durante esse tempo a peçonha de suas glândulas se tornou altamente especializado para a sobrevivência de cada uma das mais de 1700 espécies descritas, em seus respectivos habitats. A peçonha desses animais é uma mistura complexa de peptídeos, enzimas, metaloproteínas, mucoproteínas, aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas, sais inorgânicos e, provavelmente, substâncias ainda desconhecidas (HMED et al., 2013; ORTIZ et al., 2015; PRIMON-BARROS e JOSÉ MACEDO, 2017). Estima-se que há cerca de 100 mil peptídeos disponíveis através das espécies de escorpiões e, desses peptídeos, estima-se que conheçamos apenas 1% (HMED et al., 2013).

Os peptídeos encontrados na peçonha de escorpiões são classificados em dois grupos: peptídeos com pontes dissulfeto (DBP, do inglês *disulfide-bridged peptides*) e peptídeos sem

pontes dissulfeto (NDBP, do inglês *non-disulfide-bridged peptides*). Os DBPs são compostos que costumam ter afinidade por canais iônicos da membrana de eucariotos e são subdivididos em 4 famílias de acordo com o canal iônico com o qual interage. As neurotoxinas da peçonha de escorpiões encontram-se nessa classificação (REMIJSEN et al., 2010; ALMAAYTAH e ALBALAS, 2014; HARRISON et al., 2014; ORTIZ et al., 2015). Como formam pontes dissulfeto, eles podem adotar a estrutura secundária folha- β , além de α -hélice, ademais de apresentar uma relação estrutura-função mais conservada que a de NDBPs. Por sua vez, NDBPs são mais versáteis quanto aos seus alvos e possuem maior variedade estrutural. A maioria desses peptídeos são catiônicos, anfífilicos e adotam uma estrutura secundária de α -hélice (ALMAAYTAH e ALBALAS, 2014). Curiosamente, os peptídeos dessa classe não possuem estrutura definida em soluções aquosas, adotando a conformação de α -hélice apenas em soluções que mimetizam membranas (ALMAAYTAH e ALBALAS, 2014; HARRISON et al., 2014; ORTIZ et al., 2015).

O início das pesquisas com componentes da peçonha de escorpião foi marcado pela identificação de peptídeos com maior massa molecular (toxinas – DBPs). Entretanto, com os avanços nas técnicas de biologia molecular como a confecção de bibliotecas de cDNA, expressão heteróloga e RNA-Seq, percebeu-se que NDBPs representam mais de 1 terço de todas as moléculas presentes na peçonha (ALMAAYTAH e ALBALAS, 2014; ORTIZ et al., 2015). Os AMPs presentes na peçonha possuem representantes da classe DBP, com estruturas homólogas a defensinas do sistema imune de insetos. Porém, a maioria deles são classificados como NDBPs. Sugere-se que esses AMPs possuem papel protetor na glândula da peçonha e de facilitador na atuação de outras neurotoxinas (HARRISON et al., 2014).

Como mencionado acima, a versatilidade estrutural de NDBPs contribui para sua multiplicidade de efeitos. ALMAAYTAH e ALBALAS (2014) e ORTIZ et al. (2015) fazem um ótimo trabalho em aglutinar diversos NDBPs e classificá-los com base em seus efeitos, dentre eles: antimicrobianos, antifúngicos, potenciadores dos efeitos de bradicinina, anticancerígenos, antivirais e imunomoduladores. Dentre os peptídeos abordados, estão a Parabutoporina (PP – 45 aa, carga +7) e a Opistoporina 1 (OP1 – 44 aa, carga +4). Ambos são AMPs com maior eficiência contra bactérias Gram negativas (MOERMAN et al., 2002), mas que também possuem propriedades imunomodulatórias.

No trabalho de MOERMAN et al. (2003), foi avaliada os efeitos de PP e OP-1 nos níveis de Ca^{2+} intracelular de células HL-60. Essa é uma linhagem celular de leucemia mielóide humana cuja diferenciação em granulócitos pode ser induzida em cultura. Estudos prévios desse

grupo mostraram que PP e OP-1 estimulavam a degranulação de granulócitos humanos, um evento mediado pela mobilização de Ca^{2+} . De fato, esses peptídeos aumentaram a concentração de Ca^{2+} intracelular, sendo PP o mais potente. O mesmo grupo, em um estudo subsequente, observou que PP possuía atividade sobre neutrófilos, estimulando a quimiotaxia e reduzindo a produção de superóxidos (WILLEMS et al., 2004). Intrigados por essa atuação, o grupo decidiu por analisar os efeitos de PP sobre a família Rho de proteínas G, envolvida com a quimiotaxia e a atividade enzimática do complexo proteico NADPH oxidase, responsável pela produção de superóxidos. Os resultados obtidos mostraram que, em doses submicromolares não líticas, PP ativava a proteína Rac (da família Rho), promovendo a quimiotaxia. Foi concluído que, devido à sua estrutura linear em α -hélice, PP inseria-se na membrana plasmática e ativava diretamente proteínas G, que ativavam Rac em sequência. Entretanto, a ativação de Rac deveria levar à produção de superóxidos pelo complexo NADPH oxidase, mas contraditoriamente foi observado a redução de tais radicais. A hipótese levantada sugeria que a inserção de PP na membrana provavelmente comprometia a formação do complexo.

Em 2018, KIM et al. analisou os mecanismos à base da atividade antibacteriana e antibiofilme do NDBP Hp1404 (14 aa, carga +1) e de seus análogos (12 aa, cargas variadas). Isolado da peçonha do escorpião *Heterometrus petersii*, Hp1404 possui atividade antimicrobacteriana ($< 25 \mu\text{g/mL}$) contra diferentes bactérias gram-positivas, mas não contra gram-negativas (LI et al., 2014). Visando reduzir a citotoxicidade desse peptídeo, peptídeos análogos truncados foram sintetizados, substituindo resíduos de Glicina e Fenilalanina por resíduos de Lisina e Leucina. Dos análogos sintetizados, Hp1404-T1e (carga +6) foi o que apresentou melhor atividade antibacteriana. Eles também investigaram se os peptídeos eram capazes de se ligar a LPS. Para tanto, depois de determinar a CIM de todos os peptídeos contra *P. aeruginosa*, eles desafiaram a bactéria com os peptídeos em suas respectivas CIMs e 2x CIMs, concomitante à adição de LPS em diluição seriada em fator de 2 (100 a 0,39 $\mu\text{g/mL}$). Todos os peptídeos análogos testados tiveram sua atividade antibacteriana significativamente reduzida na presença de LPS, enquanto o peptídeo original não. Como todos os análogos eram mais carregados positivamente que o original, concluiu-se que o aumento da carga positiva de NDBPs aumenta a sua afinidade pela superfície bacteriana. Em adição, sugere-se que NDBPs podem ser efetivos contra inflamações induzidas por LPS.

1.6 O peptídeo ToAP-2 – trabalhos prévios do grupo

Nosso grupo, em parceria com outros colaboradores, caracterizou a atividade antifúngica de diferentes peptídeos, sintetizados quimicamente a partir de prováveis sequências de cDNA das glândulas da peçonha de escorpiões. Destes, destaca-se ToAP-2 (UniProtKB # [A0A1D3IXJ5](#)), do escorpião *Tityus obscurus*, um NDBP membro da subfamília 3 (GUILHELMELLI et al., 2016).

O peptídeo ToAP-2 é um peptídeo anfipático e catiônico (carga +6) de 26 aa (FFGTLFKLGGSKLIPGVMKLFSKKKER). Sua estrutura secundária putativa (α -hélice) foi determinada por dicroísmo circular em concentrações crescentes de trifluoroetanol (TFE), um solvente indutor de estrutura secundária que cria um ambiente que mimetiza membranas celulares (Figura 6). Dos peptídeos sintetizados, ele apresentou a melhor atividade antifúngica, com a CIM para *Candida albicans* (SC5314) e *C. neoformans* (H99, sorotipo A) em 12.5 μ M. Em concentrações abaixo de 6.25 μ M, ToAP-2 apresenta tanto uma baixa atividade hemolítica quanto uma baixa citotoxicidade contra macrófagos peritoneais e outros tipos celulares (GUILHELMELLI et al., 2016).

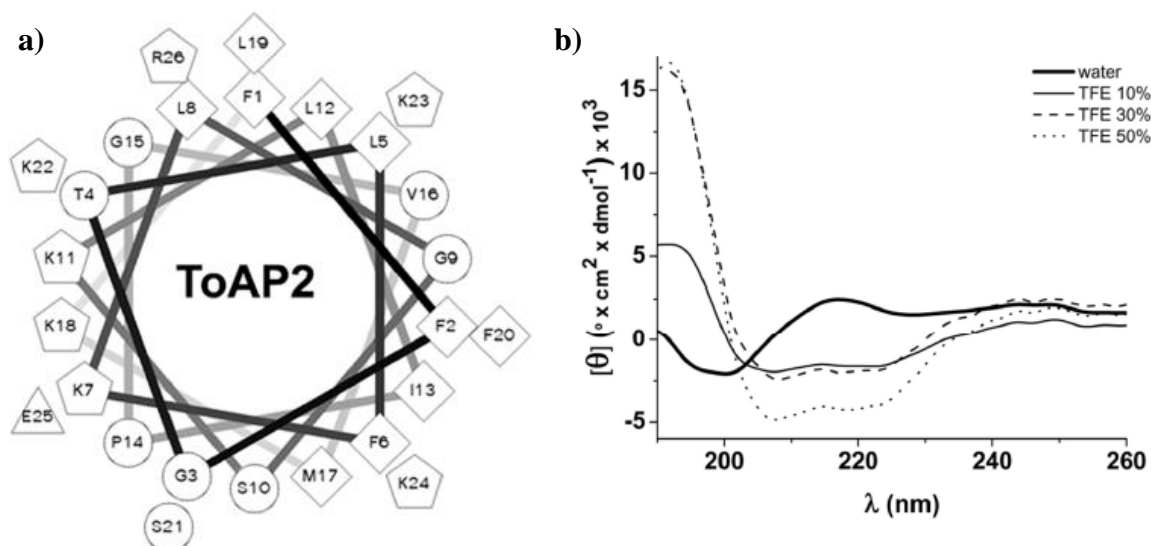
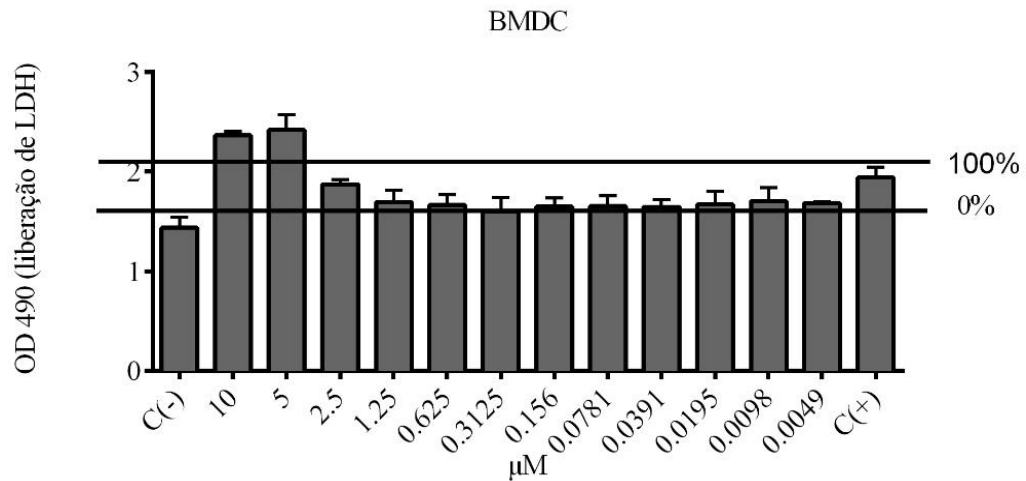


Figura 6 – Estrutura do peptídeo ToAP-2. (a) Projeção da estrutura α -hélice do peptídeo ToAP-2. Diamantes: resíduos hidrofóbicos; círculos: resíduos hidrofílicos não carregados; pentágonos: resíduos positivamente carregados; triângulos: resíduos negativamente carregados. (b) Dicroísmo circular, espectro FAR-UV, do peptídeo ToAP-2. O pico positivo em ~ 190 nm e os dois negativos em 208 e 222 nm são característicos de estrutura α -hélice. Imagens adaptadas de GUILHELMELLI et al., 2016.

