

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA - CBB**

JULIA MIRANDA FARDIN

**PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE SEMENTES DE *Bertholletia excelsa* HUMB.
E BONPL. (CASTANHA-DO-PARÁ) E ESTUDO DA ATIVIDADE E MECANISMO DE
AÇÃO SOBRE *Leishmania amazonensis***

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL - 2015

JULIA MIRANDA FARDIN

**PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE SEMENTES DE *Bertholletia excelsa* HUMB.
E BONPL. (CASTANHA-DO-PARÁ) E ESTUDO DA ATIVIDADE E MECANISMO DE
AÇÃO SOBRE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL – 2015

JULIA MIRANDA FARDIN

**PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DE SEMENTES DE *Bertholletia excelsa* HUMB.
E BONPL. (CASTANHA-DO-PARÁ) E ESTUDO DA ATIVIDADE E MECANISMO DE
AÇÃO SOBRE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.
Área de concentração: Biologia Celular.

Aprovada em 01 de Abril de 2015.

Banca Examinadora:

**Prof^a. Dr^a. Landi Veivi Guillermo Costilla
Professor /UNIRIO**

**Prof. Dr. Edésio José Tenório de Melo
Professor Associado – CBB/UENF**

**Prof^a. Dr^a. Kátia Valevski Sales Fernandes
Professora Associada – CBB/UENF**

**Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho
Orientador – Professor Associado – LFBM/CBB/UENF**

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

Aos meus pais que sempre
me apoiaram dedico-lhes essa conquista com gratidão.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Embora a dissertação seja pela sua finalidade acadêmica, há contribuições que não podem deixar de ser ressaltadas. Por essa razão, expresso aqui meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus por ter permitido essa conquista na minha vida.

Ao meu pai Arildo e a minha mãe Helena que sempre foram minha base. Agradeço por acreditarem em mim, sempre com muito apoio, incentivos e a certeza que de nada é impossível. E a toda minha família, o meu muito obrigada!!!

Ao Professor André de Oliveira Carvalho, por toda aprendizagem passada, pela paciência e pelo compromisso durante toda esta etapa;

Ao professor Edésio José Tenório de Melo e a Msc Laís Pessanha de Carvalho pela colaboração na realização dos testes com protozoários;

Às minhas colegas de grupo e de laboratório: Géssika, Flávia Camila, Maria Eliza, Érika e Julia Soares por todo carinho, pelas risadas que alegraram meu dia-a-dia e por todo ensinamento passado;

À todos os alunos, professores e funcionários do LFBM;

À Bárbara de Paula Coelho, Priscila Gurgel, Laila Canela e Bárbara Ribeiro pela amizade, pelo apoio e ajuda nos momentos mais difíceis desta caminhada;

As minhas amigas Fernanda, Bruna, Mayara e Kamila, que mesmo distantes, foram fundamentais nesta etapa;

Aos meus amigos da graduação, que foram essenciais para a concretização dessa jornada, os quais levarei no meu coração para resto da minha vida;

Ao órgão de apoio e fomento, CAPES. À UENF.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABELA.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A castanheira e a castanha-do-pará	1
1.2. Peptídeos antimicrobianos	3
1.2.1. AMPs de plantas	5
1.2.2. Mecanismo de ação	8
1.2.2.1. Ação sobre a membrana	9
1.2.2.2. Ação sobre alvos intracelulares.....	10
1.2.3. Possíveis alternativas terapêuticas	11
1.3. <i>Leishmania</i> e leishmaniose	12
1.3.1. <i>Biologia celular da Leishmania</i>	13
1.3.2. <i>Ciclo de vida do parasita</i>	15
1.3.3. <i>Leishmaniose</i>	17
1.3.3.1. Sintomas clínicos	17
1.3.3.2. Tratamento	18
1.3.4. <i>Interações entre AMPs-Leishmania</i>	19
1.3.5. <i>Perspectivas do uso terapêutico do AMP sobre Leishmania</i>	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Material biológico	24

3.1.1. Obtenção e manutenção das sementes	24
3.1.2. Manutenção da <i>Leishmania amazonensis</i>	24
3.2. Obtenção dos peptídeos	24
3.2.1. Extração proteica em tampão fosfato.....	24
3.2.2. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose	25
3.2.3. Cromatografia de fase-reversa em sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês high performance liquid chromatography)	26
3.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida	26
3.3. Análise da atividade biológica das frações proteicas sobre <i>L. amazonensis</i>	27
3.3.1. Ensaio de toxicidade dos protozoários - sinergismo	27
3.3.2. Determinação da concentração mínima inibitória.....	28
3.3.3. Avaliação do mecanismo de ação.....	28
3.3.3.1. Análise da viabilidade celular	28
3.3.3.2. Cinética e microscopia de fluorescência da permeabilização da membrana plasmática de <i>L. amazonensis</i> pela fração R2.....	28
3.3.3.3. Cinética e microscopia de fluorescência da alteração na função mitocondrial de <i>L. amazonensis</i> pela fração R2.....	29
3.3.3.4. Cinética e microscopia de fluorescência da indução da produção endógena de ROS em <i>L. amazonensis</i> pela fração R2	30
3.3.3.5. Cinética e microscopia de fluorescência da indução da produção endógena de óxido nítrico em células de <i>L. amazonensis</i>	30
3.4. Caracterização dos peptídeos.....	30
3.4.1. Sequenciamento de proteínas.....	30
3.4.1.1. Preparo de amostras e condições de corrida	30
3.4.1.2. Eletrotransferência para membrana de polivinilideno difluoreto	31
3.4.1.3. Determinação da sequência de aminoácidos.....	32

3.4.2. Ensaio de inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana.....	32
3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida na ausência de β -mercaptotanol	33
3.4.4. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Atividade sobre <i>L. amazonensis</i>	35
4.2. Mecanismo de ação	37
4.3. Caracterização peptídica.....	44
5. DISCUSSÃO	52
5.1. Atividade biológica sobre protozoário.....	52
5.2. Mecanismo de ação	54
5.3. Caracterização proteica.....	57
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos da castanheira <i>Bertholletia excelsa</i> (castanha-do-pará) (A e B) e de seus ouriços abertos e com as sementes em seu interior ainda com casca (C) e sementes descascadas e semidescascadas (D) (Google imagens).	2
Figura 2 - Representação estrutural das principais classes de peptídeos de acordo com a estrutura secundária, incluindo peptídeos com estrutura tridimensional em α -hélice (A), folha- β (B), cíclicos (C) e estruturas estendidas (D)..	4
Figura 3 - Representação esquemática de alguns mecanismos de ação dos AMPs em relação à interação com membranas. (A). Modelo da aduela de barril (B) modelo tapete e (C) poro toroidal (BAHAR e REN, 2013).	10
Figura 4 - Representação estrutural da <i>Leishmania</i>	14
Figura 5 - Representação esquemática do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp. no hospedeiro vertebrado e no hospedeiro invertebrado (adaptada de VANNIER-SANTOS <i>et al.</i> 2002).	16
Figura 6 - Representação esquemática da interação do AMP com os parasitas da ordem <i>Kinetoplastidae</i>	20
Figura 7 - Representação esquemática do resumo dos resultados obtidos previamente (FARDIN, 2013).	22
Figura 8 - Ensaio de sinergismo das frações H3 e H4 obtidas a partir da fração R2 de sementes de castanha-do-pará em cromatografia de fase reversa em sistema HPLC sobre <i>Leishmania amazonensis</i>	36
Figura 9 - Ensaio de avaliação da mínima concentração inibitória da fração R2 sobre <i>Leishmania amazonensis</i>	37
Figura 10 - Ensaio de avaliação da viabilidade celular de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com a fração R2 na concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$	38
Figura 11- Ensaio de cinética da permeabilização de membrana e da alteração da funcionalidade mitocondrial em células de <i>Leishmania amazonensis</i>	39

