

SELMA APARECIDA SOUZA KÜCKELHAUS

**TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DA
FILOSSEPTINA-1, UM PEPTÍDEO DE *PHYLLOMEDUSA*
HYPOCHONDRIALIS (AMPHIBIA)**

**Brasília
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SELMA APARECIDA SOUZA KÜCKELHAUS

**TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DA FILOSSEPTINA-1,
UM PEPTÍDEO DE *PHYLLOMEDUSA HYPOCHONDRIALIS* (AMPHIBIA)**

**Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências Médicas,
Faculdade de Medicina, Universidade de
Brasília.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Tosta

**Brasília
2007**

TERMO DE APROVAÇÃO

SELMA APARECIDA SOUZA KÜCKELHAUS

**TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DA FILOSSEPTINA-1,
UM PEPTÍDEO DE *PHYLLOMEDUSA HYPOCHONDRIALIS* (AMPHIBIA)**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Tosta
Universidade de Brasília

Prof. Carlos Henrique Nery Costa
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca
Universidade de Brasília

Prof. Dr. João Barberino Santos
Universidade de Brasília

Brasília, 27 de setembro de 2007



Amélia Cândida da Cruz

Dedico este trabalho às quatro pessoas mais importantes da minha vida e que integram a minha história. Minha mãe Amélia que foi o início de tudo, *in memoriam*. Ao meu esposo Carlos, por ser o grande companheiro de sempre e das muitas jornadas. Aos meus filhos Lucas e Sarah por fazerem parte do meu futuro.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida!

Aos meus mentores

Ao querido professor Carlos Eduardo Tosta, em quem encontrei amparo, orientação e amizade. Incansável na arte de ensinar, me mostrou que a dedicação e amor ao ensino, o respeito aos alunos, aos colegas de trabalho e a valorização da amizade são os atos que engrandecem a alma de um educador. Grata pelas incontáveis vezes que busquei ajuda e prontamente a encontrei.

À minha amiga e professora Maria Imaculada Muniz Junqueira, pelo apoio irrestrito e grande espírito de colaboração manifestado até mesmo em dias de muita atribulação. É admirável sua disposição para prestar ajuda. Grata pelos ensinamentos em estatística, mas, sobretudo, pelo ombro amigo.

Ao professor Delfino Costa Machado, por ter me ensinado os primeiros passos da jornada acadêmica.

À professora Zulmira Guerrero Marques Lacava, pelo apoio e orientação no mestrado.

Aos meus amigos e parceiros de trabalho

Ao meu grande amigo e parceiro José Roberto de Souza de Almeida Leite pelo companheirismo e amizade. Certamente seu espírito determinado, inovador e desbravador, e sua retidão de caráter, mostraram-me ao longo desses anos que a sua amizade é muito valiosa.

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia Celular que tornaram meu trabalho prazeroso e fizeram deste laboratório um local de muita amizade e companheirismo. Em especial sou muito grata:

À Shirley Couto, que pela sua competência e dedicação ao trabalho é um exemplo a ser seguido por todos os funcionários. Grata pelas inúmeras vezes que dividiu a bancada comigo durante a fase experimental e pela contínua disposição em ajudar.

Ao Nelson Pelet Nascimento, pela competência, disposição e dedicação ao Laboratório de Malária do Núcleo de Medicina Tropical e, também, pela grande ajuda dispensada durante os experimentos com plasmódio.

À Tatiana Borges, pela grande contribuição aos ensaios para a determinação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico.

À Rosana Saldanha e Mariana Carminatti, pela amizade e pela prestimosa ajuda no ensaio para quantificar o fator de necrose tumoral.

Ao querido Paulo Tabanez, pelo apoio e amizade demonstrados ao longo dessa jornada.

Aos colegas Vanessa Viana, Érica Alessandra e César Augustus, pela presença amiga durante o trabalho.

Aos caros colegas Felício Sala Neto, *in memoriam*, e José Siqueira da Silva, pela cortesia e respeito a mim dispensados.

Aos professores Vicente Perez Carrascosa e Yolanda Galindo, da área de Morfologia da Faculdade de Medicina, por abrirem as portas do laboratório para os estudos morfológicos, e ao Giuliano, pelo grande apoio técnico.

À professora Raimunda Sampaio, pela colaboração nos ensaios com leishmânia.

Aos professores Jaime Santana, Anamélia Lourenzetti Bocca e Elizabeth Schwartz, pelas críticas e sugestões feitas durante a qualificação desse trabalho.

Aos colegas de sempre: Ada, Lane, Neda, Aninha, Gutemberg e José Roberto Godoy.

Aos que são parte da minha História.

À toda família Souza, em especial aos meus queridos irmãos David, Carlos, Ademir, Zélia, Wagner e Marilda.

À toda família Kückelhaus, em especial meus sogros José e Teresinha e minha cunhada Márcia.

Aos meus queridos irmãos de alma e amigos do coração: Grasiela e Cal, Gil e William, Zé Carlos, Lucimar, Albaniza. Obrigada pela amizade!

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, meu muito obrigada!

PREFÁCIO

No ano de 2002, estava passando pelos corredores do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília quando me deparei com um colega, José Roberto, que há pouco tempo havia conhecido. Na ocasião, eu estava trabalhando com fluido magnético no curso de mestrado em Biologia Animal da Universidade de Brasília. Nesse encontro, ele contou-me, bastante empolgado, a respeito de uma nova substância, um peptídeo chamado de DS-01, que havia identificado da secreção cutânea de uma perereca, e que apresentava efeitos antibacterianos. A sua empolgação contagiou-me tanto que lhe sugeri alguns experimentos para saber se o peptídeo seria tóxico para camundongos e assim dispor informações sobre sua segurança para uma possível utilização biomédica da substância. A idéia lhe pareceu ótima e, juntos, realizamos os primeiros experimentos in vivo e in vitro para determinar a toxicidade do peptídeo para camundongos. Aos poucos fui tomando consciência do grave problema de resistência dos microorganismos aos antibióticos convencionais e, diante da descoberta de uma nova família de peptídeos, as filosseptinas, com ação anti-bacteriana, mas ainda não testadas em outros sistemas biológicos, decidi que, finalizado meu mestrado, iria iniciar os estudos com esses peptídeos. No início de 2005 ingressei no doutorado, sob a supervisão do Prof. Carlos Eduardo Tosta, no programa de Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da UnB, com a determinação de elaborar uma sistemática de estudos voltados para a avaliação da toxicidade dos peptídeos antimicrobianos e sua influência sobre a funcionalidade de diferentes sistemas biológicos. Minha motivação pessoal era contribuir para a descoberta de novas substâncias que se contrapusessem à carência de compostos antimicrobianos devido ao desenvolvimento de resistência pelos agentes infecciosos, além de procurar alternativas terapêuticas para infecções negligenciadas como a leishmaniose e a malária. As informações disponíveis na literatura sobre a toxicidade in vivo de peptídeos antimicrobianos eram extremamente escassas no início dos estudos com a filosseptina-1 (PS-1), o que dificultou a elaboração de um programa de estudo com esse peptídeo. No entanto, a despeito das dificuldades, os objetivos iniciais de determinar as concentrações tóxicas da PS-1, in vitro e in vivo, sobre diferentes sistemas biológicos e avaliar seus efeitos sobre células do sistema imunitário foram cumpridos. A mesma metodologia utilizada na presente investigação em relação à PS-1 poderá ser utilizada para avaliar outros peptídeos com potencial atividade antimicrobiana. Ensaio para a avaliação da atividade terapêutica da PS-1 contra plasmódio e leishmânia em modelos experimentais serão iniciados proximamente. Desse estudo ficou a

certeza que, o caminho que leva à aplicação biomédica de peptídeos antimicrobianos é longo e com muitas dificuldades a serem vencidas, no entanto, nossos resultados apontam para as potencialidades dessas substâncias e isto me impulsiona no caminho de novas descobertas.

RESUMO

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade em todo o mundo e seu controle depende da existência de agentes antimicrobianos eficazes. O maior entrave para a manutenção da eficácia é o desenvolvimento de resistência dos agentes infecciosos às drogas antimicrobianas. A geração de resistência aos antimicrobianos tornou-se nas últimas décadas uma das grandes preocupações da Organização Mundial de Saúde que, desde então, tem estimulado as pesquisas, básica e aplicada, na busca por novas drogas que possam ajudar na luta constante contra os mecanismos de resistência. Todos os seres vivos estão continuamente expostos a uma grande quantidade de potenciais agentes patogênicos e a capacidade para evitar as doenças depende, em grande parte, dos seus mecanismos de defesa. Tanto animais quanto plantas desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos inatos de defesa, tais como a produção de diferentes substâncias bioativas, que são identificadas, sobretudo, nos anfíbios. Dentre essas substâncias destacam-se os peptídeos com ação antimicrobiana, que exercem, *in vitro*, potente atividade lítica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários e fungos filamentosos e, comumente, exibem baixa toxicidade para células de mamíferos. Esses peptídeos são caracterizados por apresentarem seqüências de 12 a 50 resíduos de aminoácidos e intensa carga positiva e, apesar da grande diversidade molecular, têm em comum suas configurações anfipáticas e propriedade de interação com membranas celulares. Os estudos realizados com a secreção cutânea de duas pererecas do gênero *Phyllomedusa* permitiram a descoberta de uma nova família de peptídeos antimicrobianos denominada filosseptinas (PSs) e, estudos preliminares realizados com a filosseptina-1 (PS-1) mostraram seu potencial antimicrobiano. Logo, considerando a diversidade funcional desses peptídeos e sua eficácia ao longo do processo evolutivo o objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade da PS-1 sobre células de mamíferos, *in vitro* e *in vivo* e sua atividade antiparasitária sobre *L. amazonensis* e *P. falciparum*, visando aplicações biomédicas e biotecnológicas. Observaram-se, com as maiores concentrações de PS-1, efeitos tóxicos sobre células de mamíferos e com as menores concentrações capacidade imunomodulatória, por aumentar a adesão de macrófagos, influenciar a fagocitose, a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por macrófagos de camundongo e, de fator de necrose tumoral por monócitos humanos. A PS-1 apresentou também grande atividade lítica sobre *L. amazonensis* e *P. falciparum*, sendo definidas como 1 ou 48µg/mL as concentrações capazes de inibir o crescimento de, no mínimo 50% dos parasitos. Nossos resultados demonstraram que a PS-1 apresenta grande potencial para aplicações biomédicas, como modulador do sistema imunitário ou como agente antimicrobiano contra plasmódio e leishmânia.

ABSTRACT

Infectious diseases cause millions of deaths throughout the world and their control depends on the use of efficient antimicrobial agents. However, a major concern is the frequent development of resistance of the infectious agents to these products. The growing emergence of this phenomenon lead the World Health Organization to consider it as a major public health problem, and it has stimulated the development of novel products, mainly from nature, to fight the pathogens. It is well established that animals and plants produce many bioactive substances as defense mechanisms. This ability is particularly important among the amphibians. Some of these substances are represented by antimicrobial peptides, which are endowed with activity against bacteria and protozoa, and commonly exhibit low toxicity to mammalian cells. These antimicrobial peptides are characterized by the presence of 12 to 50 amino acids residues, high cationicity and, despite the great diversity of molecular structures, they are amphipathic and present the property to interact with cell membranes. Recently, our group identified a new family of antimicrobial peptides named phylloseptins, and the preliminary studies with phylloseptin-1 (PS-1) showed its potential as an antimicrobial agent. Considering the functional diversity of antimicrobial peptides and their efficacy throughout the evolutionary process, the objective of the present investigation was to evaluate the toxicity of PS-1 against mammalian cells, *in vitro* and *in vivo*, and its activity against two protozoa, *L. amazonensis* and *P. falciparum*, for future biomedical applications. Toxic effects of PS-1 were observed on mammalian cells exclusively with larger concentrations of the peptide, whereas with the smaller ones, immunomodulation was observed, affecting macrophage adherence, phagocytosis, production of hydrogen peroxide and nitric oxide by mouse peritoneal macrophages, and tumor necrosis factor by human monocytes. PS-1 showed strong activity against *L. amazonensis* and *P. falciparum*, and at concentrations of 1 or 48 μ g/mL the peptide was able to inhibit 50% of these parasites, respectively. Our results showed that PS-1 presents an important potential for biomedical applications, both as an immunomodulatory product, and as an antimicrobial agent against plasmodium and leishmania species.

SUMÁRIO

Prefácio i

Resumo ii

Abstract iii

INTRODUÇÃO 01

OBJETIVOS 10

Objetivo geral 11

Objetivos específicos 11

MATERIAIS E MÉTODOS 12

1. Delineamento experimental 13

2. Peptídeo 16

3. Animais 17

4. Microorganismos 17

5. Indivíduos 18

6. Obtenção de células peritoneais de camundongos 18

7. Determinação da dose tóxica de PS-1 para células peritoneais de camundongos 19

8. Avaliação da capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de camundongos 20

9. Quantificação de peróxido de hidrogênio em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos 21

10. Quantificação de óxido nítrico em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos 22

11. Quantificação de fator de necrose tumoral (FNT) em cultivos de monócitos humanos 23

- 12. Determinação da concentração de PS-1 a ser administrada aos camundongos 25**
- 13. Procedimentos gerais dos ensaios em camundongos 25**
- 14. Determinação do leucograma 26**
- 15. Quantificação de micronúcleos em eritrócitos de medula óssea 26**
- 16. Determinação dos níveis séricos de uréia, creatinina, aspartato-aminotransferase e alanina-aminotransferase 27**
- 17. Determinação da dose tóxica de PS-1 em camundongos Swiss 28**
- 18. Estudos histopatológicos 28**
- 19. Determinação in vitro da dose tóxica de PS-1 sobre *Leishmania amazonensis* 29**
- 20. Determinação in vitro da dose tóxica de PS-1 sobre *Plasmodium falciparum* 30**
- 21. Métodos estatísticos 31**

RESULTADOS 32

1. Ensaios de toxicidade in vitro 33

- 1.1. Influência da PS-1 sobre a aderência de células peritoneais de camundongos 33**
- 1.2. Influência da PS-1 sobre a fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos 35**
- 1.3. Influência da PS-1 sobre a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos 41**
- 1.4. Influência da PS-1 sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos 43**
- 1.5. Influência da PS-1 sobre a produção de fator de necrose tumoral por monócitos humanos 45**

2. Ensaios de toxicidade in vivo 47

- 2.1. Determinação da dose tóxica de PS-1 47**

2.2. Influência da PS-1 sobre as células do sangue periférico	48
2.3. Influência da PS-1 sobre eritrócitos da medula óssea	49
2.4. Influência da PS-1 sobre a histologia do fígado, baço, rim e pulmão	50
2.5. Influência da PS-1 sobre os níveis séricos de uréia e creatinina aspartato-aminotransferase, alanina-aminotransferase	52
3. Ensaio antiparasitários	53
3.1. Influência da PS-1 sobre <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Plasmodium falciparum</i>	53
3.1.1. <i>Leishmania amazonensis</i>	53
3.1.2. <i>Plasmodium falciparum</i>	59
DISCUSSÃO	69
Toxicidade in vitro	70
Toxicidade in vivo	77
Efeitos antiparasitários	81
CONCLUSÕES	89
LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa e artigo científico	118
ANEXOS II: Soluções, meios e regentes	128
ANEXOS III: Planilhas e tabelas	132
GLOSSÁRIO	142

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Organograma dos ensaios in vitro 14
- Figura 2.** Organograma dos ensaios in vivo 15
- Figura 3.** Modelo esquemático da filosseptina-1 16
- Figura 4.** Foto da *Phyllomedusa azurea* 17
- Figura 5.** Percentual de aderência de células peritoneais de camundongos 34
- Figura 6.** Percentual de aderência das células peritoneais de camundongos – curva de dose-resposta 35
- Figura 7.** Índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos 36
- Figura 8.** Percentual de macrófagos peritoneais de camundongos envolvidos na fagocitose 38
- Figura 9.** Percentual de macrófagos peritoneais de camundongos, envolvidos na fagocitose – curva de dose-resposta 39
- Figura 10.** Média de leveduras fagocitadas por macrófagos peritoneais de camundongos 40
- Figura 11.** Fotomicrografias de células peritoneais incubadas com leveduras 41
- Figura 12.** Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos 42
- Figura 13.** Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos – curva de dose-resposta 43
- Figura 14.** Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos 44
- Figura 15.** Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos – curva de dose-resposta 45
- Figura 16.** Produção de fator de necrose tumoral (FNT) por monócitos humanos 46
- Figura 17.** Produção de fator de necrose tumoral (FNT) por monócitos humanos – curva de dose-resposta 47

Figura 18. Efeitos da administração endovenosa de 4mg/kg de PS-1, a oito camundongos sobre o percentual de eritrócitos policromáticos **49**

Figura 19. Efeitos da PS-1 sobre o total de micronúcleos em eritrócitos policromáticos ou normocromáticos, na medula óssea de camundongos **50**

Figura 20. Fotomicrografias dos órgãos dos camundongos **51**

Figura 21. Efeito da PS-1 administrada por via endovenosa a camundongos Swiss sobre os níveis séricos de uréia e creatinina **52**

Figura 22. Efeitos da administração endovenosa de PS-1 sobre os níveis séricos de aspartato-aminotransferase e alanina-aminotransferase **53**

Figura 23. Efeitos de diferentes concentrações de PS-1 sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* 2 horas após a incubação **55**

Figura 24. Efeitos de diferentes concentrações de PS-1 sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* 6 horas após a incubação **56**

Figura 25. Efeitos de diferentes concentrações de PS-1 sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* para determinar a relação dose-resposta **57**

Figura 26. Fotomicrografias de cultivos de *Leishmania (L.) amazonensis* **58**

Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de PS-1 sobre o crescimento de *Plasmodium falciparum* **60**

Figura 28. Efeito de diferentes concentrações de PS-1 sobre o crescimento de *Plasmodium falciparum* 72 horas após a incubação **62**

Figura 29. Efeito de 128µg/mL de PS-1 sobre a parasitemia de *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, 72h após a incubação **63**

Figura 30. Percentual de parasitemia de *Plasmodium falciparum* tratado com diferentes concentrações de PS-1, para determinar a relação dose-resposta **64**

Figura 31. Efeito de diferentes concentrações de PS-1 sobre a maturação das formas intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum* **67**

Figura 32. Fotomicrografias de cultivos de *Plasmodium falciparum* **68**

Tabela 1. Efeitos da PS-1 administrada por via endovenosa a camundongos **48**

Tabela 2. Percentual de formas parasitárias em cultivos de *Plasmodium falciparum* tratados com diversas concentrações de PS-1 **66**

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade em todo o mundo e seu controle depende, em grande parte, da existência de agentes antimicrobianos eficazes. O maior entrave para esta eficácia é o desenvolvimento de resistência dos agentes infecciosos aos produtos antimicrobianos e este, há muito tem chamado à atenção dos organismos internacionais de saúde, como a Organização Mundial de Saúde (OMS). Segundo este órgão, as infecções respiratórias, a síndrome da imunodeficiência adquirida, infecções intestinais, tuberculose e malária, não são somente as grandes responsáveis por milhões de mortes por ano, em todo o mundo, como também seus agentes infecciosos são os maiores causadores dos mecanismos resistência (WHO 2007). A disseminação do uso de produtos antimicrobianos, muitas vezes de maneira inadequada, tem contribuído muito para o aumento da resistência e, conseqüentemente, para a redução na eficácia desses fármacos, causando grande impacto no controle de doenças infecciosas, principalmente no âmbito hospitalar (Cassettari e cols. 2005).

Em janeiro de 1995, a OMS publicou um relatório intitulado "Controle e prevenção de doenças transmissíveis: doenças infecciosas novas, emergentes e re-emergentes", que enfatiza o grau de preocupação da mais importante entidade de saúde no mundo em relação ao surgimento de novas doenças infecciosas e à escassez de princípios ativos eficazes (WHO 2001a). Desde então, a OMS tem estimulado as pesquisas, básica e aplicada, na busca por novas drogas, principalmente de origem natural, que possam ajudar na luta constante contra as adaptações bacterianas originadas por mutações e selecionadas pelo meio.

A geração e seleção de resistência dos microrganismos aos produtos antimicrobianos ocorrem em velocidade muito maior que a associada ao desenvolvimento de novas drogas. Acrescente-se que a indústria farmacêutica

tem investido predominantemente na modificação de fármacos já comercializados, como os conhecidos antibióticos de última geração, mas pouco se tem feito no sentido de se investir na geração de novas moléculas, capazes de superar o fenômeno de resistência cruzada aos fármacos.

Sabe-se que a coexistência entre os seres vivos, nas mais variadas escalas evolutivas, tem proporcionado o desenvolvimento de vários mecanismos adaptativos, fundamentais para a sobrevivência das espécies (Hultmark 2003), dentre os quais destaca-se a formação do sistema inato de defesa, que, pela atuação de células e moléculas (constitutivas ou induzidas), produz uma resposta rápida e eficaz contra microorganismos patogênicos (Reddy e cols. 2004). Dentre as moléculas de defesa, desenvolvidas e conservadas pelos seres vivos ao longo do período evolutivo, encontram-se os peptídeos antimicrobianos que, mesmo após milhões de anos de ação, não perderam a eficácia (Crovella e cols. 2005).

Os peptídeos antimicrobianos são caracterizados por apresentarem grande diversidade de estruturas, são formados por 10 a 50 resíduos de aminoácidos, possuem amplas cargas elétricas positivas e propriedades anfifílicas (ver Glossário) (Zasloff 2002; Crovella e cols. 2005; Hilpert e cols. 2006). Funcionalmente, esses peptídeos são conhecidos por apresentarem largo espectro de ação, que pode ser comprovado por atividades líticas contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Peschel 2002), fungos (Lee e cols. 2004), parasitos (Ghosh e cols. 1997; Brand e cols. 2006), além de serem capazes de antagonizarem vírus (Chernysh e cols. 2002; Sahl 2006) e apresentarem propriedades antitumorais (Chernysh e cols. 2002).

Todos os seres vivos produzem peptídeos antimicrobianos, que funcionam como barreiras à entrada de microorganismos (Lehrer & Ganz 1999). Nas bactérias, são conhecidos como bacteriocinas e são capazes de atuar contra outras bactérias, por um mecanismo de competição (Baba & Schneewind 1998).

Nos fungos, foram identificados no gênero *Aspergillus* as aculeacinas e aureobasidina-A, ambas efetivas contra outros fungos (Lucca & Walsh 1999). Nas plantas, é comum encontrar peptídeos antifúngicos e antibacterianos (Broekaert e cols. 1995). Mesmo de proteínas virais, foram descobertos e sintetizados alguns peptídeos antimicrobianos (Eisenberg & Wesson 1990; Tencza e cols. 1997). Nos insetos, os peptídeos antimicrobianos são encontrados na hemolinfa ou em glândulas específicas, e podem ser bastante ativos contra bactérias (Pal e cols. 2007). Nos mamíferos, esses peptídeos podem ser encontrados em células epiteliais de mucosas ou pele, em neutrófilos ou como produtos resultantes da degradação de proteínas (Bowman e cols. 1995), dentre esses destacam-se a lisozima, lactoferrina, defensinas, indolicinas e catelicidinas (Levy 2004).

A classe dos anfíbios é conhecida por produzir em glândulas granulosas cutâneas secreções ricas em moléculas bioativas. Dentre essas, destacam-se derivados guanidínicos, aminas biogênicas (feniletilamínicos e triptamínicos) e esteróides cardiotônicos como as bufoteninas e bufogeninas (Cunha Filho e cols. 2005). Foram encontrados também esteróides não-cardiotônicos como o ergosterol, colesterol e sitosterol- γ (Yoshida e cols. 1976), alcalóides (bufotoxina), e mucopolissacarídeos como as glicosaminoglicanas, sulfatos de condroitina A e C (Pederzoli e cols. 2003). Dentre as moléculas bioativas de anfíbios que apresentam grande interesse farmacológico estão os peptídeos e proteínas. Dentre os peptídeos, encontram-se vasodilatadores, bradicininas, opióides e antimicrobianos e dentre as proteínas, catalases, fosfolipases e inibidores enzimáticos (Conceição e cols. 2007).

Vanhoye e colaboradores (2003) estimaram que em torno de 5000 espécies de anuros possam produzir aproximadamente 100.000 tipos diferentes de peptídeos antimicrobianos. Até o ano de 2006, foram identificados nos diferentes seres vivos, cerca de 1000 peptídeos com atividade antimicrobiana

(ver <http://www.bbcm.univ.trieste.it/wtossi/amsdb.html>), sendo que, desses, mais de 500 foram caracterizados em anfíbios (ver <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Devido à grande variabilidade e diversidade de formas moleculares dos peptídeos antimicrobianos, seu agrupamento em classes é muito difícil. Van't Hof e colaboradores (2001) propuseram um modelo de classificação baseado na estrutura secundária da molécula (ver Glossário). Segundo esse critério, foram definidas quatro classes estruturais que compreendem: (a) peptídeos que exibem hélice- α anfifílica, (b) cadeias β estabilizadas por pontes de dissulfeto, (c) cadeias lineares com aminoácidos repetitivos e (d) peptídeos com estruturas cíclicas (em *loop*).

Os peptídeos da primeira classe exibem uma conformação hélice- α (ver Glossário) em solventes hidrofóbicos ou superfícies lipídicas e apresentam a capacidade de interação com membranas anfipáticas (ver Glossário). A maioria desses peptídeos tem propriedades catiônicas (ver Glossário) e exibe toxicidade para os microorganismos, especialmente pelos agregados de hélices dentro da bicamada lipídica, que resultam na formação de poros. Nesse grupo enquadram-se as melitinas, as magaininas, as cecropinas, as temporinas (Simmaco e cols. 1996; Mangoni e cols. 2000), as dermasseptinas (Hancock & Scott. 2000; Brand e cols. 2002; Hultmark 2003) e as ranatuerinas (Sonnevend e cols. 2004). Alguns peptídeos hidrofóbicos contendo hélices- α podem exibir carga negativa, tornando-se aniônicos, como é o caso das alameticinas, que são reconhecidamente menos seletivos para os microorganismos em relação às células de mamíferos (Kikukawa & Araiso 2002).

Os peptídeos da segunda classe, caracterizados por apresentarem fitas β (ver Glossário) estabilizadas por pontes dissulfeto, são cíclicos e estáveis em meio aquoso mas, sobretudo quando associados com lipídeos, essa estabilidade aumenta (Hancock 2001). Nesta classe de peptídeos incluem-se as

defensinas (Hancock 2001), taquiplesinas (Matsuzaki 1999), protegrinas (Harwig e cols. 1995), brevininas (Morikawa e cols. 1992), japonicinas 1 e 2 (Isaacson e cols. 2002), esculentinas 1 e 2 (Simmaco e cols. 1993) e lactoferrinas (Jones e cols. 1994), sendo as defensinas as mais amplamente estudadas. Pouco se sabe sobre o mecanismo de lesão à membrana determinada por esses peptídeos. Entretanto, alguns estudos têm relacionado à presença de pontes de dissulfeto e à troca de cisteína por aminoácidos hidrofóbicos com a diminuição da atividade antimicrobiana (Tamamura e cols. 1998; Rao 1999).

A terceira classe de peptídeos antimicrobianos é representada por produtos que apresentam um ou mais aminoácidos repetidos. Nesta classe enquadram-se a histatina (rica em histidina), encontrada na saliva e com atividade antifúngica (Helmerhorst e cols. 1999), as catelicidinas (ricas em prolina e arginina, ou prolina e fenilalanina), que constituem a maior família de peptídeos provenientes dos granulócitos de mamíferos (Linde e cols. 2001), a tritripticina e a indolicidina (ricos em triptofano). Estes dois últimos apresentam largo espectro de ação antimicrobiana, porém com uma considerável atividade hemolítica (Chan e cols. 2006). Essas características podem estar relacionadas à alta expressão de triptofano, que geralmente se encontra em baixa concentração nos peptídeos ou proteínas de uma forma geral (Schibli e cols. 2002).

Os peptídeos antimicrobianos pertencentes à quarta classe são proteoliticamente estáveis e de fácil síntese. São caracterizados pela ausência de estruturas anfipáticas (ver Glossário) devido à alta concentração de prolina, porém tendem a adotar hélice cíclica ou cadeia β do tipo poliprolina (Boman e cols. 1993; Cabiaux e cols. 1994). Essa classe é representada pelos lantibióticos, que são peptídeos contendo pequenos anéis fechados por pontes de tioéter (Montville & Chen 1998) e pela nisina, que apresenta atividade antibacteriana e comumente é utilizada na preservação de alimentos (Breukink e cols. 1999).

Como referido, os peptídeos antimicrobianos exibem um largo espectro de ação contra microorganismos. Muitos deles apresentam atividade lítica sobre bactérias, fungos e protozoários (Brand e cols. 2002), enquanto outros mostram seus efeitos contra células tumorais e vírus (Chernysh e cols. 2002) e, de uma forma geral, exibem pouca toxicidade para as células de mamíferos. A diferença de atividade sobre os vários microorganismos reflete a seletividade desses peptídeos e, muito embora os mecanismos moleculares permaneçam ainda pouco compreendidos, parecem depender da seqüência de aminoácidos do peptídeo e podem também depender das características próprias das membranas celulares, como os tipos de fosfolipídios constituintes (Lohner & Prenner 1999).

Vários estudos têm mostrado que a interação dos peptídeos antimicrobianos com membranas celulares não ocorre por meio de uma molécula de superfície específica, mas ao contrário, tendem à interação eletrostática, que é dependente do perfil de lipídeos expressos nessas membranas (Oren & Shai 1998; Zasloff 2002; Yeaman & Yount 2003; Jenssen e cols. 2006). Como resultado dessa interação, pode-se obter a permeabilização da membrana celular causando a formação de poros e, conseqüentemente, destruição celular (Peschel & Sahl 2006), interferência na cadeia respiratória por peptídeos que atravessam a membrana sem causar destruição celular (Barker e cols. 2000), efeitos diretos sobre enzimas celulares (Sahl e cols. 2005) ou, ainda, atividade imunomoduladora sobre células de mamíferos (Oppenheim & Yang 2005).

Considerando os diversos efeitos dos peptídeos antimicrobianos e considerando ainda que essas substâncias tenham sido efetivas ao longo do processo evolutivo e, de forma a contribuir com o desenvolvimento de novos fármacos, nosso grupo de pesquisa busca na fauna brasileira, especificamente nos anuros, identificar novos compostos que possam suprir a carência de novos medicamentos. As etapas fundamentais no processo de desenvolvimento e

produção industrial de novos fármacos são, inicialmente, a identificação e caracterização bioquímica dos compostos, a síntese e a purificação dos princípios ativos e posteriormente as aplicações em sistemas biológicos. Estes últimos demandam extensos protocolos que assegurem a utilização da substância em seres humanos (WHO 2001a).

Os estudos de Leite e colaboradores (2005), realizados com a secreção cutânea de duas espécies das pererecas *Phyllomedusa hypochondrialis* (Fig. 1) e *Phyllomedusa oreades*, provenientes do cerrado brasileiro, permitiram a descoberta de uma nova família de peptídeos denominada filosseptinas (PSs) (PS-1 a PS-6) e cujos representantes são formados por pequenos peptídeos contendo de 17 a 20 resíduos de aminoácidos, amidados na região c-terminal, que apresentam estrutura primária com uma região conservada contendo treze resíduos de aminoácidos, estrutura em hélice- α em 80–100% das moléculas e domínios hidrofílicos e hidrofóbicos bem definidos. Essas características permitiram a inclusão das PSs dentro da primeira classe de peptídeos antimicrobianos (Van't Hof e cols. 2001).

Recentemente, Chen e colaboradores (2006) identificaram na secreção cutânea de *Phyllomedusa hypochondrialis* cinco outras filosseptinas (PS-7, PS-8, PS-9, PS-10 e PS-11) e, Thompson e colaboradores (2007), utilizando técnicas de proteômica e genômica, identificaram mais quatro filosseptinas (PS-12, PS-13, PS-14 e PS-15) na secreção cutânea de *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. Os estudos de Chen e colaboradores (2006) sugeriram que a PS-6 identificada nos estudos de Leite e colaboradores (2005) pode ser considerada um fragmento da PS-7 e não um peptídeo isolado.

Os primeiros estudos in vitro realizados com as PSs mostraram efeitos sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas e, *Trypanosoma cruzi*. Leite e colaboradores (2005) mostraram efeitos antibacterianos da PS-1 e efeito

antiparasitário das PSs 4 e 5 sobre formas promastigotas de *T. cruzi*. Thompson e colaboradores (2007) mostraram o efeito antibacteriano da PS-7, mas não da PS-12. O efeito tóxico das PSs 1 e 2 também foi avaliado sobre eritrócitos humanos em cultura e os resultados indicaram baixa atividade hemolítica (Leite e cols. 2005).

Dentre as PSs estudadas por Leite e colaboradores (2005), a PS-1 mostrou-se com potencialidades biomédicas pelo largo espectro de ação sobre bactérias e baixa atividade hemolítica. Estes resultados serviram de base para, nesse trabalho, iniciar os estudos pré-clínicos de toxicidade da PS-1 sobre diferentes sistemas biológicos, *in vitro* e *in vivo* e identificar seus efeitos antiparasitários visando possíveis aplicações biomédicas e biotecnológicas no futuro.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da filosseptina-1 (PS-1) sobre sistemas biológicos, in vitro e in vivo, visando aplicações biomédicas e biotecnológicas.

1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar a dose tóxica da PS-1, in vitro, sobre células peritoneais de camundongos;
- b. Avaliar a influência da PS-1, in vitro, sobre a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos;
- c. Avaliar os efeitos de uma dose única, in vivo, sobre leucócitos do sangue circulante, eritrócitos da medula óssea e diferentes órgãos de camundongos.
- d. Determinar a dose tóxica da PS-1 em camundongos;
- e. Avaliar a influência da PS-1, in vitro, sobre a produção de fator de necrose tumoral por monócitos humanos;
- f. Determinar o efeito antimicrobiano e a dose tóxica da PS-1, in vitro, sobre *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum*;

1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesse estudo, foram avaliados os efeitos da filosseptina-1 (PS-1), *in vitro* (Figura 1) e *in vivo* (Figura 2) sobre quatro sistemas biológicos diferentes: sobre células peritoneais de camundongos Swiss avaliou-se a concentração tóxica do peptídeo e sua influência sobre a fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico; sobre monócitos humanos avaliou-se sua influência sobre a produção de fator de necrose tumoral; sobre *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum* foram avaliados seus efeitos antiparasitários; em camundongos Swiss foram avaliados seus efeitos tóxicos por meio de administração endovenosa ou intraperitoneal.