Outro interesse do grupo foi explorar a possível atividade imunomoduladora de alguns desses peptídeos (dados não publicados). Desse trabalho preliminar, foram selecionados os melhores candidatos para testes de imunomodulação em macrófagos tipo M1 (BMM) e células dendríticas (BMDC) derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6. Para tanto, inicialmente foi determinada a citotoxicidade de ToAP-2 sobre esses tipos celulares, medindo a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), de acordo com protocolo padrão seguindo-se as instruções do fabricante (*CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* - Promega). Observou-se que ToAP-2 não apresentava citotoxicidade para BMMs e BMDCs quando em concentrações abaixo de 2.5 e 1.5 μM , respectivamente (Figura 7).

a)



b)

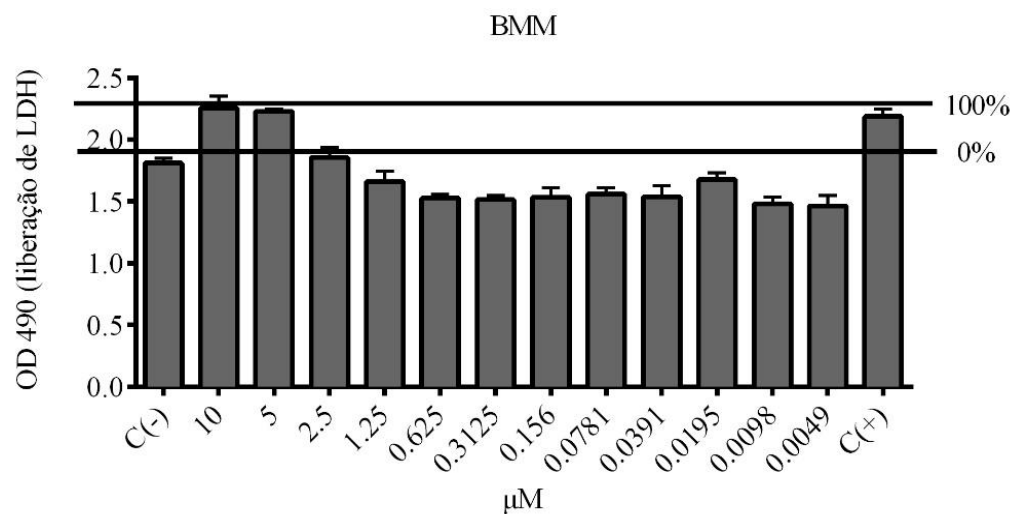


Figura 7 – Citotoxicidade de ToAP-2. (a) BMDCs e (b) BMMs. Os grupos controles empregados foram: C- (controle negativo – células não tratadas) e C+ (controle positivo – células tratadas com solução de lise celular fornecida pelo fabricante). Dados não publicados.

Em seguida, a possível atividade imunomodulatória de ToAP-2 foi avaliada pela dosagem de citocinas e quimiocinas por ensaio Luminex® de BMMs e BMDCs não tratadas, ou expostas ao peptídeo em uma concentração próxima à citotóxica (2.5 µM), ou em uma concentração intermediária (0.625 µM). Como mostrado na Figura 8, foi observado um aumento na secreção de IL-1α, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2 e TNF-α por BMDCs e uma redução na secreção de IP-10, MCP-1 e MIP-1β por BMM, indicando perfis tanto pró- quanto anti-inflamatório, respectivamente (dados não publicados).

2. Justificativa

Atualmente, o cenário para a pesquisa com AMPs e HDPs para a caracterização de suas atividades imunomodulatórias e antimicrobianas não poderia ser melhor. Ao longo do texto, foram abordados tópicos, que alicerçam a importância do trabalho com peptídeos, tais como:

- 1) A necessidade de inovação pelas empresas farmacêuticas para a geração de novos antimicrobianos (VLIEGHE et al., 2010; UHLIG et al., 2014; CZAPLEWSKI et al., 2016).
- 2) A flexibilização das exigências dos órgãos governamentais para novas moléculas (FOX, J. L. 2013).
- 3) Os avanços nas técnicas de produção, reduzindo gastos e oferecendo alternativas para as empresas (VLIEGHE et al., 2010; UHLIG et al., 2014; SACHDEVA, S. 2017; WIBOWO e ZHAO, 2019).
- 4) O aumento do número de peptídeo-fármacos no mercado e o reconhecimento do potencial dessa área (VLIEGHE et al., 2010; UHLIG et al., 2014; FOSGERAU e HOFFMANN, 2015; SACHDEVA, S. 2017).
- 5) A multiplicidade de alvos dos AMPs em microrganismos, além de sua baixa probabilidade de selecionar organismos resistentes (ZASLOFF, M. 2002; BROGDEN, K. A. 2005; LAI e GALLO, 2009; YU et al., 2018).
- 6) A importância de HDPs no balanço de estímulos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na resposta imune (LAI e GALLO, 2009; VANDAMME et al., 2012; MANSOUR et al., 2014; HANCOCK et al., 2016).
- 7) A necessidade de se ampliar o conhecimento sobre os efeitos de AMPs e HDPs tendo a modulação do sistema imune como alvo em terapias contra agentes patogênicos (BROWN et al., 2007; HANCOCK et al., 2012).

Adicionalmente, algumas características descritas para o AMP ToAP-2 podem ser mencionadas como de interesse para seu estudo em nosso grupo de pesquisa:

- 1) Estrutura catiônica alfa-helicoidal de ToAP-2, característica compartilhada com a catelecidina LL-37 (VANDAMME et al., 2012).
- 2) As pesquisas envolvendo outros NDBPs catiônicos α -helicoidais, como OP1, PP (MOERMAN et al., 2003; REMIJSEN et al., 2010) e Hp1404 (KIM et al., 2018), e a descrição de seus mecanismos antimicrobianos e potencial imunomodulatório.

3) Os dados preliminares que sugerem uma atividade imunomodulatória em BMMs e BMDCs, motivam a caracterização dessa atividade de ToAP-2.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil imunomodulatório de ToAP-2 em BMMs e BMDC de camundongos da linhagem C57BL/6

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos de ToAP-2 sobre a fagocitose de *C. neoformans* por BMMs e BMDCs
- Avaliar os efeitos de ToAP-2 sobre a capacidade fungicida de BMMs infectados com *C. neoformans*
- Avaliar os efeitos de ToAP-2 no perfil de secreção de citocinas de BMMs e BMDCs estimulados com LPS ou LPS ULT
- Avaliar os efeitos de LPS ULT na CIM de ToAP-2 contra *E. coli* e *C. neoformans*

4. Materiais e Métodos

4.1 Soluções e meios de cultura

Para os experimentos, foram utilizados os seguintes meios e soluções:

- 1) RPMI-1640 (*Gibco*), pH 7,2 a 7,4. Para meio RPMI-1640 + MOPS, foi adicionado MOPS para uma concentração final de 165 μM .
- 2) Soro fetal bovino (SFB; *Gibco*).
- 3) Tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) pH 7,2 ~ 7,4: NaCl 0,13 M, KCl 2,68 μM , KH_2PO_4 0,273 μM , Na_2HPO_4 12,53 μM .
- 4) Sabouraud Dextrose (*KASVI*) pH 5,0: dextrose 20 g/L, peptona 5 g/L, caseína 5 g/L. Para meio sólido, foi adicionado ágar (1,5%).
- 5) Mueller Hinton: Extrato de carne bovina 2 g/L, hidrolisado ácido de caseína 17,5 g/L, amido 1,5 g/L. Para meio sólido, foi adicionado ágar (1,7%).

4.2 Síntese química de ToAP-2

ToAP-2 (FFGTLFKLGSKLIPGVMKLFSSKKKER) foi quimicamente sintetizado pela Biomatik utilizando a metodologia FMOC-Butila e subsequentemente purificado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, conforme descrito por GUILHELMELLI et al. (2016). O peptídeo em estoque (liofilizado) foi diluído em água Milli-Q (3330 $\mu\text{M} \approx 10 \text{ mg/mL}$) de e armazenado a -20°C . Foram feitas diluições intermediárias (200 $\mu\text{M} \approx 600 \mu\text{g/mL}$) em água Milli-Q, as quais também foram armazenadas a -20°C , para a execução dos experimentos. As diluições dos peptídeos, a depender do ensaio, foram feitas em meio RPMI-1640 ou RMPI-1640 + MOPS ou MH.

A análise para confirmação da sequência e do grau de pureza do peptídeo ToAP-2 após a síntese foi feita de acordo com o escrito por GUILHELMELLI F. (2019). Resumidamente, uma alíquota do peptídeo após ressuspensão foi analisada em espectrômetro de massa (MALDI-TOF/TOF UltraFlex III Bruker Daltonics®, Alemanha) para a confirmação da massa molecular do peptídeo e avaliação da pureza da síntese. O peptídeo foi misturado a uma matriz de ácido α -cyano-4-hidroxi-cinâmico, volume/volume (1:1), sendo posteriormente aplicado em triplicada em uma placa Bruker MTP Massive 384. Após a cristalização, as amostras foram analisadas. Os espectros de massa foram obtidos com o equipamento sendo operado no modo

refletido positivo. A interpretação dos espectros obtidos foi realizada manualmente e com o auxílio do software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Alemanha) por colaboradores participantes do projeto.

4.3 Condições de cultivo de microrganismos

4.3.1 *Cryptococcus neoformans*

A cepa H99 de *C. neoformans* foi obtida a partir de estoques de cultura em glicerol 35%, mantidos a -80 °C. Para realizar os ensaios, uma pequena porção do estoque foi coletada, com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável, e semeada pelo método de esgotamento em uma placa de Petri (60 x 10 mm, *JProlab*) contendo meio Sabouraud Dextrose ágar. A placa era incubada em uma estufa a 30 °C e mantida por 48 h. Em seguida, a placa era mantida sob refrigeração (4 °C) e usada para o preparo do inóculo por até 2 semanas.

O inóculo para a infecção foi feito a partir de uma colônia isolada, em 5 mL de meio Sabouraud Dextrose (pH 5,0), e incubado por 24 h a 30 °C sob agitação (200 rpm). Em seguida, a cultura foi centrifugada (1300 x g, por 5 min, à temperatura ambiente), o sobrenadante descartado e o pellet foi resuspenso em PBS (lavagem). Esse procedimento foi repetido três vezes. Após a terceira lavagem, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 ou PBS e a concentração foi determinada utilizando-se uma câmara de Neubauer.

4.3.2 *Escherichia coli*

A cepa ATCC® 700336 de *E. coli* foi obtida a partir de estoques de cultura em glicerol 25% mantidos a -80 °C. Para realizar os ensaios, uma pequena porção do estoque foi coletada, com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável, mergulhada em 5 mL de meio Mueller-Hinton (pH 7,2 a 7,4) e incubada por 12 a 18 h a 37 °C sob agitação (200 rpm). Em seguida, uma alça bacteriológica descartável foi mergulhada no pré-inóculo e as células obtidas foram semeadas por esgotamento em uma placa de Petri (60 x 10 mm, *JProlab*) contendo meio Mueller-Hinton ágar. A placa foi incubada em uma estufa a 37 °C por 12 a 18 h e mantida sob refrigeração (4 °C) para preparo do pré-inóculo por até 4 semanas.

O pré-inóculo para os ensaios foi feito a partir de uma colônia isolada, em 5 mL de meio Mueller-Hinton e incubado por 12 a 18 h a 37 °C sob agitação (200 rpm). O inóculo na placa de Petri foi feito igualmente como descrito acima. As colônias geradas foram coletadas e adicionadas à PBS até atingirem a turbidez de uma solução de McFarland de 0,5 (valores de densidade óptica entre 0,1 e 0,08), medidas pelo SpectraMax[®] M2e (*Molecular devices*), e foram utilizadas nos ensaios da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo ToAP-2.

4.4 Animais

Camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem C57BL/6 de oito a doze semanas foram utilizados para a obtenção de células dendríticas e macrófagos derivados e medula. Os animais eram mantidos em condições sanitárias apropriadas, com fornecimento de comida e água *ad libitum*. Todos foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB).

Todos os procedimentos experimentais executados e o alojamento dos animais está de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do IB da UnB (UnB DOC n° 52657/2011), conforme o Anexo 1

4.5 Obtenção de células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea

As células da medula óssea foram obtidas a partir da lavagem dos fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6, de acordo com o protocolo descrito por LUTZ et al. (1999), com modificações. Resumidamente, após a coleta e limpeza dos ossos, estes eram transportados para um fluxo laminar em condições estéreis. Em seguida, os ossos foram cortados e as células foram recuperadas da cavidade medular por meio de uma lavagem com meio RPMI-1640, utilizando uma seringa com agulha de diâmetro 0,45 x 13 mm, a qual era inserida no ponto de corte. As células obtidas foram filtradas por um *cell strainer* de 40 µm e, em seguida, centrifugadas (300 x g, por 5 min, à temperatura ambiente). Após o descarte do sobrenadante, as células foram lisadas pela adição de 1 mL da solução de lise de hemácias (*Red Blood Cell Lysing Buffer; Sigma-Aldrich*) por 1 min, conforme recomendado pelo protocolo do kit. A neutralização dessa solução ocorria pela adição de 5 mL de meio RPMI-1640. Após um novo ciclo de centrifugação

e descarte de sobrenadante, o pellet foi resuspendido em meio RPMI-1640 e a concentração de células determinada utilizando câmara de Neubauer. A viabilidade celular era avaliada pela coloração com Azul de Tripano 0,2% (*Sigma-Aldrich*), onde células coradas eram consideradas mortas. Em placas de Petri de poliestireno, não tratadas e não pirogênicas (100 x 20 mm, *Coring*), foram adicionadas 2×10^6 células, em 10 mL de meio completo para diferenciação: RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, 20 $\eta\text{g/mL}$ de fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e 50 μM de β -mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*). As placas foram mantidas em uma estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.

Nos terceiros e sextos dias de incubação, as células foram suplementadas com o meio nas condições acima, para estimular a diferenciação. Entretanto, antes da suplementação no sexto dia, devido ao limite de volume da placa, 10 mL do meio de cada uma foram coletados e centrifugados (a 300 x g, por 5 min, à temperatura ambiente). O precipitado era resuspendido em 10 mL de meio completo recém preparado e as células devolvidas à placa de origem.