Figura 12 -Ensaio de cinética da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células de <i>Leishmania amazonensis</i>	40
Figura 13 - Fotomicrografia por microscopia de fluorescência das células da <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com Sytox green ao final do ensaio de cinética na presença de 150 µg/mL da fração R2.	41
Figura 14 - Fotomicrografia por microscopia de fluorescência das células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com Rhodamina 123 ao final do ensaio de cinética na presença de 150 µg/mL da fração R2.	42
Figura 15 - Fotomicrografia em microscopia de fluorescência das células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com 2',7' diclorofluoresceína diacetato para detecção de ROS ao final do ensaio de cinética na presença de 150 µg/mL da fração R2.	43
Figura 16. Fotomicrografia em microscopia de fluorescência das células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com 3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato para detecção de NO ao final do ensaio de cinética na presença de 150 µg/mL da fração R2.	44
Figura 17 - Cromatograma da fração H3* em coluna de fase reversa C18 por sistema HPLC sem passar pelo processo de redução e alquilação.	45
Figura 18 - Cromatograma da fração H3*, após redução e alquilação, em coluna de fase reversa C18 por sistema HPLC.	46
Figura 19 - Visualização eletroforética das frações H3*, A1 e A2 obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC, utilizando a metodologia de redução e alquilação.	47
Figura 20 - Sequência da banda A2 proveniente do processo de redução e alquilação. M, marcador de baixa massa molecular indicada em kDa.	48
Figura 21 - Visualização gráfica do ensaio da inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana quando na presença de diferentes concentrações da fração R2.	49

Figura 22 - Visualização eletroforética da fração R2 na presença e ausência de β -mercaptoetanol. β^- , fração R2 sem tratamento com β -mercaptoetanol e aquecimento antes da aplicação no gel. β^+ , fração R2 com adição do β -mercaptoetanol e com aquecimento.50

Figura 23 - Visualização eletroforética do perfil proteico da fração R2 em eletroforese bidimensional. Gel corado por Coomassie. M - Marcador de baixa massa molecular.51

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 – Listagem das famílias de AMPs de plantas mostrando suas características principais (tamanho em aminoácidos, número de pontes dissulfeto e atividade biológica descrita).6

ABREVIATURAS

AMPs – peptídeos antimicrobianos (do inglês *antimicrobial peptides*);

ATP – adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*);

DEAE – dietilaminoetil (do inglês *diethylaminoethyl*);

DMSO – dimetil sulfoxido (do inglês *dimethyl sulfoxid*);

DTT – ditioneitol (do inglês *dithiothreitol*)

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediaminec tetraacetic acid*);

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*);

LPG – lipofosfoglicano (do inglês *lipophosphoglycan*)

LTP – proteínas transportadoras de lipídeos (do inglês *lipid transfer protein*);

MIC- mínima concentração inibitória (do inglês *minimal inhibitory concentration*);

NO – óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*);

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*);

ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactives oxygen species*);

PVDF – difluoreto de polivinilideno (do inglês *polyvinylidene difluoride*);

SDS – dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*);

TFA – ácido trifluoroacético (do inglês *trifluoroacetic acid*);

Tris – tris (hidroximetil)aminometano (do inglês *tris(hydroxymethyl)aminomethane*);

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) fazem parte do mecanismo de defesa contra patógenos em diferentes organismos, incluindo plantas. Eles apresentam ampla atividade inibitória sobre diferentes microrganismos e por este motivo eles têm sido considerados como possíveis princípios ativos de novos terapêuticos para doenças infecciosas. Entre estas doenças estão as causadas por protozoários parasitas como a leishmaniose. O objetivo deste trabalho foi a purificação e caracterização de peptídeos biologicamente ativos de sementes de *B. excelsa* e o estudo do mecanismo de ação destes sobre *L. amazonensis*. Em um trabalho prévio, foi obtida uma fração peptídica, chamada R2, de sementes de *B. excelsa* com forte atividade inibitória sobre *L. amazonensis*. A fração R2 foi parcialmente purificada em duas outras frações denominadas de H3 e H4. No entanto, a atividade sobre o protozoário destas frações foi mais fraca do que a obtida para a fração R2. O atual trabalho se inicia a partir das frações H3 e H4 obtidas previamente (FARDIN, 2013). Devido à atividade mais fraca destas frações, comparando-se com a fração R2, foi feito inicialmente um teste de sinergismo. Este resultado indica que a porcentagem de toxicidade das frações H3 e H4 aumentaram de 44 e 58%, respectivamente (FARDIN, 2013), para 97,7% com as frações reunidas, indicando que estas frações agem em sinergismo. Por este motivo retornamos a utilizar da fração de origem R2 para os demais ensaios. Para a fração R2 foi feita a determinação da mínima concentração inibitória (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*) sobre *L. amazonensis*, avaliação da viabilidade celular e a inicial caracterização do mecanismo de ação da fração R2. A MIC da desta fração sobre *L. amazonensis* foi de 150 µg/mL e seu efeito inibitório caracterizado como leishmanicida. Sobre o mecanismo de ação, nossos resultados indicam que a fração R2 permeabiliza a membrana, estimula a função mitocondrial e induz a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Adicionalmente foram feitos experimentos para caracterização da fração R2. Para isso nós obtivemos a fração H3 e esta foi submetida ao processo de sequenciamento por degradação de Edman. Para a fração R2, foi feito um ensaio de inibição da enzima α -amilase salivar humana, um gel de poli(acrilamida) unidimensional com a fração R2 em condição redutora e não redutora e um gel bidimensional. A sequência obtida de H3 apresentou baixa similaridade com albumina 2S. A fração R2 foi capaz de inibir

100% da atividade da α -amilase a 37,5 $\mu\text{g/mL}$, em gel sem o tratamento de β -mercaptoetanol a fração R2 se apresentou com uma única banda protéica de aproximadamente 12 kDa e o gel bidimensional mostrou que esta fração tem várias proteínas com massa molecular variando de 6 e 10 kDa e com ponto isoelétrico variando aproximadamente de 5,0 a 8,0. Com relação a caracterização da fração R2 inferiu-se, a partir da capacidade de inibir α -amilase, em gel sem β -mercaptoetanol apresentar uma única banda e a presença de várias isoformas no gel bidimensional, que possivelmente esta fração apresenta proteínas da família da albumina 2S.