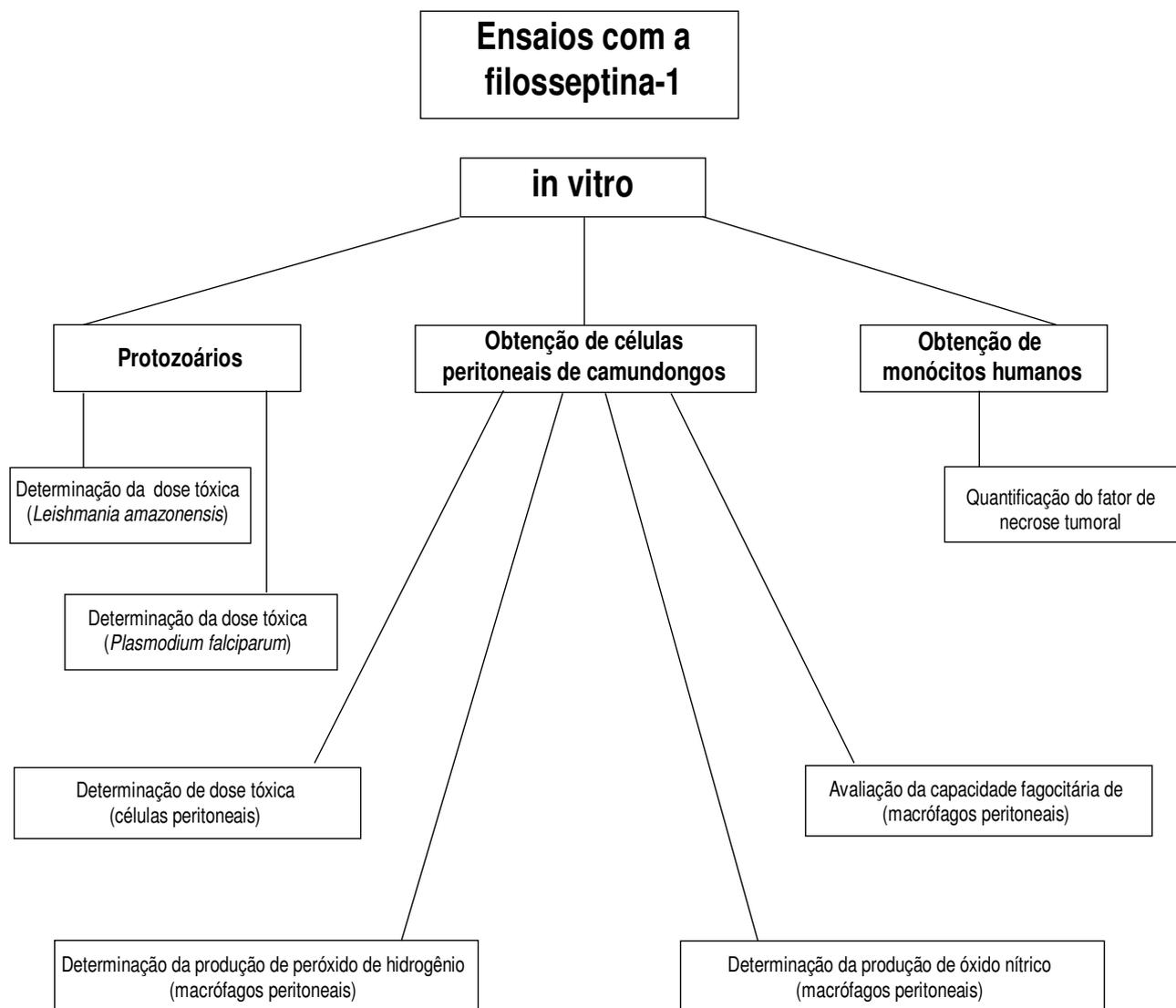


Figura 1. Organograma dos ensaios in vitro.

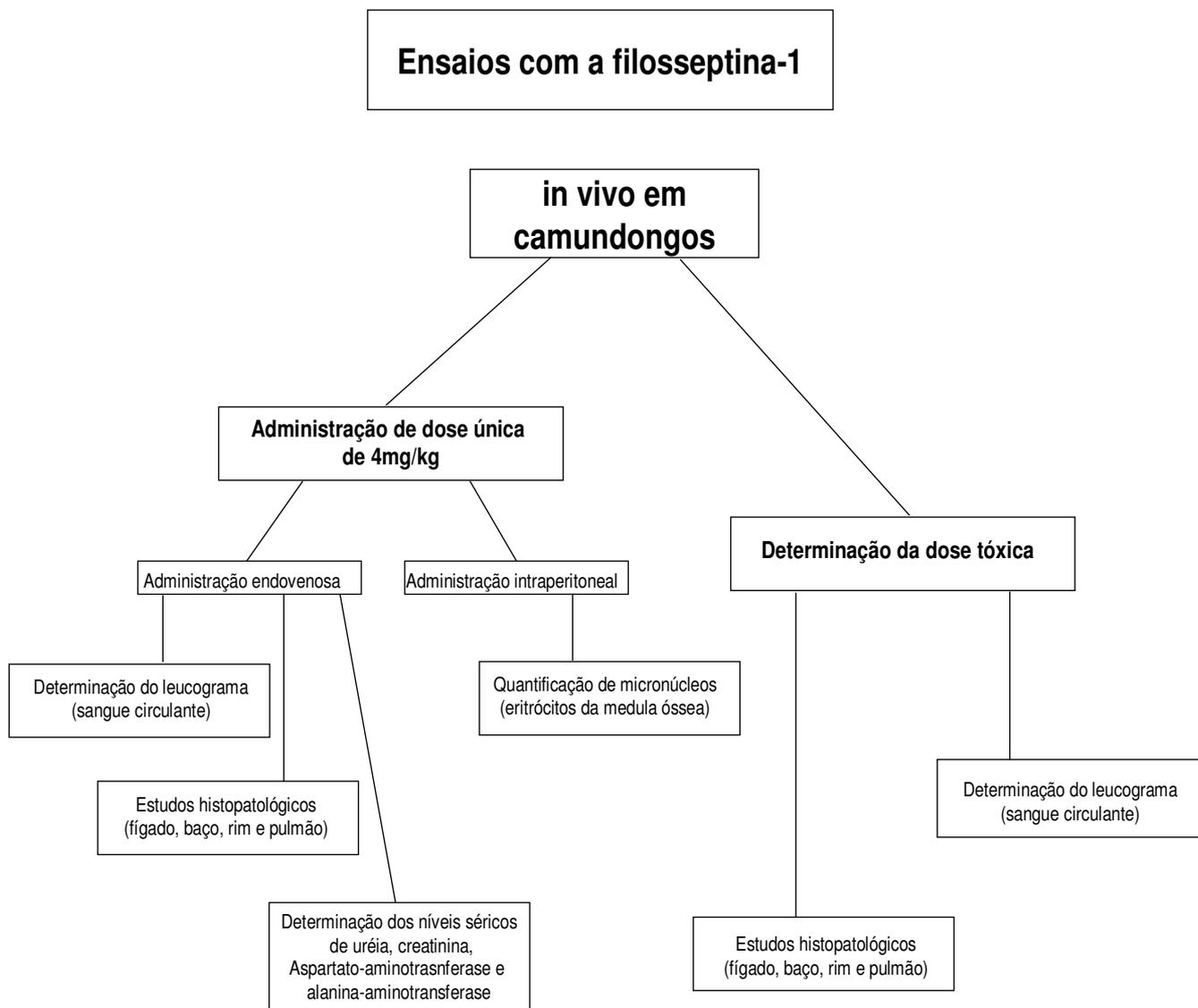


Figura 2. Organograma dos ensaios in vivo.



Figura 4. Foto da *Phyllomedusa hypochondrialis*, por José Roberto Souza Almeida Leite.

3. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, não isogênicos, pesando de 30 a 40g, provenientes do biotério do Centro Universitário de Brasília. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sob temperatura ambiente, ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração balanceada e recebendo água potável *ad libitum*.

Os critérios adotados para a experimentação e manutenção dos animais estiveram rigorosamente dentro das normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O projeto de pesquisa desenvolvido nesse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília em 22 de março de 2004.

4. MICROORGANISMOS

Para o estudo dos efeitos da PS-1 sobre os microorganismos patogênicos foram utilizados dois protozoários causadores de doenças tropicais, malária e leishmaniose. O *Plasmodium falciparum* da cepa Pf169, proveniente de portador

de malária da região endêmica do rio Ituxi (AM) é mantido no Laboratório de Malária do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília. A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* da cepa MHOM/BR/PH8, proveniente de Belo Horizonte (MG), pertence ao Laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As duas espécies são mantidas sob congelamento em nitrogênio líquido (-196°C).

5. INDIVÍDUOS

As amostras de sangue foram obtidas de seis voluntários adultos saudáveis, sendo três homens e três mulheres, com idade entre 25 e 45 anos, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa para avaliar o efeito da PS-1 sobre a produção de fator de necrose tumoral por monócitos humanos *in vitro* foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, sob o número 027/2006.

As normas éticas para a experimentação científica em seres humanos, estabelecidas pela declaração de Helsinque (WHO 1976; World Medical Association Recommendation 2000) e pela resolução 196/96 do Ministério da Saúde (1996) foram plenamente obedecidas durante o desenvolvimento desse estudo. O presente estudo foi elaborado e desenvolvido com plena isenção ou influência de conflitos de interesse.

6. OBTENÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

As células peritoneais foram obtidas de camundongos previamente anestesiados com éter etílico, através de uma pequena incisão central no abdômen de aproximadamente 0,5cm. As células foram coletadas por meio da

injeção de 10mL de salina tamponada com fosfato (STF) pH 7,2, 4°C e centrifugada a 400xG por 10min, em uma centrífuga resfriada a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso com 2mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) incompleto (ver Anexo 2) e, em seguida, as células foram quantificadas em hematocítômetro.

As suspensões de células foram mantidas sob refrigeração em tubos plásticos graduados de 15mL (LAbTech, Melbourn, Inglaterra), desde sua coleta até o início dos experimentos.

7. DETERMINAÇÃO DA DOSE TÓXICA DE PS-1 PARA CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Para avaliar o efeito tóxico da PS-1 para células de mamíferos, o peptídeo foi incubado com células peritoneais coletadas de oito camundongos, conforme procedimento descrito no item 6.

A partir da suspensão de células quantificada de acordo com o descrito no item 6 prepararam-se uma nova suspensão, em meio RPMI 1640 sem soro contendo 25×10^3 células/150 μ L (preponderantemente macrófagos e linfócitos) de cada camundongo. Também foram preparadas as soluções contendo cinco diferentes concentrações de PS-1 (1, 10, 100, 200 e 300 μ g/mL), em meio RPMI 1640 sem soro. Os oito experimentos foram conduzidos, em duplicatas, em duas placas de microcultivo de fundo plano (96 escavações) (LAbTech, Melbourn, Inglaterra), em cujas escavações foram previamente depositadas lamínulas de 5mm de diâmetro para a aderência das células.

As placas para incubação das células peritoneais foram preparadas da seguinte forma: nas escavações destinadas aos testes com o peptídeo foram colocadas 25×10^3 células em um volume de 150 μ L (ver preparo descrito acima) e em seguida eram adicionados 50 μ L das soluções contendo as diferentes

concentrações de PS-1. Nas escavações para o controle negativo foram adicionadas a suspensão de células 200 μ L de meio RPMI 1640 sem soro. Em seguida, as células foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C na presença de ar + 5% de CO₂.

As células vivas ou mortas, aderidas sobre a lamínula, foram quantificadas utilizando-se solução de nigrosina (corante supravital do tipo aniônico que não penetra em células vivas, (Emilson e cols. 1978) a 0,05%, em solução salina tamponada com fosfato, 0,15M e pH 7,2. As lamínulas eram colocadas sobre uma gota da solução de nigrosina depositada sobre lâmina de microscopia e, rapidamente, examinadas à microscopia óptica com aumento de 400x. O total de células vivas ou mortas foi estimado pela contagem de 10% da área da lamínula, correspondendo a 9 campos microscópicos (área da lamínula=19,6 μ m²; área da objetiva=220 μ m²).

8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Para avaliar o efeito de diferentes concentrações de PS-1 sobre a fagocitose por macrófagos peritoneais, coletaram-se individualmente células peritoneais (preponderantemente macrófagos e linfócitos) de cinco camundongos, conforme descrito no item 6. Os cinco experimentos foram realizados em placa de microcultivo de fundo plano e 24 escavações (TTP-Therapeutic Training Products, Ohio, EUA), em cujas escavações foram previamente depositadas lamínulas redondas de vidro de 9mm de diâmetro. As células peritoneais (2x10⁵ células/400 μ L de meio RPMI 1640 sem soro) foram distribuídas nas escavações da placa, incubadas em câmara úmida a 37°C por 60min, em atmosfera de ar + 5% de CO₂ para a aderência dos macrófagos e. em seguida, as escavações foram lavadas três vezes com STF (0,15 M, pH 7,2), a

37°C, para retirar as células não aderentes.

Na próxima etapa, distribuíam-se nas escavações as diferentes concentrações de PS-1 (1, 10 e 100µg/mL), seguida pela distribuição da suspensão de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), previamente sensibilizadas com o *pool* de soro dos camundongos (ver anexo 2). Essa suspensão continha 4×10^6 leveduras/100µL de meio RPMI 1640 completo (ver Anexo 2) por escavação, de modo a obter-se uma proporção de 20 leveduras por macrófago e as placas incubadas por 30min em câmara úmida a 37°C em atmosfera de ar + 5% de CO₂. Em seguida, as escavações eram lavadas com STF (0,15 M, pH 7,2) à temperatura ambiente, para retirar as leveduras não fagocitadas e então, as lamínulas contendo as células eram secas, fixadas com metanol absoluto e coradas com solução de Giemsa (10% em STF, pH 6,9). Depois de lavadas e secas ao ar, as lamínulas eram montadas com resina sintética em lâminas de microscopia e a fagocitose avaliada por microscopia óptica com objetiva de 100x.

A análise da fagocitose foi feita por meio do índice fagocitário, calculado pelo produto da percentagem dos macrófagos envolvidos com a fagocitose pela média de leveduras fagocitadas. Para esse cálculo foram analisados 200 macrófagos ao microscópio óptico com aumento de 1000x.

9. QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM CULTIVOS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Com o objetivo de investigar o efeito da PS-1 sobre a funcionalidade de células de mamíferos avaliou-se a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos peritoneais incubados com três diferentes concentrações de PS-1 (1, 10 e 100 µg/mL). A determinação da concentração de H₂O₂ foi feita individualmente em cultivos de células peritoneais coletadas de oito camundongos (item 6), baseado na técnica de Pick e Keisari (1980). Os

experimentos foram realizados em triplicatas, em placas de microcultivo de fundo plano e 96 escavações (LAbTech, Melbourn, Inglaterra). Foram distribuídas 2×10^5 células por escavação em 200 μ L de meio RPMI 1640 sem soro e incubadas em câmara úmida a 37°C com mistura gasosa de ar + 5% de CO₂ por 60min para a aderência das células. Em seguida, as escavações foram lavadas com STF (0,15M, pH 7,2), a 37°C, para retirar as células não aderidas. Em seguida, os macrófagos peritoneais foram incubados por 60min, nas mesmas condições descritas, com 140 μ L de solução de vermelho fenol com 85U de peroxidase (ver Anexo 2) adicionada de PS-1 (1, 10 ou 100 μ g/mL), ou acetato de forbol miristato (PMA) (20 ou 40nM/mL). Durante a incubação foi preparada uma curva padrão contendo oito diferentes concentrações (0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100nM) de H₂O₂, em 140 μ L de vermelho de fenol de uso (ver Anexo 2). A reação foi interrompida pela adição de 10 μ L NaOH 1N e as leituras de absorbância feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 620nm (Multiskan[®] Titertek, Huntsville, EUA). Os resultados foram expressos em micromoles (μ M) de H₂O₂.

10. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTIVOS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Ainda objetivando investigar o efeito da PS-1 sobre a funcionalidade de células de mamíferos, macrófagos peritoneais de camundongos foram incubados com diferentes concentrações do peptídeo e a produção de óxido nítrico (NO) avaliada utilizando-se reagente de Greiss (ver Anexo 2), segundo técnica descrita por Green e cols (1982).

Células peritoneais foram coletadas de oito camundongos Swiss normais, quantificadas e alíquotas de 2×10^5 células/ 200 μ L em meio RPMI 1640 sem soro distribuídas em triplicatas em placa de microcultivo de fundo plano e 96

escavações (LAbTech, Melbourn, Inglaterra). Após incubação em câmara úmida a 37°C, por 60min, em atmosfera de ar+ 5% de CO₂, as escavações foram lavadas 3 vezes com STF (0,15 M, pH 7,2), a 37°C, para retirar as células não aderidas e, em seguida, incubadas, nas mesmas condições anteriores por 24h com 200µL de PS-1 (1, 10 ou 100µg/mL) ou lipopolissacarídeo (LPS *Escherichia coli*, sorotipo 055:b5, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA; concentrações de 10 ou 20ng/mL), preparadas em meio RPMI 1640 completo (ver Anexo 2). Terminada a incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 400xG por 10min e em seguida, transferiam-se 100µL do sobrenadante de cada escavação para outra placa e incubados com 100µL de reagente de Greiss (ver Anexo 2). A curva padrão era preparada com oito diferentes concentrações (0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ou 100nM) de nitrito de sódio (NaNO₂), em água destilada. As leituras das reações colorimétricas foram feitas em espectrofotômetro de placa com filtro de 630nm (Multiskan[®] Titertek, Huntsville, EUA) e os resultados expressos em milimoles (mM) de NO.

11. QUANTIFICAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL (FNT) EM CULTIVOS DE MONÓCITOS HUMANOS

Amostras de 10mL de sangue venoso foram coletados de seis indivíduos adultos hígidos em tubos Vacutainer heparinizados (BD, Juiz de Fora, MG) e, após agitação, transferidas delicadamente para um tubo de centrifuga de polipropileno graduado de 15 mL, contendo 3mL de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suécia), densidade 1,077 e centrifugadas a 750xG a 4°C, por 20min, para a obtenção das células mononucleares.

Depois de aspiradas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, as células mononucleares foram ressuspensas com 10mL de STF (0,15 M, pH 7,2) a 4°C e centrifugadas a 400xG por 10min a 4°C. Após desprezar o sobrenadante as

células foram novamente ressuspensas com 10mL de STF (0,15 M, pH 7,2), a 4°C e centrifugadas a 300xG por 10min a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e as células mononucleares ressuspensas com 2mL de meio RPMI 1640 sem soro e quantificadas em hematocítômetro. Preparou-se então, uma suspensão contendo 1×10^6 células mononucleares por mililitro de meio RPMI 1640 sem soro, e alíquotas de 200 μ L distribuídas em duplicatas por escavação de placa de microcultivo de 96 escavações e incubadas em câmara úmida a 37°C, em atmosfera de ar + 5% de CO₂ por 60min, para aderência dos macrófagos. Em seguida, as placas foram lavadas com STF (0,15 M, pH 7,2) a 37°C, para retirar as células não aderentes, e incubadas por 6 horas com 200 μ L de PS-1 (1, 10 ou 100 μ g/mL), ou de lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli*, sorotipo 055:b5, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) na concentração de 20ng/mL, ambas em meio RPMI 1640 completo, nas mesmas condições anteriormente descritas. Após a incubação, os sobrenadantes foram individualmente coletados, transferidos para tubos Eppendorf (1,5mL) e estocados a -80°C até a dosagem de FNT.

A determinação do FNT foi feita por ensaio imunoenzimático, utilizando-se um kit comercial com sistema de detecção por estreptavidina-biotina (BioSource, Nivelles, Bélgica), segundo as recomendações do fabricante. A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro de placa (Multiskan® Titertek, Huntsville, EUA), com filtro de 450nm, e os resultados expressos em pg/mL de FNT.

12. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PS-1 A SER ADMINISTRADA AOS CAMUNDONGOS

A escolha da concentração de PS-1, a ser administrada aos camundongos, baseou-se nos estudos in vitro realizados por Leite e colaboradores (2005), que definiram como 6µg/mL a concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias (*Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Considerando-se que os camundongos utilizados apresentavam um peso médio de 30g e volume sanguíneo de 2mL (Feldman e cols. 1999), optou-se por administrar por via endovenosa 4mg/kg (~ 60µg/mL), uma concentração 10 vezes superior ao CIM para as bactérias.

13. PROCEDIMENTOS GERAIS DOS ENSAIOS EM CAMUNDONGOS

Nos ensaios in vivo foram avaliados os efeitos de uma dose única de 4mg/kg de PS-1, administrada por via endovenosa, sobre os leucócitos sanguíneos, parâmetros bioquímicos e histologia dos órgãos ou, por via intraperitoneal, sobre os eritrócitos da medula óssea. Foram utilizados oito camundongos Swiss fêmeas, por grupo, sendo o grupo controle negativo tratado com solução salina (NaCl 0,9%), o grupo controle positivo tratado com a concentração padrão de 33mg/kg de ciclofosfamida (Enduxan®, Abbott) e o grupo teste tratado com 4mg/kg de PS-1. A PS-1 e a ciclofosfamida foram dissolvidas em solução de NaCl 0,9% e o volume administrado foi de 100µL por camundongo. Após períodos de 24h ou 48h os animais eram mortos por anestesia com éter etílico e avaliados o leucograma, teste de genotoxicidade e citotoxicidade em eritrócitos da medula óssea, concentrações séricas de uréia, creatinina, aspartato-aminotransferase e alanina-aminotransferase e histopatologia do fígado, baço, rim e cérebro. Para os camundongos mortos com

7 ou 14 dias foram avaliados o leucograma e a histopatologia dos órgãos acima referidos.

14. DETERMINAÇÃO DO LEUCOGRAMA

Imediatamente após a coleta do sangue, uma gota foi distendida sobre lâmina para microscopia que, após secagem era fixada com metanol absoluto e corada com solução Wright-Giemsa a 10% em STF pH 6,9 por 10 min. A análise diferencial dos leucócitos (monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) foi feita por microscopia óptica com aumento de 1000x, por um único observador. Foram examinados 200 leucócitos por preparação e os valores expressos em percentagem do tipo celular.

Para a contagem global de leucócitos, amostra de 20 μ L do sangue era transferida para tubos Eppendorf (1,5mL) contendo 380 μ L de solução hemolítica de Turk (ver Anexo 2), homogeneizado e, após 10min em repouso a suspensão de era novamente homogeneizada e quantificada em hematocitômetro com aumento de 400x, por um único observador.

15. QUANTIFICAÇÃO DE MICRÔNÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA

Possíveis efeitos genotóxicos da PS-1 foram avaliados por meio da contagem dos micronúcleos (MN) de eritrócitos policromáticos (células jovens cujo citoplasma ainda contém ARN) ou normocromáticos (células maduras cujo citoplasma não mais contém ARN) da medula óssea de camundongos tratados com PS-1 (4mg/kg) ou ciclofosfamida (33mg/kg), como controle positivo, ou solução de NaCl 0,9% como controle negativo, por 24 ou 48 horas. Esse procedimento baseou-se na técnica de Rabello-Gay (1991).

Após a morte dos camundongos por anestesia profunda com éter etílico, os dois fêmures foram retirados, as epífises proximais cortadas e as células da medula óssea coletadas por meio da lavagem com 200µL de soro fetal bovino. Da suspensão de células retirou-se uma alíquota que, após ser distendida sobre lâmina para microscopia e secada, foi fixada com metanol absoluto e corada com solução de Giemsa a 10% em STF pH 7,2, por 10 minutos. Foram analisados 1000 eritrócitos normocromáticos (ENC) e 1000 policromáticos (EPC) por microscopia óptica com um aumento de 1000x, por um único observador. Considerou-se, nessa análise, a frequência de MN presentes em cada uma das fases de maturação dos eritrócitos (EPC ou ENC), para avaliar a genotoxicidade, e a proporção entre EPC e ENC, para o cálculo do índice de eritrócitos policromáticos (%PCE), que é indicativo de citotoxicidade.

16. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE URÉIA, CREATININA, ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE E ALANINA-AMINOTRANSFERASE

Para a determinação de possíveis danos celulares causados pela PS-1 ao fígado ou rim foram avaliados os níveis séricos de uréia, creatinina, aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT). As amostras de sangue coletadas dos camundongos tratados com 4mg/kg de PS-1, ou do grupo controle tratado com solução de NaCl 0,9%, foram cuidadosamente transferidas para um tubo Eppendorf (1,5mL), para evitar hemólise, e mantidas em repouso por 30min em banho-maria a 37°C, para a formação do coágulo. Posteriormente o sangue foi centrifugado a 400xG à temperatura ambiente por 10min, o soro coletado e mantido a 4°C por duas horas e, então, foi analisado. As análises foram feitas com o sistema espectrofotométrico automatizado ADVIA 1650 (Bayer Corporation, Tarrytown, EUA) no Laboratório Sabin de Análises Clínicas, Brasília.

17. DETERMINAÇÃO DA DOSE TÓXICA DE PS-1 EM CAMUNDONGOS SWISS

Para determinar a dose tóxica da PS-1, camundongos foram injetados por via endovenosa com 100 μ L de diferentes concentrações do peptídeo em solução de NaCl 0,9% (4, 8, 16 ou 32mg/kg). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de solução de NaCl 0,9%, injetada pela mesma via. A PS-1, nas diferentes concentrações, foi administrada a cada dois camundongos, por vez, e a ausência de manifestações clínicas (taquipnéia, taquicardia, prostração e letargia) nos 15 minutos subseqüentes foi utilizada como critério para administrar concentrações superiores, enquanto a presença desses sintomas serviu de critério para a interrupção do experimento.

Os camundongos utilizados nesse experimento foram observados por um tempo máximo de 24 horas e então, foram anestesiados com éter etílico e mortos com o aprofundamento da anestesia. O sangue foi coletado, por meio de punção cardíaca, para avaliação do leucograma de todos os camundongos, enquanto que os órgãos (fígado, baço, rim, pulmão e cérebro) foram retirados daqueles tratados com 32mg/kg para os estudos histopatológicos (ver método abaixo).

18. ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS

Os espécimes (fígado, baço, rim, pulmão e cérebro) foram crivados em fragmentos representativos, fixados em solução aquosa de paraformaldeído (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) a 5% durante quatro horas, em temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratados por meio de imersão seqüencial em soluções alcoólicas, com percentual decrescente de água, diafanizados em xilol e, posteriormente, embebidos em parafina quente (60°C). Os blocos de parafina contendo os espécimes foram mantidos sob refrigeração (4°C) até serem

seccionados em micrótomo.

Os fragmentos dos órgãos foram integralmente seccionados com 5µm de espessura, selecionando-se um corte a cada 250µm. Em seguida, foram corados com hematoxilina-eosina, segundo o protocolo padrão para (ver Anexo 2). As observações foram feitas em microscopia óptica com aumento topográfico, por um único observador, e posteriormente foram fotografadas com equipamento Sony Cyber shot camera model DSC-P72, 3,2 megapixels.

19. DETERMINAÇÃO IN VITRO DA DOSE TÓXICA DE PS-1 SOBRE LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS

A *Leishmania (L.) amazonensis*, originalmente mantida criopreservada, foi transferida para meio NNN-LIT (Novy-MacNeal-Nicolle + liver infusion tryptose) e mantida em estufa entre 24°C, até que os parasitos atingissem a fase log de crescimento, a qual foi verificada por quantificação em hematocítômetro. Em seguida, uma alíquota dessa suspensão era transferida para o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino e 0,2% de sulfato de gentamicina e incubadas a 24°C até atingirem 1×10^6 parasitos/mL, concentração necessária para o início dos experimentos (Childs 1977).

Para a avaliação da dose tóxica de PS-1, formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^5 parasitos/100µL), em meio RPMI 1640 completo, foram incubadas com 100µL das diferentes concentrações do peptídeo (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ou 64µg/mL) na formulação de meio RPMI 1640 acima referida. Como controle positivo, utilizou-se solução de N-metilglucamina (Glucantime® Rhodia Pharma), na concentração de 4µg/mL, e como controle negativo, o próprio meio RPMI 1640. Os experimentos foram realizados em triplicatas, em placa de microcultivo de fundo plano (96 escavações) (LAbTech, Melbourn, Inglaterra).

Após incubação a 24°C, por 2 ou 6 horas, os parasitos foram quantificados em hematocítômetro, com aumento de 400x ao microscópio óptico. Como parâmetro de viabilidade consideraram-se a morfologia e a mobilidade.

Em outro experimento incubaram-se formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^5 parasitos/100µL) com 64µg/mL de PS-1, em meio RPMI 1640 completo por 6 horas e, em seguida, os cultivos eram transferidos para frasco de cultura (Corning[®], Corning, EUA) contendo 9mL de meio RPMI 1640 completo e incubados por 7 dias, a 24°C, para verificar o crescimento dos parasitos. O crescimento das leishmânias era diariamente verificado ao microscópio óptico de luz invertida, com aumento de 400x.

20. DETERMINAÇÃO IN VITRO DA DOSE TÓXICA DE PS-1 SOBRE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

A avaliação do efeito da PS-1 sobre cultivos de *Plasmodium falciparum* foi realizada no Laboratório de Malária do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília.

Frascos de criopreservação contendo estabilato de *P. falciparum* da cepa Pf169, mantidos em nitrogênio líquido a -196°C, foram descongelados a 37°C, e iniciados cultivos em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de *pool* de soro humano durante 2 semanas, para adaptação do plasmódio ao crescimento in vitro. Para avaliar o efeito tóxico da PS-1 sobre o parasito, foram iniciados cultivos em placa de fundo plano e 96 escavações (LAbTech, Melbourn, Inglaterra) com 100µL de suspensão de eritrócitos humanos O⁺ em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de *pool* de soro humano, com 0,6% de parasitemia e 3% de hematócrito. Alíquotas de 100µL de diferentes concentrações de PS-1 (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128µg/mL), ou de artesunato de sódio (Artemix[®] 60mg Ativus, São Paulo, Brasil), na concentração de 8ng/mL, em meio RPMI 1640

suplementado com 20% de *pool* de soro humano, foram distribuídas nas placas contendo os eritrócitos parasitados por *P. falciparum* e as placas incubadas em câmara úmida, a 37 °C, na presença de ar + 5% de CO₂ por 48 ou 72 horas. Os cultivos de 72h foram submetidos à troca do meio após 48h em incubação, retirando-se 150µL do sobrenadante de todas e acrescentando-se igual volume das soluções contendo as diferentes concentrações de PS-1, artesunato de sódio ou meio RPMI 1640 (controle negativo).

Após 48 ou 72 horas de cultivo, desprezava-se o sobrenadante de cada escavação, homogenizava-se o sedimento e preparavam-se distendidos em lâmina de microscopia que, após secagem, eram fixadas com metanol absoluto e coradas com solução de Giemsa a 10% em STF pH 6,9, por 10 minutos. A determinação do percentual de trofozoítos (jovens ou adultos) e esquizontes (jovens ou adultos) foi realizada pela observação de 1000 eritrócitos, em cada preparação, por microscopia óptica com aumento de 1000x, por um único observador.

21. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os testes estatísticos empregados para a comparação entre os grupos foi o ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido pelos métodos de Student-Newman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações. Para as comparações entre duas amostras foram usados o teste t-Student ou o de Mann-Whitney. As análises foram feitas empregando-se o programa Sigma-Stat (Jandel Scientific, San Rafael, CA) e os gráficos, usando o programa Microcal™ Origin 6.0® (Microcal Software Inc. 1999), ou o Prism® Software Package (GraphPad, USA, 1997). Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

1. ENSAIOS DE TOXICIDADE *IN VITRO*

1.1. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE A ADERÊNCIA DE CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Possíveis efeitos tóxicos da PS-1 sobre células peritoneais de camundongos, tratadas com diferentes concentrações de PS-1 (1, 10, 100, 200 e 300µg/mL), foram avaliados por meio da variação do percentual de aderência das células às lamínulas.

Os resultados mostraram que o percentual de aderência foi decrescente, em relação ao controle, nas concentrações superiores a 100µg/mL de PS-1 (Fig. 5). Além da grande redução no percentual de aderência obtida nas preparações incubadas com 200 ou 300µg/mL observaram-se também muitos restos celulares (dados não mostrados). Este resultado permitiu a constatação que, nessas concentrações, a PS-1 apresenta efeitos tóxicos para células peritoneais.

Diferentemente do que ocorreu com as células incubadas com altas concentrações de PS-1, observou-se que as preparações incubadas com 1µg/mL apresentaram aumento significativo do percentual de aderência (58% maior) em relação ao do grupo controle (Fig. 5a).

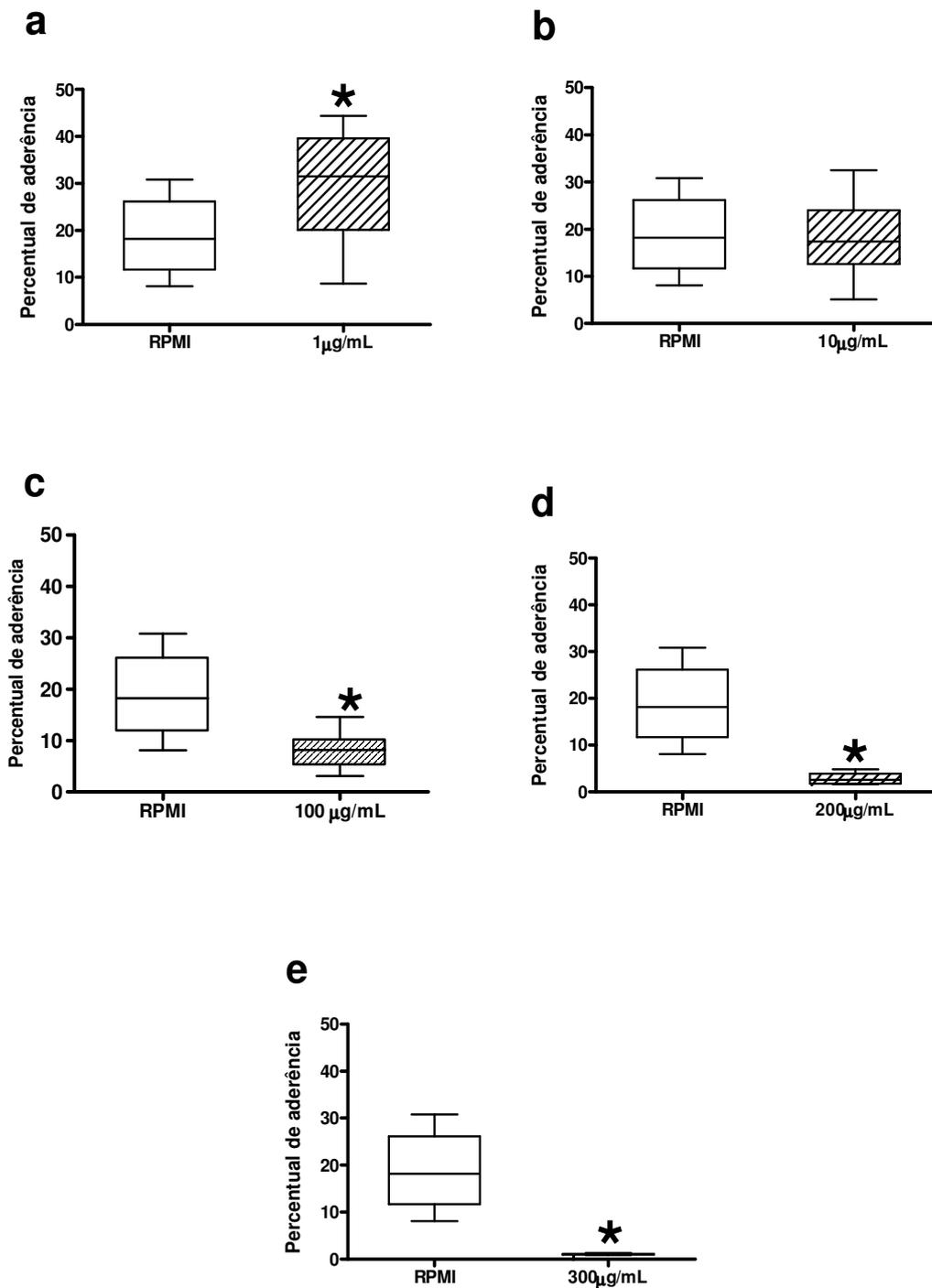


Figura 5. Percentual de aderência de células peritoneais de camundongos tratadas com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão, contendo 25×10^3 células, de cada camundongo ($n=8$), foi incubada em duplicata em placa de microcultivo (96 escavações). Os resultados de oito experimentos, analisados pelo teste de Mann-Whitney, indicaram diferenças entre o controle e os grupos tratados com 1 ($p=0,049$) (a), 100 ($p=0,007$) (c), 200 ($p=0,001$) (d) e 300 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,004$) (e), mas não com 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p>0,05$). Estão representados as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximo e mínimo.

A análise entre os grupos mostrou que a utilização de concentrações superiores a 100µg/mL de PS-1 reduz significativamente o percentual de aderência das células peritoneais de forma dose dependente (Fig. 6).