No oitavo dia de diferenciação, as populações de células foram separadas. Células não aderidas, ou fracamente aderidas, foram consideradas BMDCs, já as aderidas foram consideradas BMMs. Todo o volume de meio das placas foi coletado e foi feita uma lavagem da placa, com uma micropipeta, apenas adicionando 1 mL meio RPMI-1640, deixando-o escorrer pela superfície para coletar as células fracamente aderidas. Para soltar os BMMs aderidos à placa, foram acrescentados 2 mL do reagente TrypLE (*Gibco*) por placa, cobrindo toda a superfície, as quais foram incubadas por 20 min na estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. Logo depois, com o auxílio de um *cell scraper*, BMMs foram soltos e coletados. BMMs e BMDCs recém coletados foram centrifugados (a 300 x g, por 5 min, à temperatura ambiente) e o pellet resuspendido em meio RPMI-1640, seguido da contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram semeadas de acordo com o experimento a ser executado.

4.6 Avaliação dos efeitos de ToAP-2 na capacidade de fagocitose de leveduras de *C. neoformans* por BMMs e BMDCs

Em microplacas de poliestireno de 96 poços (*KASVI*), foram semeados em cada poço, 5×10^4 BMMs ou BMDCs em 200 μ L de meio RPMI-1640 suplementado e as microplacas de cultura incubadas *overnight* na estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. No dia do ensaio, o sobrenadante fora descartado imediatamente antes dos tratamentos.

Para determinar os efeitos de ToAP-2 na atividade fagocítica de BMMs e BMDCs, as células foram incubadas com leveduras de *C. neoformans* (H99) opsonizadas com o anticorpo monoclonal 18b7 (10 μ g/mL, como descrito por CASADEVALL et al. (1998)). A proporção fagócito:fungo foi definida por uma multiplicidade de infecção (MOI, do inglês *multiplicity of infection*) de 2 (2 leveduras por BMM ou BMDC). O meio RPMI-1640 suplementado contendo a levedura opsonizada (MOI = 2) foi denominado de meio de infecção (MI).

Duas concentrações diferentes de ToAP-2 foram utilizadas: 0,5 e 1 μ M. As placas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 30 min e 2 h. Foram testados duas formas de tratamento com o peptídeo: (1) pré-tratamento das células, seguido da infecção e (2) o tratamento simultâneo das células à infecção. Cada um desses desenhos experimentais foi detalhado na página seguinte. O grupo experimental controle foi constituído por células não tratadas com ToAP2.

Independente do tratamento, após o período de infecção, as placas foram retiradas da estufa e todos os poços tratados foram lavados duas vezes com PBS, para a retirada de leveduras não internalizadas. Em seguida, as células foram coradas com o kit Panótico Instant Prov (*Newprov*), seguindo as instruções do fabricante, com algumas modificações. Resumidamente, foi adicionado cada uma das soluções por um tempo determinado e, no final deste, esta era removida. As soluções foram adicionadas na sequência numérica, conforme descrito a seguir: solução I (ciclohexadienos a 0,1 % - 15 s); solução II (azobenzensulfônico a 0,1 %; estabilizante I à 3 % e conservante a 0,26 % - 17 s); solução III (fenoltiazinas a 0,1 %; estabilizante a 1,5 %; conservante a 0,26 % - 10 s).

As células coradas foram fotografadas pelo *software* ZEN 2.0 (blue edition; Carl Zeiss Microscopy), utilizando a câmera ZEISS Axiocam ERc 5s acoplada ao microscópio ZEISS

Primovert. Para a contagem das células e de leveduras, foi utilizado o *software* gratuito ImageJ 1.8. A partir das contagens, foi calculado o índice de fagocitose (IF) (Equação 1) e a porcentagem de células que fagocitaram. Foram considerados “ativados” BMMs e BMDCs que possuíam ao menos 1 levedura fagocitada. Para cada poço foram tiradas 4 fotografias de campos diferentes. Por campo, foram contadas 50 células, totalizando 200 células por poço, 600 por grupo. Todos os experimentos foram feitos em triplicata biológica.

(equação 1)

$$\text{Índice de Fagocitose} = \frac{\text{Número de fungos internalizados}}{\text{Número de células com fungos internalizados}}$$

Pré-tratamento de BMMs e BMDCs com ToAP-2 seguido de infecção

Para avaliar se a exposição prévia ao peptídeo ToAP-2 influenciaria na capacidade de fagocitose dos tipos celulares testados, foi adicionado 100 µL de meio RPMI-1640 suplementado (10 % SFB) e ToAP-2 nas concentrações de 0,5 e 1 µM. Ao grupo controle foi adicionado apenas meio RPMI-1640 suplementado. Em seguida, as placas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂ por 1 h. Após o período de exposição ao peptídeo, o meio foi retirado e, em cada poço, foi adicionado 100 µL do MI. As placas foram então mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂ por 30 min e 2 h. Todos os grupos foram preparados em triplicata.

Tratamento de BMMs e BMDCs com ToAP-2 simultâneo à infecção

Para avaliar os efeitos do peptídeo ToAP-2 na capacidade de fagocitose de BMMs e BMDCs durante a infecção, o peptídeo foi diluído nos 100 µL do MI, para as concentrações finais de 0,5 e 1 µM. Este volume foi, em seguida, colocado nos poços contendo as células. Ao grupo controle, foi adicionado 100 µL de MI (sem o peptídeo). As placas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂ por 30 min e 2 h. Todos os grupos foram preparados em triplicata.

4.7 Avaliação do possível efeito de ToAP-2 na capacidade fungicida de BMMs

Em microplacas de poliestireno de 96 poços (*KASVI*), foram semeados 5×10^4 BMMs em 200 μL de meio RPMI-1640 suplementado e incubados *overnight* na estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 . No dia do ensaio, o sobrenadante foi descartado imediatamente antes da adição do meio para os tratamentos.

Para determinar os efeitos de ToAP-2 na capacidade fungicida de BMMs, as células foram infectadas com leveduras de *C. neoformans* (H99, MOI = 2). Foram empregadas três estratégias de tratamento, abordadas em detalhe a seguir (grupos experimentais **A – G**). Todos os grupos foram preparados em triplicata. Foram realizados três ensaios em dias diferentes.

BMM na ausência de ToAP-2 no momento da infecção

Aos grupos **A**, **C** e **F** (Tabela 3) foi adicionado 100 μL de MI. As placas contendo BMMs e leveduras foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 por 2 h. Em seguida, as placas foram retiradas da estufa e todos os poços foram lavados três vezes com 200 μL de PBS, para a retirada de leveduras não fagocitadas. Após descartar o PBS da última lavagem, foi adicionado 200 μL de meio RPMI-1640 suplementado aos grupos **C** e **F** com o peptídeo ToAP-2, nas concentrações de 0,5 e 1 μM , respectivamente. Ao grupo **A** (controle) foi adicionado apenas 200 μL de meio RPMI-1640 suplementado. As placas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO_2 por 22 h.

Tratamento de BMM com ToAP-2 no momento da infecção

Aos grupos **B**, **D**, **E** e **G**, foram adicionados 100 μL do MI com o peptídeo ToAP-2 (concentrações indicadas na Tabela 3). As placas foram mantidas em uma estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 por 2 h. As placas então foram retiradas e os poços lavados com PBS como descrito acima. Após descartar o PBS da última lavagem, foi adicionado 200 μL de meio RPMI-1640 suplementado aos grupos **D** e **G** com o peptídeo ToAP-2 nas concentrações de 0,5 e 1 μM , respectivamente. Aos grupos **B** e **E**, foi apenas adicionado 200 μL de meio RPMI-1640 suplementado. As placas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO_2 por 22 h.

Tabela 3. Descrição da composição dos grupos experimentais para a avaliação influência de ToAP-2 na capacidade fungicida de BMMs.

Grupo	ToAP-2 (μM)	ToAP-2 durante a infecção	ToAP-2 após a infecção
A	-	-	-
B	0,5	+	-
C	0,5	-	+
D	0,5	+	+
E	1	+	-
F	1	-	+
G	1	+	+

Preparo das placas para contagem de células fúngicas viáveis (UFC)

Ao final das 22h, as placas foram retiradas da estufa e o sobrenadante de cada poço foi transferido para microtubos (*Eppendorfs*), cada um correspondendo a cada um dos poços relativos a cada uma das estratégias de tratamento descritas acima. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com 200 μL de PBS estéril e, ao final de cada lavagem, o PBS removido foi recuperado e transferido ao microtubos correspondente. Por fim, foi adicionado 200 μL de H_2O destilada estéril a 4 °C aos poços por 30 minutos, com o objetivo de provocar a lise osmótica dos BMMs e de liberar as leveduras fagocitadas. Ao final do tempo de lise dos fagócitos, o volume de H_2O de cada poço foi transferido ao seu microtubos correspondente. Para melhor visualização desse processo, ver esquema mostrado na Figura 8.

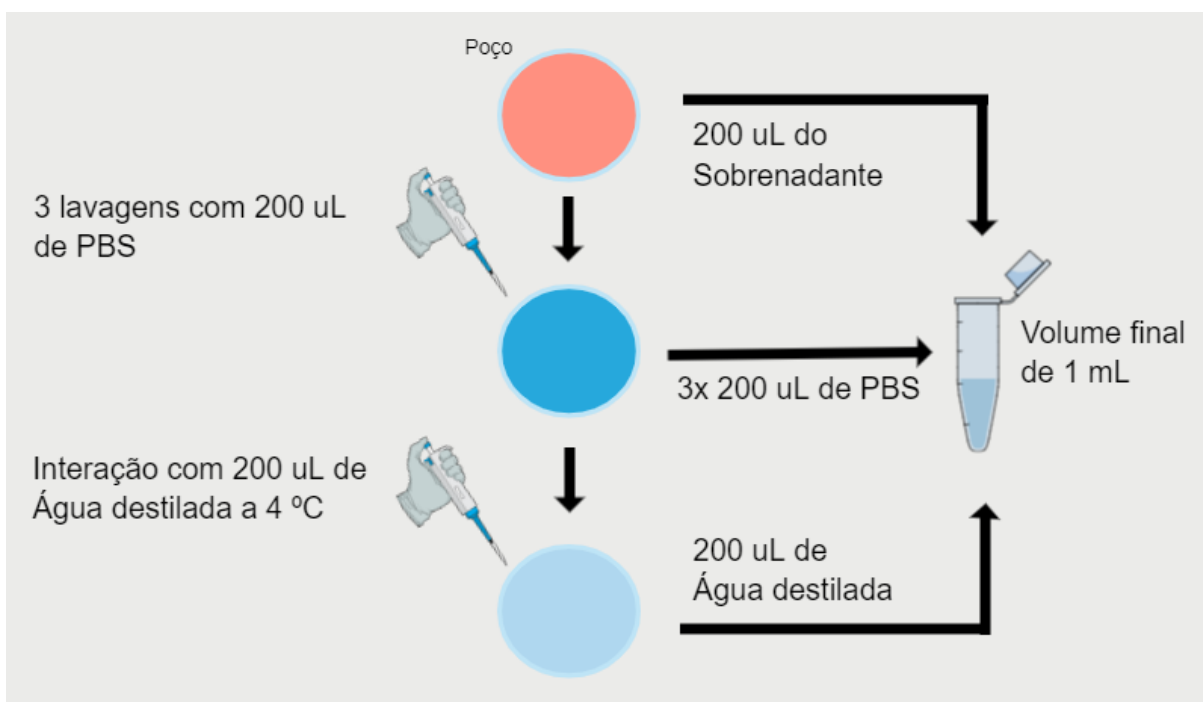


Figura 8. Esquema representativo para a coleta de toda a carga fúngica presente em cada poço. Após a interação de 22 h o sobrenadante é coletado. Em seguida, três etapas de lavagem com 200 µL de PBS ocorrem, com o volume sendo coletado após cada lavagem. Por fim, os fagócitos são lisados osmoticamente com a adição de 200 µL de H₂O destilada estéril a 4 °C, por 30 minutos. Ao final desse tempo de lise, o volume do poço também é recuperado e adicionado ao mesmo microtubos, totalizando um volume final de 1,0 mL.

O conteúdo de cada microtubos foi diluído 2,5, 25 e 125 vezes. Foram semeados 50 µL de cada diluição em uma seção de uma placa de Petri tripartida (90 x 15 mm, *JProLab*), contendo Sabouraud Dextrose ágar (1,5 %). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. Posteriormente, a viabilidade fúngica foi determinada pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

4.8 Avaliação da atividade de ToAP-2 na modulação da produção de citocinas e quimiocinas por BMMs e BMDCs

Em microplacas de poliestireno de 24 poços (*KASVI*), para o tempo de 24 h, 2×10^5 BMMs ou BMDCs foram semeadas com 500 μ L de meio RPMI-1640 suplementado, seguido de incubação *overnight* a 37 °C em estufa sob atmosfera de 5 % de CO₂. Para o tempo de 12 h, foram utilizadas o dobro de BMDCs (4×10^5), uma vez ter sido observado que a produção de citocinas pelo controle positivo (2×10^5 BMDCs expostas a LPS) foi relativamente baixa. Assim, para o tempo de 12 h, 2×10^5 BMMs ou 4×10^5 BMDCs foram semeadas, como descrito acima para o tempo de 24 h, e a seguir empregadas no ensaio para determinação da influência de ToAP-2 na produção de citocinas, conforme detalhado a seguir.