Palavras chave: Castanha-do-pará, Peptídeos Antimicrobianos, *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are part of defense mechanism against pathogens in different organisms. In plants they can be obtained from various organs, particularly seeds. They are widely inhibitory activity on various microorganisms and for this reason they have been suggested as possible active principles of new therapeutic for infectious diseases. Among these diseases are those caused by parasitic protozoa such as leishmaniasis. This work aims purification and characterization of biologically active peptides from *B. excelsa* seeds on *Leishmania amazonensis*, and to study the mechanism of action of these on *L. amazonensis* In a previous study (FARDIN, 2013) was obtained the peptide fraction, denominated R2, from *B. excelsa* seeds with strong activity about *L. amazonensis*. This fraction R2 was partially purified in two other fractions denominated to as H3 and H4. However, the activity about protozoa of these fractions was weaker than that obtained for the R2 fraction. The current work begin from H3 and H4 fractions previously obtained (FARDIN, 2013). Due to weaker activity of these fractions, compared with the R2 fraction, it was initially made a synergism test. This result indicates that the percentage of toxicity of the H3 and H4 fractions increased 44 and 58%, respectively (FARDIN, 2013) to 97.7% with the pooled fractions, indicating that these fractions act in synergy. For this reason we returned to use the R2 fraction for the other tests. For the R2 fraction was taken to determine the minimum inhibitory concentration (MIC, minimal inhibitory concentration of the English) on *L. amazonensis*, assessment of cell viability and initial characterization of R2 fraction of mechanism of action. The MIC for *L. amazonensis* this fraction was 150 µg/mL and characterized its inhibitory effect as leishmanicidal. About the mechanism of action, our results indicate that the R2 fraction permeates the membrane, stimulates mitochondrial function and induces the production of reactive species of oxygen and nitrogen. Additionally experiments were done to characterize the R2 fraction. For this we obtained a fraction H3 and this was subjected to sequencing by Edman degradation procedure. For the R2 fraction was done a inhibition assay of human salivary α -amylase enzyme, a polyacrylamide gel with the R2 fraction in a normal and reduced condition and bidimensional gel. Initially the H3 fraction was reduced and alkylated and subjected to sequencing by Edman degradation procedure. The sequence obtained from H3 showed low similarity with 2S albumin. The R2 fraction was able to inhibit 100% of the α -amylase

activity at 37.5 mg / mL, in a gel without β -mercaptoethanol treatment showed a single band of approximately 12 kDa and two dimensional gel showed several proteins with molecular mass between 6 and 10 kDa with an isoelectric point ranging approximately from 5.0 to 8.0. Regarding the characterization of R2 fraction, it is concluded that possibly this fraction has the 2S albumin protein.

Keywords: Brazil nut, Antimicrobial peptides, *Leishmania amazonensis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A castanheira e a castanha-do-pará

A castanheira, também conhecida como castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* Humb. e Bonpl.), é classificada na botânica como uma angiosperma, da classe dicotiledônea, da ordem Myrtiliflorae, pertencente à família *Lecythidae*, gênero *Bertholletia* e espécie *Bertholletia excelsa*. Esta é considerada a mais famosa espécie de árvore nativa Amazônica. Representantes desta espécie são consideradas entre as árvores mais antigas do mundo, algumas tiveram a idade calculada em mais de 1.100 anos (FAO, 1995; ENRÍQUEZ *et al.*, 2003). A semente é vendida internacionalmente, mas só é coletada em florestas nativas da Amazônia brasileira, peruana e boliviana (PERES *et al.*, 2003; KAINER *et al.*, 2007; WWF, 2013).

Morfológicamente, é uma árvore de grande porte (Figura 1A e 1B) que chega a atingir até 60 metros de altura (com essa altura estima-se que a árvore esteja com idade variando entre 800 e 1.200 anos), e possuir até quatro metros de diâmetro na base. Apresenta um tronco reto, muito regular, desde a base da árvore até sua copa. A castanheira é encontrada em matas de terra firme, muitas vezes formando agrupamentos, conhecidos como castanhais, onde se encontram associadas a outras espécies de árvores de grande porte (FERNANDES e ALENCAR, 1993; LORENZI, 2000).

Os frutos (Figura 1C), conhecidos como ouriços, são lenhosos, esféricos, possuem casca escura, dura e espessa, atingindo entre 10 e 15 centímetros de diâmetro, pesando até 1,5 kg e podem conter até 25 castanhas ou sementes (parte comestível do fruto e a que utilizamos no nosso trabalho) (Figura 1D). Essa espécie tem crescimento lento, tendo aos 12 anos a maturação de produção de frutos (ENRÍQUEZ *et al.*, 2003; YANG, 2009).

A castanheira é considerada vulnerável pela União Mundial para a Natureza e no Brasil aparece na lista de espécies ameaçadas do Ministério do Meio Ambiente. A principal causa para o risco de extinção é o desmatamento. No Brasil, estas árvores são derrubadas para a construção de estradas e barragens, para assentamentos de reforma agrária e para a criação de gado (LORENZI, 2000). A madeira desta árvore é moderadamente pesada e com superfície sem brilho e lisa

ao tato. Por estas qualidades foi usada na construção civil, servindo de base para a construção de vigas, ripas, rodapés e molduras. Porém, hoje a sua extração é proibida no Brasil (LORENZI, 2000; LOCATELLI *et al.*, 2006).

A importância econômica da castanheira encontra-se na sua semente que pode ser utilizada na confecção de objetos (comércio local), em indústrias de cosméticos e é amplamente utilizada na alimentação (LORENZI, 2000; LOCATELLI *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2013). Esta semente oleaginosa é um dos produtos do agronegócio brasileiro e um dos principais na região norte (AMAZÔNIA, 2015).