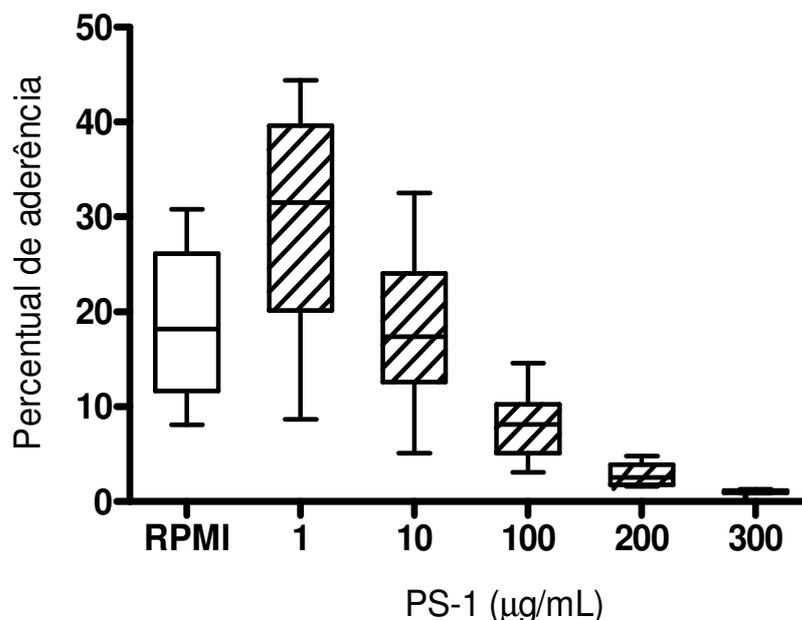


Figura 6. Percentual de aderência das células peritoneais de camundongos tratadas com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão, contendo 25×10^3 células, de cada camundongo ($n=8$), foi incubada em duplicata em placa de microcultivo (96 escavações). Os resultados de oito experimentos, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, indicaram diferenças entre os grupos ($p=0,001$). Houve relação entre a dose e a redução no percentual de aderência. Estão representados as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximo e mínimo.

1.2. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE A FAGOCITOSE POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

A influência da PS-1 sobre a fagocitose de células peritoneais tratadas com as diferentes concentrações de PS-1 (1, 10 ou 100µg/mL) foi avaliada por meio do índice fagocitário, que equivale ao produto entre a percentagem de macrófagos envolvidos na fagocitose e a média de leveduras fagocitadas. Os resultados indicaram que o índice fagocitário nas três concentrações de PS-1 não difere do encontrado no grupo controle (Fig. 7).

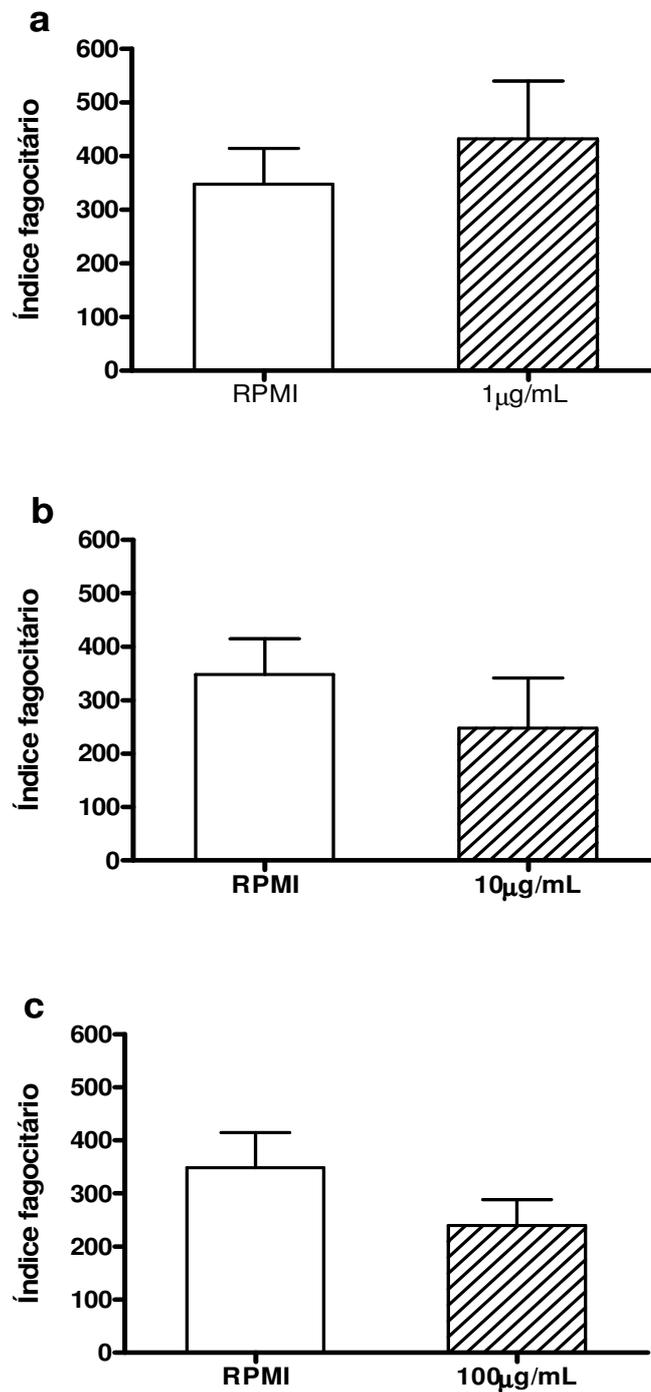


Figura 7. Índice fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão contendo 2×10^5 células de cada camundongo ($n=5$) foi incubada com 4×10^6 leveduras por escavação em placa de microcultivo de 24 escavações. Os resultados de cinco experimentos, avaliados pelo teste t de Student, não mostraram diferenças entre o controle e os grupos tratados com a PS-1. Estão representados as médias e desvios padrão.

Observou-se que nas preparações incubadas com 10 μ g/mL de PS-1 houve redução de 55% do percentual de células envolvidas na fagocitose (Fig. 8b). Entretanto, as preparações tratadas com 1 ou 100 μ g/mL de PS-1 apresentaram resultados semelhantes aos do controle (Fig 8a,c).

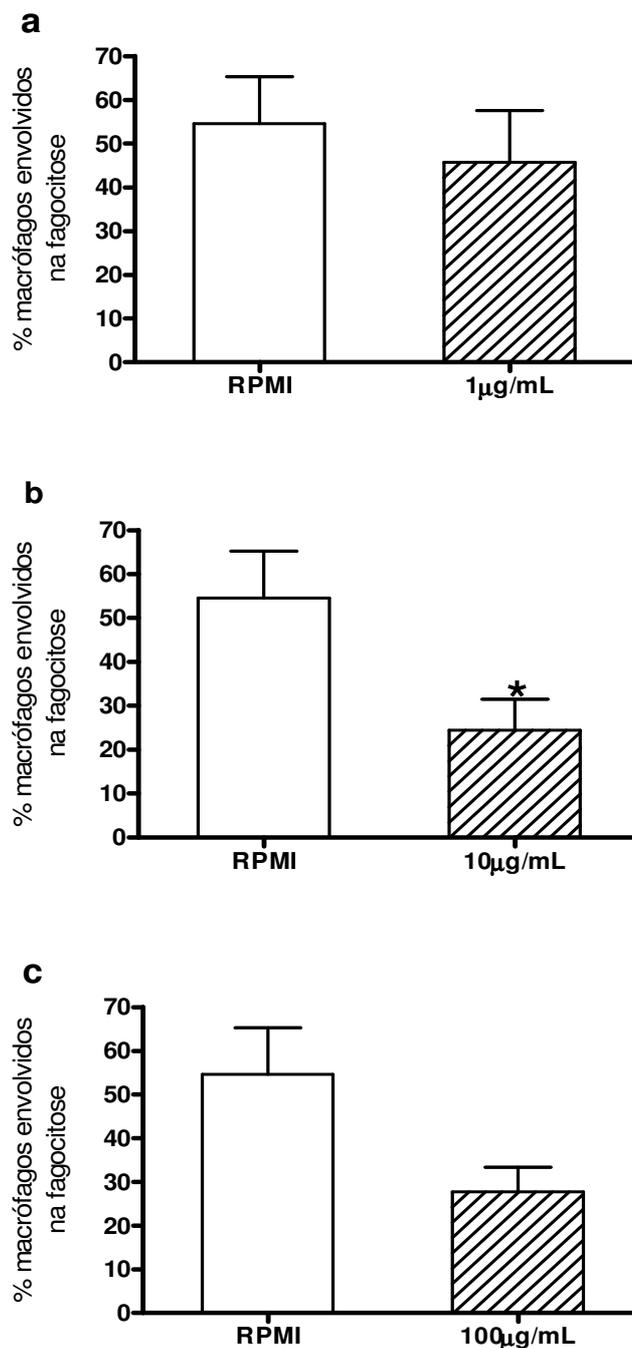


Figura 8. Percentual de macrófagos peritoneais de camundongos envolvidos na fagocitose tratados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão contendo 2×10^5 células de cada camundongo ($n=5$) foi incubada com 4×10^6 leveduras por escavação em placa de microcultivo de 24 escavações. Os resultados de cinco experimentos, avaliados pelo teste t de Student, mostraram diferenças entre o controle e o grupo tratado com 10 µg/mL de PS-1 (**b**) ($p=0,045$), mas não para o grupo tratados com 1 µg/mL (**a**). Houve tendência à diferenças entre o controle e o grupo tratado 100 µg/mL (**c**) ($p=0,078$). Estão representados as médias e desvio padrão.

A análise entre os grupos mostrou que não houve relação entre a concentração de PS-1 e o percentual de macrófagos envolvidos na fagocitose (Fig. 9).

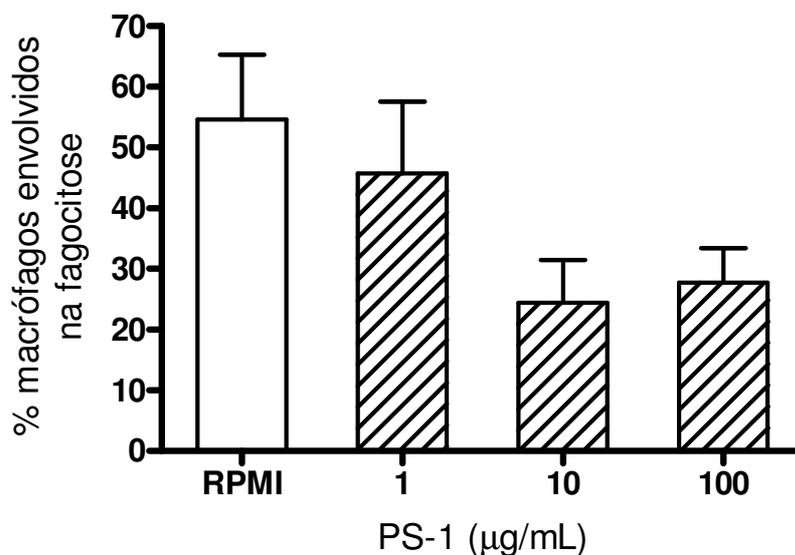


Figura 9. Percentual de macrófagos peritoneais de camundongos, envolvidos na fagocitose, tratados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão contendo 2×10^5 células de cada camundongo ($n=5$) foi incubada com 4×10^6 leveduras por escavação em placa de microcultivo de 24 escavações. Os resultados de cinco experimentos, avaliados pelo teste de ANOVA, não mostraram diferenças entre os grupos ($p=0,115$), o que indica ausência de relação dose resposta. Estão representados as médias e desvios padrão.

Os resultados indicaram que os grupos tratados com as diferentes concentrações de PS-1 (1, 10 ou $100 \mu\text{g/mL}$) apresentaram média de leveduras fagocitadas por macrófago comparável à do grupo controle (Fig. 10). Entretanto, observou-se tendência estatística para diferenças entre o controle e o grupo tratado com $1 \mu\text{g/mL}$ de PS-1 ($p=0,067$). Os macrófagos tratados com esta concentração fagocitaram 44% mais leveduras do que os do grupo controle (Fig. 10 e 11).

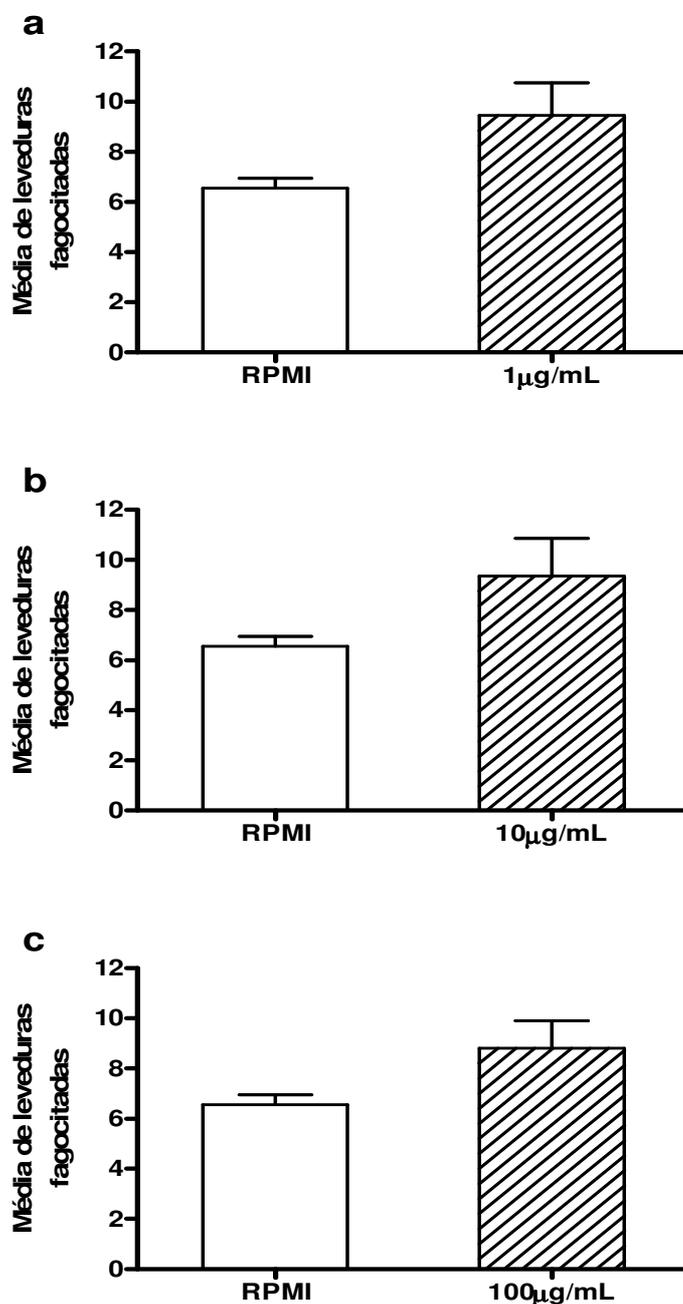


Figura 10. Média de leveduras fagocitadas por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão contendo 2×10^5 células de cada camundongo ($n=5$) foi incubada com 4×10^6 leveduras por escavação em placa de microcultivo de 24 escavações. Os resultados de cinco experimentos, avaliados pelo teste t de Student, não mostraram diferenças entre os grupos, entretanto houve tendência à diferenças entre o controle e o grupo tratado com $1 \mu\text{g/mL}$ de PS-1 ($p=0,067$). Estão representados as médias e desvios padrão.

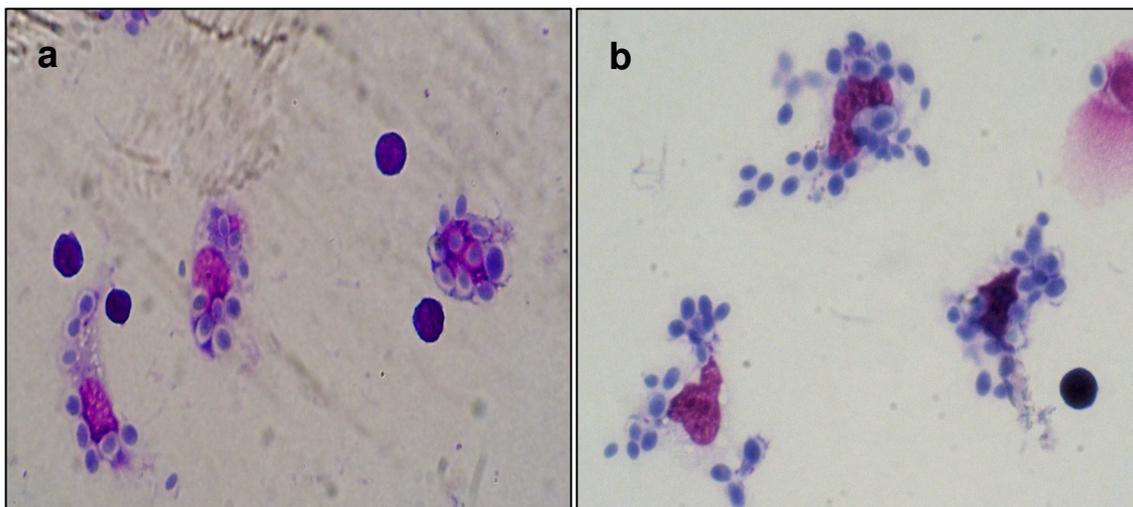


Figura 11. Fotomicrografias de células peritoneais incubadas em meio de cultura RPMI 1640 (a), ou acrescido com 1µg/mL de PS-1 (b). Foram incubadas 2×10^5 células e 4×10^6 leveduras. Aumento 1000x. Coloração de Giemsa.

1.3. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

O efeito de diferentes concentrações da PS-1 (1, 10 ou 100µg/mL) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos peritoneais foi avaliado no sobrenadante dos cultivos, após a incubação por 60 minutos. Os resultados mostraram que o grupo tratado com 1µg/mL de PS-1 apresentou redução de 89% na produção de H_2O_2 em relação ao controle (Fig. 12a). Entretanto, nas preparações tratadas com 10 ou 100µg/mL de PS-1 as concentrações de H_2O_2 foram semelhantes às do grupo controle (Fig. 12b,c).

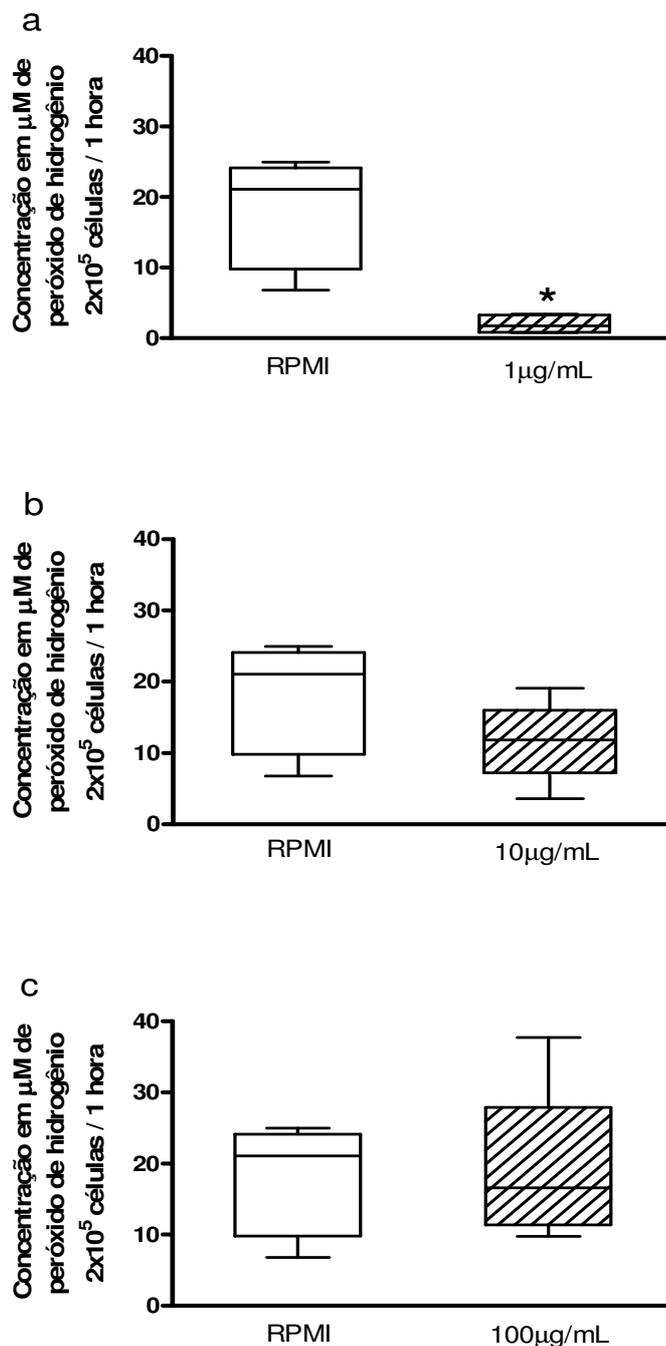


Figura 12. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos incubados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão, contendo 2×10^5 células, de cada camundongo ($n=8$), foi incubada em triplicata em placa de microcultivo (96 escavações). Os resultados de oito experimentos, avaliados pelo teste Mann-Whitney, mostraram diferenças entre o controle e o grupo tratado com $1 \mu\text{g/mL}$ de PS-1 (**a**) ($p < 0,001$), mas não com 10 ($p = 0,090$) ou $100 \mu\text{g/mL}$ ($p = 0,700$). Estão representados as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximo e mínimo.

Os resultados indicaram também que a PS-1 interferiu na síntese de H_2O_2 de forma dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração do peptídeo maior foi a detecção dessa substância (Fig 13).

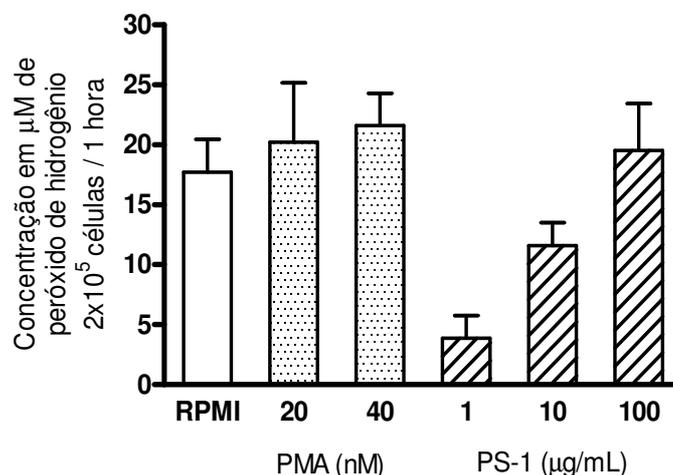


Figura 13. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos incubados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão, contendo 2×10^5 células, de cada camundongo ($n=8$), foi incubada em triplicata em placa de microcultivo (96 escavações). RPMI 1640 ou acetato de forbol miristato (PMA) foram usados como controles negativo ou positivo, respectivamente. Os resultados de oito experimentos, avaliados pelo teste de ANOVA, mostraram diferenças entre os grupos ($p=0,002$), indicando que há relação direta dose-resposta entre a concentração de PS-1 e a produção de H_2O_2 . Estão representados médias e desvios padrão.

1.4. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Os efeitos de diferentes concentrações de PS-1 (1, 10 e $100 \mu g/mL$) sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais foram avaliados no sobrenadante de cultivos, após a incubação por 24 horas. Os resultados mostraram que nas preparações incubadas com $1 \mu g/mL$ de PS-1 houve redução de 85% na produção de NO, em relação ao controle (Fig. 14a). Entretanto, quando tratadas com 10 ou $100 \mu g/mL$ de PS-1 as células apresentaram produção de NO semelhante à do grupo controle (Fig.14b).

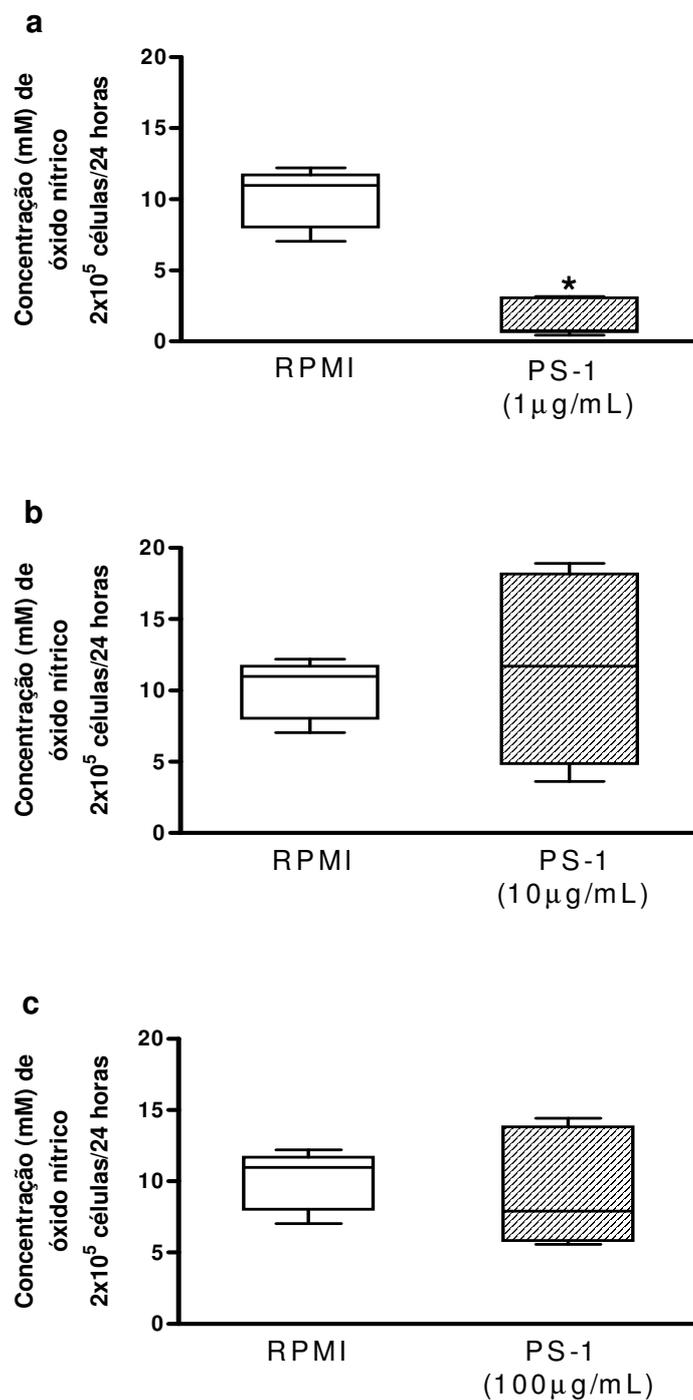


Figura 14. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos incubados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão, contendo 2×10^5 células, de cada camundongo ($n=8$), foi incubada em triplicata em placa de microcultivo (96 escavações). Os resultados de oito experimentos, avaliados pelo método de Mann-Whitney, mostraram diferenças entre o controle e o grupo tratado com $1 \mu\text{g/mL}$ PS-1 (a) ($p < 0,001$), mas não com 10 ou $100 \mu\text{g/mL}$. Estão representados as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximo e mínimo.

O resultado da análise entre os grupos tratados com PS-1 indicou que não há relação entre a concentração do peptídeo e a produção de NO (Fig 15).

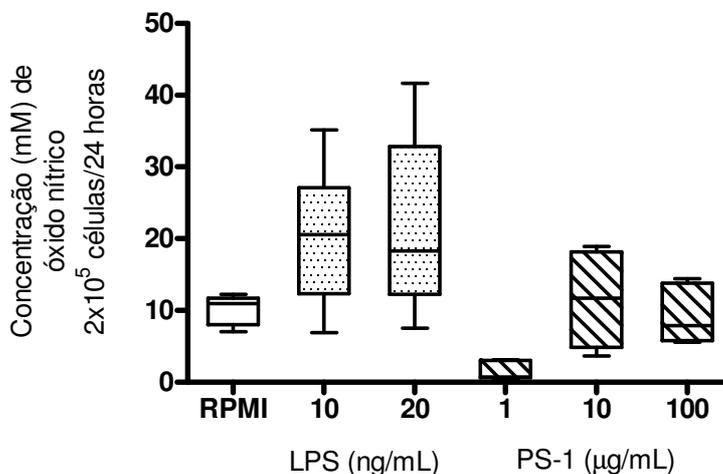


Figura 15. Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos incubados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão, contendo 2×10^5 células, de cada camundongo ($n=8$), foi incubada em triplicata em placa de microcultivo (96 escavações). RPMI 1640 ou lipopolissacarídeo (LPS) foram usados como controle negativo ou positivo, respectivamente. Os resultados de oito experimentos, avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, não mostraram diferenças entre os grupos, o que indica ausência de relação dose resposta. Estão representados as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximo e mínimo.

1.5. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL POR MONÓCITOS HUMANOS

Os efeitos das diferentes concentrações de PS-1 (1, 10 ou 100µg/mL) sobre a produção de fator de necrose tumoral (FNT) por monócitos humanos, *in vitro*, foram avaliados no sobrenadante de cultivos após a incubação por 6 horas. Os resultados mostraram que 10µg/mL de PS-1 causou aumento na concentração de FNT. Enquanto que a mediana da produção de FNT pelos monócitos do grupo controle foi 141µg/mL, as células incubadas com 10µg/mL tiveram uma produção 290% maior (Fig. 16b). Nas demais concentrações de PS-1 (1 ou 100µg/mL) não houve diferenças na produção de FNT, em relação ao controle (Fig. 16a,c).

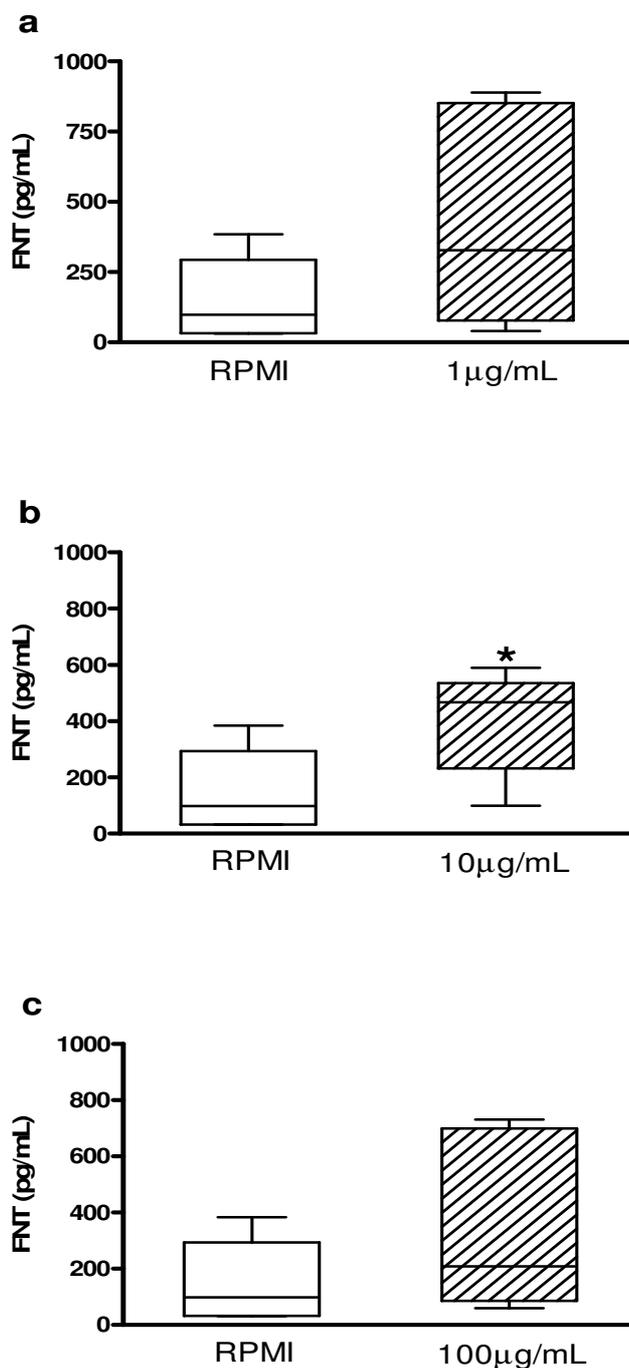


Figura 16. Produção de fator de necrose tumoral (FNT) por monócitos humanos, coletados de seis indivíduos normais, tratados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão, contendo 2×10^5 células, de cada indivíduo ($n=8$), foi incubada em duplicata em placa de microcultivo (96 escavações). Os resultados, avaliados pelo teste de Mann-Whitney, mostraram diferenças entre o controle e o grupo tratado com 10 µg/mL de PS-1 (**b**) ($p=0,026$), mas não com 1 ou 100 µg/mL. Estão representados as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximo e mínimo.

A análise estatística entre os grupos mostrou que não há relação entre a concentração de PS-1 e a produção de FNT (Fig. 17).

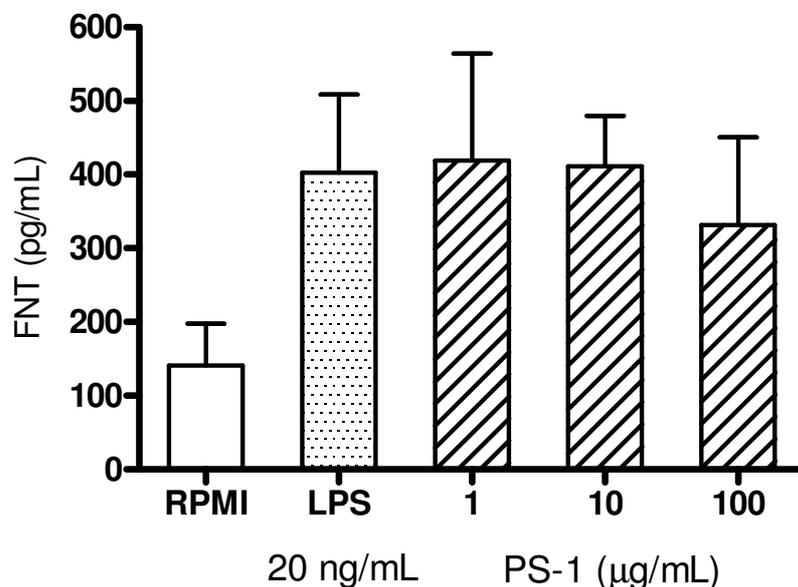


Figura 17. Produção de fator de necrose tumoral (FNT) por monócitos humanos, coletados de seis indivíduos normais, tratados com diferentes concentrações de PS-1. Uma suspensão, contendo 2×10^5 células, de cada indivíduo ($n=6$), foi incubada em duplicata em placa de microcultivo (96 escavações). RPMI 1640 ou lipopolissacarídeo (LPS) foram usados como controle negativo ou positivo, respectivamente. Os resultados de seis experimentos, avaliados pelo teste de ANOVA, não mostraram diferenças entre o controle e os grupos tratados com PS-1 ($p=0,312$), o que indica ausência de relação dose resposta. Estão representados as médias e desvios padrão.

2. ENSAIOS DE TOXICIDADE IN VIVO

2.1. DETERMINAÇÃO DA DOSE TÓXICA DE PS-1

O estudo para avaliar a influência da PS-1 sobre a indução de alterações clínicas indicativas de toxicidade ou mortalidade foi realizado por meio de administração endovenosa de diferentes concentrações do peptídeo (8, 16 ou 32mg/kg). Os resultados mostraram que nas concentrações de 8 ou 16mg/kg a PS-1 não causou quaisquer alterações clínicas que indicassem a presença de

toxicidade nos camundongos. Entretanto, utilizando-se 32mg/kg de PS-1 foi possível observar, durante 10 a 15 minutos, prostração, taquicardia e taquipnéia, as quais foram revertidas espontaneamente após esse tempo.

Os estudos morfológicos realizados nos animais tratados com 32mg/kg de PS-1, 24 horas depois, mostraram leucograma e morfologia dos órgãos (fígado, baço, rim e pulmão) normais.

2.2. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE AS CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO

A influência de 4mg/kg de PS-1 sobre os leucócitos do sangue circulante foi avaliada pela quantificação total e dos diferentes tipos de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) (Tabela 1). Os resultados mostraram que não houve diferença quantitativa ou qualitativa dessas células entre os dois grupos, controle (0,9% NaCl) e tratado.