Para quantificação da secreção de citocinas e quimiocinas produzidas por BMMs e BMDCs, os grupos de tratamento foram incubados por 12 h ou 24 h a 37 °C, em estufa sob atmosfera de 5 % de CO₂. Ao final do tempo de interação, as placas de 24 poços foram centrifugadas (300 x g por 5 min, a temperatura ambiente) e o sobrenadante de cada poço foi coletado e armazenado a -20 °C. Todas as condições foram feitas em triplicata técnica e biológica.

Produção de citocinas em 24 horas

Após o descarte do meio colocado no dia anterior, foi adicionado, em cada poço, 500 μ L de meio RPMI-1640 suplementado, com o respectivo tratamento. Como controle positivo para indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, as células foram expostas por 24 h ao LPS de *E. coli* (Agonista TLR2/TLR4, LPS do sorotipo 055:B5, *Invivogen*) a 100 η g/mL. Como controle negativo, foi coletado o sobrenadante de BMMs e BMDCs sem nenhum estímulo. Em dois grupos, foi adicionado apenas ToAP-2 nas concentrações de 0,5 e 1 μ M. Em outros dois grupos, a exposição ao indutor de inflamação, LPS, foi feito concomitantemente à exposição ao peptídeo nas concentrações de 0,5 e 1 μ M (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição detalhada dos grupos de tratamento para a quantificação de citocinas secretadas por BMMs e BMDCs após 24 h. A concentração de LPS nos grupos estimulados é de 100 ng/mL. A quantificação de citocinas e quimiocinas foi realizada por ELISA.

Grupos	C-	0,5	1	LPS+0,5	LPS+1	LPS
ToAP2 (μM)	-	0,5	1	0,5	1	-
ToAP-2	-	+	+	+	+	-
LPS	-	-	-	+	+	+

Produção de citocinas em 12 horas

Após o descarte do meio colocado no dia anterior, foi adicionado, em cada poço, 500 μL de meio RPMI-1640 suplementado e com o respectivo tratamento. Como controle positivo para indução da produção de citocinas pró-inflamatórias as células foram expostas por 6 h ao LPS ultrapuro (LPS ULT) de *E. coli*, específico para TLR4 (Agonista TLR4, LPS ultrapuro do sorotipo 055:B5, *Invivogen*) a 100 ng/mL. Como controle negativo, foi coletado o sobrenadante de BMMs e BMDCs sem nenhum estímulo. Em dois grupos, foi adicionado ToAP-2 para uma concentração final de 0,5 ou 1 μM, 6 h antes do indutor pró-inflamatório (LPS ULT - 100 ng/mL). Em outros dois grupos, foram adicionados LPS ULT e ToAP-2, concomitantemente, para uma concentração final de 100 ng/mL e 0,5 ou 1 μM, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Descrição detalhada dos grupos de tratamento para a quantificação de citocinas secretadas por BMMs e BMDCs após 12 h. A concentração de LPS ULT nos grupos estimulados é de 100 ng/mL. A quantificação de citocinas e quimiocinas foi realizada por ELISA.

Grupos	C-	0,5→LPS ULT	1→LPS ULT	0,5+LPS ULT	1+LPS ULT	LPS ULT
ToAP-2 (μM)	-	0,5	1	0,5	1	-
ToAP-2 (6h antes de LPS ULT)	-	+	+	-	-	-
ToAP-2 e LPS ULT simultaneamente	-	-	-	+	+	-
LPS ULT	-	+	+	+	+	+

Quantificação da produção de citocinas e quimiocinas por ELISA

As dosagens das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10; e da quimiocina MCP-1, foram realizadas pela técnica ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) tipo *sandwich*, seguindo o protocolo estabelecido pelos fabricantes (*R&D Systems*). Resumidamente, microplacas de 96 poços de poliestireno com meia-área e de alta ligação (*MICROLON*[®]) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura para cada citocina e quimiocina, diluídos em PBS, e mantidas a 4 °C *overnight*. Em seguida, as placas passaram por uma etapa de lavagem: três lavagens, em sequência, com o tampão de lavagem (PBS com 0,05 % Tween 20, pH 7,2-7,4; *R&D Systems*). Após a etapa de lavagem, foi realizado o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos com o reagente diluente (1 % BSA em PBS pH 7,2-7,4, filtrado a 0,2 μ m) fornecido pelo fabricante (*DuoSet Ancillary Reagent kit 2*; *R&D Systems*), por 1 h à temperatura ambiente. Após uma nova etapa de lavagem, os sobrenadantes das culturas foram adicionados aos poços. Diluições foram feitas quando necessárias. Ao mesmo tempo, em duplicata, foram pipetadas as citocinas murinas recombinantes (*standards*) em diluição seriada de sete pontos, para determinar a curva padrão. As placas foram mantidas a 4 °C *overnight*. Escolheu-se TNF- α , IL-1 β e IL-6 por serem estimuladas quando da ativação do receptor TLR4 por LPS (LU et al., 2008; DEMON et al., 2014); IL-10 para averiguar potencial papel anti-inflamatório de ToAP-2; e MCP-1 por sua secreção aumentar na presença de LPS.

No terceiro dia, as placas passaram por uma nova etapa de lavagem, seguida da adição dos respectivos anticorpos biotinizados, diluídos com reagente diluente e incubadas por 2 h à temperatura ambiente. Após a incubação e uma nova etapa de lavagem, foi adicionado a enzima estreptavidina-peroxidase e as placas foram incubadas por 20 min, abrigadas da luz. Uma nova etapa de lavagem foi realizada e então foram adicionados os substratos H₂O₂ e tetrametilbenzidina para a reação enzimática (sempre abrigada da luz). Para interromper a reação, foi utilizado a solução *Stop* (2 N H₂SO₄; *R&D Systems*). A densidade óptica (DO) foi determinada pelo leitor de placas do aparelho SpectraMax[®] M2e (*Molecular devices*), a 450 nm. Com a DO da curva padrão como referência, foi determinada a concentração das amostras, utilizando o *software* SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices, LLC, San Jose, EUA).

4.9 Determinação da concentração inibitória mínima de ToAP-2 contra *E.coli*

A avaliação da CIM *in vitro* de ToAP-2 contra *E. coli* foi feita pelo método de microdiluição em caldo segundo a norma aprovada do Instituto Norte-Americano de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI – do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*), com algumas modificações. Resumidamente, em microplacas de poliestireno de 96 poços, foram feitas diluições seriadas em fator de 2 de ToAP-2 e Polimixina B (PMB, *Sigma Aldrich*), um peptídeo-antimicrobiano muito utilizado em tratamentos contra bactérias gram-negativas, para um volume de 50 µL em meio Mueller-Hinton (MH). Em seguida, 50 µL do inóculo (em meio MH) foi adicionado em cada poço. Para o volume final de 100 µL a concentração de *E. coli* era de 5×10^5 UFC/mL. As concentrações finais de ToAP-2 e PMB variaram de, aproximadamente, 30 a 0,12 µg/mL e 20 a 0,08 µg/mL, respectivamente. Como controle positivo para o crescimento bacteriano, foram adicionados 50 µL do inóculo a 50 µL de meio MH. Como controle de contaminação, poços contendo apenas 100 µL de meio MH foram preparados. Os grupos controles foram feitos em triplicata técnica e as demais condições em duplicata. Todos os experimentos foram realizados três vezes, em dias diferentes.

O período de incubação das bactérias com os peptídeos foi de 24 h, a 37 °C. Ao fim da incubação, foi observado se houve crescimento em todas as condições e foi adicionado 10 µL de alamarBlue® (*Invitrogen*) para avaliar a viabilidade das bactérias (Laranja: vivo; Roxo: morto). Para confirmar os resultados após a adição do corante, foram semeados 3 µL dos poços em placas de Petri (60 x 10 mm, *JProLab*) com meio MH ágar (1,7 %) e incubados por 12 a 18 h a 37 °C.

4.10 Avaliação dos efeitos de LPS ULT sobre a concentração inibitória mínima de ToAP-2 contra *E.coli* e *C. neoformans*

Para avaliar a capacidade de ToAP-2 se ligar a LPS, foi adicionado LPS ULT em diluição seriada em fator de 2 (concentração final em 100 µL: 100 a 0,39 µg/mL) à CIM de ToAP-2 contra *E. coli* e *C. neoformans* (definida previamente por GUILHEIMELLI et al. (2016)). Foi utilizado o método de microdiluição em caldo como feito na determinação da CIM contra *E. coli*, com modificações, conforme abordado abaixo.

Impacto de LPS ULT na CIM de ToAP-2 contra *E. coli*

Nestes ensaios foram utilizadas a CIM de ToAP-2, de PMB e 2x CIM de ToAP-2. Em microplacas de poliestireno de 96 poços, foram adicionados 25 µL dos peptídeos, em meio MH, nos poços, com suas concentrações ajustadas para 100 µL de volume final. Em seguida, foram adicionados 25 µL das diluições de LPS ULT, também ajustadas. Por fim, foi adicionado 50 µL do inóculo para a concentração final de 5×10^5 UFC/mL, em 100 µL. Para avaliar se LPS ULT sozinho não afetaria no crescimento bacteriano, foram adicionados 25 µL das diluições em 25 µL de meio MH, seguido da adição do inóculo. Como controle da atividade antimicrobiana dos peptídeos, foram preparados poços sem a adição de LPS ULT. Como controle positivo para o crescimento bacteriano, foram adicionados 50 µL do inóculo a 50 µL de meio MH. Como controle de contaminação, poços contendo apenas 100 µL de meio MH foram preparados. Os grupos controles foram feitos em triplicata técnica e as demais condições em duplicata. Todos os experimentos foram realizados três vezes, em dias diferentes.

Após o preparo das placas, estas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Ao fim da incubação, foi observado se houve crescimento em todas as condições e foi adicionado 10 µL de alamarBlue® (*Invitrogen*) para avaliar a viabilidade bacteriana (Laranja: vivo; Roxo: morto). Para confirmar os resultados após a adição do corante, foram semeados 3 µL dos poços em placas de Petri (60 x 10 mm, *JProLab*) com meio MH ágar (1,7 %) e incubados por 12 a 18 h, a 37 °C.

Impacto de LPS ULT na CIM de ToAP-2 contra *C. neoformans*

Para estes ensaios, foi utilizado o meio RPMI-1640 + MOPS, nas diluições de LPS ULT, ToAP-2 e Anfotericina B (AMB, *Sigma Aldrich*). Em microplacas de poliestireno de 96 poços ToAP-2 foi adicionado da maneira descrita acima, assim como as diluições de LPS ULT. Foram adicionados 50 µL do inóculo para a concentração final de 10^4 UFC/mL, em 100 µL. Para avaliar se LPS ULT sozinho não afetaria no crescimento da levedura, foram adicionados 25 µL das diluições em 25 µL de meio de cultura, seguido da adição do inóculo. Como controle da atividade antifúngica de ToAP-2 e AMB, foram preparados poços sem a adição de LPS ULT. Como controle positivo para o crescimento da levedura, foram adicionados 50 µL do inóculo a 50 µL de meio de cultura. Como controle de contaminação, poços contendo apenas 100 µL de meio de cultura foram preparados. Os grupos controles foram feitos em triplicata técnica e as demais condições em duplicata. Todos os experimentos foram realizados três vezes, em dias diferentes.

Após o preparo das placas, estas foram incubadas por 48 h a 37 °C. Ao fim da incubação, foi observado se houve crescimento em todas as condições e foi adicionado 10 µL de alamarBlue® (*Invitrogen*), para avaliar a viabilidade das leveduras (Rosa: vivo; Azul: morto). Diferente de *E. coli*, cuja marcação foi instantânea, após a adição do corante as placas retornaram para a estufa (37° C) e foram incubadas por 24 h. Para confirmar a marcação do corante, foram semeados 3 µL dos poços em placas de Petri tripartidas (90 x 15 mm, *JProLab*), contendo Sabouraud Dextrose ágar (1,5 %). As placas foram incubadas por 24 h a 30 °C.

4.11 Análise Estatística

A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram feitos utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). A depender do experimento, os dados foram submetidos à análise de variância (*one-way* ANOVA) com teste *post hoc* de Tukey ou Dunnet, ou teste qui-quadrado com com intervalo de confiança (IC) de 95%. Apenas valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados e Discussão

5.1. ToAP-2 não altera o índice de fagocitose de leveduras de *C. neoformans* por BMMs e BMDCs

Ensaio preliminares realizados por nosso grupo com o peptídeo ToAP-2 apontaram para a produção de marcadores pró-inflamatórios em BMDCs e para uma redução na produção de quimiocinas por BMMs (dados não publicados). Esses efeitos foram observados nas concentrações de 0,625 e 2,5 μM de ToAP-2.

Devido ao baixo CIM (12.5 μM) contra a cepa H99, sorotipo A, de *C. neoformans* (GUILHELMELLI et al., 2016) e à essa aparente imunomodulação de BMMs e BMDCs, foi decidido avaliar se o tratamento dessas células com ToAP-2 influenciaria na fagocitose de leveduras de *C. neoformans* (H99). Entretanto, devido à citotoxicidade observada para esse peptídeo em concentrações acima de 1,25 μM para BMDCs e 2,5 μM para BMMs, foram avaliados os efeitos de ToAP-2 na fagocitose nas concentrações de 0,5 e 1 μM , em 30 min e 2 h.