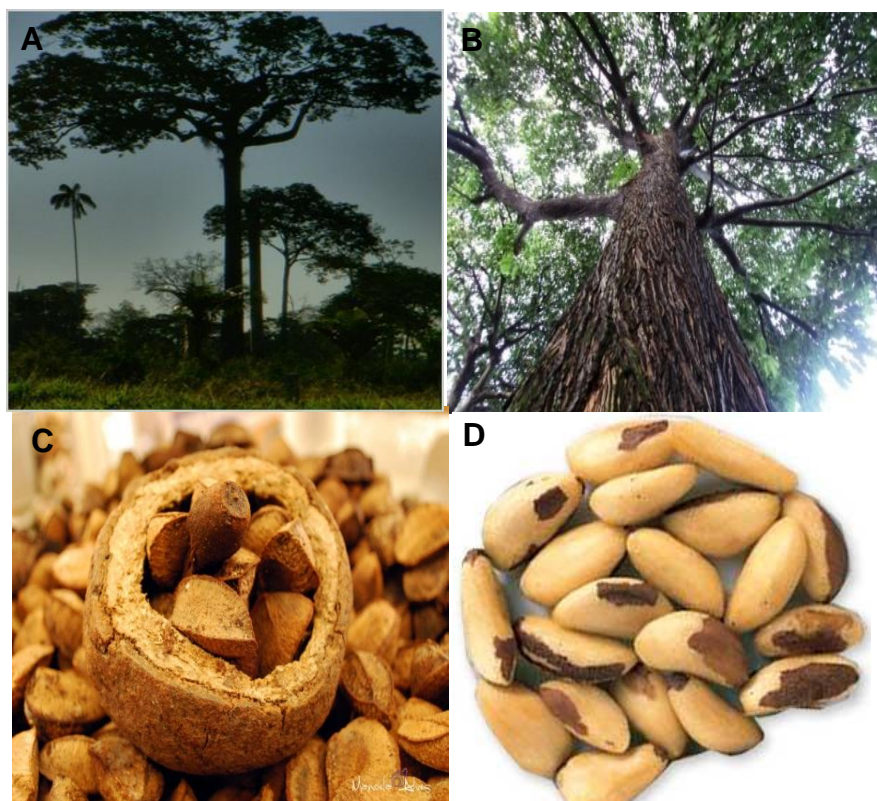


Figura 1 - Fotos da castanheira *Bertholletia excelsa* (castanha-do-pará) (A e B) e de seus ouriços abertos e com as sementes em seu interior ainda com casca (C) e sementes descascadas e semidescascadas (D) (Google imagens).

Nutricionalmente, as sementes da castanheira são consideradas uma grande fonte de nutrientes, onde são encontradas proteínas, fibras, vitaminas (B2, B5, A e C) e minerais como: cálcio, magnésio, fósforo, ferro e potássio, e dentre estes se destaca o selênio. Estas sementes são as únicas com altíssima fonte de selênio, sendo este mineral necessário para o equilíbrio da tireóide, fortalecimento do sistema imunológico e prevenção de tumores (próstata, fígado e pulmões). A semente tem sido associada a muitos benefícios para a saúde, como por exemplo,

exibe atividade antioxidante, auxilia a redução de colesterol, proteção contra radicais livres e possui efeitos antiproliferativos. As castanhas têm alto valor nutritivo possuindo cerca de 60 - 70% de óleo e 17% de proteína (YANG, 2009).

Em relação a estudos de proteínas e peptídeos desta espécie, com exceção de proteínas de reserva, como as proteínas pertencentes às classes das leguminas 11S, vicilinas 7S e albuminas 2S, informações sobre peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) desta espécie são limitadas (YANG, 2009; SHARMA *et al.*, 2010; ALCOCER *et al.*, 2012).

1.2. Peptídeos antimicrobianos

Os AMPs são encontrados tanto em organismos procariontes quanto em eucariontes, incluindo microrganismos, artrópodes, nematóides, plantas, anfíbios, aves, peixes, mamíferos e humanos (WANG e WANG, 2004; GUANÍ-GUERRA *et al.*, 2010; ODINTSOVA e EGOROV, 2012). Estes são geralmente definidos como moléculas constituídas por menos de 100 resíduos de aminoácidos (massa molecular inferior a 10 kDa) (PETERS *et al.*, 2010; PASUPULETI *et al.*, 2012), possuem carga líquida positiva em pH fisiológico, em parte pela presença de múltiplos resíduos de lisinas e argininas e também apresentam uma parcela de resíduos hidrofóbicos o que lhes conferem caráter anfipático (GIULIANI *et al.*, 2007; ADADE *et al.*, 2013). Os AMPs são codificados por genes, formados por pequenos ribossomos e apresentam L-aminoácidos com configuração cíclica ou linear (GANZ e LEHRER, 1999; GIULIANI *et al.*, 2007); diferem de outros AMPs como garamicinas, streptomocinas e polimixinas, pois estes são sintetizados por grandes complexos enzimáticos e apresentam aminoácidos incomuns, em alguns casos na conformação D, e também por terem diferentes tipos de modificações, como a incorporação de ácidos graxos, aminoácidos glicosilados e de anéis heterocíclicos (SIEBER e MARAHIEL, 2005; HANCOCK e SAHL, 2006; CHOI *et al.*, 2009).

Como a diversidade dos AMPs é vasta, a classificação é complexa. Eles podem ser caracterizados com base na sua estrutura secundária em quatro classes principais: α -hélice (como exemplo: magainina, cecropina e catelicidina), folhas β (como exemplo: hepcidina, β -defensina humana), cíclicos (como exemplo: kalata B2) e peptídeos de estrutura estendida (como exemplo: indolicidina), sendo que as duas

primeiras classes são as mais comuns na natureza (HANCOCK e SAHL, 2006; PETERS *et al.*, 2010) (Figura 2).

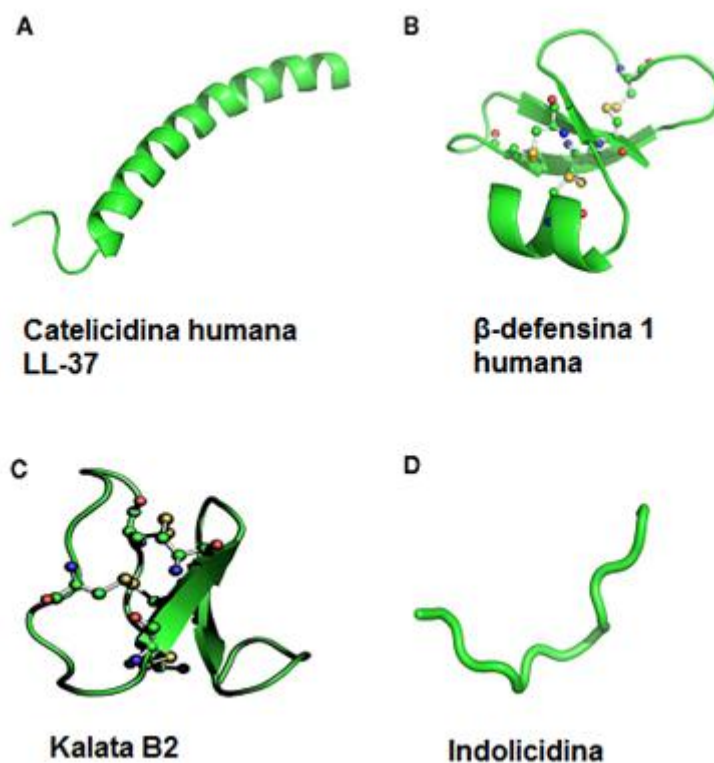


Figura 2 - Representação estrutural das principais classes de peptídeos de acordo com a estrutura secundária, incluindo peptídeos com estrutura tridimensional em α -hélice (A), folha- β (B), cíclicos (C) e estruturas estendidas (D). As pontes dissulfeto estão representadas por bolas e o bastões (Adaptado de SILVA *et al.* (2011).