Tabela 1. Efeitos da filosseptina-1 (PS-1), administrada por via endovenosa a camundongos (n=8), sobre o total ou diferentes categorias de leucócitos no sangue periférico (células/ μ L). O tempo de experimento foi de 24 ou 48 horas e 7 ou 14 dias depois da administração única de 4mg/kg PS-1 ou solução salina (0,9% NaCl (Sal). Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunn para múltiplas comparações. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Tempo	Tratamento	Leucócitos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
		($\times 10^2$) Mediana (25% - 75%)				
24 horas	Sal	72 (65 - 79)	56 (50 - 63)	7 (5 - 9)	6 (5 - 10)	0,8 (0,3 - 1)
	PS-1	82 (67 - 106)	60 (45 - 76)	6 (2 - 1)	9 (3 - 16)	1 (1 - 2)
48 horas	Sal	66 (58 - 70)	54 (50 - 59)	5 (4 - 6)	2 (2 - 4)	0,3 (0 - 0,7)
	PS-1	65 (61 - 69)	57 (54 - 61)	3 (2 - 6)	1 (1 - 2)	0,1 (0 - 0,3)
7 dias	Sal	69 (64 - 75)	54 (50 - 65)	5 (4 - 7)	7 (3 - 8)	0,3 (0,3 - 0,9)
	PS-1	68 (64 - 79)	54 (49 - 67)	5 (3 - 6)	8 (6 - 10)	1 (0,4 - 1)
14 dias	Sal	75 (60 - 91)	66 (55 - 77)	5 (3 - 8)	7 (5 - 8)	1 (0 - 0,9)
	PS-1	86 (70 - 94)	71 (53 - 79)	9 (7 - 10)	4 (3 - 8)	1 (0 - 0,6)

2.3. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE ERITRÓCITOS DA MEDULA ÓSSEA

O estudo da influência da PS-1 sobre os eritrócitos da medula óssea, avaliado por meio do índice de eritrócitos policromáticos mostrou que o peptídeo não causou alterações significantes nos animais tratados com 4mg/kg de PS-1, quando comparados com o grupo controle (Fig. 18).

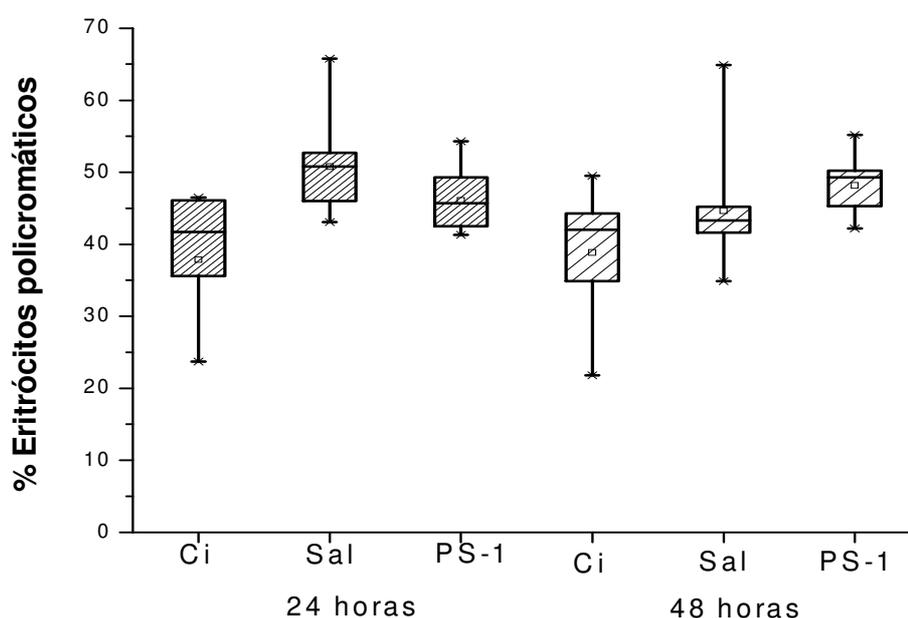


Figura 18. Efeitos da administração endovenosa de 4mg/kg de PS-1, a oito camundongos da linhagem Swiss, sobre o percentual de eritrócitos policromáticos 24 e 48 horas após sua injeção. Como controle negativo foi utilizada solução salina (0,9% NaCl) (Sal) e para controle positivo 33mg/kg ciclofosfamida (Ci). Os efeitos dos tratamentos, avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, mostrou que não houve diferenças entre o grupo tratado com PS-1 e o controle ($p > 0,05$). São mostradas as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximos e mínimos.

O estudo de possível atividade clastogênica (ver glossário) da PS-1, avaliado pela quantificação de micronúcleos em eritrócitos jovens (policromáticos) ou maduros (normocromáticos), mostrou que 24 ou 48 horas após o tratamento

os animais dos grupos controle negativo ou tratado com 4mg/kg PS-1 apresentaram quantidades semelhantes de micronúcleos, o contrário foi observado nos camundongos tratados com ciclofosfamida, nesse houve aumento de micronúcleos nos dois estágios de maturação eritrocitária (Fig. 19).

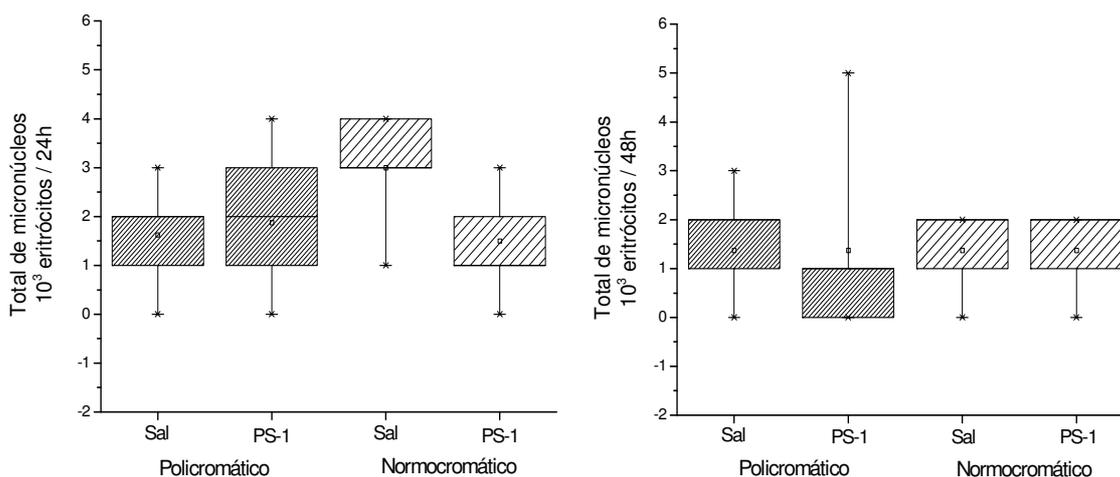


Figura 19. Efeitos da PS-1 24 h (a) ou 48 h (b) sobre o total de micronúcleos por 10³ eritrócitos policromáticos ou normocromáticos, na medula óssea de camundongos. Os animais (n=8) foram tratados com dose única de 4mg/kg de PS-1 ou solução salina (0,9% NaCl) (Sal). O efeito da PS-1, avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis, mostrou que o grupo experimental e controle negativo são semelhantes. São mostrados as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximos e mínimos.

2.4. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE A HISTOLOGIA DO FÍGADO, BAÇO, RIM E PULMÃO

O estudo histopatológico dos órgãos fígado, baço, rim e pulmão mostrou que a administração de 4mg/kg de PS-1 não afetou o parênquima dos mesmos. A figura 20 mostra fotomicrografias dos vários órgãos, provenientes dos animais tratados com solução salina (0,9% NaCl) comparados com aqueles dos animais tratados com o peptídeo, aonde é possível verificar morfologia normal e ausência de processo inflamatório.

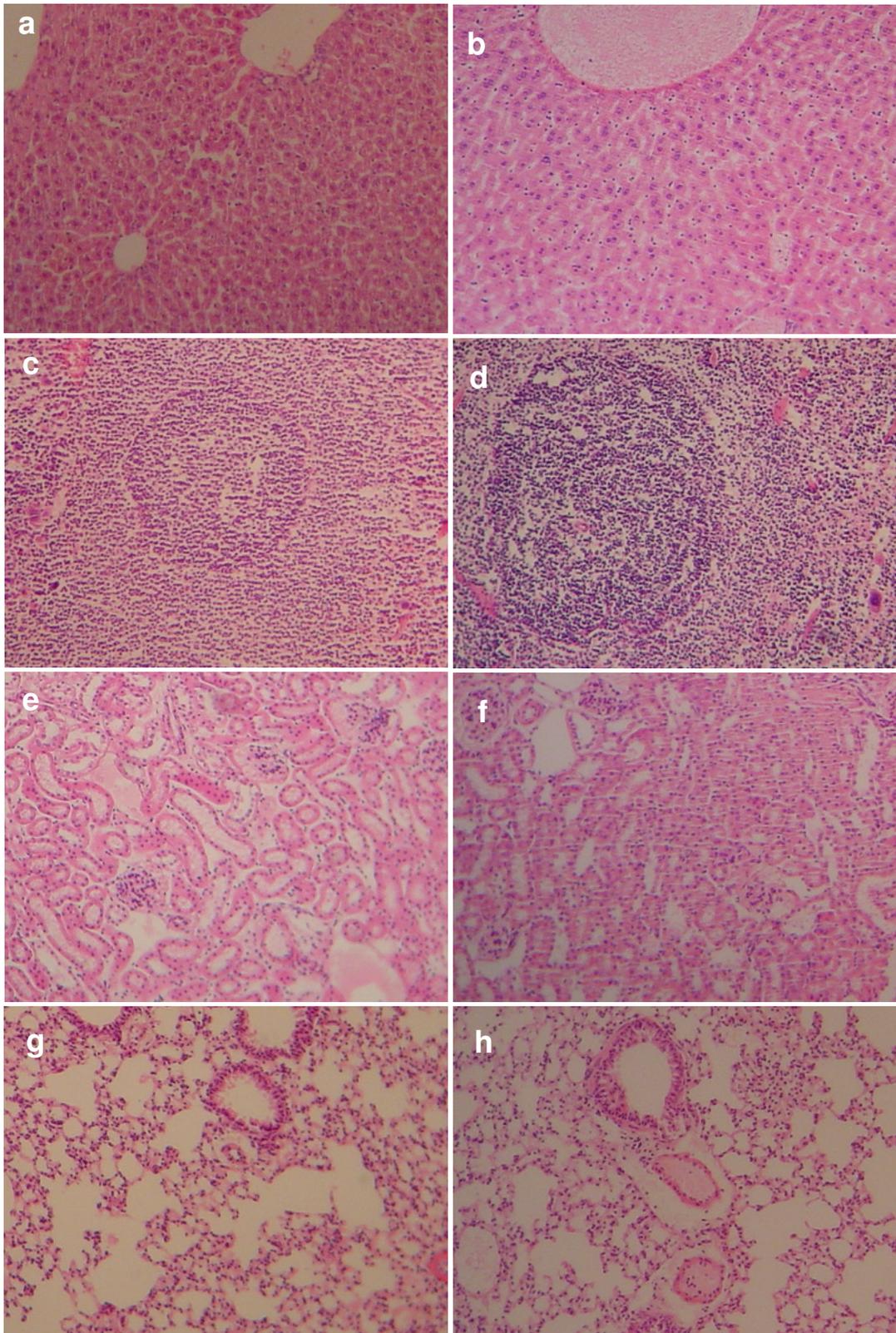


Figura 20. Fotomicrografias do fígado, baço, rim e pulmão de camundongos tratados com solução salina (0,9% NaCl) (**a, c, e, g**) ou tratados com 4mg/kg de PS-1 (**b, d, f, h**), 48 horas após o tratamento. A avaliação feita com microscopia óptica mostrou morfologia normal em todos os órgãos. Coloração hematoxilina e eosina, 100x.

2.5. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE URÉIA, CREATININA, ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE E ALANINA-AMINOTRANSFERASE

O estudo da influência da PS-1 sobre a toxicidade renal ou hepática avaliado pelos níveis séricos de uréia e creatinina (Fig. 21) e das enzimas intracelulares, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina-aminotransferase) (Fig. 22), mostrou que a administração 4mg/kg do peptídeo não causou alterações nas concentrações dessas substâncias no soro dos animais tratados em relação ao grupo controle.

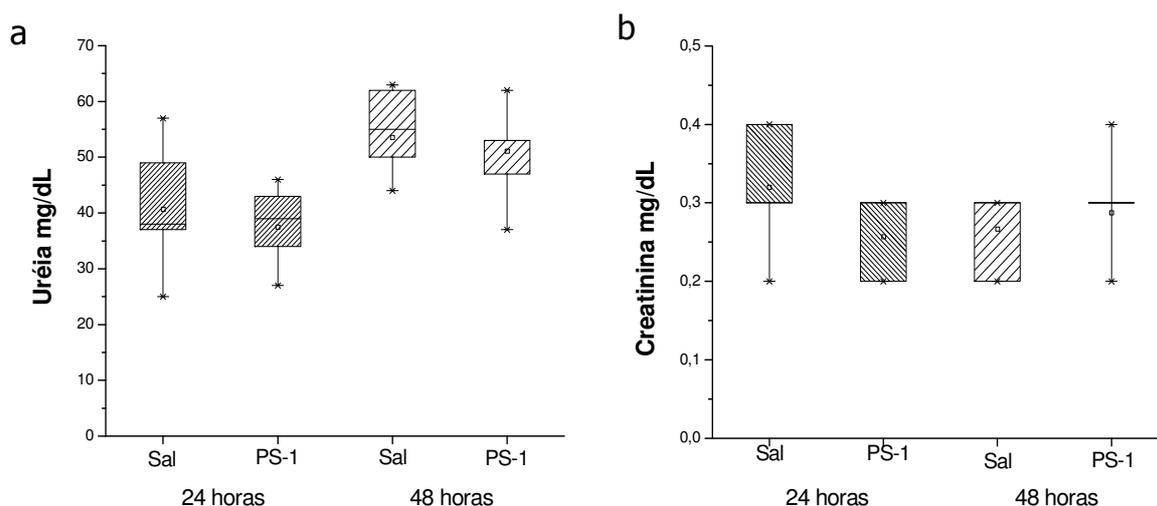


Figura 21. Efeito da PS-1 (4mg/kg), ou solução salina (0,9% NaCl), administrados por via endovenosa a camundongos Swiss (n=8), sobre os níveis séricos de uréia (a) e creatinina (b), 24 ou 48 horas depois do tratamento. Os resultados, avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, não mostraram diferenças entre o grupo tratado com a PS-1 e o controle. Os dados estão representados pelas medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

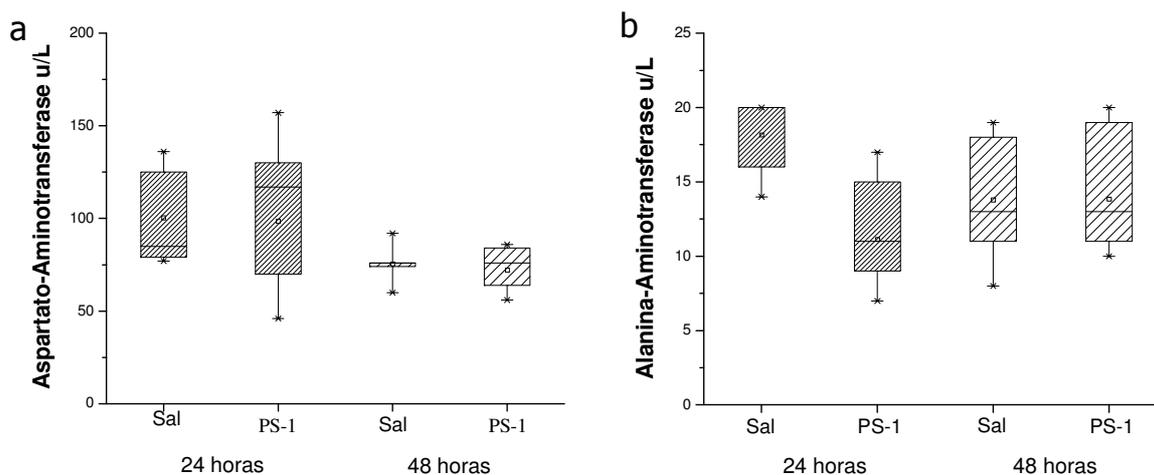


Figura 22. Efeitos da administração endovenosa de 4mg/kg de PS-1, ou solução salina (0,9% NaCl), a camundongos Swiss (n=8) sobre os níveis séricos de aspartato-aminotransferase (**a**), e alanina-aminotransferase (**b**), 24 ou 48 horas depois do tratamento. Os resultados, avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, não mostraram diferenças entre o grupo tratado com a PS-1 e o controle. Estão representados as medianas, quartis superiores e inferiores, valores máximo e mínimo.

3. ENSAIOS ANTIPARASITÁRIOS

3.1. INFLUÊNCIA DA PS-1 SOBRE *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS* E *PLASMODIUM FALCIPARUM*

A influência da PS-1 sobre cultivos de *Leishmania (L.) amazonensis* ou *Plasmodium falciparum* foi avaliada verificando-se o crescimento das duas espécies incubadas com diferentes concentrações do peptídeo. Os resultados mostraram considerável redução do número de protozoários incubados com as diferentes concentrações da PS-1.

3.1.1. *Leishmania (L.) amazonensis*

Os resultados mostraram que todas as concentrações de PS-1 (0,5, 1, 2,

4, 8, 16, 32 ou 64 μ g/mL) causam a redução do número de promastigotas, em relação ao grupo controle, após a incubação por 2h (Fig 23) ou 6h (Fig 24). A análise desses resultados permitiu inferir que as concentrações superiores a 1 μ g/mL de PS-1 são capazes de inibir no mínimo 50% das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Depois da incubação por 6 horas as concentrações equivalentes a 8, 16 ou 32 μ g/mL foram capazes de reduzir 95% do total de parasitos (CI₉₅), enquanto que a inibição total das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foi alcançada com 64 μ g/mL de PS-1 (CI₁₀₀) (Fig. 24h).

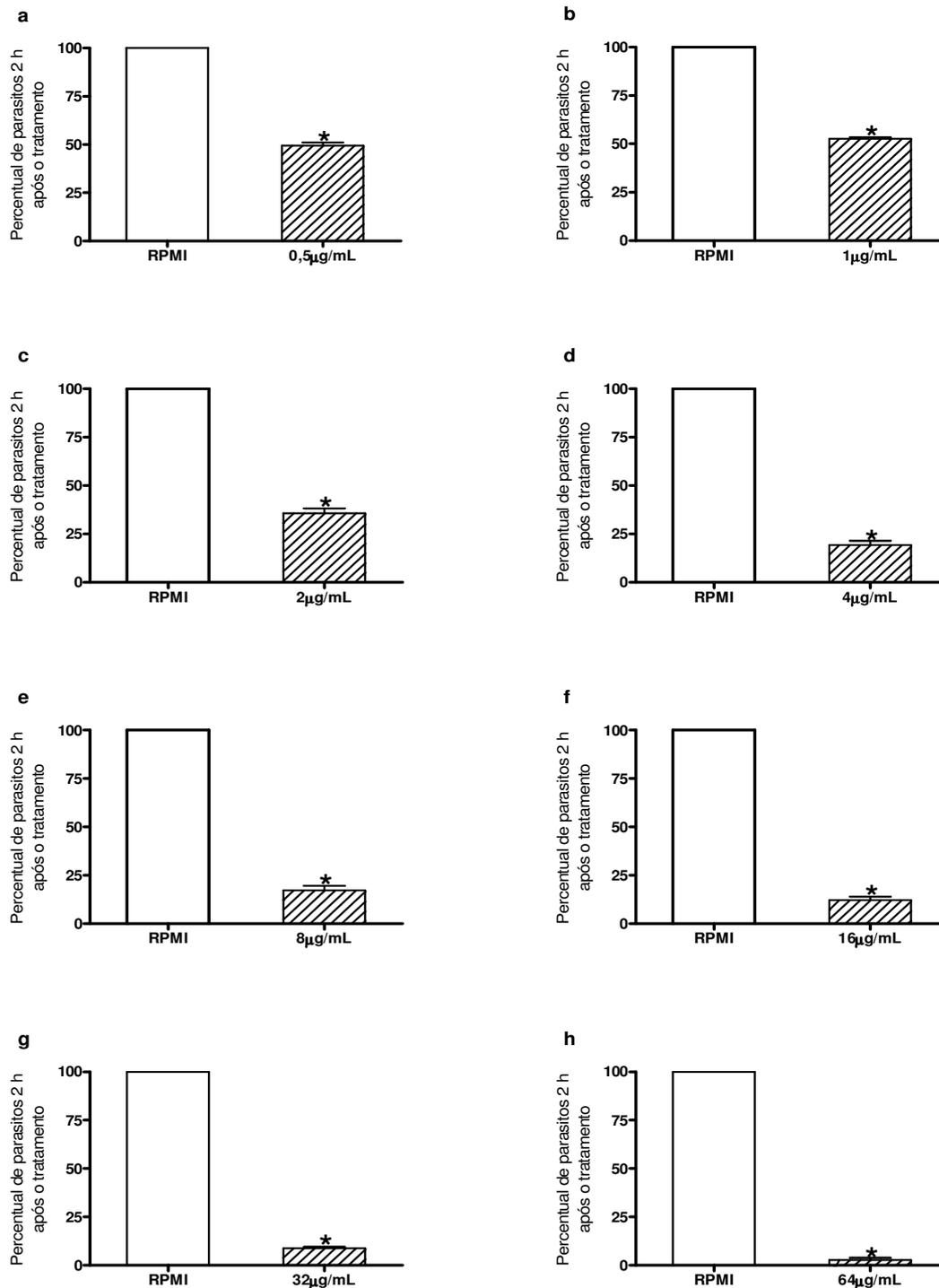


Figura 23. Efeitos de diferentes concentrações de PS-1 sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* para determinar a concentração inibitória (CI) após a incubação por 2 horas. Foram incubados 10^6 parasitos, em triplicata, com diferentes concentrações de PS-1. Os resultados, analisados pelo teste t de Student, mostraram diferenças entre o controle e todos os grupos tratados ($p < 0,001$) e a CI_{50} , após duas horas de incubação foi definida como $1 \mu\text{g/mL}$. Estão representados as médias e desvios padrão.

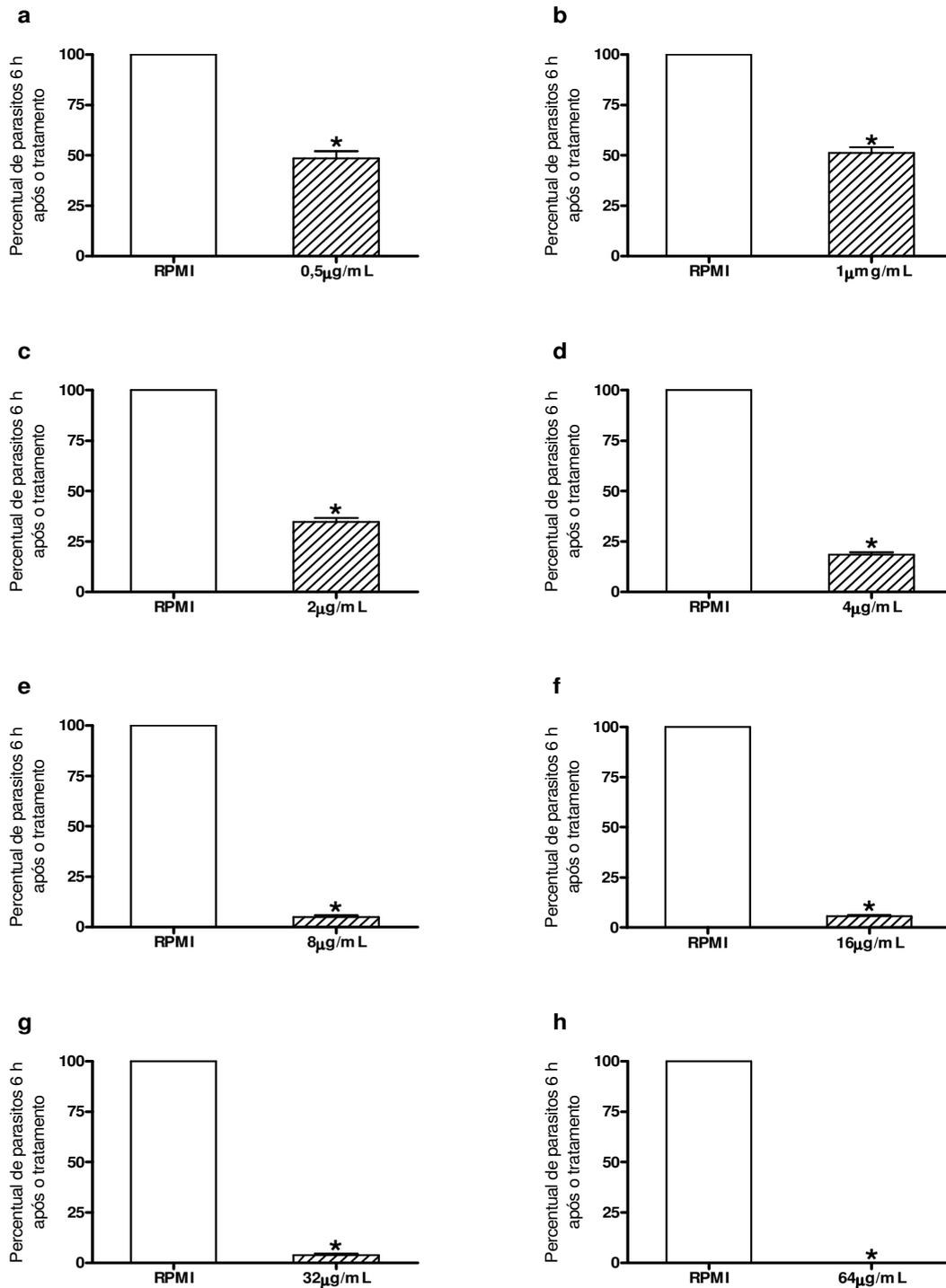


Figura 24. Efeitos de diferentes concentrações de PS-1 sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* para determinar a concentração inibitória (CI) após a incubação por 6 horas. Foram incubados 10^6 parasitos, em triplicata, com diferentes concentrações de PS-1. Os resultados, analisados pelo teste t de Student, mostraram diferenças entre o controle e todos os grupos tratados ($p < 0,001$). Os resultados indicam que a CI_{50} após seis horas de incubação foi de $0,5 \mu\text{g/mL}$ e a CI_{100} foi de $64 \mu\text{g/mL}$. Estão representados as médias e desvios padrão.

Os resultados mostraram que a redução do número de parasitos ocorreu de forma dose dependente (Fig 25 a,b).

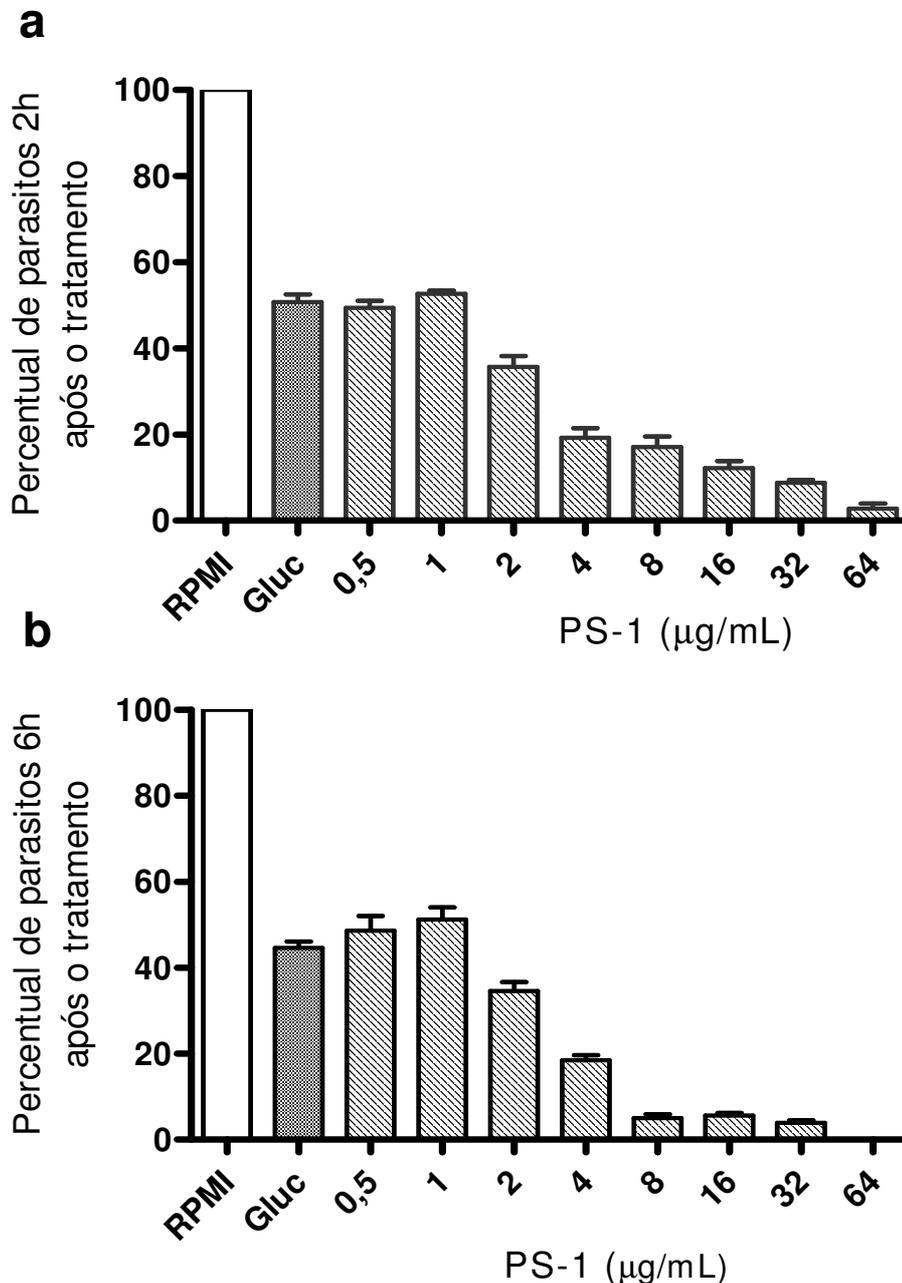


Figura 25. Efeitos de diferentes concentrações de PS-1 sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* para determinar a relação entre a dose e a resposta após a incubação por 2 (a) ou 6 horas (b). Glucantime na concentração padrão de 4µg/mL e meio RPMI 1640 foram usados como controles, positivo e negativo, respectivamente. Os resultados, analisados pelo teste de ANOVA, mostraram diferenças entre os grupos ($p=0,001$) e definiram uma relação inversa entre dose e resposta. Estão representados as médias e desvios padrão.

Amostras coletadas dos cultivos de *Leishmania (L.) amazonensis* após incubação por 2 ou 6 horas, coradas com solução de Giemsa, mostraram que os parasitos tratados com 64 μ g/mL de PS-1 formaram massas amorfas contendo restos celulares, enquanto que aquelas provenientes do grupo controle apresentaram morfologia normal, conforme observado na figura 26.

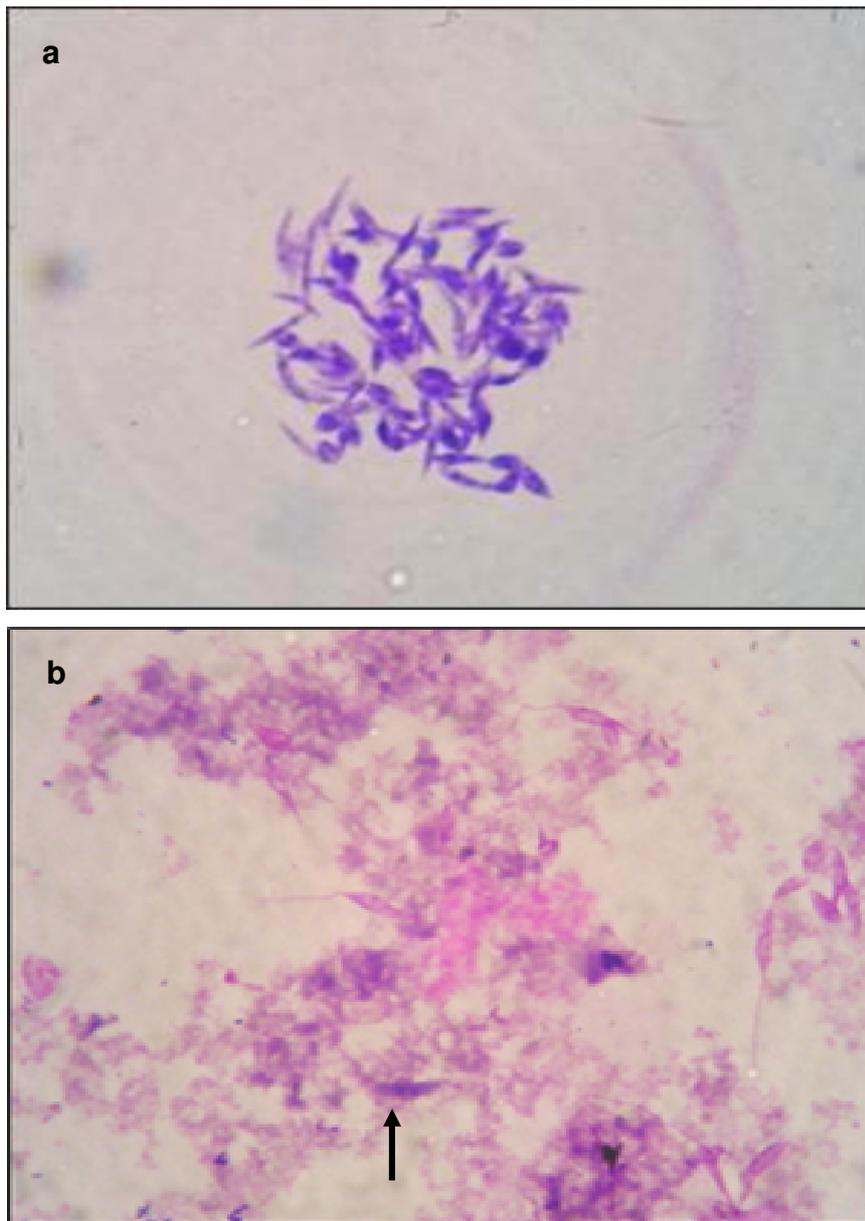


Figura 26. Fotomicrografias de cultivos de *Leishmania (L.) amazonensis*, incubados por 6 horas em meio de cultura RPMI 1640 (a) e acrescido com 64 μ g/mL de PS-1 (b). Observe em (b) a massa amorfa contendo os restos celulares do protozoário (seta). Aumento 1000x. Coloração de Giemsa.

A viabilidade dos parasitos foi avaliada com o repique dos cultivos incubados por 6 horas, grupo controle (meio RPMI 1640) e acrescido com 64µg/mL de PS-1. Esses cultivos novamente incubados por 7 dias, em meio RPMI 1640, mostrou que apenas os parasitos do grupo controle (ausência de PS-1) apresentaram morfologia e crescimento normais, enquanto que aqueles previamente incubados com 64µg/mL de PS-1 não apresentaram parasitos.

3.1.2. *Plasmodium falciparum*

A influência da PS-1 sobre os cultivos de *Plasmodium falciparum* avaliada, em função da concentração e do tempo de incubação, foi verificada após incubação por 48 ou 72 horas.

Nos cultivos incubados por 48 horas observou-se redução da parasitemia nos grupos tratados com concentrações superiores a 32µg/mL, quando comparados ao controle (Fig. 27).