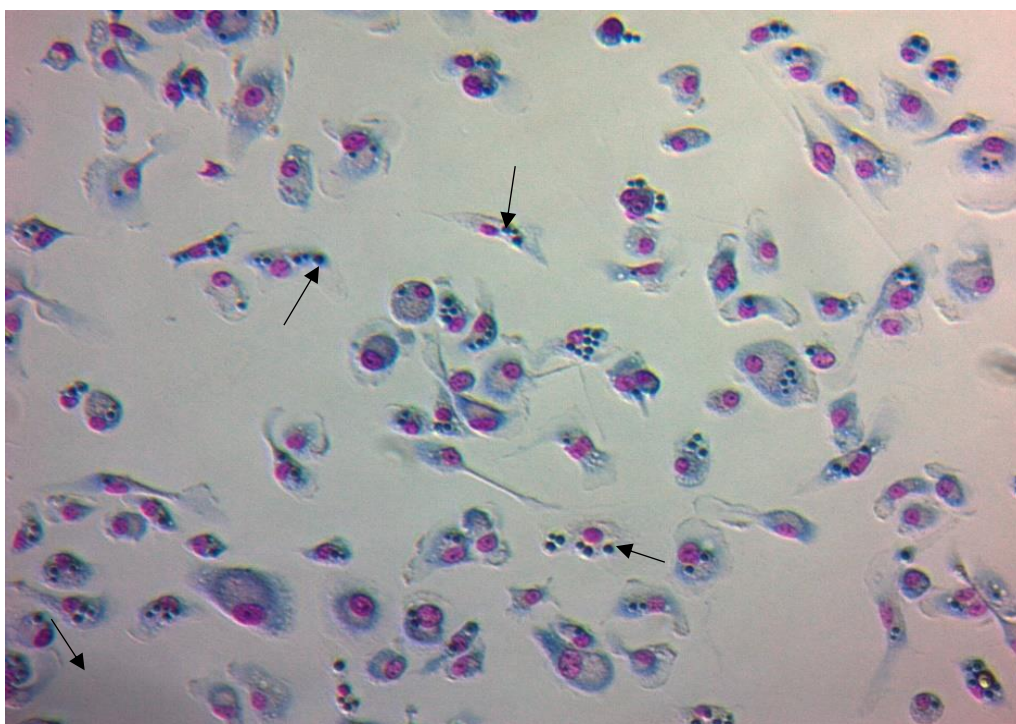


Figura 9 – Fotografia de BMMs em 30 min de infecção com *C. neoformans*, coradas com o kit Panótico. Leveduras de *C. neoformans* fagocitadas são indicadas por uma seta. Imagem capturada pela câmera ZEISS Axiocam ERc 5s acoplada ao microscópio ZEISS Primover, utilizando o software ZEN 2.0 (blue edition; Carl Zeiss Microscopy). Aumento 10X.

Em BMMs, obteve-se que, em 30 min, tanto para o grupo pré-tratado com ToAP-2 por 1 h (Figura 10-a), quanto para o grupo cujo tratamento ocorreu simultâneo à infecção (Figura 10-b), não houve diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA) entre os índices de fagocitose (IFs) das condições avaliadas, quando comparados com o grupo controle (sem peptídeo). Da mesma maneira, no tempo de 2 h, não houve diferença entre as diferentes condições em ambas as estratégias de tratamento. Entre os tempos de 30 min e 2 h houve um aumento no IF, como o esperado, porém foi um aumento discreto que não apresentava diferença estatística entre as várias condições. Os resultados indicam que o peptídeo não altera a capacidade de BMMs de fagocitar leveduras nas concentrações de 0,5 e 1 μM , tanto em 30 min quanto em 2 h de infecção.

Semelhante ao ensaio com BMMs, a exposição de BMDCs à ToAP-2 não alterou a capacidade das células de fagocitar as leveduras de *C. neoformans*, independente da estratégia de tratamento, da concentração do peptídeo e do tempo de interação com a levedura, quando comparados ao grupo controle (Figura 10-c e d). Observou-se que os IFs de BMDCs eram, em todos os grupos, condições e tratamentos, maiores que os de BMMs. Porém, após comparar cada grupo individualmente, não foi encontrado diferença estatística entre eles ($p < 0,05$, teste *t* não pareado).

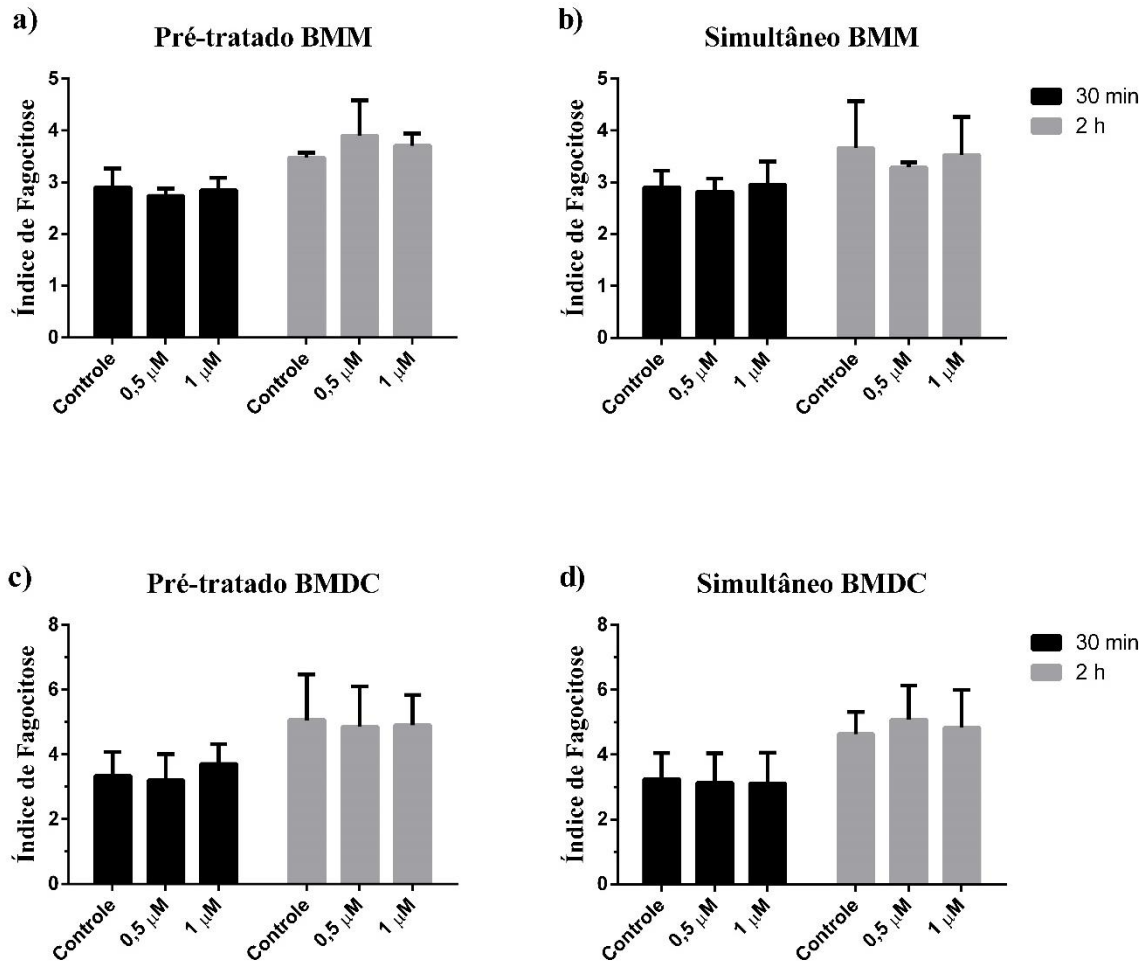


Figura 10 - ToAP-2 não modula a atividade de internalização de leveduras de *C. neoformans* por BMMs ou BMDCs. O tratamento de BMMs ou BMDCs com ToAP-2 em diferentes tempos. (a, c) 1 hora antes da infecção com leveduras de *C. neoformans*, previamente opsonizadas (MOI = 2), ou (b, d) simultaneamente à infecção. O índice de fagocitose dessas células não foi alterado por qualquer dos tratamentos, considerando o período de interação de 30 min ou 2 h. Controles representam células sem tratamento. Barras de erro representam a média \pm SD de três réplicas biológicas. A análise estatística para comparar os grupos controle aos grupos expostos à ToAP-2 foi feita por *one-way* ANOVA com o teste *post hoc* de Dunnett.

Também foi feita, para cada tratamento, a comparação da porcentagem de fagocitose entre as condições, analisando a atuação de ToAP-2 sobre a ativação de BMMs e BMDCs. Em ambos os tratamentos e em todos os grupos, a porcentagem de BMMs ativadas manteve-se entre 50 e 60% (Figura 11-a e b). Em concordância com BMMs, a comparação da porcentagem de BMDCs (Figura 11-c e d) ativados não apontou nenhuma diferença estatística ($p < 0,05$, teste qui-quadrado) entre os tratamentos e os grupos avaliados.

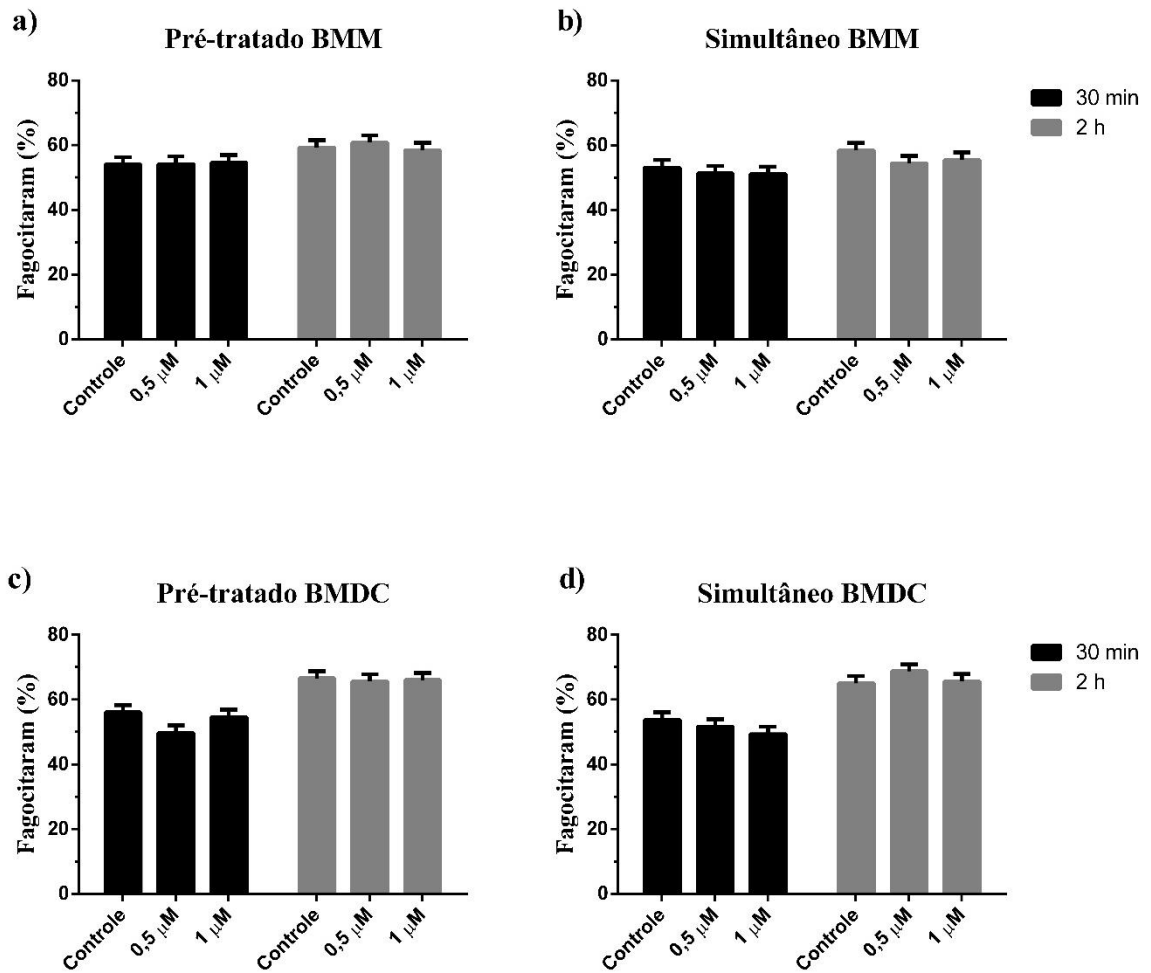
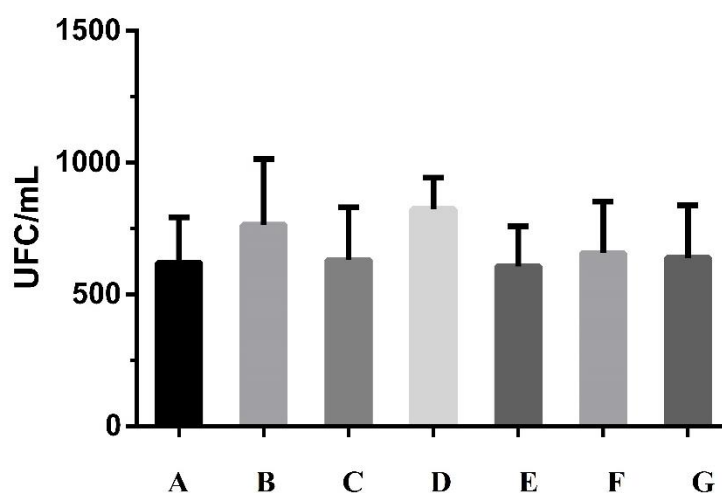


Figura 11 - ToAP-2 não afetou a porcentagem de BMMs ou BMDC com leveduras internalizadas. O tratamento de BMMs ou BMDCs com ToAP2 em diferentes tempos. (a, c) 1 hora antes da infecção com leveduras de *C. neoformans* (MOI = 2) previamente opsonizadas ou (b, d) simultaneamente à infecção. Os tempos de interação foram de 30 min e 2 h. Controles representam células sem tratamento. Os dados estão apresentados como a média da porcentagem da fagocitose \pm o IC de 95%. Para a análise estatística foi feito o teste qui-quadrado.