Os AMPs formam um importante e antigo mecanismo de resistência inata fornecendo uma linha rápida e metabolicamente barata de defesa contra patógenos (EGOROV *et al.*, 2005). A diversidade dos AMPs que vem sendo descrita realça a importância destes na imunidade inata (HANCOCK e SAHL, 2006). Em relação à sua expressão, os AMPs podem ser expressos de maneira constitutiva ou induzida através de infecções e/ou estímulos inflamatórios, como por exemplo, injúrias e citocinas pro-inflamatórias (CUNLIFFE e MAHIDA, 2004; HANCOCK e SAHL, 2006). AMPs são denominados antimicrobianos por apresentarem atividade sobre diversos microrganismos, como vírus envelopados, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e até mesmo sobre células cancerígenas (THOMAS *et al.*, 2009; YEUNG *et al.*, 2011; AOKI *et al.*, 2012; KHAMIS *et al.*, 2014). Pelos motivos expostos acima, nos últimos anos, os AMPs têm sido utilizados como modelo de estudo, visto que podem servir como modelos para o desenvolvimento de

nova geração de drogas e possuem um elevado potencial de aumentar a resistência ao patógeno em culturas (PADOVAN *et al.*, 2010; ODINTSOVA e EGOROV, 2012).

1.2.1. AMPs de plantas

Constantemente as plantas sofrem a ação de fatores físicos do ambiente, tais como temperatura, umidade, radiação ultravioleta e fatores mecânicos. Elas também são expostas a uma grande variedade de organismos fitopatogênicos. Ao analisarmos a interação entre planta e patógeno, enquanto o parasita utiliza uma série de compostos químicos para ataque, tais como toxinas e enzimas hidrolíticas, as plantas utilizam como forma de defesa a presença de barreiras físicas, como camadas epiculares, suberizadas, cutinizadas, tecidos epidérmicos lignificados e a produção de substâncias, como metabólitos secundários pertencentes a diversas classes químicas como terpenos, alcalóides, compostos fenólicos e proteínas de defesa como quitinases, lectinas, β -glucanases, inibidores de proteases e AMPs (YIKE *et al.*, 1999; CASTRO e FONTES, 2005; FRANCO *et al.*, 2006; MORENO e CLEMENTE, 2008; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010).

Os AMPs de plantas compartilham uma série de características comuns e gerais dos AMPs descritos no item anterior, tais como um pequeno tamanho (30-100 resíduos), carga líquida positiva em pH fisiológico, uma porção elevada de resíduos hidrofóbicos (cerca de 30%) e em geral contém um considerável número de resíduos de cisteínas que estabilizam a estrutura proteica através da formação de pontes dissulfeto (HANCOCK e SAHL, 2006; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010).

De acordo com a estrutura primária dessas moléculas e também com a sua organização tridimensional, estes são classificados em várias famílias, tais como tioninas, defensinas, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs do inglês, *lipid transfer proteins*), esnquinas, peptídeos similares à heveína, peptídeos similares à knotina, sheferdinas, MBP-1, Ib-AMP e ciclotídeos. Seguem na tabela 1 as principais características dessas famílias (GARCÍA OLMEDO *et al.*, 2001; ODINTSOVA e EGOROV, 2012).

Tabela 1 – Listagem das famílias de AMPs de plantas mostrando suas características principais (tamanho em aminoácidos, número de pontes dissulfeto e atividade biológica descrita).

Família	Aminoácidos	N° de pontes dissulfeto	Atividade biológica
LTPs	90-95	3-4	Antibacteriana e antifúngica
Defensinas	45-54	4	Antibacteriana, antifúngica e inibe α-amilase
Tioninas	45-47	3-4	Antibacteriana e antifúngica
Snakinas	61-70	4	Antibacteriana e antifúngica
Heveínas	43	4	Antibacteriana (Gram +) e antifúngica
Sheferdinas	28-38	0	Antibacteriana e antifúngica
Knotina	36-37	3	Antibacteriana (Gram +) e antifúngica
MBP-1	33	2	Antibacteriana e antifúngica
Ib-AMPs	30	2	Antibacteriana (Gram +) e antifúngica

Fonte: Adaptado de GARCÍA-OLMEDO *et al.* (2001).

O papel dos AMPs de plantas na defesa tem sido confirmado pela i) observação do aumento da resistência de plantas transgênicas que expressam constitutivamente os AMPs; ii) regulação positiva de genes de AMPs em resposta à infecção; iii) localização predominante em camadas de células periféricas e em tecidos especialmente sensíveis à infecção e iv) atividade direta antimicrobiana observada *in vitro* (ODINTSOVA e EGOROV, 2012).

Sabe-se que os AMPs são produzidos em todos os órgãos (folhas, sementes, raízes e frutos) de forma constitutiva ou de forma induzida em resposta a infecção por microrganismos em tecidos vegetativos quando comparamos com o sistema de

defesa dos animais, os AMPs fornecem uma resposta relativamente rápida contra os patógenos e com um custo energético mais baixo comparado com o sistema imune adaptativo da maioria dos vertebrados (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010).

Dentre as famílias citadas, as que mais apresentam trabalhos descritos são as tioninas, as defensinas e as LTPs. As tioninas foram inicialmente descritas em sementes de trigo (*Triticum turgidum*) (BALLS *et al.*, 1942). Constituem uma família de peptídeos básicos ($pI > 8,0$), ricos em argininas e lisinas, possuem peso molecular em torno de 5 kDa e possuem muitos resíduos contendo enxofre (cisteínas). Sua estrutura tridimensional é caracterizada por duas cadeias antiparalelas de folhas- β e duas de α -hélices (BROEKAERT *et al.*, 1997; CASTRO e FONTES, 2005; KIDO *et al.*, 2010). Estas estão predominantemente localizadas nos espaços intracelulares, mas também se encontram no espaço extracelular. Dentre as suas principais características, com exceção da crambina que não apresenta atividade antimicrobiana, destaca-se o seu efeito tóxico sobre diferentes organismos, como bactérias, fungos, leveduras, animais e células vegetais (CASTRO e FONTES, 2005; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010). O mecanismo de ação está relacionado à permeabilização de membrana através da formação de poros (ODINTSOVA e EGOROV, 2012).

As defensinas são a maior família dos AMPs e a mais estudada (PELEGRINI e FRANCO, 2005; CARVALHO e GOMES, 2009; STOTZ *et al.*, 2009; SUAREZ-CARMONA *et al.*, 2014). Estas foram primeiramente isoladas de endosperma de trigo e cevada (*Hordeum vulgare*) (COLILLA *et al.*, 1990; MENDEZ *et al.*, 1990). Constituem uma família identificada por apresentar oito resíduos de cisteínas que formam quatro pontes dissulfeto, as quais ajudam a estabilizar a estrutura tridimensional. Esses peptídeos são básicos, ricos em resíduos de cisteína e apresentam massa molecular de 5 kDa. A sua estrutura terciária compreende uma tripla cadeia antiparalela de folhas- β e uma cadeia de α -hélice (THEVISSSEN *et al.*, 2007; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010; CARVALHO e GOMES, 2011). Estas se localizam principalmente no meio extracelular (CARVALHO e GOMES, 2009). Em relação à atividade antimicrobiana, são ativos principalmente contra fungos e em alguns casos bactérias (YE e NG, 2001) Seu mecanismo de ação está relacionado a interações com a membrana, incluindo, por exemplo, permeabilização da membrana celular, aumento do efluxo de potássio, do influxo de cálcio, alcalinização do meio e

mudança no potencial de membranas (AERTS *et al.*, 2007; CARVALHO e GOMES, 2009).