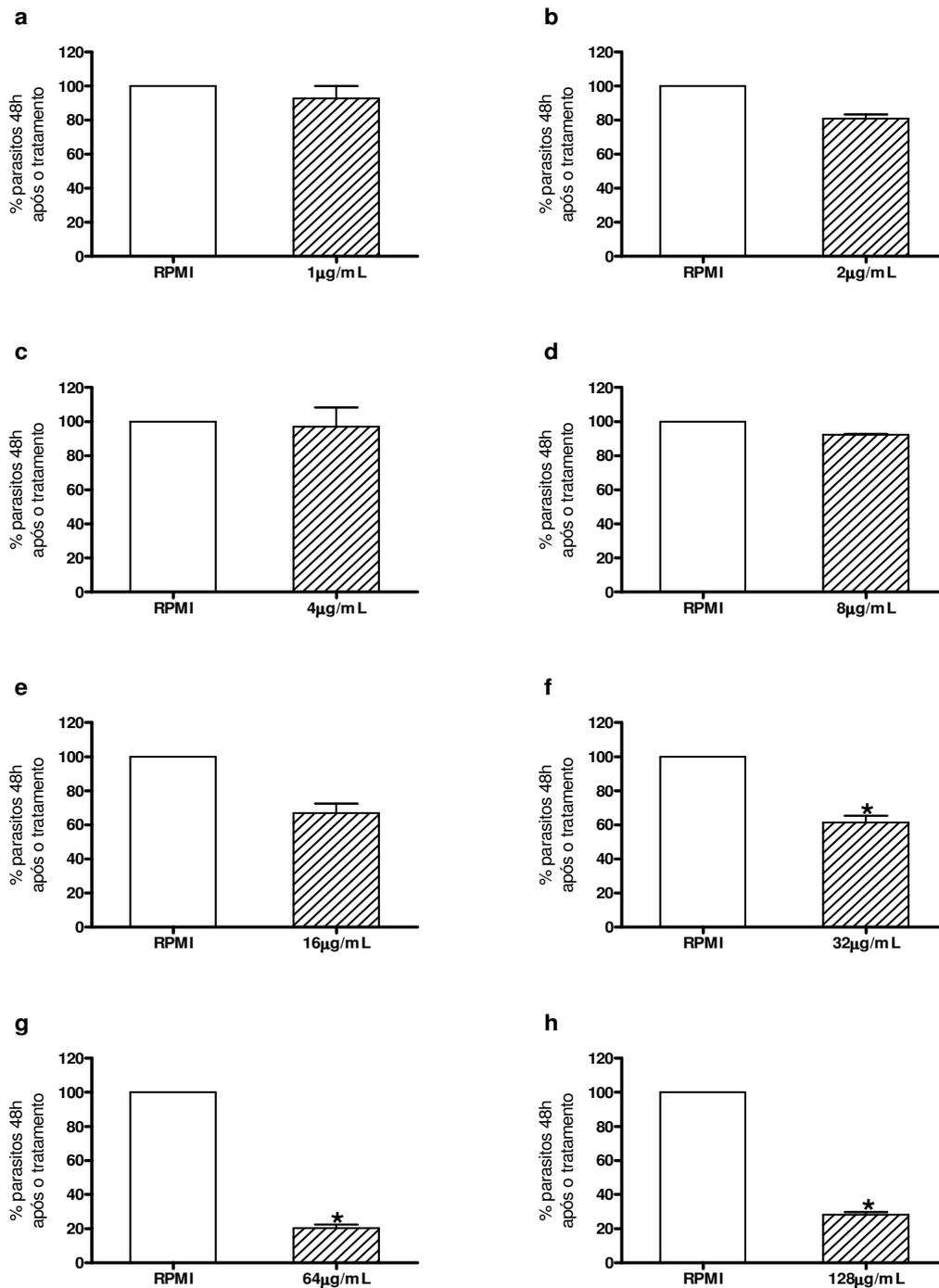


Figura 27. Efeito da PS-1 sobre o crescimento de *Plasmodium falciparum* tratado com diferentes concentrações de PS-1, para determinar a concentração inibitória (CI) 48h após o tratamento. Iniciou-se o experimento, em triplicata, com 3% de hematócrito e 0,6% de parasitemia. Foram analisados 1000 eritrócitos por preparação. Os resultados, avaliados pelo teste t de Student, mostraram diferenças entre o controle e os grupos tratados com 32 ($p=0,004$) (f), 64 ($p=0,001$) (g) e 128 µg/mL ($p<0,001$) (h), mas não com 1, 2, 4, 8 ou 16 µg/mL de PS-1. Estão representados as médias e desvios padrão.

Diferentemente da redução observada com as maiores concentrações, a utilização de 1µg/mL de PS-1, nas preparações incubadas por 72 horas, causou um aumento significativo de 25% na parasitemia (Fig 28a).

Houve redução da parasitemia nas concentrações de PS-1 superiores a 32µg/mL (Fig. 28), entretanto, a maior redução (97%) foi observada nas preparações incubadas com 128µg/mL de PS-1 (Fig. 28h).

As concentrações inibitórias (CI) foram definidas depois da incubação por 72 horas. Como CI_{50} estabeleceu-se a concentração intermediária entre 32 e 64µg/mL, equivalente a 48µg/mL de PS-1, enquanto que 128µg/mL de PS-1 foi definida como a concentração capaz de inibir 97% das formas intraeritrocitárias de *P. falciparum* (CI_{97}).

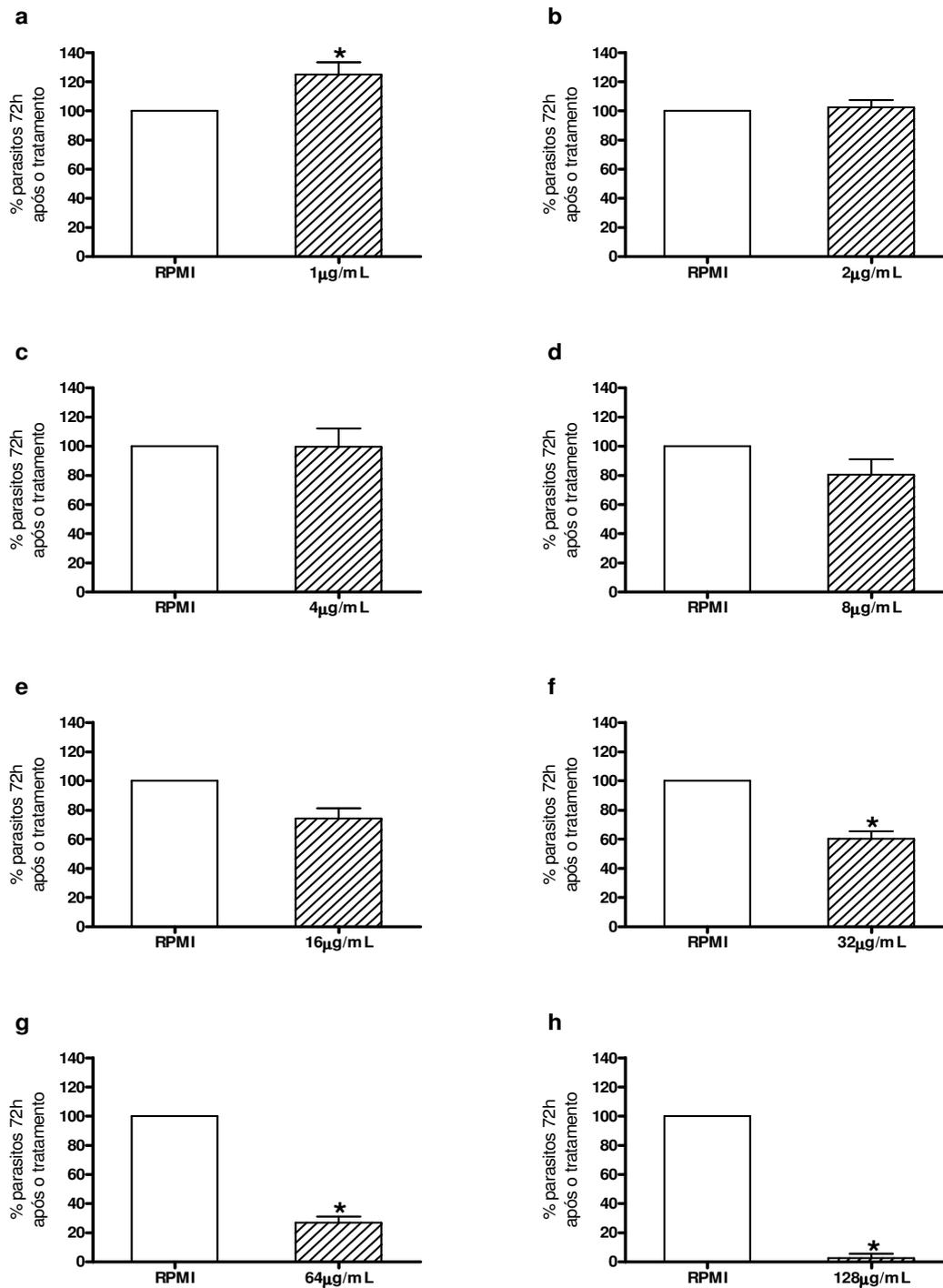


Figura 28. Efeito da PS-1 sobre o crescimento de *Plasmodium falciparum* tratado com diferentes concentrações de PS-1, para determinar a concentração inibitória (CI) 72 horas após o tratamento. Iniciou-se o experimento, em triplicata, com 3% de hematócrito e 0,6% de parasitemia. Foram analisados 1000 eritrócitos por preparação. Os resultados, avaliados pelo teste t de Student, mostraram diferenças entre o controle e os grupos tratados com 1 ($p=0,014$) (a) 32 ($p=0,004$) (f), 64 ($p=0,001$) (g) e 128 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$) (h), mas não com 2, 4, 8 ou 16 $\mu\text{g/mL}$ de PS-1. Estão representados as médias e desvios padrão.

O efeito da PS-1 sobre a redução da parasitemia de *P. falciparum* pode ser facilmente observado na figura 29. Enquanto o grupo controle mostrou crescimento, o tratado com 128 μ g/mL PS-1 após incubação por 72h exibiu redução.

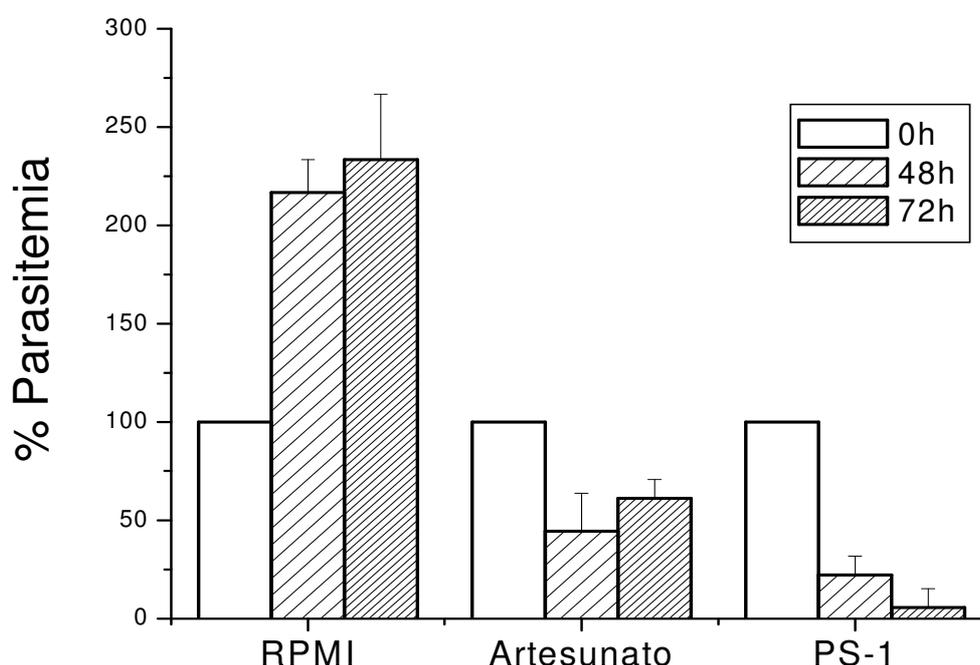


Figura 29. Efeito de 128 μ g/mL de PS-1 sobre a parasitemia de *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, após a incubação por 72h. Meio RPMI 1640 e artesunato de sódio (Art) (concentração padrão de 8ng/mL) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Iniciou-se o experimento, em triplicata, com 3% de hematócrito e 0,6% de parasitemia. Foram analisados 10³ eritrócitos, por preparação, considerando-se as formas intraeritrocitárias (trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e esquizontes). Estão representados as médias e desvios padrão.

A análise entre os grupos mostrou a existência de relação dose resposta, ou seja, quanto maior a concentração de PS-1 menor é a parasitemia de *P. falciparum* 72h após a incubação (Fig. 30b).

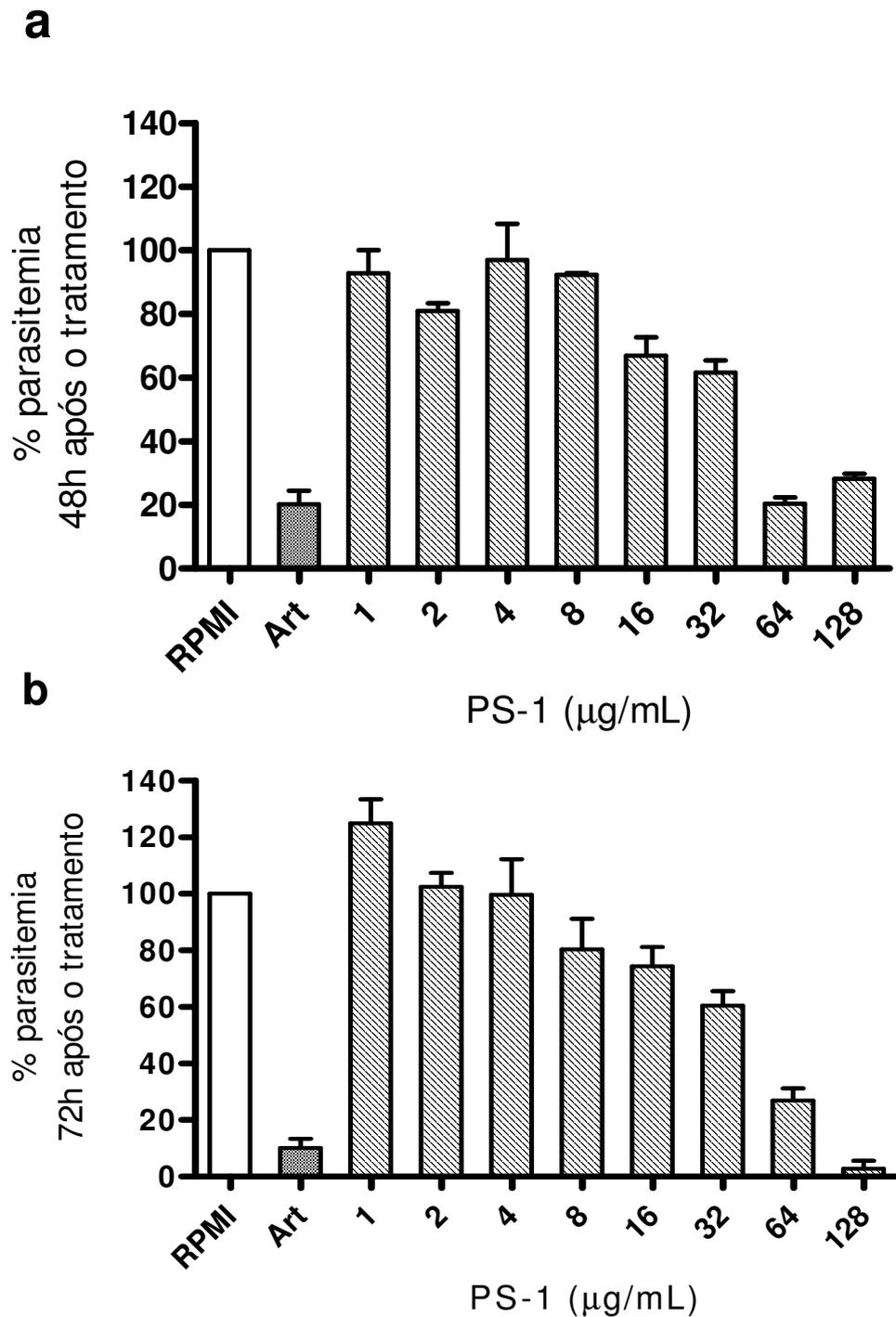


Figura 30. Percentual de parasitemia de *Plasmodium falciparum* tratado com diferentes concentrações de PS-1, para determinar a relação entre a dose e a resposta após a incubação por 48 (a) ou 72 horas (b). Iniciou-se o experimento, em triplicata, com 3% de hematócrito e 0,6% de parasitemia. Meio RPMI 1640 e artesunato de sódio (Art) (concentração padrão de 8ng/mL) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Foram analisados 10^3 eritrócitos por preparação. Os resultados, avaliados pelo teste de ANOVA mostraram diferenças entre os grupos ($p < 0,001$) e indicaram um padrão de dose resposta. Estão representados as médias e desvios padrão.

O efeito da PS-1 também foi observado sobre a maturação das formas intraeritrocitárias, como pode ser visto na tabela 2 e figura 31, nas quatro concentrações de Ps-1 (1, 8, 32 ou 128µg/mL).

Verificou-se, após a incubação por 72 horas, que 1µg/mL de PS-1 causou aumento da velocidade de maturação do *Plasmodium falciparum*. Nesse grupo o percentual de trofozoítos maduros foi 27%, contra 7% para o grupo controle. Observou-se também um aumento de 4% no número de esquizontes maduros (Tab. 2; Fig. 31b,d).

Na concentração de 8µg/mL de PS-1 não se observou diferença na maturação das formas intraeritrocitárias após a incubação por 48 ou 72 horas, em relação ao controle (Tabela 2, Fig. 31e,f). Entretanto, com 32, 64 ou 128µg/mL houve depressão da maturação do *P. falciparum* (Fig. 31g,h,i,j).

Nas preparações incubadas com 128µg/mL de PS-1 verificou-se drástica redução das formas intraeritrocitárias. Depois da incubação por 72 horas foram encontrados apenas 23 parasitos com a concentração de 128µg/mL, contra 150 no grupo controle (Tab. 2). Entretanto dentre as formas encontradas, para a maior concentração de PS-1 (128µg/mL), houve predomínio de esquizontes jovens, contendo de 2 a 4 núcleos (Tab. 2, Fig. 31i,j).

Tabela 2. Percentual de formas parasitárias em cultivos de *Plasmodium falciparum* tratados com diversas concentrações de PS-1. Os dados foram coletados após a incubação por 48 ou 72 horas e são relativos a 10^4 eritrócitos.

Duração do cultivo	Tratamento	Formas parasitárias (%)				Total
		Trofozoíto jovem	Trofozoíto Maduro	Esquizonte jovem	Esquizonte maduro	
48 horas	RPMI	117	3	4	16	140
	1 µg/mL	107	3	4	16	130
	8 µg/mL	117	0	4	16	137
	32 µg/mL	60	7	7	13	87
	128 µg/mL	10	20	16	4	50
72 horas	RPMI	120	10	8	12	150
	1 µg/mL	90	40	2	18	150
	8 µg/mL	87	20	12	8	127
	32 µg/mL	60	23	11	9	103
	128 µg/mL	3	0	18	2	23

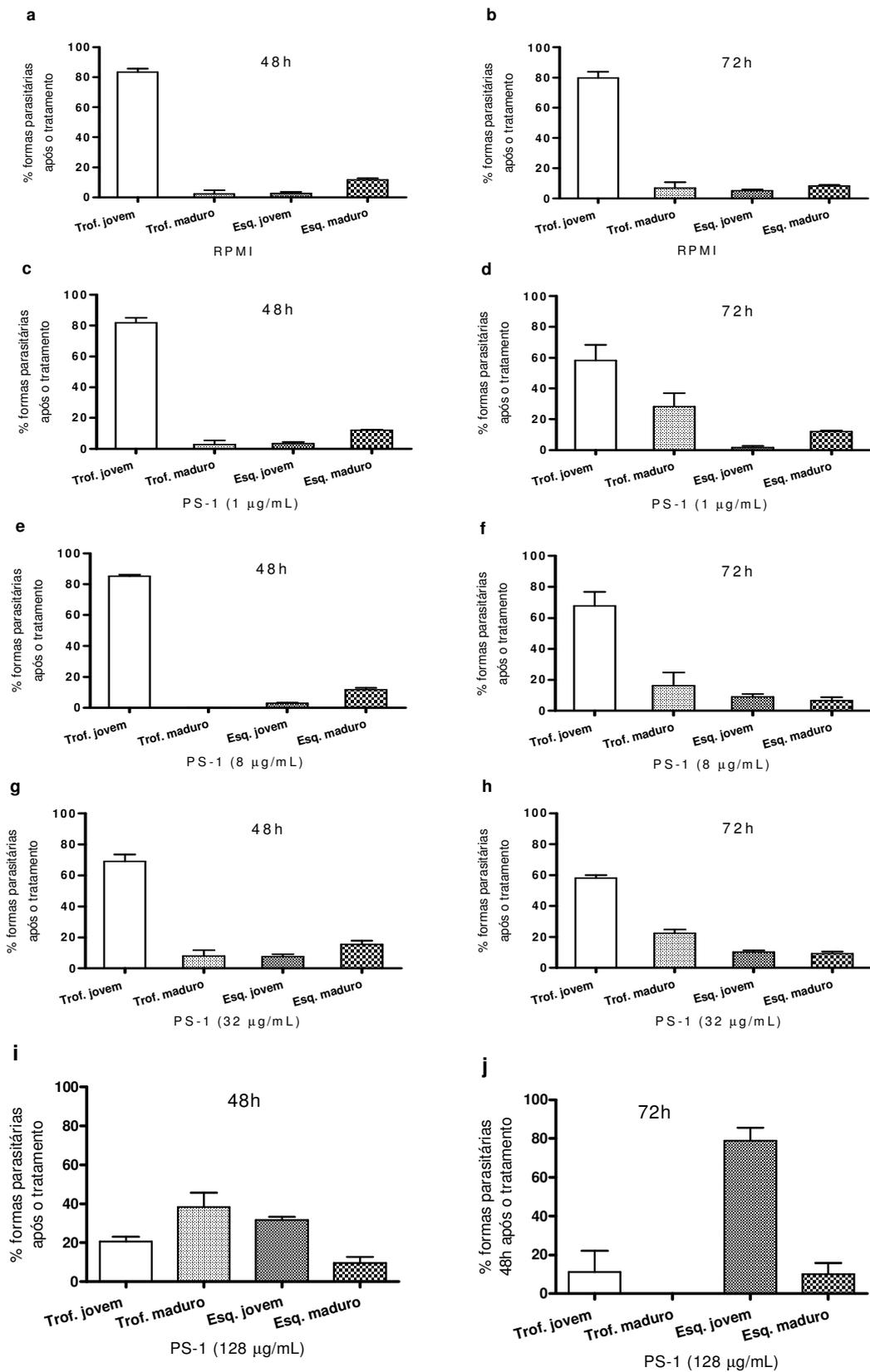


Figura 31. Efeito de diferentes concentrações de PS-1 (1, 8, 32 ou 128µg/mL) sobre a maturação das formas intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, em triplicata, após a incubação por 48 ou 72 horas. Os valores relativos referem-se a 10^4 eritrócitos. Estão representados as médias e desvios padrão.

Observou-se nas preparações incubadas com 128 μ g/mL o predomínio de esquizontes contendo de 2 a 4 núcleos e citoplasma escasso (Fig. 32).

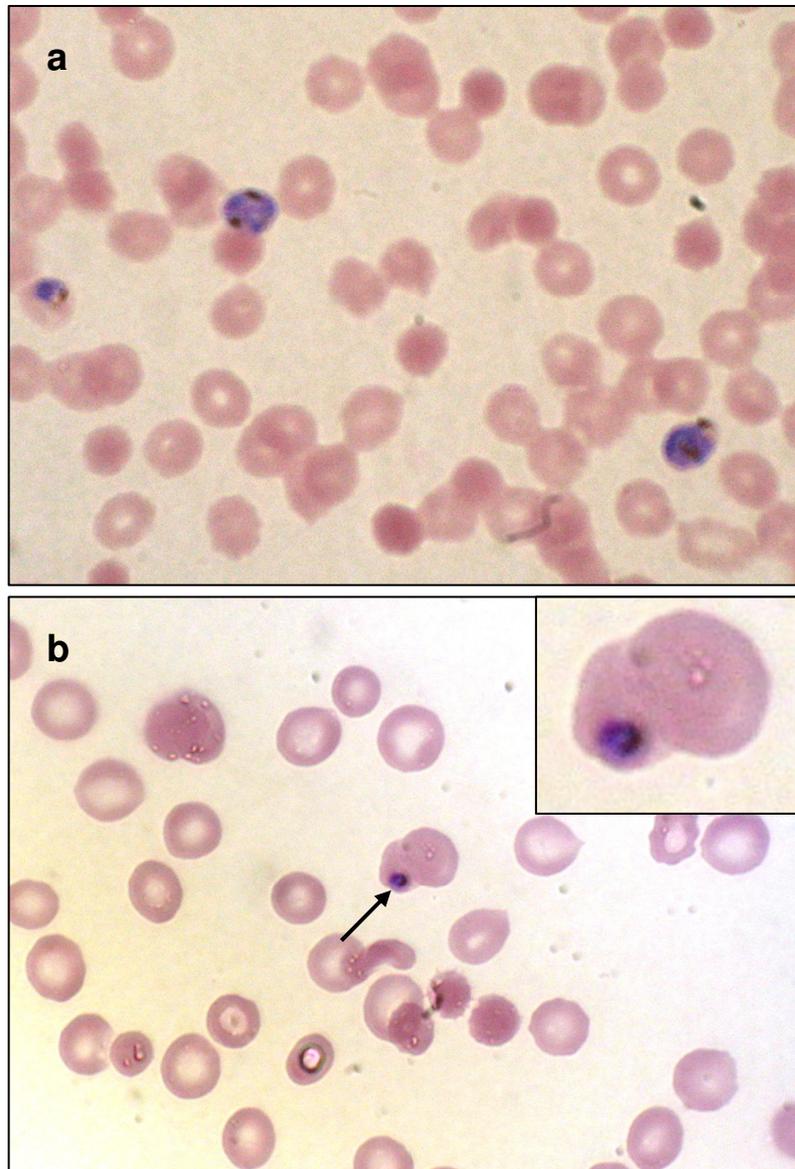


Figura 32. Fotomicrografias de cultivos de *Plasmodium falciparum*, incubados por 72 horas em meio de cultura RPMI 1640 (a) ou acrescido com 128 μ g/mL de PS-1 (b). Observe em (b) um pequeno esquizonte (seta e destacado). Aumento 1000x. Coloração de Giemsa.

Um dos passos relevantes para o desenvolvimento de substâncias voltadas para aplicações biomédicas é a decisão de submeter aos testes clínicos que, em grande parte, se baseia nos resultados dos ensaios pré-clínicos para a avaliação das ações farmacológicas, efeitos biológicos, biodisponibilidade e toxicidade (WHO 2001b). Os estudos de toxicidade são especialmente importantes para estimar a dose inicial a ser administrada e para identificar os parâmetros que necessitarão de monitoramento, como possíveis efeitos adversos, durante os ensaios clínicos.

Os estudos de novos compostos, naturais ou sintéticos, de origem animal ou vegetal, requerem extensa investigação, fundamentais para a passagem da fase pré-clínica para a clínica. Como a filosseptina-1 (PS-1) é uma nova substância sintética e dotada de propriedades que lhe permite interagir com membranas celulares (estrutura secundária em hélice- α , domínios hidrofílicos e hidrofóbicos bem definidos e cationicidade), de onde advém sua atividade antimicrobiana (Leite e cols. 2005), o objetivo da presente investigação foi avaliar seus efeitos sobre quatro sistemas biológicos: células peritoneais de camundongos, *in vitro*; monócitos humanos, *in vitro*; camundongos da linhagem Swiss, *in vivo*; protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Plasmodium*, *in vitro*. O peptídeo foi selecionado para esse estudo por ser candidato potencial para aplicações biomédicas, especialmente como agente antimicrobiano.

TOXICIDADE IN VITRO

Os efeitos da PS-1, *in vitro*, foram observados sobre células obtidas da cavidade peritoneal de camundongos ou monócitos humanos coletados de sangue venoso de indivíduos saudáveis. Utilizando-se células peritoneais de camundongos verificou-se, por meio do percentual de aderência dos macrófagos,

1) a concentração tóxica do peptídeo, enquanto que a interferência do peptídeo sobre a 2) funcionalidade de macrófagos incubados com a PS-1 foi verificada por meio da avaliação da capacidade fagocitária, da produção de peróxido de hidrogênio, de óxido nítrico e de fator de necrose tumoral. Os macrófagos ou monócitos foram escolhidos para este estudo por serem células fundamentais no processo de defesa inata.

Os estudos de toxicidade da PS-1 realizados por meio do percentual de aderência de células peritoneais de camundongos mostraram que houve aumento da aderência na menor concentração (1µg/mL) de PS-1 e redução dose-dependente desse percentual nas maiores concentrações. O aumento da aderência observado com 1µg/mL de PS-1 foi também observado em relação a outros peptídeos antimicrobianos catiônicos. Gudmundsson & Agerberth (1999) reportaram aumento da expressão de moléculas de adesão (CD11 e ICAM-1) por neutrófilos, como efeito dos peptídeos CAP11 e defensinas. Além disso, o peptídeo PR-39 induziu a expressão de proteoglicanas, sindecam-1 e sindecam-4 na superfície de fibroblastos, durante os processos de reparação tecidual (Galo e cols. 1994). O aumento do percentual de aderência de macrófagos pode indicar que a menor concentração de PS-1 influencia as vias que ativam a síntese e a expressão de moléculas de adesão na membrana celular, o que pode ser um fenômeno importante na modulação da resposta imunitária.

A redução do percentual de aderência dos macrófagos tratados com as maiores concentrações de PS-1 pode ter decorrido de ação tóxica do peptídeo como consequência da interação deste com as membranas celulares, ocasionando a formação de poros e posteriormente a morte celular. Sabe-se que a membrana das células dos mamíferos é do tipo zwitteriônica (ver Glossário): composta principalmente por fosfolipídeos neutros, é globalmente neutra, mas possui cargas localizadas devido à presença de grupos ionizados (Williamson &

Schlegel 1994). Esta característica faz com que a ação de peptídeos catiônicos sobre essas membranas seja reduzida. No entanto, utilizando-se altas concentrações do peptídeo, pode haver agregação deste na membrana celular, causando perturbações estruturais e aumento da permeabilidade com formação de poros (Sansom 1993; Dathe e cols. 2002; Brand e cols. 2006). É possível que a maior concentração de PS-1 tenha ocasionado morte das células peritoneais pela saturação de peptídeos sobre as membranas. Efeitos tóxicos de peptídeos antimicrobianos associados à interação entre membrana celular de mamíferos e peptídeos catiônicos foram mostrados em estudos anteriores. Khandelia e Kaznessis (2005) mostraram que a baixa interação entre dois peptídeos catiônicos modificados, novispirin-G10 e novispirin-T7, e a membrana celular de eritrócitos resultou na diminuição dos efeitos tóxicos. Outros estudos mostraram que uma maior interação entre peptídeos catiônicos com membranas celulares resulta em aumento de toxicidade e caracterizam os peptídeos tóxicos, como é o caso da melitina, originária de abelhas (Perez-Paya e cols. 1994), da caribdoxina, presente no veneno de escorpiões (Tenenholz e cols. 2000) e da temporina-L, proveniente de anuros do gênero *Rana* (Rinaldi e cols. 2002). A toxicidade observada com as maiores concentrações do peptídeo pode ter sido determinada pela interação da PS-1 com a membrana das células peritoneais e, como a redução do percentual de aderência ocorreu de forma dose-dependente é possível que quanto maior a concentração do peptídeo maior será a interação e consequentemente sua toxicidade.

No estudo de toxicidade da PS-1 sobre as células peritoneais de camundongos, observaram-se restos celulares nas preparações incubadas com as maiores concentrações do peptídeo (dados não mostrados). Sabe-se que os peptídeos antimicrobianos catiônicos podem, quando utilizados em alta concentração, apresentar toxicidade para células de mamíferos (Feder e cols. 2001). Logo, a presença de restos celulares, observados nas preparações

incubadas com concentrações superiores a 100µg/mL de PS-1 pode ser um indicativo de dano permanente causado pelo peptídeo às células peritoneais, possivelmente gerado por perturbação na homeostase eletrolítica. Embora não tenha sido objetivo do presente estudo avaliar os a natureza dos efeitos tóxicos da PS-1, especula-se que os danos irreversíveis sofridos pelas células peritoneais tenham ocorrido por ação do peptídeo, causando alterações eletrolíticas e osmóticas nas células, que foram dependentes da concentração e do tempo de exposição ao peptídeo. Tem sido descrito que os peptídeos antimicrobianos podem interferir com o metabolismo celular, causando sua paralisação e até mesmo a morte da célula (El Amri e cols. 2006). As defensinas secretadas por neutrófilos (HNP-1, HNP-2 e HNP-3) interferem no metabolismo celular pelo seu potente efeito inibidor da via das proteíno-cinases ativadas por mitógenos (Charp e cols. 1988). As magaininas e defensinas são conhecidas por seus efeitos antimitogênicos sobre células tumorais (Lichtenstein 1991; Baker e cols. 1993). É possível que a PS-1 tenha causado distúrbios eletrolíticos e osmóticos ocasionando a paralisação das vias de ativação celular, alterações no processo de fosforilação oxidativa, comprometimento da síntese protéica, perda da integridade da membrana celular ou da estrutura dos cromossomas. O nível de interação entre peptídeos antimicrobianos catiônicos e membranas anfipáticas (ver Glossário) pode determinar o grau de toxicidade desses peptídeos, pela concentração de estruturas secundárias formadas (Chia e cols. 2002) e, embora os mecanismos que determinam essa interação ainda não estejam completamente esclarecidos, acredita-se que, ela ocorra devido às propriedades dos peptídeos catiônicos e, dos tipos de fosfolipídeos presentes nas membranas celulares (Shai & Oren 1996; Ben & Shai 1997). Uma das propriedades dos peptídeos antimicrobianos catiônicos é a ausência de estrutura secundária (ver Glossário) estável em solução. Entretanto, ao se associarem, por meio de interações eletrostáticas com os fosfolipídeos aniônicos das membranas

celulares, os peptídeos catiônicos tendem a adotar estruturas anfipáticas (hélices- α , fitas- β ou ambas) na superfície da membrana ou no interior da bicamada lipídica (Oren e cols. 1997; Chia e cols. 2002; Khandelia & Kaznessis 2005). Os fosfolipídeos presentes na superfície da membrana celular dos mamíferos são comumente neutros, como a fosfatidilcolina e esfingomiéline, enquanto no interior da bicamada lipídica, predominam fosfolipídeos aniônicos, como a fosfatidilserina e fosfatidilinositol (Williamson & Schlegel 1994; Matsuzaki e cols. 1995). Também é relevante considerar que as membranas celulares dos mamíferos são ricas em colesterol, o que dificulta a inserção dos peptídeos catiônicos (Oren & Shai 1998) e contribui para a ação de proteases que os removem da superfície da membrana, comprometendo assim a sua atividade (Andreu & Rivas 1998). Como a PS-1 é um peptídeo catiônico, é possível que, depois de se associar com os fosfolipídeos neutros da membrana celular, ela adquira sua estrutura secundária (ver Glossário) em hélice- α , o que ocasionaria aumento da permeabilidade e morte celular.

Os resultados obtidos com a avaliação da capacidade fagocitária de macrófagos incubados com PS-1 mostraram que houve redução do percentual de células envolvidas na fagocitose com as diferentes concentrações do peptídeo. Entretanto, houve aumento da média das leveduras fagocitadas por macrófago, o que ocasionou a não modificação do índice fagocitário, que é o produto entre ambos, em relação às células controles, não incubadas com o peptídeo. Uma possível explicação para este fenômeno seria a influência da PS-1 sobre os mecanismos envolvidos na polimerização e movimentação das proteínas do citoesqueleto dos macrófagos e / ou sobre a ativação da síntese e expressão dos receptores para o complemento e para a fração Fc da IgG. Desde que existe interação entre peptídeos antimicrobianos catiônicos e a membrana celular dos macrófagos é possível que a PS-1 tenha interferido nas vias de ativação envolvidas na movimentação do citoesqueleto (Stuart & Ezekowitz 2005).