5.2 ToAP-2 não interfere com a atividade fungicida de BMMs

Após observar que ToAP-2 não modulava o IF de *C. neoformans* por BMMs, foi avaliado se o peptídeo afetaria a capacidade microbicida dos macrófagos contra as leveduras fagocitadas. Para abordar essa questão, foram empregadas três estratégias de exposição a ToAP-2: (1) Expor as células a ToAP-2 apenas durante a etapa da fagocitose (grupos **B** e **E**); (2) expor as células a ToAP-2 após a etapa de fagocitose (grupos **C** e **F**) e (3) expor as células a ToAP-2 durante, e após, a fagocitose (grupos **D** e **G**) (Figura 12).

A análise da viabilidade fúngica feita pela determinação das UFCs após 24 h de infecção mostrou que nenhum dos grupos apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$, ANOVA) quando comparados ao grupo controle. Foi concluído que ToAP-2 não modula a atividade fungicida de BMMs contra leveduras de *C. neoformans* nas condições testadas.



ToAP-2 durante a infecção	-	+	-	+	+	-	+
ToAP-2 após a infecção	-	-	+	+	-	+	+
ToAP-2 (μM)	-	0,5	0,5	0,5	1	1	1

Figura 12 - O tratamento com ToAP-2 não afeta a atividade fungicida de BMMs. As células foram tratadas com ToAP-2 concomitantemente e/ou após 2 h de infecção com leveduras de *C. neoformans* (MOI = 2) previamente opsonizadas. Em seguida, leveduras não internalizadas foram removidas por lavagem com PBS e as células foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementado, por 22 h. Ao fim do período de interação, as células foram lavadas e lisadas com H₂O destilada à 4 °C. As leveduras obtidas foram semeadas em meio Sabouraud Dextrose ágar e incubadas a 30 °C por 48 h. Controle (grupo A) representa células não tratadas com ToAP-2. Barras de erro representam a média \pm SD de três réplicas biológicas realizadas em triplicata técnica. Análise estatística feita por *one-way* ANOVA com teste *post hoc* de Tukey.

5.3 ToAP-2 interfere com a secreção de citocinas por BMMs e BMDCs estimulados com LPS

O sobrenadante de BMMs e BMDCs, após 24 h de tratamento com peptídeo, LPS, ou os dois; foi utilizado para a dosagem das citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α e da quimiocina MCP-1, por ELISA.

Conforme mostrado na Figura 13, o tratamento dos tipos celulares com ToAP-2 sozinho não afetou a secreção das citocinas analisadas. Entretanto, no tratamento conjunto com LPS, uma redução na secreção de IL-6, de TNF- α e de MCP-1 foi observada. Para IL-6 e TNF- α a redução foi mais expressiva, apresentando diferença significativa ($p < 0,0001$, ANOVA) com ToAP-2 na concentração de 0,5 μ M (grupo LPS+0,5). Quando na concentração de 1 μ M (grupo LPS+1) a resposta inflamatória foi abolida, quando comparados ao grupo estimulado com LPS ($p < 0,0001$, ANOVA). Para MCP-1, todos os grupos estimulados com LPS tiveram maior secreção ($p < 0,0001$, ANOVA) da quimiocina, quando comparados aos grupos sem estímulo. Dos grupos estimulados, LPS+1 teve a menor secreção de MCP-1 em ambos os tipos celulares ($p < 0,05$, ANOVA). Não foi possível detectar a secreção de IL-10 e IL-1 β no sobrenadante de cultura.

De acordo com os resultados, foi concluído que o aumento da concentração do peptídeo reduz, proporcionalmente, a secreção de IL-6, TNF- α e MCP-1 por BMMs e BMDCs estimulados com LPS.

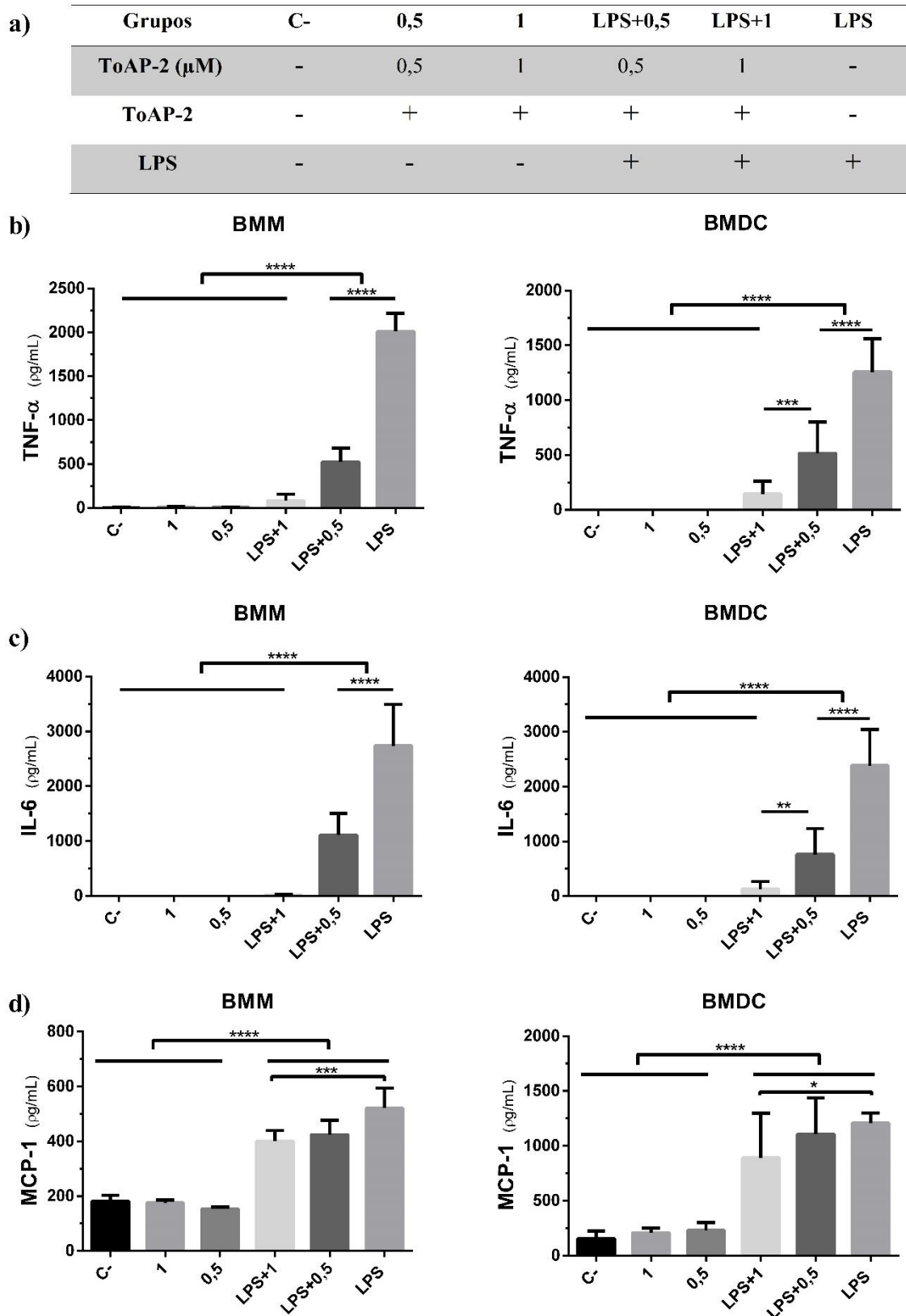


Figura 13 – ToAP-2 reduz a secreção de MCP-1, IL-6 e TNF- α por BMMs e BMDCs estimuladas com LPS por 24 h. (a) Representação esquemática do desenho experimental. Níveis de secreção de TNF- α , IL-6 e MCP-1 (b, c e d, respectivamente) por BMMs e BMDCs, foram medidos no tempo de 24 h de ensaio. Como controles (C-), foram utilizadas células sem nenhum tratamento. Análise estatística feita por *one-way* ANOVA com o teste *post hoc* de Tukey. Asteriscos indicam valor de $p < 0,05$ (*, ** e ***) e $p < 0,0001$ (****). Quantificação feita por ELISA.

O LPS é parte da membrana externa de bactérias gram-negativas e um ótimo indutor de respostas pró-inflamatórias. Por ser um padrão molecular associado a patógenos (PAMP), este PAMP é reconhecido por receptores de reconhecimento padrão (PRR), como os da família Toll (TLR4, principalmente, e TLR2). Entretanto, sua ligação a TLR4 depende de proteínas acessórias (LU et al., 2008). Os agregados de LPS ligam-se, primeiramente, a proteínas ligantes de LPS (LBP, do inglês *LPS binding protein*), convertendo sua estrutura agregada em uma monomérica. O monômero de LPS é transportado à uma proteína de membrana chamada CD14 que, por sua vez, promove a ligação do LPS com a proteína MD2 no complexo MD2/TLR4. A ligação de LPS à MD2 resulta na dimerização de receptores TLR4 e a ativação do receptor, transmitindo o sinal através de seu domínio transmembrânico, que inicia uma cascata de sinalização intracelular e leva à translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B e a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 e de espécies reativas de oxigênio (SUN e SHANG, 2015; TANDON et al., 2018).

Pelo fato de LPS ser uma molécula aniônica, a cationicidade de peptídeos pode levar à uma atração eletrostática entre essas moléculas (SUN e SHANG, 2015; KIM et al., 2018). Na literatura, é possível encontrar exemplos de peptídeos com essa propriedade, como o HDP LL-37 (LAI e GALLO, 2009; VANDAMME et al., 2012; LEE et al., 2019), o AMP Hp1404-T1e e suas variantes (KIM et al., 2018), o tetradecapeptídeo Mastoparan-1 (YIBIN et al., 2005) e o peptídeo Cecropin DH (WANG et al., 2018).

Levando essas informações em consideração, os resultados observados geraram três hipóteses: (1) ToAP-2 atua em alguma proteína da via de ativação do TLR-4, ou até mesmo no receptor; (2) ToAP-2 interage com LPS ou (3) ToAP-2 atua sobre a via e interage com LPS.

No ensaio a seguir, o objetivo era comparar a secreção de citocinas pró-inflamatórias dos grupos cujo tratamento com ToAP-2 foi simultâneo ao estímulo com LPS ULT, específico para o receptor TLR4 (LPS ULT+0,5 e LPS ULT+1), com os grupos que foram expostos ao peptídeo por 6 h antes do estímulo (0,5 \rightarrow LPS ULT e 1 \rightarrow LPS ULT) (Figura 14).