As LTPs foram primeiramente descobertas em batata, a partir da ideia de que os fosfolipídios eram transportados no meio aquoso celular por alguma molécula facilitadora devido a sua natureza hidrofóbica (CARVALHO e GOMES, 2009). A atividade antimicrobiana destes peptídeos foi descrita em espinafre (KADER, 1997). As LTPs são peptídeos divididos em duas famílias, uma com massa molecular entre 7 kDa (família dois) e outra com 10 kDa (família um). Ambas são catiônicas e possuem padrões conservados de oito resíduos de cisteína, formando quatro pontes dissulfeto. Suas estruturas terciárias compreendem estruturas globulares compactas formadas por quatro α -hélices (para a família um) e quatro α -hélices (para a família dois) e estabilizadas pelas quatro pontes dissulfeto (CARVALHO e GOMES, 2007; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010). As LTPs foram, portanto, assim denominadas devido à sua capacidade para se ligar reversivelmente e transportar as moléculas hidrofóbicas *in vitro*. Esta característica é dada pela presença em ambas as famílias de uma cavidade hidrofóbica (CARVALHO e GOMES, 2009). Estas se localizam principalmente no ambiente extracelular (CARVALHO e GOMES, 2007). As LTPs exibem atividade principalmente contra fungos e bactérias, sendo que em fungos é reconhecida uma maior atividade biológica (MOLINA *et al.*, 1993; ZOTTICH *et al.*, 2011). Seu mecanismo de ação tem sido relacionado com a permeabilização da membrana plasmática (CARVALHO e GOMES, 2007; ODINTSOVA e EGOROV, 2012).

1.2.2. Mecanismo de ação

O mecanismo exato pelo qual AMPs exercem suas propriedades antimicrobianas ainda não é completamente conhecido, mas sabe-se que devido à sua natureza catiônica e anfipática, estes podem interagir, por forças eletrostáticas, com cargas negativas da parede e/ou das cabeças polares dos fosfolipídios na membrana (GUANÍ-GUERRA *et al.*, 2010; BAHAR e REN, 2013). Assim podem causar em alguns organismos a ruptura da membrana, já em outros a membrana não se rompe e o AMP pode atravessar a membrana e interagir com alvos intracelulares (POWERS e HANCOCK, 2003; BROGDEN, 2005; NGUYEN *et al.*, 2011; AOKI *et al.*, 2012).

1.2.2.1. Ação sobre a membrana

Sabe-se que, mesmo que o alvo dos AMPs seja intracelular, é necessária uma interação inicial com a membrana celular para o desencadeamento de suas atividades antimicrobianas (HE *et al.*, 1996; BAHAR e REN, 2013).

Em relação ao mecanismo de ruptura da membrana, sabe-se que existem três modelos principais: aduela de barril, modelo “tapete” e poro toroidal (BROGDEN, 2005; GIULIANI *et al.*, 2007; YEUNG *et al.*, 2011; BAHAR e REN, 2013).

- No modelo da aduela de barril, o poro na membrana é formado apenas pelos peptídeos, que ficam com suas partes hidrofílicas voltadas para o interior do poro enquanto suas partes hidrofóbicas ficam alinhadas com as caudas dos fosfolipídios localizados na região periférica do poro (Figura 3A);
- No modelo tapete ocorre a desestruturação da membrana plasmática, onde os peptídeos ficam orientados paralelamente à bicamada lipídica formando uma camada contínua ou “tapete” que pode levar a formação de micelas (Figura 3B);
- No modelo poro toroidal, o interior do poro na membrana é formado pelos peptídeos e pela cabeça polar dos fosfolipídios da membrana que foram induzidos a formar uma curvatura mais positiva, ambos estão com a parte hidrofílica voltada para o poro (Figura 3C);

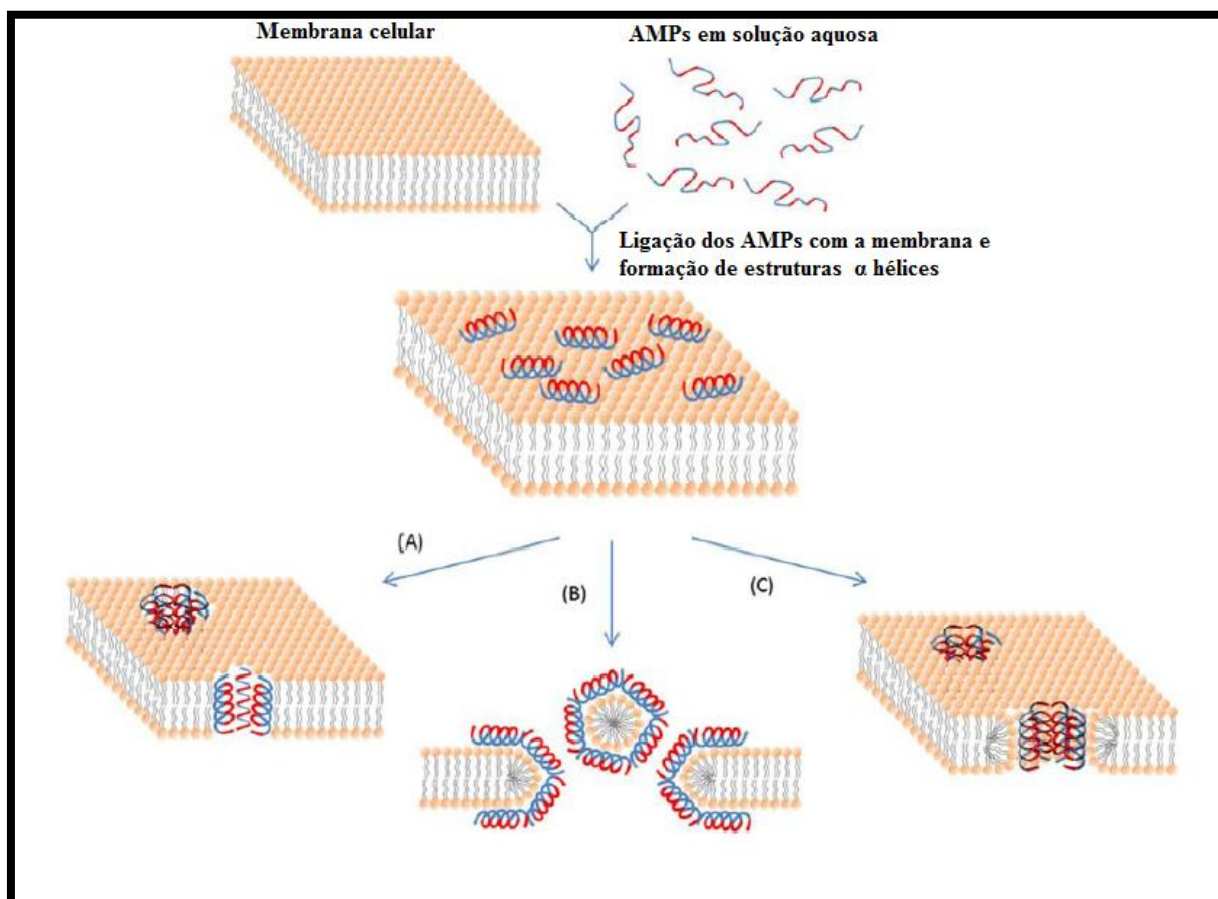


Figura 3 - Representação esquemática de alguns mecanismos de ação dos AMPs em relação à interação com membranas. (A). Modelo da aduela de barril (B) modelo tapete e (C) poro toroidal (BAHAR e REN, 2013).