Uma explicação possível para a diminuição do número de células envolvidas na fagocitose é que, depois de interagir com os fosfolípidos da membrana celular, a PS-1 tenha alterado os receptores envolvidos com a fagocitose e, conseqüentemente, impedido o início dos mecanismos que levam à polimerização da actina, impedindo assim a movimentação das células em direção às leveduras (Aderem & Underhill 1999). Outra explicação possível refere-se à presença de colesterol nas membranas celulares de mamíferos. Esse lipídeo é responsável por tornarem lenta a inserção dos peptídeos antimicrobianos na membrana celular (Andreu & Rivas 1998) logo, é possível que essa lenta inserção tenha ocultado os receptores da fagocitose e retardado o processo de polimerização da actina.

Quanto ao aumento da média de leveduras fagocitadas, nas diferentes concentrações de PS-1, é possível que o peptídeo tenha interferido nas vias de ativação que culminam com o aumento da expressão dos receptores que medeiam a fagocitose.

Os peptídeos antimicrobianos catiônicos estão relacionados a uma variedade de ações moduladoras sobre a imunidade (Hancock & Sahl 2006). Como parte dessa categoria, a PS-1 também interferiu com mecanismos envolvidos na imunidade, como a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), de óxido nítrico (NO) e de fator de necrose tumoral (FNT). Nossos resultados mostraram que a PS-1 causou inibição da síntese de H_2O_2 e NO por macrófagos peritoneais de camundongos, e aumento da produção de FNT por monócitos humanos. Vários são os estudos mostrando a ação dos peptídeos antimicrobianos catiônicos sobre a imunidade, sobretudo na modulação da expressão de citocinas e radicais livres. Aumento da produção e expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) por macrófagos, enzima responsável pela geração de NO (Hucke e cols. 2004), foi observado como

efeito da cecropina-A e um derivado da melitina (Velasco e cols. 1997). As defensinas HNP-1, HNP-2 e HNP-3 estão relacionadas com a proliferação de linfócitos T, com a expressão de IFN- γ , IL-5 e aumento da secreção de IgG (Lillard e cols. 1999), enquanto que a histatina está relacionada à diminuição do dano tecidual pela inibição da síntese de proteases como a furina e catepsina (Basak e cols. 1997). Um peptídeo de 25kD, extraído de *Mycobacterium tuberculosis*, inibe a liberação de lisozima e a produção de H₂O₂ por polimorfonucleares e monócitos coletados de indivíduos normais, pela interferência sobre a cadeia respiratória (Wadee & Clara 1989). Os peptídeos LL-37 e CP-28 estão diretamente relacionados à estimulação da transcrição de aproximadamente 30 genes e à supressão de mais de 40 genes relacionados à imunidade inata, em linhagens de macrófagos estimulados por LPS (Hancock & Scott 2000). Logo, é possível que os efeitos da PS-1 sobre a produção de H₂O₂ e NO estejam relacionados à sua interferência sobre as vias metabólicas que geram radicais livres, como a fosforilação oxidativa, ou sobre a ativação das vias de produção de substâncias antioxidantes. Observamos aumento da produção de FNT pelos monócitos incubados com todas as concentrações de PS-1. Entretanto, devido à grande dispersão dos resultados e ao número reduzido da amostra não foi possível comprovar diferenças estatísticas em todas as amostras. O aumento da produção de FNT por influência da PS-1 pode ter decorrido de sua interferência com as vias de ativação dessa citocina.

Diferentemente do efeito da concentração mais baixa de PS-1 (1 μ g/mL) que reduziu a produção de H₂O₂ e NO por macrófagos, com as concentrações mais elevadas (10 ou 100 μ g/mL) não houve diferença em relação aos níveis produzidos pelo grupo controle. Esse resultado pode ser explicado por uma possível interferência do peptídeo aumentando a produção de citocinas, pois se sabe que nos macrófagos a produção de radicais livres

ocorre também por estímulo de citocinas (Forman & Torres 2002). Observou-se nos estudos com monócitos humanos que a PS-1 causa aumento da concentração de FNT, o que evidencia seu efeito estimulador sobre essa citocina. Efeitos semelhantes foram observados com as defensinas HNP-1, HNP-2 e HNP-3 sobre a produção de IL-5 e IFN- γ (Lillard e cols. 1999). Logo, é possível que o aumento da produção de H₂O₂ e NO tenha ocorrido pelo efeito estimulador da PS-1 sobre a produção de citocinas.

TOXICIDADE IN VIVO

O estudo para avaliar a influência da PS-1 sobre a indução de alterações clínicas indicativas de toxicidade ou mortalidade foi realizado por meio de administração endovenosa a camundongos de diferentes concentrações do peptídeo. Concentrações inferiores a 16mg/kg de PS-1 não causaram quaisquer alterações clínicas que indicassem a presença de toxicidade, no entanto, com 32mg/kg de PS-1 observaram-se sintomas compatíveis com toxicidade, como prostração, taquicardia e taquipnéia. Os estudos realizados nos animais 24 horas após a administração de 4mg/kg de PS-1 mostraram leucograma e histologia dos órgãos (fígado, baço, rim e pulmão) normais. Esses resultados indicam que, quando administradas por via endovenosa, concentrações de PS-1 inferiores a 16mg/kg não apresentam toxicidade em camundongos (Kuckelhaus e cols. 2006).

A despeito da grande quantidade de estudos mostrando a atividade dos peptídeos antimicrobianos *in vitro*, poucos trabalhos têm sido dedicados à avaliação de seus efeitos *in vivo*. Os estudos de toxicidade realizados com a indolicidina (presente nos grânulos dos neutrófilos de bovinos) mostraram que a administração endovenosa de 12mg/kg causou a morte de todos os camundongos tratados (Ahmad e cols. 1995). Outras investigações para avaliar os efeitos tóxicos de dois peptídeos administrados por via endovenosa mostraram

que a dose capaz de matar 50% dos animais tratados foi 10mg/kg para o peptídeo BMAP-27 e de 15mg/kg para o BMAP-28 (Benincasa e cols. 2003). Em comparação com esses peptídeos, a PS-1 possui baixa toxicidade, pois na concentração de 32mg/kg ela causou, nos camundongos tratados por via endovenosa, sintomas transitórios de toxicidade, mas não a morte. Este resultado mostrando a baixa toxicidade da PS-1 in vivo pode ser bastante promissor para futuras aplicações biomédicas.

A influência de uma dose única de 4mg/kg de PS-1 em camundongos foi avaliada em detalhe por tratar-se de uma concentração que não exibe toxicidade quando administrada por via endovenosa e por ser superior às concentrações inibitórias capazes de matar 50% (CI₅₀) das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *P. falciparum*. Assim, foram avaliados os efeitos dessa concentração de PS-1 sobre os leucócitos do sangue periférico, os eritrócitos da medula óssea, os níveis séricos de uréia, creatinina, aspartato-aminotransferase e alanina-aminotransferase e sobre a histologia de diferentes órgãos. O peptídeo não mostrou qualquer alteração significativa sobre os leucócitos no período de 24 horas. Sabe-se que os neutrófilos são a principal população celular numa resposta inflamatória aguda e aumentam em condições de estresse, infecções, estímulos adrenérgicos. Nessas condições, rapidamente respondem a estímulos quimiotáticos, fagocitam e auxiliam na eliminação de patógenos. Nossos resultados indicam que, nas condições utilizadas, a PS-1 não interferiu com a produção ou circulação de leucócitos.

O estudo da influência da PS-1 sobre os eritrócitos da medula óssea, avaliado por meio do índice de eritrócitos policromáticos (células jovens), mostrou que a administração intraperitoneal de 4mg/kg do peptídeo não causou toxicidade a essa população. A eritropoese é o processo natural de produção de eritrócitos a partir dos proeritroblastos, que entram em mitose na medula óssea e

transformam-se em eritroblastos basófilos. Estes, depois de 24 a 48 horas de maturação, transformam-se em eritroblastos policromáticos, que não mais entram em divisão celular e, após 12 horas expulsam o núcleo, sendo então, denominados eritrócitos policromáticos ou reticulócitos. Em indivíduos normais, não submetidos a tratamento que afeta o estágio proliferativo da medula óssea, a relação esperada entre eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) é de aproximadamente 1:1 (Schmid 1975; Rabello-Gay 1991) e, qualquer desvio desta proporção pode ser indicativo de toxicidade aguda (Lewinska e cols. 2007). Os resultados obtidos para o índice de eritrócitos policromáticos mostraram que a PS-1, administrada por via intraperitoneal, não alterou a frequência entre eritrócitos jovens ou maduros e, portanto, não exibiu toxicidade aguda.

O estudo de possíveis efeitos genotóxicos da PS-1 em camundongos tratados por via intraperitoneal, avaliados pelo teste do micronúcleo, mostrou que, o peptídeo não causou alterações indicativas de genotoxicidade. O micronúcleo (MN) é um pequeno fragmento nuclear separado da cromatina durante o processo de divisão celular dos eritroblastos (Lewinska e cols. 2007) que resulta de alterações estruturais espontâneas ou induzidas experimentalmente (Evans 1997). O teste do MN tornou-se viável e confiável utilizando-se eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos, passando a ser um bom indicador de dano citogenético na medula óssea (Schmid 1975), pois como na fase de maturação, os eritrócitos expulsam seus núcleos, os pequenos fragmentos nucleares podem ficar retidos dentro da célula e, desse modo aumenta-se a frequência de MNs. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que a PS-1, na concentração de 4mg/kg, administrada por via intraperitoneal, não causou alteração na frequência de MNs, o que mostrou ausência de genotoxicidade e um resultado positivo a favor de futuras aplicações biomédicas do peptídeo.

Os testes preliminares com a PS-1 realizados por Leite e colaboradores (2005) mostraram que, em baixas concentrações ($\mu\text{g/mL}$), esse peptídeo apresenta-se bastante potente contra bactérias, porém com baixa toxicidade para eritrócitos. De forma semelhante, em nosso estudo, observou-se alta atividade antiprotozoário e baixa toxicidade para células de camundongos. Diferentes estudos têm mostrado que a cationicidade dos resíduos de aminoácidos e a propriedade de permeabilizar membranas celulares podem conferir aos peptídeos antimicrobianos atividade sobre uma série de microorganismos, entretanto, também pode ser responsável pelos efeitos indesejáveis sobre células de mamíferos (Dathe e cols. 2002), como os observados com altas concentrações de PS-1, tanto *in vitro* como *in vivo*.

O estudo histopatológico dos animais tratados com a PS-1 mostrou que, a administração de 4mg/kg do peptídeo não afetou o parênquima dos órgãos (fígado, baço, rim e pulmão), possivelmente pela grande quantidade lipídeos catiônicos como o colesterol que diminui a interação do peptídeo com a membrana celular (Goluszko & Nowicki 2005; Tomasinsig e cols. 2006). Alguns estudos mostram que a seletividade dos peptídeos antimicrobianos para células de mamíferos pode ser alta, como é o caso da melitina, que apresenta alta toxicidade para células musculares, quando administrada por via intramuscular (Ownby e cols. 1997), mas também pode ser baixa pela interferência do colesterol, como observado para a cecropina (Silvestro e cols. 1997). A ausência de alterações histológicas nos camundongos tratados com a 4mg/kg de PS-1 pode indicar a ausência de toxicidade pela baixa seletividade do peptídeo para a membrana das células dos mamíferos.

A administração de PS-1 a camundongos na concentração de 4mg/kg não apresentou efeito tóxico sobre rim ou fígado, avaliado pelos níveis séricos de uréia e creatinina, e das enzimas aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-

aminotransferase (ALT). A concentração sérica de uréia e creatinina constitui um indicador confiável da função renal, pois, como essas substâncias são normalmente filtradas e excretadas pelo rim, o aumento de suas concentrações no sangue pode refletir um declínio da filtração glomerular. As enzimas AST e ALT são encontradas no citoplasma de células de vários tecidos, especialmente nos hepatócitos e células musculares e, quando liberadas, por ocasião de morte celular, são consideradas de grande utilidade no diagnóstico e monitoramento de dano tecidual (Servin-Abad e cols. 2005). Como os níveis séricos de uréia, creatinina, AST e ALT nos camundongos tratados foram comparáveis aos do controle, a administração de PS-1 não causou toxicidade renal, hepática e muscular, possivelmente pela baixa interação do peptídeo com as membranas celulares.

EFEITOS ANTIPARASITÁRIOS

Os peptídeos antimicrobianos são potencialmente ativos contra um grande espectro de microorganismos e, embora a base molecular dessa seletividade não esteja bem definida, vários estudos mostram que ela pode estar relacionada à presença de fosfolipídeos aniônicos, associada à ausência de colesterol, o que lhes confere maior fluidez e as tornam alvos dos peptídeos catiônicos (Williamson & Schlegel 1994; Epanand e cols. 1995; Oren & Shai 1998; Feder e cols. 2000). Membranas com tais características são encontradas em bactérias (Peschel 2002; Peschel & Sahl 2006), fungos (Lee e cols. 2004), protozoários e células tumorais (Williamson & Schlegel 1994), cujos fosfolipídeos superficiais aniônicos interagem com peptídeos catiônicos. Acredita-se que as características estruturais das membranas celulares dos microorganismos sejam as responsáveis pela toxicidade seletiva dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (Dolis e cols. 1997; Matsuzaki e cols.

1998; Epanand & Vogel 1999), que são consideradas fundamentais para o aumento da permeabilidade da membrana, formação de poros e morte celular, como provavelmente acontece com os protozoários.

A influência da PS-1 sobre cultivos de *Leishmania amazonensis* ou *Plasmodium falciparum* foi avaliada verificando-se o crescimento das duas espécies, incubadas com diferentes concentrações do peptídeo. Os resultados mostraram que a redução do número de parasitos ocorreu de forma dose-dependente, sendo estabelecido que concentrações superiores a 1 ou 48µg/mL são capazes de inibir o crescimento de no mínimo 50% das formas promastigotas de *L. amazonensis* ou intraeritrocitárias de *P. falciparum*, respectivamente. As diferenças de toxicidade da PS-1 observadas em relação aos dois protozoários podem estar relacionadas às particularidades entre os dois sistemas biológicos ou às propriedades aniônicas (ver Glossário) das membranas desses microorganismos (Matsuzaki e cols. 1998). Considera-se que as diferenças entre as concentrações inibitórias (CI_{50}) observadas em relação ao plasmódio (48µg/mL) e a leishmânia (1µg/mL) tenham ocorrido não somente em decorrência de diferenças estruturais das membranas dos dois protozoários, mas também pela situação predominantemente intra-eritrocitária do do *P. falciparum*.

Os resultados obtidos nos cultivos de *Leishmania amazonensis* mostraram que a PS-1, mesmo nas menores concentrações, apresentou efeitos líticos sobre as formas de cultivo, in vitro, promastigotas. É possível que esse efeito resulte da grande interação eletrostática do peptídeo catiônico com a membrana aniônica (ver Glossário) do parasito, com conseqüente aumento da permeabilidade e morte celular. Sabe-se que a superfície celular das formas promastigotas de leishmânia possui um glicocálix ricamente aniônico (Guerrero e cols. 2004), composto principalmente, de lipofosfoglicana e

glicosilfosfatidilinositol, que conferem a esses parasitos uma barreira de resistência ao ataque de hidrolases, radicais livres ou ainda de componentes do sistema complemento, além de ser essencial na interação com as células do hospedeiro (Ilgoutz & McConville 2001). Entretanto, mesmo na presença dessa barreira, pequenas concentrações de PS-1 causaram a morte dos parasitos, o que indica uma forte interação eletrostática entre o peptídeo e a membrana do parasito. É possível, também, que a alta toxicidade da PS-1 para as formas promastigotas de *L. amazonensis* resulte da interferência do peptídeo com vias metabólicas do parasito. Os estudos realizados com três peptídeos derivados da magaininas (MG-H1, MG-H2 e F5W-magainina-2) mostraram que esses peptídeos diminuíram a produção de trifosfato de adenosina (ATP) de forma dose-dependente, em cultivos de *Leishmania donovani*, causando sua morte (Guerrero e cols. 2004). Logo, não se descarta a possibilidade de que a grande toxicidade da PS-1 sobre os cultivos de *L. amazonensis* resulte da interação direta do peptídeo com os fosfolipídeos da membrana plasmática, causando alterações nas bombas de sódio e potássio, aumento do volume celular e rompimento da célula. Outra possibilidade é a interferência do peptídeo sobre o processo de respiração celular, especialmente, na fosforilação oxidativa e produção de ATP, levando à paralisação dos processos metabólicos com conseqüente morte celular.

Embora não tenha sido objetivo do presente estudo avaliar mecanismos de ação da PS-1, especula-se que a grande quantidade de restos celulares, formando uma massa amorfa, observados nas preparações de *L. amazonensis* incubadas com altas concentrações de PS-1 (64µg/mL) resultem da formação de poros semelhante ao modelo de *estacas de barril*, descrito por Ehrenstein & Lecar (1977). Nesse modelo, os poros se formam pelo acúmulo de monômeros de peptídeos em um ponto específico da membrana, que culmina com a perfuração da bicamada lipídica. Nos estudos realizados para

identificar a dose tóxica de duas dermasseptinas, DS-01 e DShypo-01, foi verificado um intenso efeito tóxico sobre promastigotas de *L. amazonensis* e, na concentração de 32µg/mL, ambas atuaram sobre os parasitos, sem contudo deixar massas amorfas (Brand e cols. 2006). Nesse estudo, a ausência de restos de leishmânia aponta para o modelo de interação do peptídeo com a membrana do parasito, conhecido como *carpete* (Pouny e cols. 1992), onde os peptídeos inicialmente ligam-se à superfície da membrana formando um tapete sobre ela e, depois de atingir um determinado limiar de concentração, a membrana rompe-se em pedaços (Oren & Shai 1998). Assim, a presença, em nosso estudo, de restos de leishmânia após o tratamento com a PS-1 (ver figura 22) sugere que ela tenha agido principalmente através da formação de poros, semelhantes ao modelo proposto por Ehrenstein e Lecar (1977).

Nossa investigação sobre os efeitos da PS-1 em cultivos de *Plasmodium falciparum* mostrou que o peptídeo apresenta toxicidade para o plasmódio em concentrações superiores a 32µg/mL e ausência de toxicidade para os eritrócitos. À semelhança da PS-1, os derivados da dermasseptina S4 apresentaram alta atividade lítica contra plasmódio, em associação com baixo efeito hemolítico (Dagan e cols. 2002). Dentre as possibilidades para a redução da parasitemia deve ser considerada a ação direta do peptídeo sobre os merozoítos, por ocasião do rompimento dos eritrócitos infectados, resultando na formação de poros e conseqüente morte celular. Outra possibilidade é que a PS-1 tenha agido sobre as formas intraeritrocitárias. Uma evidência disso é a redução do tamanho e do grau de maturidade dos esquizontes intra-eritrocitários, sob o efeito das maiores concentrações do peptídeo (ver figura 28). Tal ação pressupõe que a PS-1 tenha atravessado as membranas eritrocitária e do vacúolo parasitóforo e tenha atuado na ou através da membrana do plasmódio intra-eritrocitário. Não se pode excluir a

possibilidade de que o peptídeo, após penetrar no interior dos eritrócitos, tenha sido ingerido pelo plasmódio, juntamente com a hemoglobina.

Sabe-se que os eritrócitos infectados por plasmódio apresentam uma série de alterações morfológicas e funcionais decorrentes do processo de crescimento intraeritrocitário, que podem culminar com a expressão de várias proteínas do parasito na membrana eritrocitária ou mesmo causar mudanças na composição lipídica dessa membrana (Vial e cols. 2003; Jens e cols. 2005). Dentre as alterações, incluem-se a mudança da forma discoidal do eritrócito, o surgimento de vesículas e agregados protéicos no citoplasma (Howard 1982; Hommel 1996), alterações na expressão de lipídeos e proteínas na superfície da membrana (responsáveis pela sua aderência às células endoteliais), aumento da fluidez, da carga superficial e da mobilidade dos fosfolipídeos (Hsiao e cols. 1991; Knapp e cols. 1991; Simões e cols. 1991). É possível que essas alterações facilitem a interação do eritrócito infectado com a PS-1 e sua posterior ação sobre as membranas do plasmódio. O processo de interação do peptídeo com a membrana do parasito pode ter sido facilitado pelo aumento da permeabilidade da membrana dos eritrócitos decorrente do crescimento do plasmódio (Krugliak e cols. 2000). Como esta alteração permite a passagem rápida de uma grande quantidade de solutos como açúcares, aminoácidos, ânions, cátions, pirimidinas, purinas e alguns peptídeos (Pouvelle e cols. 1991) é possível que a PS-1 tenha alcançado facilmente a membrana das formas intraeritrocitárias do plasmódio.

Os efeitos da PS-1 sobre o *P. falciparum* nas preparações incubadas com a menor concentração do peptídeo (1 µg/mL) mostraram que os parasitos apresentaram aumento da velocidade de maturação das formas intraeritrocitárias e conseqüentemente, maior parasitemia. Esse efeito pode indicar uma atuação direta do peptídeo sobre as vias envolvidas na duplicação

cromossômica, como observado com o peptídeo SB-37, que atua estimulando a proliferação de fibroblastos nos processos de reparação tecidual (Reed e cols. 1992). Não se pode descartar a possibilidade de que a PS-1, em concentrações muito baixas, estimule também o crescimento de outros sistemas celulares.

Nossos dados mostraram que a PS-1, em concentração extremamente baixa (1µg/mL) estimula sistemas celulares tão distintos quanto *P. falciparum*, macrófagos de camundongo e monócitos humanos. Uma possibilidade para explicar esse achado pode estar relacionada ao fenômeno da hormese (ver Glossário). O fenômeno hormético decorre da ativação de mecanismos de compensação em sistemas biológicos expostos a doses muito baixas de agentes potencialmente nocivos (Rattan, 2004). A consequência é que tais sistemas biológicos apresentam melhor desempenho que aqueles não expostos ao efeito potencialmente deletério. Nossos resultados mostraram que concentrações muito baixas de PS-1 aumentaram a aderência de macrófagos peritoneais de camundongos, diminuíram a produção de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos, aumentou a maturação de formas intraeritrocitárias *P. falciparum*. Os possíveis efeitos horméticos induzidos por concentrações muito baixas de PS-1 (1µg/mL) apresentam potenciais aplicações biomédicas, sobretudo para o controle de condições associadas à produção excessiva de H₂O₂ ou de NO, à expressão de moléculas de aderência ou à síntese de fator de necrose tumoral.

Os resultados obtidos no presente estudo revelam que, nas condições experimentais utilizadas, a PS-1 apresentou efeitos sobre todos os sistemas biológicos avaliados. Esses efeitos foram divididos em três grupos e estão possivelmente relacionados ao sistema biológico utilizado em cada experimento, ao mecanismo de ação e também à concentração do peptídeo: tóxicos, sobre

células peritoneais de camundongos (in vitro) e sobre camundongos (in vivo); imunomoduladores, sobre macrófagos peritoneais de camundongo e monócitos humanos e antiparasitários, sobre *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum*.

Os efeitos tóxicos da PS-1 foram observados apenas nas maiores concentrações do peptídeo, em todos os sistemas biológicos. Sobre as células peritoneais, in vitro, causou destruição celular, enquanto que, em camundongos tratados por via endovenosa causou manifestações clínicas compatíveis com toxicidade. Como referido, em altas concentrações peptídeos antimicrobianos podem ser tóxicos para células de mamíferos (Feder e cols. 2001). Nossos resultados indicam que, em altas concentrações, a PS-1 apresentou efeito tóxico, provavelmente decorrente de grande interação com os componentes das membranas celulares.

O efeito imunomodulador observado com a concentração mais baixa de PS-1 ocorreu de forma inespecífica, ou seja, não houve discriminação quanto ao tipo de membrana, pois foi observado com diferentes células de mamíferos podem decorrer de um efeito hormético do peptídeo (Rattan 2004). Os efeitos da PS-1 sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais de camundongos e de monócitos humanos comprovam a diversidade funcional dos peptídeos antimicrobianos, que vão desde a atividade antimicrobiana, proliferação celular e ativação de vias metabólicas. Esses dois últimos podem ser traduzidos como imunomoduladores (Galo e cols. 1994; Andreu & Rivas 1998; Gudmundsson & Agerberth 1999).

Os efeitos da PS-1 sobre *L. amazonensis* e *P. falciparum* indicaram o potencial do peptídeo no tratamento das parasitoses causadas por esses agentes infecciosos. Os resultados mostraram que a redução do número de parasitos tratados com a PS-1 ocorreu de forma dose-dependente, sendo estabelecido

que, concentrações superiores a 1 ou 48µg/mL são capazes de inibir o crescimento de 50% das formas promastigotas de *L. amazonensis* ou intraeritrocitárias de *P. falciparum*, respectivamente. É interessante observar que, as concentrações inibitórias de PS-1 sobre esse dois protozoários, estão bem aquém da dose tóxica de 32mg/kg (480µg/mL) encontrada nos experimentos in vivo. Assim, em experimentos futuros com modelos animais utilizando esses agentes infecciosos, é possível aumentar as concentrações sem comprometer a segurança do tratamento.

O conjunto de metodologias empregadas no presente estudo fornece informações importantes sobre os efeitos de diferentes concentrações de PS-1 em diferentes sistemas biológicos e poderão ser de grande utilidade para aprimorar o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas para futuras aplicações biomédicas.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. O tratamento in vitro das células peritoneais de camundongos com a PS-1 causou aumento da aderência das células tratadas com 1µg/mL do peptídeo.
2. O tratamento in vitro das células peritoneais de camundongos com PS-1 causou diminuição da aderência das células tratadas com concentrações superiores a 100µg/mL do peptídeo, de forma dose-dependente.
3. O tratamento in vitro de macrófagos peritoneais de camundongos com diferentes concentrações de PS-1 (1, 10 ou 100µg/mL) causou tendência à diminuição do percentual de células envolvidas na fagocitose e aumento da média de leveduras fagocitadas.
4. O tratamento in vitro de macrófagos peritoneais de camundongos com PS-1 causou diminuição da produção de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico nas preparações tratadas com 1µg/mL do peptídeo, mas não com 10 ou 100µg/mL.
5. O tratamento in vitro de monócitos de indivíduos normais com a PS-1 aumentou a produção de fator de necrose tumoral por monócitos humanos de indivíduos normais nas preparações incubadas com 10µg/mL, mas não com 1 ou 100µg/mL do peptídeo.
6. O tratamento de camundongos com diferentes concentrações de PS-1, por via endovenosa, causou alterações clínicas compatíveis com toxicidade

(prostração, taquicardia e taquipnéia), na concentração de 32mg/kg, mas não nas concentrações inferiores a essa.

7. A administração a camundongos de dose única de 4mg/kg de PS-1, por via endovenosa, não causou alterações histológicas de fígado, baço, rim e pulmão, nem alterações leucocitárias, ou nos níveis séricos de uréia, creatina e de aspartato-aminotransferase ou alanina-aminotransferase.
8. A administração a camundongos por via intraperitoneal de dose única de 4mg/kg de PS-1 não causou alterações citotóxicas ou genotóxicas sobre eritrócitos da medula óssea.
9. O tratamento de cultivos de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou de *Plasmodium falciparum* com diferentes concentrações de PS-1 causou inibição do crescimento de forma dose-dependente, em ambos protozoários, sendo estabelecido que concentrações superiores a 1 ou 48 µg/mL são capazes de inibir o crescimento de, no mínimo 50% das formas promastigotas de *L. amazonensis* ou intraeritrocitárias de *P. falciparum*, respectivamente.
10. A PS-1 aumentou a velocidade de maturação das formas intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum* nas preparações incubadas com 1µg/mL, após incubação por 72 horas.

11.O conjunto de resultados obtidos com o emprego da PS-1, oriundos dos diferentes sistemas biológicos, mostrou algumas potencialidades desse peptídeo para futuras aplicações biológicas, como modulação do sistema imunitário inato ou como agente antimicrobiano contra plasmódio e leishmânia.

LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Os efeitos dos peptídeos antimicrobianos catiônicos não são limitados ao combate aos agentes infecciosos, mas as evidências mostram que tais compostos são potentes moduladores do sistema imunitário (Oppenheim & Yang 2005), por meio da interferência com a produção de citocinas, produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, diferenciação e proliferação celular. Além do mais, sua habilidade de interação com moléculas, presentes nas membranas dos diversos agentes infecciosos, como lipopolissacarídeos ou ácido lipoteicóico, pode trazer benefícios extras, como na diminuição da resposta imunitária inata por meio da interação e inativação dessas moléculas. A diversidade funcional dos peptídeos antimicrobianos faz com que essas substâncias sejam bastante atrativas para o desenvolvimento de novas estratégias de combate aos agentes infecciosos e no tratamento de doenças de origem imunitária. No entanto, o caminho que conduz os compostos de origem natural à atividade farmacológica eficaz é longo e muitas são as dificuldades a serem superadas.

Existem vários entraves para a produção em escala industrial de peptídeos antimicrobianos, entre eles o custo de produção, a susceptibilidade às enzimas proteolíticas e a dificuldade de modificação estrutural das moléculas. O custo da síntese pode inviabilizar a comercialização desses compostos e uma forma de minimizar esses custos seria o investimento em técnicas de ADN recombinante. No entanto, é importante considerar que os microorganismos, comumente utilizados nessas técnicas, são susceptíveis aos efeitos dessas substâncias. Logo, para viabilizar sua produção por essa técnica, em escala industrial seria necessário a transfecção de plasmídios contendo genes que codificam o peptídeo e também genes de resistência à ação dos próprios peptídeos. A susceptibilidade à proteólise trás também grandes dificuldades na aplicação biológica dos peptídeos antimicrobianos, pois comumente são alvos de proteases (Reddy e cols. 2004). Uma forma de minimizar este entrave seria

associar os peptídeos com inibidores enzimáticos, que permitiria a estabilização da molécula e, conseqüentemente, maior tempo de circulação.

Segundo Sahl (2006), os peptídeos antimicrobianos são pouco susceptíveis à modificação da molécula, o que é importante para o processo de desenvolvimento de novas drogas. Entretanto, mesmo com esta dificuldade pequenas modificações estruturais efetivas já têm sido feitas (Benincasa e cols. 2003) para manter a atividade antimicrobiana, com baixa toxicidade para células de mamíferos.

A despeito das grandes dificuldades no desenvolvimento de drogas eficazes a partir dos peptídeos antimicrobianos, vários estudos têm mostrado que é possível a mudança da fase pré-clínica para a clínica. A P-113, um derivado da histatina, produzida em glândulas salivares humanas, está sendo testada na fase I/II, contra candidíase oral em pacientes imunodeficientes e, um derivado da magainina, conhecido como Pexiganan, está na fase clínica III, contra úlceras em pacientes diabéticos (Paquette e cols. 2002). Um derivado da protegrina, denominado Iseganan está em fase de teste clínico contra pneumonia em pacientes entubados e, o peptídeo rBPI-21, derivado de um peptídeo encontrado em neutrófilos (BPI) está sendo testado contra meningococemia e na doença de Crohn, ambos em fase clínica III (Reddy e cols. 2004). A nisina já foi desenvolvida comercialmente para o tratamento de infecções gástricas e, seus derivados estão em testes pré-clínicos com bactérias intestinais resistentes aos antibióticos de última geração (Reddy e cols. 2004). Esses estudos encorajam a continuidade das pesquisas, não somente na busca de novos compostos, como a PS-1, mas na modificação estrutural de moléculas conhecidas.

Inúmeros peptídeos sintéticos de origem natural apresentam potenciais atividades antimicrobianas, mas, somente uma pequena quantidade é sistematicamente estudada e, dentre esses, a maioria não apresenta a mesma

eficácia in vivo que a demonstrada in vitro. Essa limitação pode comprometer a mudança da fase pré-clínica para a clínica. No entanto, algumas estratégias podem ser adotadas, como sistematizar os estudos de forma a resolver os problemas estruturais dos peptídeos, quanto à estabilidade, susceptibilidade à proteólise e eficácia molecular. A sistematização dos estudos pré-clínicos pode ser útil para identificar as alterações estruturais necessárias para acelerar a mudança de fase.

Várias são as potencialidades para aplicações biomédicas dos peptídeos antimicrobianos e dentre essas, sua atuação como antibiótico único ou combinado com antibióticos convencionais, como modulador do sistema imunitário ou na neutralização de endotoxinas. Os resultados obtidos com a PS-1, oriundos dos diferentes sistemas biológicos, mostraram algumas dessas potencialidades, como a modulação do sistema imunitário ou como agente antimicrobiano, contra plasmódio e leishmânia. Em breve, serão recomeçados os estudos in vivo para avaliar a eficácia da PS-1 em modelos experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*. 17:593-623, 1999.

Ahmad I, Perkins WR, Lupan DM, Selsted ME, Janoff AS. Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 26:109-114, 1995.

Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47:415-433, 1998.

Baba T, Schneewind O. Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. *Trends in Microbiology*. 6:66–71, 1998.

Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, Jacob LS. Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides. *Cancer Research*. 53:3052-3057, 1993.

Barker HC, Kinsella N, Jaspe A, Friedrich T, O'Connor CD. Formate protects stationary-phase *Escherichia coli* and *Salmonella* cells from killing by a cationic antimicrobial peptide. *Molecular Microbiology*. 35:1518–1529, 2000.

Basak A, Ernst B, Brewer D, Seidah NG, Munzer JS, Lazure C, Lajoie GA. Histidine-rich human salivary peptides are inhibitors of proprotein convertases furin and PC7 but act as substrates for PC1. *Journal of Peptide Research*. 49:596–603, 1997.

Ben EI, Shai Y. The structure and organization of synthetic putative membranous segments of ROMK1 channel in phospholipid membranes. *Biophysical Journal*. 72:85-96, 1997.

Benincasa M, Skerlavaj B, Gennaro R, Pellegrini A, Zanetti M. In vitro and in vivo antimicrobial activity of two alpha-helical cathelicidin peptides and of their synthetic analogs. *Peptides*. 24:1723–1731, 2003.

Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity*. 7:2978-2984, 1993.

Bowman EP, Uhlinger DJ, Lambeth JD. Neutrophil phospholipase D: inhibition by Rho-GDP dissociation inhibitor and stimulation by small GTPase GDP dissociation stimulator. *Methods in Enzymology*. 256:246-256, 1995.

Brand GD, Leite JRSA, Silva LP, Albuquerque S, Prates MV, Azevedo RB, Carregaro V, Silva JS, Sá VCL, Brandão RA, Bloch JrC. Dermaseptins from *Phylomedusa oreades* and *Phylomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:49332– 49340, 2002.

Brand GD, Leite JRSA, de Sa Mandel SM, Mesquita DA, Silva LP, Prates MV, Barbosa EA, Vinecky F, Martins GR, Galasso JH, Kuckelhaus SA, Sampaio RN, Furtado JR Jr, Andrade AC, Bloch C Jr. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 47:739-746, 2006.

Breukink E, Wiedemann I, Van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, de Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286:2361-2364, 1999.

Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*. 108:1353-1358, 1995.

Cabiaux V, Agerberth B, Johansson J, Homblé F, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM. Secondary structure and membrane interaction of PR-39, a Pro+Arg-rich antibacterial peptide. *European Journal of Biochemistry*. 224:1019-1027, 1994.

Cassettari VC, Strabelli T, Medeiros EA. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 9:70-76, 2005.

Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptofan and arginine rich and peptides structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758:1184-1202, 2006.

Charp PA, Rice WG, Raynor RL, Reimund E, Kinkade JM Jr, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI, Kuo JF. Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils. *Biochemical Pharmacology*. 37:951-956, 1988.

Chen T, Zhou M, Gagliardo R, Walker B, Shaw C. Elements of the granular gland peptidome and transcriptome persist in air-dried skin of the South American orange-legged leaf frog, *Phyllomedusa hypocondrialis*. *Peptides*. 27:2129-2136, 2006.