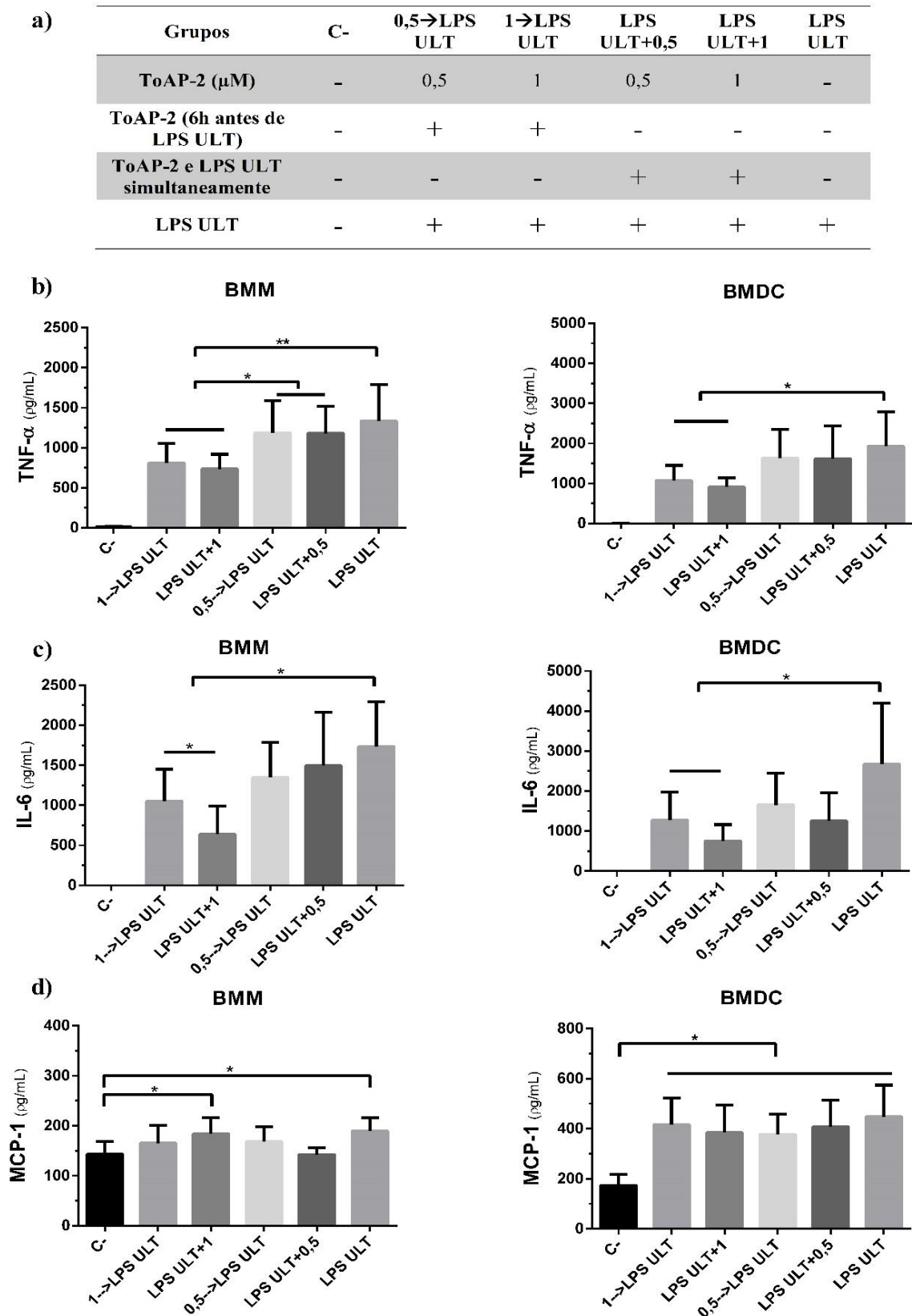


Figura 14 - ToAP-2 reduz a secreção de IL-6 e TNF-α por BMMs e BMDCs estimulados com LPS por 6 h. (a) Representação esquemática do desenho experimental. Níveis de secreção de TNF-α, IL-6 e MCP-1 (b, c e d, respectivamente) por BMMs e BMDCs, 6 h antes ou concomitante ao estímulo com LPS, foram medidos no tempo de 12 h de ensaio. Como controles (C-), foram utilizadas células sem nenhum tratamento. Análise estatística foi feita usando *one-way* ANOVA com o teste *post hoc* de Tukey. Asteriscos indicam valor de $p < 0.05$ (* e **). Quantificação das citocinas e quimiocinas feita por ELISA.

A quantificação de IL-6 e TNF- α por ELISA não mostrou nenhuma diferença entre as estratégias de tratamento com o peptídeo. Tanto para 0,5 μ M, quanto para 1 μ M, o tratamento prévio ao estímulo não diferiu significativamente do tratamento simultâneo em BMMs e BMDCs. Não obstante, houve diferença significativa entre o grupo LPS ULT e os grupos tratados com 1 μ M de ToAP-2. Em BMMs e BMDCs, foi observada uma redução ($p < 0,05$, ANOVA) na secreção de TNF- α e IL-6. Também foi quantificado a secreção de MCP-1, visto que em 24 h houve uma redução significativa entre os grupos LPS+1 e LPS. Em BMMs, os grupos LPS ULT \rightarrow 1 e LPS ULT apresentaram diferença com o controle negativo (C-). Em BMDCs, os grupos estimulados com LPS ULT diferiram significativamente ($p < 0,05$, teste de Tukey) de C-, mas não entre si.

Em conclusão, o pré-tratamento não potencializou a redução na secreção de IL-6 e TNF- α , mas o padrão observado em 24 h se manteve: os tratamentos cuja concentração de ToAP-2 foi de 1 μ M reduziram significativamente a secreção dessas citocinas quando comparados ao grupo LPS ULT. Esse resultado, porém, não invalida a hipótese de que o peptídeo possa atuar na via de sinalização, apenas evidencia que o pré-tratamento não difere do tratamento simultâneo com LPS ULT e ToAP-2.

Segundo o trabalho de VELOSO JUNIOR et al. (2019), os peptídeos ToAP-3 (17aa, carga +1) e ToAP-4 (17aa, carga +1), apresentaram resultados semelhantes ao ToAP-2, quanto à redução na secreção de TNF- α de BMMs e BMDCs devido à exposição prévia ao estímulo (LPS ou LPS ULT) das células a esses peptídeos, apesar das diferenças na sequência e na carga entre os peptídeos. No trabalho dos autores citados acima, também foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos selvagem e nocaute para TLR4. O tratamento por 6 h com os peptídeos, prévio ao estímulo, semelhante ao mostrado na Figura 15 dessa dissertação, reduziu significativamente a secreção de TNF- α na linhagem selvagem, mas no nocaute, os grupos estimulados com LPS ULT tiveram a resposta abolida. Nos grupos nocaute, estimulados com LPS, houve uma baixa secreção, provavelmente devido à ativação de TLR2, mas o tratamento com os peptídeos não a reduziu significativamente. Os autores concluíram que os resultados corroboram a hipótese de que estes peptídeos (ToAP-3 e 4) interagem com TLR4. Devido à semelhança dos resultados, é possível que ToAP-2 também tenha uma atividade antagonista de TLR4, entretanto, mais experimentos são necessários para melhor caracterizar o mecanismo de ação à base do efeito imunomodulatório desse peptídeo.

5.4 A presença de LPS ULT afeta a atividade antimicrobiana de ToAP-2 contra *E. coli* e *C. neoformans*

Uma das hipóteses discutida na seção anterior foi a possível interação do peptídeo ToAP-2 com LPS. De modo similar, o peptídeo Hp1404-T1e (KIM et al., 2018) é um NDBP catiônico alfa-helicoidal, que interage com essa molécula. No trabalho descrito por Kim et al. (2018), foi mostrado que os AMPs utilizados tinham sua atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* reduzida, quando expostos a diferentes concentrações de LPS. Como mencionado anteriormente, a cationicidade de AMPs é um fator importante para sua agregação na membrana externa de bactérias gram-negativas (SUN e SHANG, 2015; KIM et al., 2018). Devido às semelhanças entre ToAP-2 e Hp1404-T1e, assim como o seu perfil imunomodulador evidenciado nos experimentos anteriores, experimentos realizados para Hp1404-T1e foram adaptados para este trabalho.

Primeiramente, foi determinada a CIM de ToAP-2 (7,5 µg/mL – 2,5 µM) contra *E. coli* (ATCC 700336). Também foi determinada a CIM de Polimixina B (PMB, 5 µg/mL), um peptídeo catiônico utilizado para tratar infecções causadas por bactérias gram-negativas, cuja interação com LPS já foi descrita (RYDER et al., 2014; MADHUMANCHI et al., 2019) (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentração inibitória mínima (CIM) de ToAP-2 e PMB contra *E. coli*. Em microplacas de poliestireno de 96 poços, ToAP-2 e PMB foram adicionados em diluição seriada em fator de 2 e incubados com *E. coli* por 24 h a 37 °C. As concentrações abrangeram o intervalo de 30 a 0,12 µg/mL e de 20 a 0,08 µg/mL para ToAP-2 e PMB, respectivamente. PMB: Polimixina B.

Peptídeo	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)
ToAP-2	7,5
PMB	5

Uma vez determinada a CIM de ToAP-2 e PMB contra *E. coli*, foi realizado o ensaio de inibição de crescimento na presença de LPS, utilizando a CIM e 2x CIM de ToAP-2 (7,5 e 15 µg/mL, respectivamente) e a CIM de PMB (5 µg/mL). Os resultados mostraram que LPS ULT comprometia a atividade antibacteriana de ambos os peptídeos (Tabela 7). Para os poços tratados com a CIM de ToAP-2, havia crescimento bacteriano quando LPS ULT era adicionado em concentrações acima de 12,5 µg/mL. Para 2x CIM de ToAP-2, foi observado que sempre havia crescimento em 100 µg/mL de LPS ULT. Entretanto, em alguns experimentos houve crescimento em 50 µg/mL, mas os resultados variavam de experimento para experimento. Acredita-se que essa variação se deve à proximidade da concentração mínima de LPS ULT necessária para comprometer a atividade antibiótica desse grupo, uma vez que foi o único ponto de diluição que apresentou essa inconsistência. Para a CIM de PMB, concentrações acima de 50 µg/mL de LPS ULT permitiam o crescimento bacteriano.

Em vista dos resultados observados contra *E. coli*, foi decidido realizar este mesmo experimento contra *C. neoformans*, com algumas modificações abordadas na metodologia. A CIM de ToAP-2 (37,5 µg/mL) para este organismo já havia sido descrita por GUILHELMELLI et al. (2016). De acordo com o observado em *E. coli*, LPS ULT também interferiu com a atividade antifúngica da CIM de ToAP-2 em 100 µg/mL (Tabela 7).

Tabela 7 – A adição de LPS ULT interfere com as atividades antimicrobiana e antifúngica de ToAP-2. ToAP-2 foi incubado com LPS ULT e *E. coli* ou *C. neoformans* por 24 h e 48 h, respectivamente, a 37 °C. Como controle de crescimento, foi adicionado LPS ULT, nas concentrações indicadas, ao meio de cultura MH (*E. coli*) ou RPMI-1640 + MOPS (*C. neoformans*). Como controle de interação com LPS ULT, foi utilizado PMB. CIM de PMB: 5 µg/mL; CIM de ToAP-2 contra *E. coli*: 7,5 µg/mL; CIM de ToAP-2 contra *C. neoformans*: 37,5 µg/mL. “+” indica que houve crescimento, “-“ que não houve e “*” que os resultados foram inconsistentes.

LPS ULT (µg/mL)	Crescimento					
	<i>E. coli</i>				<i>C. neoformans</i>	
	Meio	PMB CIM	ToAP-2 CIM	ToAP-2 2x CIM	Meio	ToAP-2 CIM
100	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	*	+	-
25	+	-	+	-	+	-
12,5	+	-	+	-	+	-
6,25	+	-	-	-	+	-
3,12	+	-	-	-	+	-
1,56	+	-	-	-	+	-
0,78	+	-	-	-	+	-

Os resultados desses experimentos mostraram que ToAP-2 têm suas atividades antibacteriana e antifúngica comprometidas na presença de LPS ULT, sustentando a hipótese levantada de que ToAP-2 interage com LPS. É possível que a baixa CIM de ToAP-2 contra *E. coli* derive de sua atração eletrostática por LPS, facilitando a agregação do peptídeo e a formação de poros na membrana externa. Entretanto, ainda são necessários mais estudos abordando a atividade antibacteriana e a interação com LPS de ToAP-2, para confirmar essa hipótese.

6. Conclusões e Perspectivas

Os experimentos realizados neste trabalho mostraram que ToAP-2 não altera a resposta de BMMS e BMDCs à infecção de *C. neoformans*. Não obstante, houve uma redução significativa na secreção de TNF- α , IL-6 e MCP-1 por BMMs e BMDCs, quando estes eram estimulados com LPS ou LPS ULT, na presença de ToAP-2. Estes resultados nos levaram a pensar que ToAP-2 prejudicaria a interação de LPS com seu receptor (TRL4) ou a cascata de sinais intracelulares após a sua ativação. Ao expor *E. coli* e *C. neoformans* às suas respectivas CIMs de ToAP-2 e, simultaneamente, à diferentes concentrações de LPS ULT, houve uma clara interferência nas atividades antibacterianas e antifúngicas do peptídeo, corroborando a hipótese de sua interação com LPS.

O padrão de redução da secreção de citocinas por ToAP-2 foi semelhante ao observado com ToAP-3 e ToAP-4 (VELOSO JUNIOR et al., 2019), o que torna a execução de alguns experimentos realizados com estes peptídeos de interesse para nosso. Ao expor BMDCs e BMMs a LPS e os peptídeos (ToAP-3 e 4), foi observada uma redução nos transcritos de TNF- α , IL-1 β e de NF- κ B, quando comparados ao grupo exposto somente à LPS. Baseado nos resultados obtidos, é possível que ToAP-2 também interfira com níveis dos transcritos de TNF- α , IL-6 e NF- κ B.

Também foram observados a expressão de proteínas de membrana associadas à apresentação de antígenos em BMDCs diferenciadas, essenciais para a ativação de linfócitos T. Para ver o papel dos peptídeos na maturação e diferenciação de BMDCs, essas células foram ativadas com LPS sozinho ou em combinação com eles. Ao analisar os marcadores de maturação (MCH-II e CD80) e diferenciação (CD86), foi observada uma redução de CD80 e CD60 nas células tratadas com ToAP-3, e um aumento de MHC-II nas células tratadas com ToAP-4. Em um experimento semelhante, PFALZGRAFF et al. (2016) testou os efeitos de peptídeos sintéticos anti-LPS sobre a produção de marcadores de maturação (CD83 e CD86) em DCs derivadas de monócitos. Nos peptídeos testados, houve uma redução nesses marcadores, reforçando a importância do mecanismo anti-LPS na redução desses marcadores de maturação em DC. Experimentos como estes contribuiriam para a caracterização das atividades imunomoduladoras de ToAP-2.