Vale ressaltar que os modelos citados são característicos de AMPs com conformação em α -hélice e estabelecidos para interações com membranas de bactérias, porém são modelos que podem ser utilizados para os demais AMPs por suas características gerais (GIULIANI *et al.*, 2007; TORRENT *et al.*, 2012).

1.2.2.2. Ação sobre alvos intracelulares

Inicialmente acreditava-se que os AMPs causavam a morte celular somente através da interação com a membrana. Porém estudos têm demonstrado que eles podem matar suas células-alvo sem provocar permeabilização de membrana, sugerindo a existência de outros mecanismos de morte celular (CUDIC e OTVOS JR, 2002; OTVOS, 2005; MOOKHERJEE *et al.*, 2009; BAHAR e REN, 2013).

Em relação aos alvos intracelulares, sabe-se que AMPs se translocam pela membrana e bloqueiam processos celulares, como inibição da síntese de ácidos nucléicos, da síntese e enovelamento proteico, da atividade enzimática e podem

causar dano mitocondrial (POWERS e HANCOCK, 2003; BROGDEN, 2005; NGUYEN *et al.*, 2011; AOKI *et al.*, 2012). Podem inibir a síntese de parede celular (BRUMFITT *et al.*, 2002) e também aumentar os efeitos no metabolismo e nas vias bioenergéticas (síntese de adenosina trifosfato [ATP, do inglês *adenosine triphosphate*] e potencial eletroquímico) (LUQUE-ORTEGA *et al.*, 2008; WIMLEY, 2010). Por fim, este modo de ação tem sugerido que os AMPs possuem mecanismos de captura pela célula alvo, seja por penetração local ou endocitose (MADANI *et al.*, 2011).

1.2.3. Possíveis alternativas terapêuticas

Nos últimos anos os antibióticos têm sido amplamente utilizados no combate a doenças, entretanto o uso excessivo destes tem provocado resistência por parte dos microrganismos (BALTZER e BROWN, 2011). O desenvolvimento de novos antibióticos é um campo caro e longo, com poucos investimentos das grandes indústrias farmacêuticas (UPTON *et al.*, 2012). Por isso vários estudos têm sido feitos em busca de novas fontes terapêuticas, dentre as quais os AMPs tem recebido destaque considerável (REDDY *et al.*, 2004; AOKI *et al.*, 2012).

Os AMPs são considerados uma promissora classe de terapêuticos devido a uma série de fatores: amplo espectro antimicrobiano; possuem atividade em baixas doses, matando rapidamente os microrganismos; muitos possuem baixa toxicidade em células eucarióticas, neutralizam endotoxinas (prevenindo choque séptico), atuam na indução de angiogênese, possuem propriedades imunomoduladoras (alertam o hospedeiro da ação do patógeno e estimulam o sistema de defesa) e podem atuar sinergisticamente com as classes de antibióticos já existentes (ZASLOFF, 2002; GIULIANI *et al.*, 2007; UPTON *et al.*, 2012).

Apesar das diversas características citadas acima, as quais tornam os AMPs atrativos para o desenvolvimento de drogas, há diversos desafios para a aplicação clínica que precisam ser ultrapassados com base em algumas desvantagens que os AMPs possuem, como por exemplo: o alto custo para produção sintética (BOMMARIUS *et al.*, 2010); inativação dependente de sal, o que inviabilizaria o uso em condições fisiológicas (soro); susceptibilidade à degradação por proteólise (GIULIANI *et al.*, 2007; SEO *et al.*, 2012); precariedade de estudos feitos sobre

farmacocinética (MARR *et al.*, 2006) e em relação a falta de informação sobre citotoxicidade sobre células de mamíferos (PACOR *et al.*, 2002; MATSUZAKI, 2009).

Acredita-se que devido ao modo de ação mais comum dos AMPs (aumento da permeabilidade da membrana), o aparecimento de resistência é praticamente improvável (HANCOCK e SAHL, 2006; ROSSI *et al.*, 2008). Entretanto, alguns estudos estão sendo feitos em relação à possível aquisição de resistência dos AMPs por parte dos microrganismos, como descrito por GIULIANI *et al.* (2007). Estudos feitos com bactérias mostraram que estas podem adquirir resistência quando expostas a elevados níveis de AMPs (BADER *et al.*, 2005; MARR *et al.*, 2006; MARR *et al.*, 2012).

Com o crescente interesse em AMPs, muitas empresas têm demonstrado interesse em introduzi-los no mercado. Vários deles já estão em estudos clínicos. O primeiro composto desenvolvido foi o acetato de pexigana produzido a partir de mangainina (um AMP inicialmente isolado da pele do sapo *Xenopus laevis*), o qual mostrou ótima atividade. Porém o sucesso foi limitado e neste caso a agência que regulamenta a liberação nos Estados Unidos, *Food and Drug Administration*, não aceitou a aprovação, alegando que o peptídeo não é tão eficaz quanto os outros antibióticos para o tratamento de úlceras dos pés (KANG *et al.*, 2012).

Vários trabalhos têm descrito a atividade de AMPs sobre protozoários parasitas. Porém há poucos relatos sobre a atividade biológica dos AMPs em relação à *Leishmania*, sendo os poucos AMPs relatados com esta atividade as dermaseptinas, mangaininas e temporinas (AMPs isolados da pele de sapos), cecropinas (AMPs isolados de insetos) e gomesinas (AMPs isolados de aranhas) (ALBEROLA *et al.*, 2004; MANGONI *et al.*, 2005; KULKARNI *et al.*, 2009; PÉREZ-CORDERO *et al.*, 2011).

1.3. *Leishmania* e leishmaniose

Leishmania é um protozoário parasita intracelular que infecta diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos. Esta espécie pertence à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A transmissão natural ocorre principalmente através da picada da fêmea do inseto vetor, do gênero *Phlebotomous* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014). E o parasita também pode ser transmitido através do compartilhamento de seringas no

uso de drogas (CRUZ *et al.*, 2002), transmissão congênita (ROSYPAL e LINDSAY, 2005) e por transfusão sanguínea (OWENS *et al.*, 2001). A característica específica desta família é que possui uma mitocôndria única que contém uma região densa de DNA chamada cinetoplasto (PASSOS-SILVA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2013).