Chernysh S, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, Platonov VG, Bulet P.. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:12628–12632, 2002.

Chia CS, Torres J, Cooper MA, Arkin IT, Bowie JH. The orientation of the antibiotic peptide maculatin 1.1 in DMPG and DMPC lipid bilayers. Support for a pore-forming mechanism. *FEBS Letters*. 512:47–51, 2002.

Childs JD. Conditional lethal mutants of bacteriophage T4 unable to grow on a streptomycin resistant mutant of *Escherichia coli*. *Mutation Research*. 44:165-176, 1977.

Conceição K, Bruni MF, Antoniazzi MM, Jared C, Camargo ACM, Lopes-Ferreira M, Pimenta DC. Major biological effects induced by the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Toxicon*. 49:1054-1062, 2007.

Crovella S, Antcheva N, Zelezetsky I, Boniotto M, Pacor S, Falzacappa MVV, Tossi A. Primate beta-defensins--structure, function and evolution. *Current Protein & Peptide Science*. 6:7–21, 2005.

Cunha Filho GA, Schwartz CA, Resck IS, Murtab MM, Lemos SS, Castro MS, Kyawc C, Pires Jr OR, Leite JRS, Bloch Jr C, Schwartz EIF. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. *Toxicon*. 45:777–782, 2005.

Dagan A, Efron L, Gaidukov L, Mor A, Ginsburg H. In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46:1059–1066, 2002.

Dathe M, Meyer J, Beyermann M, Maul B, Hoischen C, Bienert M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1558:171-186, 2002.

Dolis D, Moreau C, Zachowski C, Devaux PF. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophysical Chemistry*. 68:221-231, 1997.

Ehrenstein G, Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 10:1-34, 1977.

Eisenberg D, Wesson M. The most highly amphiphilic α helices include two amino acid segments in human immunodeficiency virus glycoprotein. *Biopolymers* 41:171–177, 1990.

El Amri C, Lacombe C, Zimmerman K, Ladram A, Amiche M, Nicolas P, Bruston F. The plasticins: membrane adsorption, lipid disorders, and biological activity. *Biochemistry*. 45:14285-14297, 2006.

Emilsson LB, Dougherty KA, Cockett AT, Urry RL. Simultaneous determination of human sperm morphology and viability: simple office technique. *Urology*. 11:488-491, 1978.

Epand RM, Shai Y, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. *Biopolymers*. 37:319–338, 1995.

Eband RM, Vogel HJ. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1462:11–28, 1999.

Evans HJ. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: personal view. *Mutation Research*. 392:5–10, 1997.

Feder R, Dagan A, Mor A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:4230–4238, 2000.

Feder R, Nehushtai R, Mor A. Affinity driven molecular transfer from erythrocyte membrane to target cells. *Peptides*. 22:1683-1690, 2001.

Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5^a Edition. Lippincott Williams & Williams. Philadelphia. 1999.

Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling respiratory burst in macrophage signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 166:S4–S8, 2002.

Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:11035–11039, 1994.

Ghosh JK, Shaool D, Guillaud P, Cicéron L, Mazier D, Kustanovich I, Shai Y, Mor A. Selective Cytotoxicity of dermaseptin S3 toward Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:31609–31616, 1997.

Goluszko P, Nowicki B. Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells. *Infection and Immunity*. 73:7791-7796, 2005.

Green LC, Wagner JG, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126:131–138, 1982.

Gudmundsson GH, Agerberth B. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *Journal of Immunological Methods*. 232:45–54, 1999.

Guerrero E, Saugar JM, Matsuzaki K, Rivas L. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:2980–2986, 2004.

Hancock REW, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:8856-8861, 2000.

Hancock REW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*. 1:156-164, 2001.

Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. 24:1551-1557, 2006.

Harwig SS, Swiderek KM, Lee TD, Lehrer RI. Determination of disulphide bridges in PG-2, an antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Journal of Peptide Science*. 1:207-215, 1995.

Helmerhorst EJ, Reijnders IM, van 't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. A critical evaluation of the lytic activity of cationic antimicrobial peptides against *Candida albicans* cells and human erythrocytes. *Febs Letters*. 449:105–110, 1999.

Hilpert K, Elliot MR, Volkmer-Engert R, Henklein P, Donini O, Zhou Q, Winkler DFH, Hancock REW. Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. *Chemistry & Biology*. 13:1101–1107, 2006.

Hommel M. Physiopathology of symptoms of malaria. Role of cytokines, cytoadherence and premunition. *Presse Médicale*. 25:70–76, 1996.

Howard, R. J. Alterations in the surface membrane of red blood cells during malaria. *Immunology Review*. 61:67–107, 1982.

Hsiao LL, Howard RJ, Aikawa M, Taraschi TF. Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Biochemical Journal*. 274:121–132, 1991.

Hucke C, MacKenzie CR, Adjogble KD, Takikawa O, Daubener W. Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and Immunity*. 72:2723-2730, 2004.

Hultmark D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*. 15:12-19, 2003.

Ilgoutz SC, McConville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *International Journal of Parasitology*. 31:899-908, 2001.

Isaacson T, Soto A, Iwamuro S, Knoop FC, Conlon JM. Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides*. 23:419-425, 2002.

Jens E, Pagliarini T, Novaretti MCZ. Duffy blood group system: biology and transfusion practice. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 27:1-14, 2005.

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

Jones EM, Smart A, Bloomberg G, Burgess L, Millar MR. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *The Journal of Applied Bacteriology*. 77:208-214, 1994.

Khandelia H, Kaznessis YN. Molecular dynamics investigation of the influence of anionic and zwitterionic interfaces on antimicrobial peptides' structure: Implications for peptide toxicity and activity. *Peptides*. 109: 12990-12996, 2005.

Kikukawa T, Araiso T. Changes in lipid mobility associated with alamethicin incorporation into membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 405: 214-222, 2002.

Knapp B, Hundt E, Lingelbach KR. Structure and possible function of *Plasmodium falciparum* proteins exported to the erythrocyte membrane. *Parasitology Research*. 77:277–282, 1991.

Krugliak M, Feder R, Vadim Y, Zolotarev LG, Dagan A, Ginsburg H, Mor A. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 2442–2451, 2000.

Kuckelhaus SAS, Leite JRSA, Neves MP, Frota KS, Abdala LF, Muniz-Junqueira MI, Bloch Jr C, Tosta CE. Toxicity evaluation to mice of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. on line, DOI:10.1007/s10989-006-9060-1, 2006.

Lee DG, Hahm KS, Shin SY. Structure and fungicidal activity of a synthetic antimicrobial peptide, P18, and its truncated peptides. *Biotechnology Letters*. 26: 337-341, 2004.

Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology*. 11: 23-27, 1999.

Leite JRSA, Silva LP, Rodrigues MIS, Prates MV, Brand GD, Lacava BM, Azevedo RB, Bocca AL, Albuquerque S, Bloch Jr C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*. 26: 565–573, 2005.

Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 76:909-925, 2004.

Lewinska D, Arkusz J, Stanczyk M, Palus J, Dziubałtowska E, Stepnik M. Comparison of the effects of arsenic and cadmium on benzo(a)pyrene-induced micronuclei in mouse bone-marrow. *Mutation Research* 632: 37–43, 2007.

Lichtenstein A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *The Journal of Clinical Investigation*. 88:93-100, 1991.

Lillard JW, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, Mcghee JR. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:651–656, 1999.

Linde CMA, Hoffner SE, Refai E, Andersson M. In vitro activity of PR-39, a proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. 47:575-580, 2001.

Lohner K, Prenner EJ. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1462:141-156, 1999.

Lucca AJ, Walsh TJ. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43:1–11, 1999.

Mangoni ML, Rinaldi AC, Di Giulio A, Mignogna G, Bozzi A, Barra D, Simmaco M. Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *European Journal of Biochemistry*. 267:1447-1454, 2000.

Matsuzaki K, Sugishita K, Fujii N, Miyajima K. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin-2. *Biochemistry* 34:3423-3429, 1995.

Matsuzaki K, Mitani Y, Akada KY, Murase O, Yoneyama S, Zasloff M, Miyajima K. Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. *Biochemistry*. 37:15144-15153, 1998.

Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462:1–10, 1999.

Merrifield RBJ. Solid Phase Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 85:2149–2156, 1963.

Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde, Resolução nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. *Informe Epidemiológico do SUS*. 3:13-41, 1996.

Montville TJ, Chen Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50:511-519, 1998.

Morikawa N, Hagiwara K, Nakajima T. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipedata*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 189:184-190, 1992.

Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*. 17:359–365, 2005.

Oren Z, Hong J, Shai Y. A repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:14643-14649, 1997.

Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 47:451-463, 1998.

Ownby CL, Powell JR, Jiang MS, Fletcher JE. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon*. 35:67-80, 1997.

Paiva GR, Bloch JrC, Leite JRSA, Silva LP. New cationic peptides of the dermaseptin family isolated from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. World Intellectual Property Organization. WO/010191/2003.

Pal S, St Leger RJ, Wu LP. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry*. 23:8969-8977, 2007.

Paquette DW, Simpson DM, Friden P, Braman V, Williams RC Safety and clinical effects of topical histatin gels in humans with experimental gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 29:1051-1058, 2002.

Pederzoli A, Gambarelli A, Restani C. Xanthophore migration from the dermis to the epidermis and dermal remodeling during *Salamandra salamandra salamandra* (L.) larval development. *Pigment Cell Research*. 16:50-58, 2003.

Perez-Paya E, Houghten RA, Blondelle SE. Determination of the secondary structure of selected melittin analogs with different hemolytic activities. *The Biochemical Journal*. 299:587-591, 1994.

Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology*. 10:179-186, 2002.

Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 4:529–536, 2006.

Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*. 38:161-170, 1980.

Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipids membranes. *Biochemistry*. 31:12416-12423, 1992.

Pouvelle B, Spiegel R, Hsiao L, Howard RJ, Morris RL, Thomas AP. Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature*. 353:73-75, 1991.

Rabelo-Gay MN. Teste do micronúcleo em medula óssea em Rabelo-Gay, M.N., Rodrigues, M.A.L.R., Monteleone-Neto, R. (Eds), *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese: métodos e critérios de avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, pp. 83-90, 1991.

Rao AG. Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachyplesin lacking disulfide bonds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 361:127-134, 1999.

Rattan ISS. Aging, anti-aging, and hormesis. *Mechanisms of Ageing and Development* 125:285–289, 2004.

Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24:536-547, 2004.

Reed WA, White KL, Enright FM, Holck J, Jaynes JM, Jeffers GW. Enhanced *in vitro* growth of murine fibroblast cells and preimplantation embryos cultured in medium supplemented with an amphipathic peptide. *Molecular Reproduction and Development*. 31: 106–113, 1992.

Rinaldi AC, Mangoni MI, Rufo A, Luzi C, Simmaco M, Barra D, Zhao H, Kinnunen PKJ, Bozzi A, Di Giulio A. Temporin L: antimicrobial, cytotoxic activities and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *The Biochemical Journal*. 368:91-100, 2002.

Sahl HG. Optimizing antimicrobial host defense peptides. *Chemistry & Biology* 13:1015-1017, 2006.

Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *Journal of Leukocyte Biology*. 77:466–475, 2005.

Sansom MS. Alamethicin and related peptaibols-model ion channels. *European Biophysics Journal*. 22:105-124, 1993.

Sociedade Brasileira de Herpetologia. Brazilian amphibians – List of species. <http://www.sbherpetologia.org.br>, 2007.

Schibli DJ, Epand RF, Vogel HJ, Epand RM. Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. *Biochemistry and Cell Biology*. 80:667-677, 2002.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research*. 31:9–15, 1975.

Servin-Abad L, Molina E, Baracco G, Arosemena L, Regev A, Jeffers L, Schiff E. Liver enzymes elevation after HAART in HIV-HCV co-infection. *Journal of Viral Hepatitis*. 12:429-434, 2005.

Shai Y, Oren Z. Diastereoisomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. 271:7305–7308, 1996.

Silvestro L, Gupta K, Weiser JN, Axelsen PH. The concentration dependent membrane activity of cecropin A. *Biochemistry*. 36:11452-11460, 1997.

Simmaco M, Mignogna G, Barra D, Bossa F. Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *Febs Letters*. 324:159-161, 1993.

Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, Barra D. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European Journal of Biochemistry*. 242:788-792, 1996.

Simões A, Moll GN, Slotboom AJ, Roelofsen B, Op den Kamp JA. Selective internalization of choline-phospholipids in *Plasmodium falciparum* parasitized human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1063:45-50, 1991.

Sonnevend A, Knoop FC, Patel M, Pal T, Soto AM, Conlon JM. Antimicrobial properties of the frog skin peptide, ranatuerin-1 and its [Lys-8]-substituted analog. *Peptides*. 25:29-36, 2004.

Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*. 22:539-550, 2005.

Tamamura H, Waki M, Imai M, Otaka A, Ibuka T, Waki K, Miyamoto K, Matsumoto A, Murakami T, Nakashima H, Yamamoto N, Fujii N. Downsizing of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polyphemusin II), with the maintenance of anti-HIV activity and solution structure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 6:473-479, 1998.

Tencza SB, Douglas JP, Creighton DJ, Montelaro RC, Mietzner TA. Novel antimicrobial peptides derived from human immunodeficiency virus type 1 and other lentivirus transmembrane proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:2394-2398, 1997.

Tenenholz TC, Klenk KC, Matteson DR, Blaustein MP, Weber DJ. Structural determinants of scorpion toxin affinity: the charybdotoxin (α -KTX) family of K⁺channel blocking peptides. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*. 140:135-185, 2000.

Thompson AH, Bjourson AJ, Orr DF, Shaw C, McClean S. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. *Peptides*. 28:1331-1343, 2007.

Tomasinsig L, Skerlavaj B, Papo N, Giabbai B, Shai Y, Zanetti M. Mechanistic and functional studies of the interaction of a proline-rich antimicrobial peptide with mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 383-391, 2006.

Van 't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AV. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biological Chemistry*. 382: 597-619, 2001.

Vanhoye D, Bruston F, Nicolas P, Amiche M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European Journal of Biochemistry*. 270: 2068–2081, 2003.

Velasco M, Díaz-Guerra MJ, Díaz-Achirica P, Andreu D, Rivas L, Boscá L. Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression. *Journal of Immunology*. 158: 4437–4443, 1997.

Vial HJ, Eldin P, Tielens AG, van Hellemond JJ. Phospholipids in parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 126:143-154, 2003.

Wadee AA, Clara AM. A 25-kilodalton fraction from *Mycobacterium tuberculosis* that inhibits hexose monophosphate shunt activity, lysozyme release, and H₂O₂ production: reversal by gamma interferon. *Infection and Immunity*. 57:864-869, 1989.

Williamson P, Schlegel RA. Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells. *Molecular Membrane Biology*. 11:199-216, 1994.

World Health Organization. Model list of essential drugs. World Health Assembly Report, 1976.

World Health Organization. Global strategy for containing of antimicrobial resistance. Geneva, 2001a.

World Health Organization. Good Laboratory Practice (GLP) UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva, 2001b.

World Health Organization. Drug resistance.

<http://www.who.int/drugresistance/guidance/en/index.html>, 2007.

World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. Scotland, 2000.

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

Yoshida S, Kamano Y, Sakai T. Studies on the surface anesthetic activity of bufadienolides isolated from ch' an su. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 24:1714-1717, 1976.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 415:389–395, 2002.

ANEXO I

(Parecer do comitê de ética e artigo científico)



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA - IBDB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

22 de Março de 2004.

A QUEM POSSA INTERESSAR

Declaramos que o projeto intitulado **“ESTRUTURA, MECANISMO DE AÇÃO E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DE PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS”**. Foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Cesar Koppe Griso a
Comitê de Ética do Uso Animal
Presidente



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 027/2006

Título: “Efeito da Filosseptina-1, um peptídeo antimicrobiano de *Phylomedusa Hypochondrialis*, sobre a função de células humanas”

Pesquisador responsável: Selma Aparecida Souza Kuckelhaus

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 11/05/2006

Proposição do(a) relator(a)

Aprovação

Aprovação com recomendação

Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 23/06/2006

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 22/08/2006

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** *ad referendum*, conforme parecer do(a) relator(a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;

2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 22 de Agosto de 2006.


Profa. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina - UnB

Toxicity Evaluation to Mice of Phylloseptin-1, an Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia)

Selma Kückelhaus,^{1,5} José Roberto S. A. Leite,^{2,3} Mateus P. Neves,¹ Karla S. Frota,¹ Lídia F. Abdala,⁴ Maria Imaculada Muniz-Junqueira,¹ Carlos Bloch Jr.,³ and Carlos Eduardo Tosta¹

(Accepted November 30, 2006; Online publication January 6, 2007)

The growing resistance of microorganisms to antibiotics has been considered as a global public health problem. Therefore, the search for novel antimicrobial drugs, chemically unrelated to the presently used antibiotics, is urgently needed. Our group has recently characterized a new family of antimicrobial peptides – phylloseptins – isolated from the skin secretion of the South American amphibian *Phyllomedusa hypochondrialis*, which showed a strong antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria. We now investigate the *in vivo* toxicity of synthetic phylloseptin-1 (PS-1) toward bone marrow, liver, spleen, kidney and lung after endovenous administration to Swiss mice of a bolus dose of 4 mg/kg. Genotoxicity was evaluated by quantifying erythrocyte micronuclei. PS-1-treated mice showed no alteration in the histology of liver, spleen, kidney and lung, as well as of blood biochemistry, as compared to normal controls. Cytotoxicity tests, evaluated either by blood cytometry or bone marrow polychromatophilic erythrocyte index, revealed no deleterious effect of PS-1. Moreover, the peptide showed no toxicity towards bone marrow erythrocytes. We concluded that, in a concentration ten times over that providing antimicrobial effect, synthetic PS-1 showed no *in vivo* toxicity.

KEY WORDS: phylloseptin-1; antimicrobial peptide; *Phyllomedusa hypochondrialis*; cytotoxicity; genotoxicity; mouse.

INTRODUCTION

The growing emergence of resistance of microorganisms to antibiotics throughout the world, due to massive use and the occurrence of strongly selective environments for pathogens, such as the hospitals, lead the World Health Organization (WHO) to consider this phenomenon as a major public health problem (WHO, 2000). Therefore, the development of novel products or strategies became a central issue in the fight against pathogens (Black and Hodgson, 2005). In the last decades over 500 peptides with antimicrobial activity have been described (see <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), some of them were isolated from amphibians

¹ Laboratório de Imunologia Celular, Área de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil.

² Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Parnaíba, PI, 64202-020, Brazil.

³ Laboratório de Espectrometria de Massa, EMBRAPA/Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 70910-900, Brazil.

⁴ Laboratório Sabin de Análises Clínicas Ltda, Brasília, DF, 70910-900, Brazil.

⁵ Correspondence should be addressed to: Selma Kückelhaus, Laboratório de Imunologia Celular, Área de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil. Tel.: +55-61-33072273; Fax: +55-61-34356569; e-mail: selmak@unb.br.

(Vanhoye *et al.*, 2003). These animals are found to produce abundant active substances (Brand *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005), ranging from biogenic amines, complex alkaloids, and antimicrobial peptides related to self-defence (Cunha Filho *et al.*, 2005; Silva, 2004).

It is well established that antimicrobial peptides from amphibians are produced and stored in cutaneous granular glands, and are continuously released by holocrine mechanisms (Chen *et al.*, 2003, 2005). These natural antimicrobial peptides confer protection against microorganisms, not only in the absence of a clonally based immune system, like in insects, but also in higher organisms, as an immediate host response to infections, well before the adaptive immune system is activated (Apponyi *et al.*, 2004; Hancock and Diamond, 2000). These molecules are chemically unrelated to conventional antibiotics, making unlikely the emergence of cross-resistant microorganisms. Moreover, amphibian-derived antimicrobial peptides act directly on target cells by increasing membrane permeability in a way that does not appear to depend on specific receptors (Ambroggio *et al.*, 2005; Matsuzaki, 1999; Peschel, 2002), and that is not affected by the resistance mechanisms presented by a growing number of pathogens towards antibiotics (Stark *et al.*, 2002).

Several bioactive substances have been isolated from the skin secretions of amphibians belonging to the genus *Phyllomedusa* (subfamily *Phyllomedusinae*), which include dermaseptins (Brand *et al.*, 2002; Krugliak *et al.*, 2000; Mor *et al.*, 1991; Shiri *et al.*, 2002). Recently, our group identified a new family of six antimicrobial peptides called phylloseptins (PS) from the cutaneous secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. The members of this family present activity against bacteria and fungi at micromolar concentrations (Leite *et al.*, 2005). One of these is phylloseptin-1 (PS-1), a 19 amino-acid-cationic peptide of 2016.14 Da, with amphiphilic properties, which showed a strong antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and presented no significant hemolytic activity (<0.6% at the MIC range) to mammalian erythrocytes (Leite *et al.*, 2005). The aim of the present study was to evaluate the toxicity of synthetic PS-1 in an *in vivo* model, an essential step towards its possible future use in humans.

MATERIAL AND METHODS

Phylloseptin-1 Solid Phase Synthesis

Amidated PS-1 (FLSLIPHAINAVSAIAKHN-NH₂) was synthesized on a Pioneer Synthesis System from Applied Biosystems (California, USA) (Merrifield, 1963). Fmoc amino acids and Fmoc-PALpoly (ethyleneglycol)-polystyrene (FmocPAL-PEG-PS) resin were purchased from Applied Biosystems (California, USA). A preparative C18 column Vydac 218 TP 1022 (Columbia, MD) on an HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used for purifying the product. Molecular mass and sample purity were checked by a Voyager DE MALDI-TOF/MS (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) and MALDI TOF-TOF MS ULTRAFLEX II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Animals

Female adult Swiss mice ($n = 8$), weighing 35–40 g, obtained from the Centro Universitário de Brasília Animal House, received endovenously a bolus dose of PS-1 (4 mg/kg, a concentration 10-fold over its antimicrobial dose) in 100 μ L of 0.9% NaCl solution, while the control group was treated with the same volume of the diluent. In the experiments on genotoxicity, mice were endovenously treated with a bolus dose of cyclophosphamide (33 mg/kg), a drug known for its clastogenic effect (Colvin and Chabner, 1990), and used as the positive control group. The animals were killed by ether inhalation after 24 h to 14 days, and several biological tests were performed using standard techniques. During the duration of experiments, mice were maintained at 12 h dark/light cycles, controlled temperature (23 °C), and received balanced food and water *ad libitum*.

Cytotoxicity Assays

Toxicity of PS-1 to blood cells was evaluated by quantification of total and differential peripheral blood leucocytes collected after treatment (24 h up to 14 days), or by the polychromatophilic bone marrow erythrocyte index (24 or 48 h). Blood was collected in syringes previously treated with EDTA, and leucometry and leucogram were performed by standard techniques (Brillard and Medaniel, 1985). Bone marrow cells were collected from the femur, after cutting its extremities, with fetal calf serum, mechanically disrupted, distended on glass slide, fixed with absolute methanol, and stained with 15% Giemsa solution in phosphate-buffered saline pH 7.2. The polychromatophilic erythrocyte index (Bolliger, 2004) was calculated by assessing the ratio between polychromatophilic and normochromatophilic erythrocytes after examining 1000 cells.

Genotoxicity Assay

The possible clastogenic effect of PS-1 was investigated by quantifying the total number of micronuclei in 1000 bone marrow polychromatophilic or normochromatophilic erythrocytes. Mice were divided into three groups of eight animals and received, by endovenous route, either a bolus dose of 4 mg/kg of PS-1 (test group), or 33 mg/kg of cyclophosphamide (Enduxan®, Brasil)

(positive control group), or 0.9% NaCl solution (negative control group). The animals were killed 24 or 48 h after treatment, and bone marrow cells were collected, processed and examined as previously described.

Biochemical Analysis

The possible toxicity of PS-1 towards kidney and liver was evaluated by assessing the serum concentrations of urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST) and alanine-aminotransferase (ALT) (Moura, 1982). Groups of eight mice were treated with 100 μ L of either PS-1 (4 mg/kg) or 0.9% NaCl solution and killed after 24 or 48 h. The analyses were made using the spectrophotometric system ADVIA 1650 (Bayer Corporation, Diagnostics Division, Tarrytown, USA).

Histopathological Analysis

Small fragments of liver, spleen, kidney and lung were collected and processed for histopathology following standard techniques (Clark, 1980), stained with hematoxylin and eosin and analysed by light microscopy. Photomicrographs were performed with a Sony Cyber shot camera model DSC-P72 of 3.2 megapixels (Tokio, Japan).

Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate the normality of the variables distribution, and the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's method, to compare multiple unrelated non-normal samples (Glantz, 1992). Differences with a two-tailed value of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The SigmaStat software (Jandel Scientific, San Rafael, CA) was used for statistical tests and the MicrocalTM Origin 6.0[®] software package (Microcal Software Inc., 1999) was employed for the graphic representations.

RESULTS

The determination of the LD₅₀ of PS-1, with purity of 99.9%, the dose able to kill 50% of the animals, is a usual step for toxicity studies. We administered doses from 4 to 32 mg/kg of PS-1 to mice. This last concentration is equivalent 80-fold over that able to provide *in vitro* antimicrobial effects ($\sim 4 \mu$ M). However, even at this high concentration, the peptide caused no death of injected animals or any morphological alterations (data not shown).

Endovenously administered PS-1 caused, in the time window used, no significant alteration in the total number of mouse peripheral blood leucocytes, as compared to the control group treated with 0.9% NaCl solution. This finding indicates that the peptide caused no *in vivo* inflammatory effect (Table I).

Erythrocyte toxicity, evaluated from the bone marrow polychromatophilic erythrocyte index, showed no *in vivo* effect of PS-1 when compared to that of the control group (Fig. 1). To evaluation of a possible clastogenic effect of PS-1 we utilized bone marrow immature erythrocytes. Both 24 and 48 h after treatment of mice with PS-1, the total number of micronuclei in erythrocytes were comparable to that of control mice treated with 0.9% NaCl solution (Dunn's method, $p > 0.05$), and lower than that caused by cyclophosphamide, a drug with known clastogenic effect (Fig. 2).

The evaluation of serum concentration of urea and creatinine gives a trusted indication of overall kidney function because, since these substances are normally filtered and excreted by the organ, an increased in their serum levels reflects a decline in the glomerular filtration rate. PS-1-treated mice showed serum levels of urea and creatinine comparable to those of the control group treated with 0.9% NaCl solution (Dunn's method, $p > 0.05$), which indicates no toxicity of PS-1 to the kidney (Fig. 3).

AST and ALT are cytosolic enzymes found in cells of several tissues, especially hepatocytes and muscle cells. These enzymes are released from damaged cells and are considered as useful tools for the diagnosis and monitoring of cell injury (Moura, 1982). We found that serum concentrations of AST and ALT in mice treated with PS-1 were comparable to those detected in control mice treated with 0.9% NaCl solution (Dunn's method, $p > 0.05$), which indicates the toxicity absence of the peptide to liver and muscle cells (Fig. 4).

The histopathological evaluation of liver, spleen, kidney and lung by microscopy revealed no morphological alteration in mice treated with PS-1 in comparison to the control group treated with 0.9% NaCl (Fig. 5).

DISCUSSION

The results of the present investigation clearly indicate that, at a concentration 10-fold higher than that in which it presents an antimicrobial effect, endovenously administered PS-1 caused no detected toxic effect in mice, confirming the findings of Leite et al. (2005), using an *in vitro* system. At the same single concentration Ownby et al. (1997) have demonstrated the myotoxic effect of melittin by dorso-lateral injection on mice.

Table 1. Effects of phylloseptin-1 (PS-1), endovenously administered to mice ($n = 8$), on the number and categories of peripheral blood leucocytes (cells/ μL)

Time	Treatment	Leucocytes ($\times 10^2$)	Lymphocytes ($\times 10^2$)	Neutrophils ($\times 10^2$)	Monocytes ($\times 10^2$)	Eosinophils ($\times 10^2$)
		Median (25–75%)	Median (25–75%)	Median (25–75%)	Median (25–75%)	Median (25–75%)
24 h	Saline	72 (65–79)	56 (50–63)	7 (5–9)	6 (5–10)	0.8 (0.3–1)
	PS-1	82 (67–106)	60 (45–76)	6 (2–1)	9 (3–16)	1 (1–2)
48 h	Saline	66 (58–70)	54 (50–59)	5 (4–6)	2 (2–4)	0.3 (0–0.7)
	PS-1	65 (61–69)	57 (54–61)	3 (2–6)	1 (1–2)	0.1 (0–0.3)
7 days	Saline	69 (64–75)	54 (50–65)	5 (4–7)	7 (3–8)	0.3 (0.3–0.9)
	PS-1	68 (64–79)	54 (49–67)	5 (3–6)	8 (6–10)	1 (0.4–1)
14 days	Saline	75 (60–91)	66 (55–77)	5 (3–8)	7 (5–8)	1 (0–0.9)
	PS-1	86 (70–94)	71 (53–79)	9 (7–10)	4 (3–8)	1 (0–0.6)

The time windows varied from 24 h to 14 days after a bolus dose of 4 mg/kg of PS-1 or 0.9% NaCl solution (Saline). The differences between groups were analysed by the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's method for multiple comparisons. No difference between groups was found.

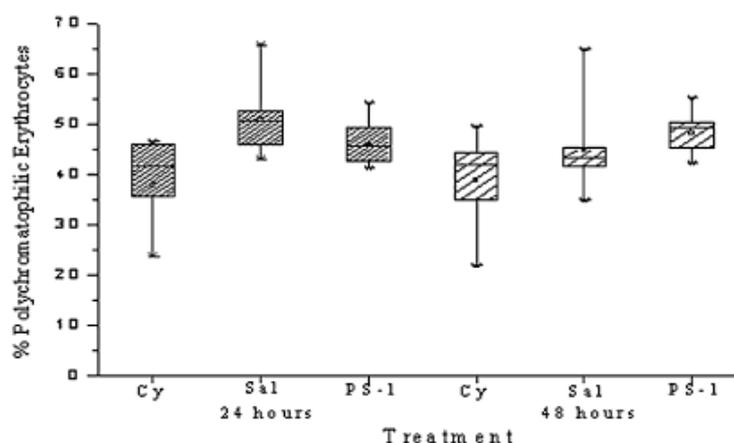


Fig. 1. The effects of endovenously administered phylloseptin-1 (PS-1) on bone marrow polychromatophilic erythrocytes 24 and 48 h after injection. Mice ($n = 8$) were treated with a bolus dose of PS-1 (4 mg/kg), or 33 mg/kg cyclophosphamide (Cy), or 0.9% NaCl solution (Sal). Median, upper and lower quartiles and extreme values are shown. The effects of treatments were evaluated by the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's method for multiple comparisons. No statistical difference between PS-1 and control groups was found.

The inability to determine the LD_{50} concentration of PS-1, even after treating mice with a dose 80-fold over its MIC, indicated no or very low toxicity (undetectable by morphology). After a systematic investigation of a single dose (10-fold higher than MIC), no quantitative or qualitative alteration was found in blood leucocytes, or in biochemical parameters of liver and kidney damage. These findings were confirmed by the absence of microscopic alterations of these organs. The examination of bone marrow cells is a sensitive way to detect cytotoxicity. In normal situations, the proportion of polychromatophilic to normochromatophilic erythrocytes in this organ is 1:1 (Rabelo-Gay, 1991). PS-1-treated mice presented

an average of 50% of polychromatophilic erythrocytes, which indicates an absence of toxicity in this system.

Micronuclei are small fragments of chromatin formed when the nucleus of erythrocytes is expelled from the cell during its maturation (Evans, 1997). An increase in the number of micronuclei indicates chromosome injury (Schmid, 1975). In our study, PS-1 caused no effect on the number of erythrocyte micronuclei (Fig. 2), which indicates an absence of genotoxicity.

The remarkable feature of PS-1 to kill bacteria and fungi (Leite *et al.*, 2005) but not mammalian cells is shared with other antimicrobial peptides, including

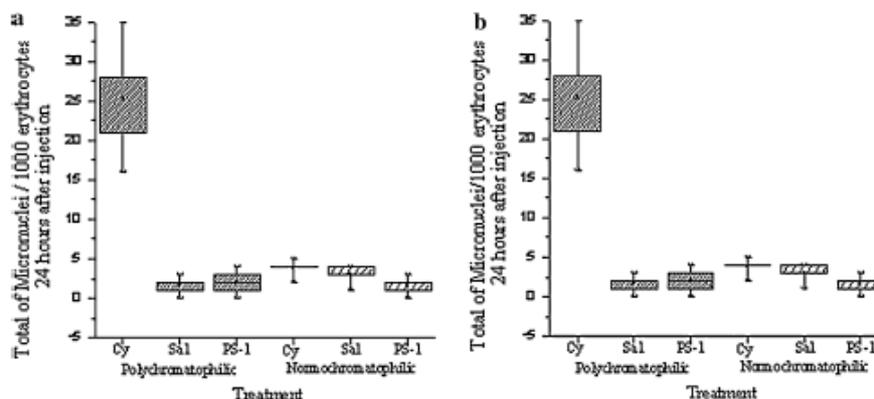


Fig. 2. Effect of phylloseptin-1 (PS-1) on Swiss mice ($n = 8$) following endovenous administration on the total micronuclei of 1000 bone marrow polychromatophilic or normochromatophilic erythrocytes after 24 h (a) or 48 h (b). Mice were treated with a bolus dose of 4 mg/kg of PS-1, or 33 mg/kg cyclophosphamide (Cy), or 0.9% NaCl solution (Sal). Median, upper and lower quartiles and extreme values are shown. The effects of the drug were evaluated by the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's method for multiple comparisons. While Cy caused an increase in polychromatophilic (24 and 48 h, both $p = 0.001$) and normochromatophilic erythrocytes (48 h, $p = 0.001$), no statistical difference was found between PS-1 and control groups.

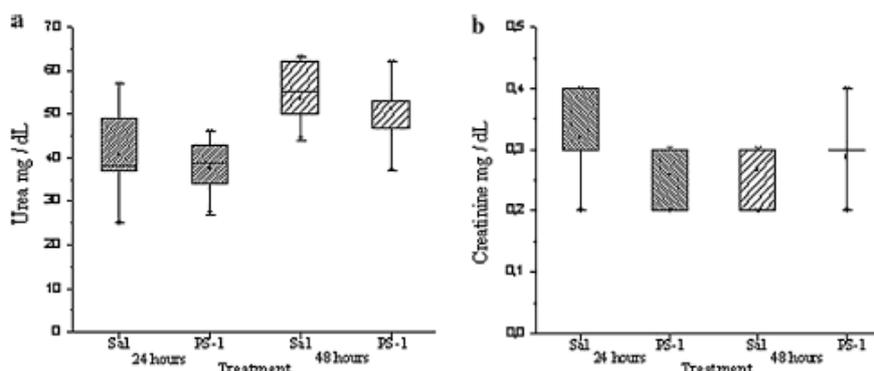


Fig. 3. Effect of phylloseptin-1 (PS-1) (4 mg/kg), or 0.9% NaCl solution (Sal), endovenously administered to Swiss mice ($n = 8$), on blood urea (a), and creatinine (b) concentrations, 24 or 48 h after injection. Median, upper and lower quartiles are shown. The results were evaluated by the Kruskal–Wallis test, followed by the Dunn's method for multiple comparisons, and showed no statistical difference between PS-1 treated and control mice.

cecropins (Steiner et al., 1981), magainins (Andrès and Dimarçq, 2004), and dermaseptins (Krugliak et al., 2000). These peptides vary considerably in their chain length and structure, but have cationic properties in common. This feature could explain the selectivity of these antimicrobial peptides towards microorganisms, which usually are more negatively charged than mammalian cells (Sitaram and Nagaraj, 1999). This selectivity also depends on the characteristics of the amino acid sequence of the peptide, including the hydrophobic moment, isoelectric point and helicity, as shown by Blondelle and Houghten (1991).