O controle da maturação de DCs resulta na diminuição de linfócitos T ativados, o que conseqüentemente reduz a proliferação dessas células, controlando o processo de inflamação. Em quadros de inflamação crônica ou de infecções sistêmicas, a atenuação do

sistema imune é uma alternativa sendo estudada (PFALZGRAFF et al., 2016; GENGA et al., 2018; VELOSO JUNIOR et al., 2019).

Sepse ou choque séptico, é um quadro de infecção causado por qualquer microrganismo que atinja a corrente sanguínea, provocando uma ativação generalizada do sistema imune inato. O uso de antimicrobianos convencionais ainda é a melhor forma de tratamento para quadros de sepsis, aumentando as chances de sobrevivência do paciente quanto mais cedo forem administrados (GENGA et al., 2018). Entretanto, a atividade antibiótica, do sistema imune do hospedeiro e a de antimicrobianos administrados, leva à liberação de endotoxinas, como LPS, na corrente sanguínea, cujas concentrações de 2 a 4 $\eta\text{g}/\text{kg}$ são o suficiente para estimular respostas pró-inflamatórias (RYDER et al., 2014; MADHUMANCHI et al., 2019). A liberação de HDPs no quadro de sepsis pode servir como um mecanismo anti-infectivo e anti-inflamatório, devido às propriedades antimicrobianas e anti-LPS de alguns deles (LL-37, por exemplo). A ligação de HDPs à LPS previne a ativação de células do sistema imune inato e, portanto, auxiliam no controle da inflamação (GENGA et al., 2018). Isso torna peptídeos com atividade antimicrobiana e anti-LPS alternativas atraentes para o tratamento de infecções bacterianas, especialmente com o surgimento de organismos multirresistentes a antimicrobianos convencionais (PFALZGRAFF et al., 2016).

Com sua baixa CIM contra *E. coli* e aparente interação com LPS, ToAP-2 pode ser um bom candidato para o tratamento de sepsis e demais infecções bacterianas. Entretanto, é necessário a melhor caracterização de ambas as atividades. Os próximos experimentos a serem realizados com ToAP-2 buscarão determinar tanto o alcance de, quanto a maneira como ele exerce sua atividade antibacteriana, utilizando cepas multirresistentes de bactérias gram-negativas, como de *P. aeruginosa* e *E. coli*, e bactérias gram-positivas. Em respeito à sua interação com LPS, serão feitos ensaios de difusão circular e de espalhamento de luz dinâmica na presença dessa endotoxina, como já descritos na literatura, com peptídeos semelhantes (RYDER et al., 2014; TANDON, et al., 2018; KIM et al., 2018; MADHUMANCHI et al., 2019).

7. Referências Bibliográficas

- ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v. 51, p. 35–45, 2014.
- BARLOW, P. G. et al. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 43, n. 6, p. 692–702, 2010.
- BOWDISH, D. M. E. et al. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. v. 77, n. April, p. 451–459, 2005.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.
- BROWN, K. L. et al. Complexities of targeting innate immunity to treat infection. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 6, p. 260–266, 2007.
- CASADEVALL, A. et al. Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1437–1446, 1998.
- CARRETERO, M. et al. In vitro and In vivo Wound Healing-Promoting Activities of Human Cathelicidin LL-37. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 1, p. 223–236, jan. 2008.
- CHEN, N. et al. Animal protein toxins: origins and therapeutic applications. **Biophysics Reports**, v. 4, n. 5, p. 233–242, 2018.
- CULLEN, T. W. et al. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. **Science**, v. 347, n. 6218, p. 170–175, 9 jan. 2015.
- CZAPLEWSKI, L. et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 239–251, 2016.
- DAVIDSON, D. J. et al. The Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Dendritic Cell Differentiation and Dendritic Cell-Induced T Cell Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 1146–1156, 2004.
- DEMON, D.; VANDE WALLE, L.; LAMKANFI, M. Sensing the enemy within: How macrophages detect intracellular Gram-negative bacteria. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 12, p. 574–576, 2014.
- DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, 2014.

DE YANG et al. LL-37, the Neutrophil Granule–And Epithelial Cell–Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor–Like 1 (Fpr1) as a Receptor to Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1069–1074, 2000.

DING, L. et al. Interaction of Antimicrobial Peptides with Lipopolysaccharides. **Biochemistry**, v. 42, n. 42, p. 12251–12259, 2003.

EASTON, D. M. et al. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 582–590, 2009.

FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 18 maio 2018.

FOX, J. L. Antimicrobial peptides stage a comeback. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 379–382, 2013.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015.

GENGA, K. R. et al. The Understanding and Management of Organism Toxicity in Septic Shock. **Journal of Innate Immunity**, v. 10, n. 5–6, p. 502–514, 2018.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. DEC, p. 1–12, 2013.

GUILHELMELLI, F. et al. Activity of scorpion venom-derived antifungal peptides against planktonic cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–14, 2016.

GUILHELMELLI, F. Atividade antifúngica e mecanismo de ação do peptídeo ToAP2 em células planctônicas e biofilme de *Cryptococcus neoformans*. 2019. 168 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

HANCOCK, R. E. W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402–410, 2000.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, 2006.

HANCOCK, R. E. W.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D. J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 243–254, 2012.

- HANCOCK, R. E. W.; HANEY, E. F.; GILL, E. E. The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 5, p. 321–334, 2016.
- HARRISON, P. L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon**, v. 88, p. 115–137, 2014.
- HARRIS, F.; DENNISON, S.; PHOENIX, D. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 6, p. 585–606, 2009.
- HAZLETT, L.; WU, M. Defensins in innate immunity. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 175–188, 21 jan. 2011.
- HMED, B.; SERRIA, H. T.; MOUNIR, Z. K. Scorpion peptides: Potential use for new drug development. **Journal of Toxicology**, v. 2013, 2013.
- HURTADO, P.; AU PEH, C. LL-37 Promotes Rapid Sensing of CpG Oligodeoxynucleotides by B Lymphocytes and Plasmacytoid Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1425–1435, 2010.
- JENSSEN, H. et al. Peptide Antimicrobial Agents Peptide Antimicrobial Agents. v. 19, n. 3, 2006.
- KANG, H. K. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–12, 2017.
- KASPAR, A. A.; REICHERT, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 17–18, p. 807–817, 2013. v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.
- KATZ, M. L. et al. Where have all the antibiotic patents gone? **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1529–1531, 2006.
- KIM, M. K. et al. Mechanisms driving the antibacterial and antibiofilm properties of Hp1404 and its analogue peptides against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.
- KOCZULLA, R. et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 11, p. 1665–1672, 2003.
- KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 711–715, 2004.
- KOSIKOWSKA, P.; LESNER, A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 6, p. 689–702, 2016.

- LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises 3. **BIODIVERSITY OF ANTIMICROBIAL**. p. 1341–1371, 2016.
- LAI, Y.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 3, p. 131–141, 2009.
- LATHAM, P. W. Therapeutic peptides revisited After a roller coaster ride of successes and failures, new discovery technologies and. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. August, p. 755–757, 1999.
- LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2700–2707, 2018.
- LEE, E. Y.; LEE, M. W.; WONG, G. C. L. Modulation of toll-like receptor signaling by antimicrobial peptides. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 88, p. 173–184, 2019.
- LI, Z. et al. Hp1404, a new antimicrobial peptide from the scorpion *Heterometrus petersii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.
- LIEN, S.; LOWMAN, H. B. Therapeutic peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 556–562, 2003.
- LIU, M. et al. Fabrication of KR-12 peptide-containing hyaluronic acid immobilized fibrous eggshell membrane effectively kills multi-drug-resistant bacteria, promotes angiogenesis and accelerates re-epithelialization. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 3345–3360, 2019.
- LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–151, 2008.
- LUTZ, M. B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **Journal of Immunological Methods**, v. 223, n. 1, p. 77–92, fev. 1999.
- MADHUMANCHI, S. et al. Binding interactions of bacterial lipopolysaccharides to polymyxin B in an amphiphilic carrier ‘sodium deoxycholate sulfate’. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, n. July, p. 110374, 2019.
- MANGONI, M. L.; MCDERMOTT, A. M.; ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 3, p. 167–173, mar. 2016.
- MANSOUR, S. C.; PENA, O. M.; HANCOCK, R. E. W. Host defense peptides: Front-line immunomodulators. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 9, p. 443–450, 2014.
- MANSOUR, S. C.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. Peptide IDR-1018: Modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial

- infections. **Journal of Peptide Science**, v. 21, n. 5, p. 323–329, 2015.
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963.
- MOERMAN, L. et al. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 19, p. 4799–4810, 2002.
- MOERMAN, L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venom induce Ca^{2+} signaling in HL-60 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, n. 1, p. 90–97, 2003.
- MORAVEJ, H. et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. mdr.2017.0392, 2018.
- NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides: Old molecules with new ideas. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3 PART 2, p. 887–895, 2012.
- NEUMANN, A. et al. The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. **Biochemical Journal**, v. 464, p. 3–11, 2014.
- O'NEILL, L. A. J. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 7, p. 549–563, 2006.
- ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125–135, 2015.
- PFOSSER, A. et al. NF κ B activation in embryonic endothelial progenitor cells enhances neovascularization via PSGL-1 mediated recruitment: Novel role for LL37. **Stem Cells**, v. 28, n. 2, p. 376–385, 2010.
- PERUMAL SAMY, R. et al. Animal venoms as antimicrobial agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 127–138, 2017.
- PFALZGRAFF, A. et al. Synthetic antimicrobial and LPS-neutralising peptides suppress inflammatory and immune responses in skin cells and promote keratinocyte migration. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–12, 2016.
- PRIMON-BARROS, M.; JOSÉ MACEDO, A. **Animal Venom Peptides: Potential for New Antimicrobial Agents**. [s.l.: s.n.]. v. 17, 2017.
- RAUTAJOKI, K. J. et al. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation. **Annals of Medicine**, v. 40, n. 5, p. 322–335, 2008.
- REYGAERT, C. W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS**

Microbiology, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.

REMIJSEN, Q.; VERDONCK, F.; WILLEMS, J. Parabutopirin, a cationic amphipathic peptide from scorpion venom: Much more than an antibiotic. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 180–185, 2010.

RYDER, M. P. et al. Binding interactions of bacterial lipopolysaccharide and the cationic amphiphilic peptides polymyxin B and WLBU2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 120, n. 2, p. 81–87, ago. 2014.

SACHDEVA, S. Peptides as ‘Drugs’: The Journey so Far. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 49–60, 2017.

SAMY, R. P. et al. Wound healing activity and mechanisms of action of an antibacterial protein from the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

SCOTT, M. G. et al. Cutting Edge: Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 2, p. 549–553, 2000.

SHAHROUR, H. et al. AMPs as anti-biofilm agents for human therapy and prophylaxis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1117, p. 257–279, 2019.

SILVA, T.; GOMES, M. S. Immuno-stimulatory peptides as a potential adjunct therapy against intra-macrophagic pathogens. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1–12, 2017.

SUN, Y.; SHANG, D. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

TANDON, A. et al. An MD2-derived peptide promotes LPS aggregation, facilitates its internalization in THP-1 cells, and inhibits LPS-induced pro-inflammatory responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 13, p. 2431–2446, 2018.

UHLIG, T. et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 58–69, 2014.

VANDAMME, D. et al. A comprehensive summary of LL-37, the lactoferrin human cathelicidin peptide. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 1, p. 22–35, 2012.

VELOSO JÚNIOR, P. H. DE H. et al. Peptides ToAP3 and ToAP4 decrease release of inflammatory cytokines through TLR-4 blocking. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 118, n. May, 2019.

VLIEGHE, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 1–2, p. 40–56, 2010.

WANG, J. et al. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory

properties. **PeerJ**, v. 2018, n. 7, p. 1–21, 2018.

WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 313–322, 2016.

WIBOWO, D.; ZHAO, C. X. Recent achievements and perspectives for large-scale recombinant production of antimicrobial peptides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 659–671, 2019.

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 249–259, 2017.

WILLEMS, J. et al. Parabutopirin - An antibiotic peptide from scorpion venom - Can both induce activation and inhibition of granulocyte cell functions. **Peptides**, v. 25, n. 7, p. 1079–1084, 2004.

YIBIN, G. et al. A synthesized cationic tetradecapeptide from hornet venom kills bacteria and neutralizes lipopolysaccharide in vivo and in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 209–219, 2005.

YU, G. et al. Predicting drug resistance evolution: Insights from antimicrobial peptides and antibiotics. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1874, 2018.

YUK, J. M. et al. Vitamin D3 Induces Autophagy in Human Monocytes/Macrophages via Cathelicidin. **Cell Host and Microbe**, v. 6, n. 3, p. 231–243, 2009.





ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 24 jan. 2002.

ZENG, X. C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. **IUBMB Life**, v. 57, n. 1, p. 13–21, 2005.

ZHAO, L.; LU, W. Defensins in innate immunity. **Current Opinion in Hematology**, v. 21, n. 1, p. 37–42, 2014.

8. Anexos

Anexo 1

	
	Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal
Brasília, 10 de setembro de 2012.	
	DECLARAÇÃO
Declaramos que o projeto intitulado " CARACTERIZAÇÃO DAS BASES MOLECULARES DA SUSCETIBILIDADE IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO SISTÊMICA. ", UnBDOC n.º 52657/2011, sob responsabilidade da Profa. Ildinete Silva Pereira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.	
	 Prof. José Raimundo Corrêa Coordenador da CEUA