As suggested by Leite et al. (2005) the first target of PS-1 is the anionic plasma membrane of microorganisms. The association resulting in severe membrane alteration leads progressively to increased permeability and cell lysis. The absence of detectable toxicity of PS-1 to mouse cells and tissues could reflect its low interaction with cell plasma membrane, due to a high content of cationic lipids as cholesterol (Goluszko and Nowicki, 2005; Tomasinsig et al., 2006). Our findings indicate that the low selectivity of PS-1 to mammalian cell membranes is an important feature for explaining its low toxicity.

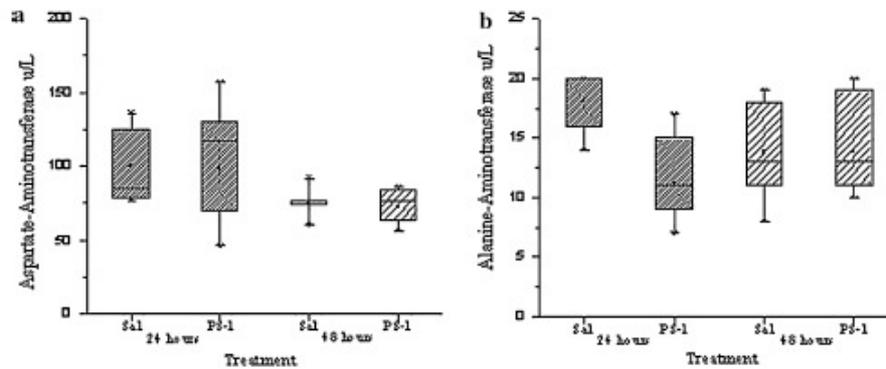


Fig. 4. Effect of phylloseptin-1 (PS-1) (4 mg/kg), or 0.9% NaCl solution (Sal), endovenously administered to Swiss mice ($n = 8$) on aspartate-aminotransferase (a), and alanine-aminotransferase (b) concentrations, 24 or 48 h after injection. Median, upper and lower quartiles are shown. Results were tested by the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn's method to multiple comparisons, and showed no statistical differences between PS-1 treated and control mice.

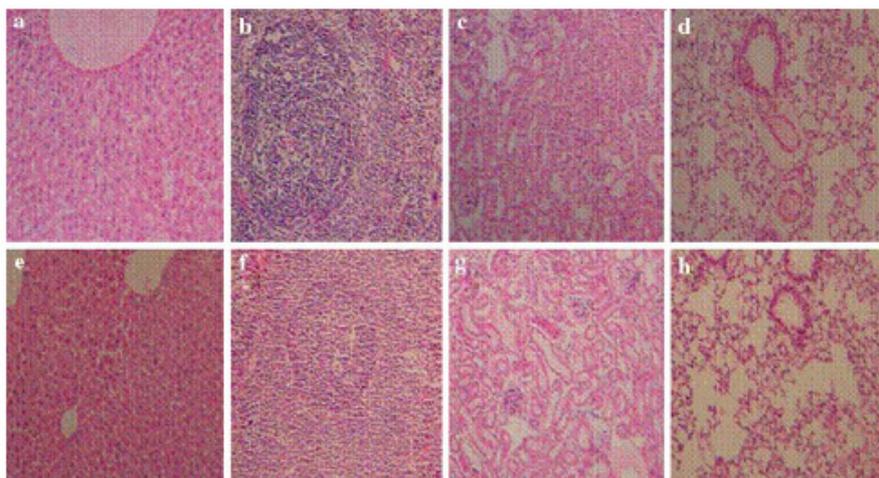


Fig. 5. Comparison between the histology of liver (a), spleen (b), kidney (c), and lung (d) from mice treated with phylloseptin-1, and the equivalent organs from mice treated with 0.9% saline solution (e-h). All pictures refer to mice killed 7 days after treatment. Light microscopy evaluation of these organs showed no detectable morphological changes between the two groups. Hematoxylin and eosin staining, used with 100 \times magnification.

The broad-spectrum activity of antimicrobial peptides produced by amphibians and the enormous variability of these animals in nature make them important potential source of antibiotics for human use. We have previously showed that PS-1 is active against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and displayed no toxic effect in an *in vitro* system (Leite *et al.*, 2005). We now show, in an *in vivo* model, no evidence of toxicity for PS-1, using

a concentration 10-fold over that providing antimicrobial effect. The use of a single dose is an accepted procedure for preliminary toxicity tests of new compounds in animals, according to the WHO Manual of Good Laboratory Practices (WHO, 2001).

These findings may provide novel templates from which new compounds may be developed to widen the strategies for the treatment of infections,

particularly those caused by pathogens resistant to conventional antimicrobial agents. Our present results represent a step forward a possible future use of PS-1 in humans and animals.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. We are grateful to Centro Universitário de Brasília (UnICEUB) for the donation of the mice used in this research.

REFERENCES

- Ambroggio, E. E., Separovic, F., Bowie, J. H., Fidelio, G. D. and Bagatolli, L. A.: 2005, *Biophys. J.* 89, 1874–1881.
- Andrés, E. and Dimarq, J. L.: 2004, *Rev. Med. Interne* 25, 629–635.
- Apponyi, M. A., Pukala, T. L., Brinkworth, C. S., Maselli, V. M., Bowie, J. H., Tyler, M. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., Carver, J. A., Separovic, F., Doyle, J. and Llewellyn, L. E.: 2004, *Peptides* 25, 1035–1054.
- Black, M. T. and Hodgson, J.: 2005, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1528–1538.
- Blondelle, S. E. and Houghten, R. A.: 1991, *Biochemistry* 30, 4671–4678.
- Brand, G. D., Leite, J. R. S. A., Silva, L. P., Albuquerque, S., Prates, M. V., Azevedo, R. B., Carregaro, V., Silva, J. S., Sá, V. C. L., Brandão, R. A. and Bloch, C. Jr.: 2002, *J. Biol. Chem.* 277, 49332–49340.
- Bolliger, A. P.: 2004, *Vet. Clin. Pathol.* 33, 58–67.
- Brillard, J. P. and McDaniel, G. R.: 1985, *Poult. Sci.* 64, 155–158.
- Chen, T., Farragher, S., Bjourson, A. J., Orr, D. F., Rao, P. and Shaw, C.: 2003, *Biochem. J.* 371, 125–130.
- Chen, T., Xue, Y., Zhou, M. and Shaw, C.: 2005, *Peptides* 26, 377–383.
- Clark, G.: 1980, *Stained Procedures*, 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, London.
- Colvin, M. and Chabner, B. A.: 1990, in: Chabner, B. A., Collins, J. M. (eds.), *Cancer Chemotherapy: Principles and Practices*, J.B. Lippencott, Philadelphia, California, pp. 276–313.
- Cunha Filho, G. A., Schwartz, C. A., Resck, I. S., Murta, M. M., Lemos, S. S., Castro, M. S., Kyaw, C., Pires, O. R. Jr., Leite, J. R. S. A., Bloch, C. Jr. and Schwartz, E. F.: 2005, *Toxicol.* 45, 777–782.
- Evans, H. J.: 1997, *Mutat. Res.* 392, 5–10.
- Glantz, S. A.: 1992, *Primer of Biostatistics*, McGraw Hill, New York.
- Goluszko, P. and Nowicki, B.: 2005, *Infect. Immun.* 73, 7791–7796.
- Hancock, R. E. W. and Diamond, G.: 2000, *Trends Microbiol.* 8, 402–410.
- Kruglak, M., Feder, R., Vadim, Y., Zolotarev, L. G., Dagan, A., Ginsburg, H. and Mor, A.: 2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2442–2451.
- Leite, J. R. S. A., Silva, L. P., Rodrigues, M. I. S., Prates, M. V., Brand, G. D., Lacava, B. M., Azevedo, R. B., Bocca, A. L., Albuquerque, S. and Bloch, C. Jr.: 2005, *Peptides* 26, 565–573.
- Merrifield, R. B. J.: 1963, *Chem. Soc.* 85, 2149–2156.
- Matsuzaki, K.: 1999, *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 1–10.
- Mor, A., Nguyen, V. H., Delfour, A., Migliore, S. D. and Nicolas, P.: 1991, *Biochemistry* 30, 8824–8830.
- Moura, R. A. A. (ed.): 1982, in *Técnicas de Laboratório*, Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, RJ, pp. 77–119.
- Owby, C. L., Powell, J. R., Jiang, M. S. and Fletcher, J. E.: 1997, *Toxicol.* 35, 67–80.
- Peschel, A.: 2002, *Trends Microbiol.* 10, 179–186.
- Rabelo-Gay, M. N.: 1991, in: Rabelo-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. L. R., Monteleone-Neto, R. (eds.), *Mutagenese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, pp. 83–90.
- Schmid, W.: 1975, *Mutat. Res.* 31, 9–15.
- Silva, L. P.: 2004, *Lett. Drug Design Discov.* 3, 230–236.
- Sitaram, N. and Nagaraj, R.: 1999, *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 29–54.
- Shiri, J., Navon-Venezia, S., Feder, R., Gaidukov, L., Carmeli, Y. and Mor, A.: 2002, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 689–694.
- Stark, M., Liu, L. P. and Deber, C. M.: 2002, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3585–3590.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. and Boman, H. G.: 1981, *Nature* 292, 246–248.
- Tomasinsig, L., Skerlavaj, B., Papo, N., Giabbai, B., Shai, Y. and Zanetti, M.: 2006, *J. Biol. Chem.* 281, 383–391.
- Vanhoye, D., Bruston, P., Nicolas, P. and Amiche, M.: 2003, *Eur. J. Biochem.* 270, 2068–2081.
- World Health Organization: 2000, Drug resistance threatens to reverse medical progress, Press Release WHO/41.12.
- World Health Organization: 2001, Good Laboratory Practice (GLP) UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (document no. TDR/PRD/GLP/01.1B).

ANEXO II

(SOLUÇÕES, MEIOS E REAGENTES)

Líquido de Türk

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

Solução de nigrosina 0,05%

Nigrosina	0,05 g
Tampão fosfato	100 mL
Filtrar e colocar em frasco âmbar	
Estocar a 4 °C	

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

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

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

Meio RPMI 1640, PH 7,2, (Sigma)	10,4 g
Tampão Hepes (Sigma, mm: g/mol)	5,96 g
Hipoxantina	2,50 mg
Gentamicina	25,0 mg
Água bidestilada	1000 mL
Filtrar em membrana de 0,22 µL Guardar a 4 °C por um mês	

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

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

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

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

Bicarbonato de sódio 7,5%

Pesar 7,5 g de bicarbonato de sódio
Dissolver em 100 mL de água bidestilada
Filtrar com filtro 0,02 µm

Solução de vermelho de fenol 0,028 M

a) Solução estoque:	Vermelho de fenol (Merck)	9,92 g
	Água bidestilada	1000 mL
b) Solução de uso:	Peroxidase (85unidades)	200 µL
	Vermelho de fenol	200 µL
	Tampão fosfato	9,6 mL

Solução de Greiss**a) Solução estoque:**

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

Sal sulfanilamida (Sigma) 500 mg

H₃PO₄ a 5% 25 mL

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

NEED 0,2%

N-1-naphthylethylenediamine (Sigma) 50 mg

Água bidestilada 25 mL

b) Solução de uso:

Sulfanilamida 2% 10 mL

NEED 0,2 % 10 mL

OBS: Preparar 01 hora antes do término do período de incubação

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina (cristais) 5,0 g

Álcool absoluto 50 mL

Alúmen de potássio ou amônio 100 g

Água destilada 1000 mL

Óxido amarelo de mercúrio 2,5 g

Eosina estoque

Eosina y 1,0 g

Água destilada 20 mL

Dissolver e adicionar

Álcool 95% 80 mL

Eosina solução de uso

Eosina y estoque 1 parte

Álcool a 80% 3 partes

Imediatamente antes do uso adicionar 0,5 mL de ácido acético glacial para cada 100 mL de solução

HISTOLOGIA
(Hematoxilina / eosina)

Xilol I 1 minuto

Xilol II 1 minuto

Xilol III 1 minuto

Álcool 100%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 70%	1 minuto
Hematoxilina de Harris	1 minuto
Água corrente	3 minutos
Eosina	1 minuto
Álcool 70%	1 minuto
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool 100%	1 minuto
Xilol I	1 minuto
Xilol II	1 minuto
Xilol III	1 minuto

Proteger os cortes com lamínulas e resina sintética (Entelan – Merck)

ANEXO III

(Planilhas e tabelas)

CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS**24 horas**

Animal	CG	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo	CG	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo
	Controle	Controle	Controle	Controle	Controle	PS-1	PS-1	PS-1	PS-1	PS-1
1	7300	5694	986	584	37	6750	6244	270	101	135
2	6400	4448	736	1120	96	12000	9840	1500	480	180
3	x	x	x	x	x	8200	4264	287	3403	205
4	8200	6601	492	1025	82	6700	4791	804	804	302
5	7000	5495	105	1225	175	5100	4386	510	153	51
6	6400	4864	960	544	32	11300	8927	904	1130	339
7	7200	6156	684	324	36	8200	5781	205	2009	205
8	8300	6433	1079	623	166	10000	6350	2200	1300	150

48 horas

Animal	CG	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo	CG	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo
	Controle	Controle	Controle	Controle	Controle	Ps-1	Ps-1	Ps-1	Ps-1	Ps-1
1	6850	5480	788	548	34	7050	5288	1022	599	71
2	7100	5858	710	426	71	6300	5670	347	158	32
3	5450	4633	463	300	27	6550	6157	295	98	0
4	8000	7200	600	200	0	6450	6063	226	129	32
5	6400	5440	160	672	0	6850	5925	685	240	0
6	5650	4859	565	198	0	7550	6720	680	151	0
7	6100	5216	519	214	92	5950	5534	238	149	30
8	6900	6107	621	104	69	5400	5049	81	270	0

7 dias

Animal	CG	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo	CG	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo
	Controle	Controle	Controle	Controle	Controle	Ps-1	Ps-1	Ps-1	Ps-1	Ps-1
1	8000	6680	480	800	40	8150	6479	245	1263	163
2	6100	4911	793	336	61	9950	8358	945	498	149
3	8600	7052	559	860	129	6650	5187	532	865	67
4	6850	5240	719	856	34	7750	7053	194	388	116
5	7000	6370	245	350	35	6300	4820	567	882	32
6	5650	4238	452	763	170	7000	5635	630	735	0
7	6900	5727	725	414	35	5300	3127	398	1670	106
8	7100	5254	426	1420	0	6600	5049	627	759	165

14 dias

Animal	CG	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo	CG	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo
	Controle	Controle	Controle	Controle	Controle	Ps-1	Ps-1	Ps-1	Ps-1	Ps-1
1	6500	5265	455	748	0	9800	8379	833	588	33
2	9000	7920	810	180	0	6800	5270	442	1088	90
3	5650	4238	509	904	0	7300	5475	694	1132	0
4	7500	6450	338	675	0	8600	7439	1075	86	38
5	7800	6942	156	702	110	11000	8965	1485	440	0
6	7600	5776	836	988	180	9000	7425	990	405	0
7	9200	7636	506	828	86	8600	6966	1075	473	230
8	9300	8045	884	372	28	5600	4508	840	224	0

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE URÉIA, CREATININA,
ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE E ALANINA-AMINOTRANSFERASE**

Camundongos	Controle	Uréia mg/dL	Creatinina mg/dL	AST u/L	ALT u/L
1	24h	33	0,4	x	14
2	24h	57	0,3	x	x
3	24h	46	0,3	77	20
4	24h	49	0,2	85	20
5	24h	38	x	79	16
6	24h	25	x	136	20
7	24h	37	0,4	125	19
8	24h	x	x	x	x

Camundongos	PS-1	Uréia mg/dL	Creatinina mg/dL	AST u/L	ALT u/L
1	24h	34	0,3	157	9
2	24h	34	0,3	117	12
3	24h	43	0,2	46	17
4	24h	39	0,3	130	15
5	24h	44	0,3	70	7
6	24h	46	x	x	x
7	24h	27	0,2	x	7
8	24h	33	0,2	71	11

Camundongos	Controle	Uréia mg/dL	Creatinina mg/dL	AST u/L	ALT u/L
1	48h	44	0,2	92	19
2	48h	46	0,2	x	x
3	48h	55	0,3	x	x
4	48h	62	0,2	60	13
5	48h	63	0,3	76	11
6	48h	50	0,3	74	8
7	48h	55	0,3	121	18
8	48h	x	x	x	x

Camundongos	PS-1	Uréia mg/dL	Creatinina mg/dL	AST u/L	ALT u/L
1	48h	47	0,3	76	19
2	48h	60	0,3	84	14
3	48h	37	0,3	56	10
4	48h	53	0,3	67	10
5	48h	50	0,2	186	x
6	48h	47	0,3	64	13
7	48h	53	0,4	x	20
8	48h	62	0,2	86	11

CONTAGEM DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS E NORMOCROMÁTICOS

Número	Controle negativo	Eritrócito policromático	Micronúcleo EPC	Eritrócito normocromático	Micronúcleo ENC	EPC + ENC	% PCE
1	24h	1000	1	970	4	1970	50,8
2	24h	1000	1	812	1	1812	55,2
3	24h	759	3	1000	4	1759	43,1
4	24h	852	3	1000	3	1852	46,0
5	24h	1000	1	896	3	1896	52,7
6	24h	759	2	1000	3	1759	43,1
7	24h	982	2	1000	2	1982	49,5
8	24h	1000	0	520	4	1520	65,8

Número	Controle negativo	Eritrócito policromático	Micronúcleo EPC	Eritrócito normocromático	Micronúcleo ENC	EPC + ENC	% PCE
1	48h	725	2	1000	1	1725	42,0
2	48h	972	2	1000	1	1972	49,3
3	48h	1000	0	542	2	1542	64,9
4	48h	824	2	1000	2	1824	45,2
5	48h	536	1	1000	1	1536	34,9
6	48h	763	0	1000	2	1763	43,3
7	48h	711	1	1000	0	1711	41,6
8	48h	565	3	1000	2	1565	36,1

Número	Controle positivo	Eritrócito policromático	Micronúcleo EPC	Eritrócito normocromático	Micronúcleo ENC	EPC + ENC	% PCE
1	24h	1000	21	909	3	1909	52,4
2	24h	554	35	1000	4	1554	35,6
3	24h	868	22	1000	4	1868	46,5
4	24h	374	31	1000	2	1374	27,2
5	24h	854	21	1000	5	1854	46,1
6	24h	794	28	1000	4	1794	44,3
7	24h	716	28	1000	4	1716	41,7
8	24h	310	16	1000	4	1310	23,7

Número	Controle positivo	Eritrócito policromático	Micronúcleo EPC	Eritrócito normocromático	Micronúcleo ENC	EPC + ENC	% PCE
1	48h	536	15	1000	8	1536	34,9
2	48h	868	3	1000	5	1868	46,5
3	48h	725	3	1000	8	1725	42,0
4	48h	600	8	1000	2	1600	37,5
5	48h	279	17	1000	4	1279	21,8
6	48h	796	2	1000	1	1796	44,3
7	48h	523	6	1000	7	1523	34,3
8	48h	980	9	1000	6	1980	49,5

Número	PS-1 4 mg/kg	Eritrócito policromático	Micronúcleo EPC	Eritrócito normocromático	Micronúcleo ENC	EPC + ENC	% PCE
1	24h	738	2	1000	3	1738	42,5
2	24h	972	0	1000	2	1972	49,3
3	24h	842	2	1000	3	1842	45,7
4	24h	1000	3	841	1	1841	54,3
5	24h	988	1	1000	0	1988	49,7
6	24h	713	4	1000	1	1713	41,6
7	24h	795	3	1000	1	1795	44,3
8	24h	703	0	1000	1	1703	41,3

Número	PS-1 4 mg/kg	Eritrócito policromático	Micronúcleo EPC	Eritrócito normocromático	Micronúcleo ENC	EPC + ENC	% PCE
1	48h	900	0	1000	2	1900	47,4
2	48h	809	1	1000	0	1809	44,7
3	48h	729	0	1000	2	1729	42,2
4	48h	1000	0	813	1	1813	55,2
5	48h	1000	1	961	1	1961	51,0
6	48h	971	5	1000	2	1971	49,3
7	48h	1000	1	991	2	1991	50,2
8	48h	829	3	1000	1	1829	45,3

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

	RPMI	RPMI	1ug	1ug	10ug	10ug	100ug	100ug	200ug	200ug	300ug	300ug
Animal	Vivas	Mortas										
1	410	70	230	10	120	19	211	6	92	12	20	15
2	440	79	850	13	430	12	83	1	109	34	x	x
3	369	14	1090	10	480	2	220	12	83	28	16	2
4	201	23	860	9	700	84	260	44	75	13	x	x
5	778	70	1068	11	528	10	212	47	47	1	18	11
6	816	6	1210	11	887	8	119	7	43	1	x	x
7	608	8	458	31	444	13	367	35	45	5	16	9
8	257	5	605	14	241	8	149	4	48	5	x	x

FAGOCITOSE POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Camundongo 1	Células sem leveduras	Células com leveduras	Total de leveduras	Total de células	% células com leveduras	Média fagocitose	Índice fagocitário
Controle	167	33	240	200	16,5	7,27	120,0
1ug/mL	143	57	723	200	28,5	12,68	361,5
10ug/mL	180	20	229	200	10,0	11,45	114,5
100ug/mL	140	60	972	200	30,0	6,94	208,3

Camundongo 2	Células sem leveduras	Células com leveduras	Total de leveduras	Total de células	% células com leveduras	Média fagocitose	Índice fagocitário
Controle	90	110	706	200	55,0	6,42	353,0
1ug/mL	135	65	751	200	32,5	11,55	375,5
10ug/mL	120	80	909	200	40,0	11,36	454,5
100ug/mL	119	81	901	200	40,5	7,57	306,6

Camundongo 3	Células sem leveduras	Células com leveduras	Total de leveduras	Total de células	% células com leveduras	Média fagocitose	Índice fagocitário
Controle	95	105	737	200	52,5	7,02	368,5
1ug/mL	62	138	1166	200	69,0	8,45	583,0
10ug/mL	114	86	993	200	43,0	11,55	496,5
100ug/mL	145	55	654	200	27,5	11,89	327,0

Camundongo 4	Células sem leveduras	Células com leveduras	Total de leveduras	Total de células	% células com leveduras	Média fagocitose	Índice fagocitário
Controle	55	145	732	200	72,5	5,05	366,0
1ug/mL	161	39	202	200	19,5	5,18	101,0
10ug/mL	168	32	120	200	16,0	3,75	60,0
100ug/mL	174	26	229	200	13,0	8,81	114,5

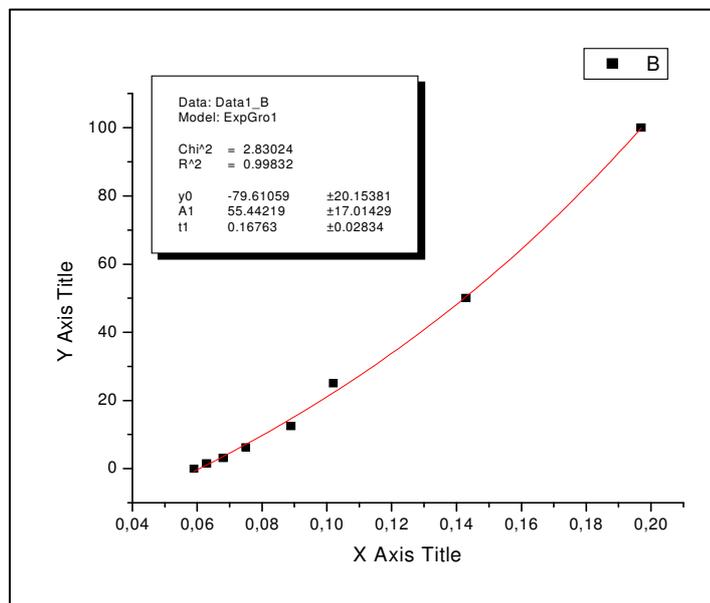
Camundongo 5	Células sem leveduras	Células com leveduras	Total de leveduras	Total de células	% células com leveduras	Média fagocitose	Índice fagocitário
Controle	47	153	1069	200	76,5	6,99	534,5
1ug/mL	42	158	1478	200	79,0	9,35	739,0
10ug/mL	174	26	227	200	13,0	8,73	113,5
100ug/mL	x	x	x	x	x	x	x

QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

C curva	DO
0,00	0,059
1,56	0,063
3,12	0,068
6,25	0,075
12,50	0,089
25,00	0,102
50,00	0,143
100,00	0,197

$$y = y_0 + A1 * \exp(x/t1)$$

$y_0 = -79,6106$
 $A1 = 55,4422$
 $t1 = 0,16763$



Animal	RPMI	RPMI	RPMI	PMA 20	PMA 20	PMA 20	PMA 40	PMA 40	PMA 40
1	10,28	9,74	18,11	3,57	4,57	9,74	9,74	10,81	19,28
2	23,50	33,15	18,69	16,37	13,55	10,28	35,87	42,97	21,67
3	8,16	8,16	4,07	19,87	25,36	31,81	9,74	11,35	18,69
4	8,68	6,09	6,09	8,68	14,67	9,74	15,23	16,37	19,87
5	34,50	21,06	18,69	35,87	66,99	52,85	33,82	26,62	32,48
6	25,36	21,06	24,73	9,21	20,47	10,28	23,50	26,62	24,11
7	23,50	24,73	19,87	23,50	23,50	14,11	16,37	16,37	22,27
8	24,73	16,37	17,52	18,69	22,88	21,67	24,11	25,36	17,52

1 ug/mL	1 ug/mL	1 ug/mL	10 ug/mL	10 ug/mL	10 ug/mL	100 ug/mL	100 ug/mL	100 ug/mL
1,12	7,63	1,61	6,60	7,63	16,37	11,90	11,90	11,35
1,61	1,12	4,07	10,81	4,07	5,07	31,81	8,68	10,81
1,12	4,57	4,07	5,58	4,57	13,55	16,37	8,68	9,21
1,12	0,64	0,64	6,60	2,09	2,09	13,55	8,16	7,63
14,11	13,55	17,52	17,52	17,52	16,95	24,73	91,59	97,83
1,12	1,12	0,64	17,52	18,11	21,67	20,47	24,73	20,47
1,12	1,12	1,61	16,95	14,11	13,00	20,47	24,11	76,00
25,36	35,18	30,49	14,11	13,55	13,00	27,25	27,25	29,18

QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

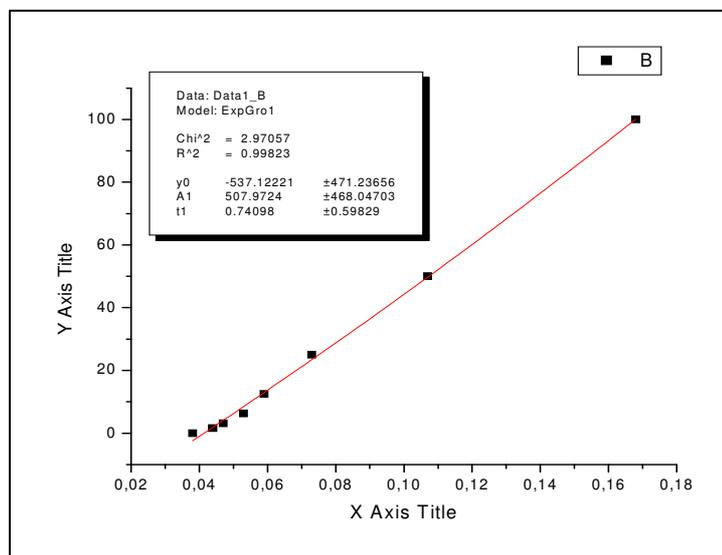
Curva padrão	
Dens. Ótica	C. curva
0,038	0,00
0,044	1,56
0,047	3,12
0,053	6,24
0,059	12,50
0,073	25,00
0,107	50,00
0,168	100,00

$$y = y_0 + A1 * \exp(x/t1)$$

$$y_0 = 537,1222$$

$$A1 = 507,9724$$

$$t1 = 0,74098$$



Camundongo	RPMI	RPMI	RPMI	LPS 10	LPS 10	LPS 10	LPS 20	LPS 20	LPS 20
1	9,99	11,47	12,95	18,92	18,17	21,18	19,67	21,18	18,92
2	11,47	10,73	14,44	35,68	34,91	34,91	39,56	42,68	42,68
3	7,04	8,51	9,99	28,00	26,48	31,83	35,68	31,06	30,29
4	12,21	12,95	9,25	16,68	25,72	22,69	35,68	31,06	33,36
5	4,11	8,51	8,51	13,69	9,25	5,58	9,25	10,73	13,69
6	2,66	9,25	10,73	4,27	4,99	11,47	4,11	5,58	12,95
7	7,78	9,25	14,44	26,48	22,69	27,24	13,69	15,18	10,73
8	11,47	9,99	14,44	11,47	14,44	19,67	16,68	17,42	15,93

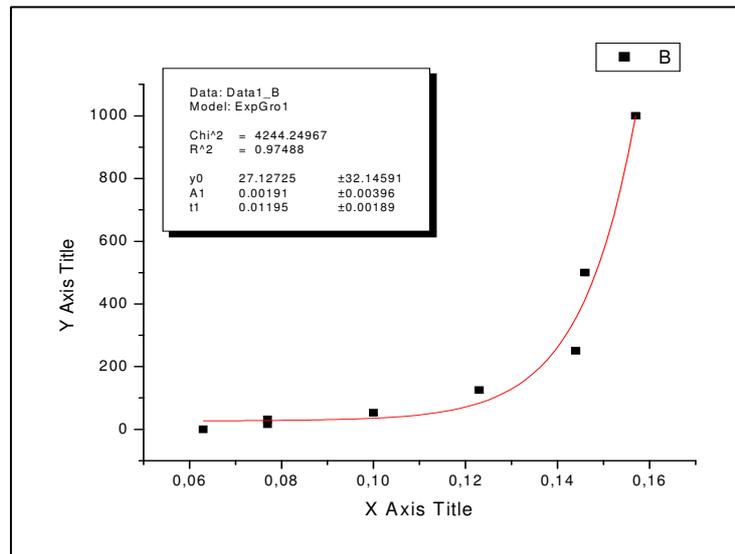
Camundongo	1 ug/mL	1 ug/mL	1 ug/mL	10 ug/mL	10 ug/mL	10 ug/mL	100 ug/mL	100 ug/mL	100 ug/mL
1	0,47	0,73	0,79	15,93	21,18	17,42	16,68	8,51	14,44
2	23,44	32,59	24,20	14,44	21,93	20,42	16,68	13,69	12,95
3	0,28	0,55	0,47	44,25	41,90	38,78	81,48	65,82	74,84
4	1,20	5,36	2,66	15,93	14,44	12,95	45,82	43,46	49,76
5	0,55	1,20	0,47	11,47	13,69	4,11	5,58	4,85	7,78
6	1,20	0,47	0,55	4,11	6,31	4,11	4,11	9,25	3,38
7	5,58	1,93	1,93	18,92	8,51	7,78	8,51	9,25	9,25
8	0,55	0,47	1,20	1,93	8,51	0,47	5,58	4,85	9,99

QUANTIFICAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL

Conc. adicionada	Dens. Óptica
0,000	0,063
15,600	0,077
31,200	0,094
52,500	0,114
125,000	0,123
250,000	0,144
500,000	0,146
1000,000	0,157

$$y = y_0 * A1 * \exp(x/t1)$$

$y_0=27,12725$
 $A1=0,00191$
 $t1=0,01195$



Indiv.	0ug/mL	0ug/mL	LPS	LPS	1ug/mL	1ug/mL	10ug/mL	10ug/mL	100ug/mL	100ug/mL
1	209,09	88,44	281,43	447,27	781,87	847,75	181,05	224,97	847,75	523,82
2	413,55	354,00	721,28	483,95	327,76	354,00	105,93	83,51	146,87	261,01
3	34,69	28,33	40,72	32,54	781,87	997,25	997,25	721,28	1081,93	614,31
5	224,97	181,05	567,17	721,28	327,76	303,62	447,27	242,24	281,43	146,87
7	53,68	40,72	919,37	303,62	128,42	99,61	194,48	120,29	168,69	58,52
8	35,36	32,54	157,33	x	41,91	39,63	56,00	29,11	67,47	51,55

QUANTIFICAÇÃO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS***2 horas**

Leituras	RPMI	Glucantime	0,5 ug/mL	1 ug/mL	2 ug/mL	4 ug/mL	8 ug/mL	16 ug/mL	32 ug/mL	64 ug/mL
n1	64	31	30	33	22	11	8	6	5	1
n2	59	30	29	31	24	10	11	7	6	1
n3	59	32	31	32	19	14	12	9	5	3

6 horas

Leituras	RPMI	Glucantime	0,5 ug/mL	1 ug/mL	2 ug/mL	4 ug/mL	8 ug/mL	16 ug/mL	32 ug/mL	64 ug/mL
n1	59	28	30	27	22	12	4	4	2	0
n2	58	27	31	32	21	11	2	3	3	0
n3	62	26	26	33	19	10	3	3	2	0

QUANTIFICAÇÃO DE *PLASMODIUM FALCIPARUM***48 horas**

Leituras	RPMI	Artesunato de sódio	1 ug/mL	2 ug/mL	4 ug/mL	8 ug/mL	16 ug/mL	32 ug/mL	64 ug/mL	128 ug/mL
n1	14	4	12	11	12	13	8	8	3	4
n2	12	2	12	10	13	11	8	7	2	3
n3	13	2	12	11	12	12	10	9	3	4

72 horas

Leituras	RPMI	Artesunato de sódio	1 ug/mL	2 ug/mL	4 ug/mL	8 ug/mL	16 ug/mL	32 ug/mL	64 ug/mL	128 ug/mL
n1	14	1	16	13	15	11	12	9	4	0
n2	16	1	19	17	12	10	10	8	3	0
n3	12	2	17	13	14	12	9	8	4	1

GLOSSÁRIO

Anifílico ou anfipático

Esses termos referem-se a moléculas que possuem regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, ou ainda moléculas que possuem ambos os grupos, polar e apolar.

Aniônico

Termo relativo à carga elétrica negativa

Atividade clastogênica

Termo relativo a atividade danosa de uma droga sobre a molécula de ADN (ácido desoxiribonucléico), comumente quebra cromossômica.

Catiônico

Termo relativo à carga elétrica positiva

Domínio hidrofílico

Região de uma determinada molécula que apresenta hidrofília, ou seja, afinidade pela água.

Domínio hidrofóbico

Região de uma determinada molécula que apresenta hidrofobia, ou seja, repulsão pela água.

Estrutura secundária

Refere-se ao arranjo espacial dos radicais de aminoácidos que estão próximos uns dos outros na seqüência linear. Consistem em regiões com estruturas ordenadas tipo hélice- α ou fita- β ao longo da cadeia de proteína.

Fitas- β

Presente na estrutura secundária dos níveis de organização das proteínas. Nessa estrutura a cadeia peptídica apresenta-se pregueada e é estabilizada por pontes de hidrogênio entre grupamentos NH e CO em fitas peptídicas diferentes, ao contrário da alfa hélice cujas pontes de hidrogênio estão entre grupamentos do mesmo filamento.

Hélice- α

Presente na estrutura secundária dos níveis de organização das proteínas, semelhante a uma escada em espiral. Nesta estrutura o esqueleto polipeptídico está estreitamente enrolado ao longo do maior eixo da molécula e a estabilidade ocorre pela presença das ligações de hidrogênio entre os grupamentos NH e CO da cadeia principal.

Hidrofobicidade média (HM)

Refere-se à média da hidrofobicidade dos aminoácidos apolares.

Hormese

Significa algum evento que é perigoso em altas doses, mas torna-se benéfico em baixas doses. De acordo com essa teoria, em baixas doses de uma substância, potencialmente danosa ao organismo, ativaria o sistema imunitário.

Ponto isoelétrico (pI)

É o valor de pH onde uma molécula, por exemplo, um aminoácido ou uma proteína, apresenta carga elétrica líquida igual a zero. O pI é o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína.

Zwitteriônico

O termo provém do alemão *Zwitter* (híbrido) e refere-se a substâncias químicas, eletricamente neutras, mas possuindo cargas locais, negativas e positivas, devido à presença de grupos ionizados.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)