1.3.1. Biologia celular da *Leishmania*

Estes protozoários são parasitas que apresentam duas formas evolutivas fundamentais: amastigota no hospedeiro vertebrado e promastigota no vetor (flebótomo). As formas promastigotas são alongadas, medindo de 5 a 20 x 1 a 4 µm de comprimento, já as amastigotas são arredondadas e medem entre 2 e 4 µm de diâmetro. O formato celular é determinado por um arranjo de microtúbulos subpeliculares, dispostos abaixo da membrana plasmática de forma longitudinal ao corpo do parasita. O flagelo está inserido na bolsa flagelar e obedece à configuração 9+2, ou seja, consiste de nove pares de microtúbulos na periferia circundando um par de microtúbulos centrais. Além das organelas presentes em todas as células eucarióticas convencionais, os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ainda algumas organelas características, como megassomos, acidocalcissomos, glicossomos e cinetoplasto (VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002) (Figura 4A e B).

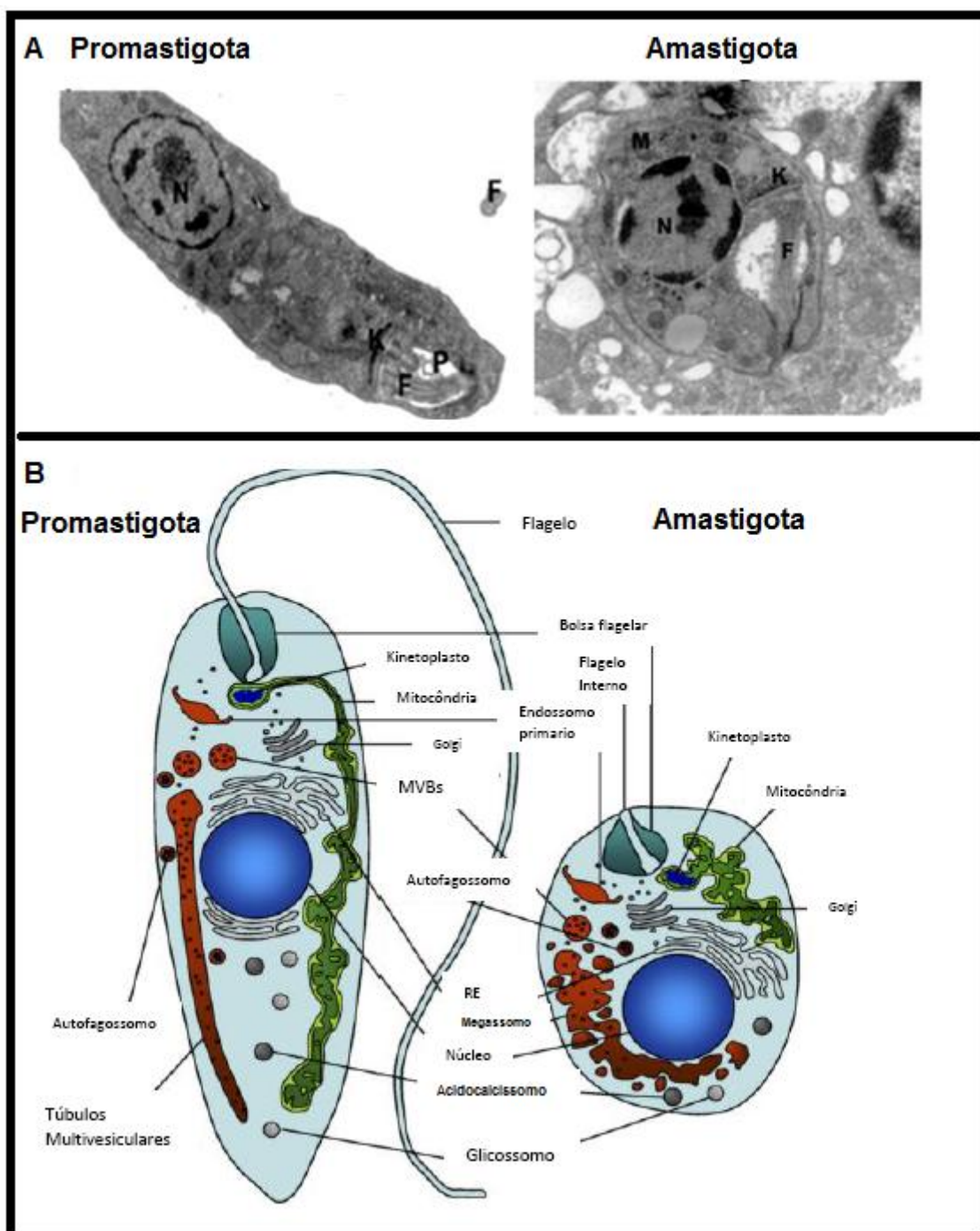


Figura 4 - Representação estrutural da *Leishmania*. A – Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão das formas promastigota e amastigota de *Leishmania* sp. As principais organelas podem ser observadas, tais como (N) – núcleo, (K) – cinetoplasto, (P) – bolsa flagelar, (F) – flagelo e (M) – megassomos (em amastigotas) (VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). B – Representação esquemática das características estruturais das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp. (adaptada de BESTEIRO *et al.*, 2007).

1.3.2. Ciclo de vida do parasita

A *Leishmania* apresenta um ciclo de vida complexo, pois está adaptada a viver em dois hospedeiros diferentes (vertebrado e invertebrado) e encontra-se exposta a diversas condições ambientais, como mudanças de temperatura, pH e disponibilidade do oxigênio (BANULS *et al.*, 2007; BESTEIRO *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2011). Apresenta um ciclo digenético, apresentando dois estágios principais: promastigota extracelular flagelado e amastigota intracelular aflagelado (Figura 4A e B).

O ciclo celular de *Leishmania* inicia-se quando os promastigotas pró-cíclicos, que estão no intestino médio do mosquito vetor, sofrem diferenciação para a forma infectante metacíclica (Figura 5a); estas são injetadas no hospedeiro mamífero durante a picada do inseto vetor (Figura 5b). Na derme, os promastigotas são rapidamente reconhecidos pelos receptores dos macrófagos do hospedeiro e assim capturados para o interior da célula hospedeira (Figura 5c). Um vacúolo parasitóforo é formado em torno do parasita recentemente internalizado, ocorrendo então a diferenciação em amastigotas aflagelados (Figura 5d) e estes se unem a lisossomos dando origem ao fagolisossoma (Figura 5e). A lise dos macrófagos infectados dá origem a formas amastigotas flageladas que infectam outros macrófagos (Figura 5f). Por fim, os amastigotas podem ser ingeridos pelo inseto (Figura 5g), onde ocorrerá a diferenciação em promastigotas pró-cíclicos (Figura 5a) e o ciclo é reiniciado.

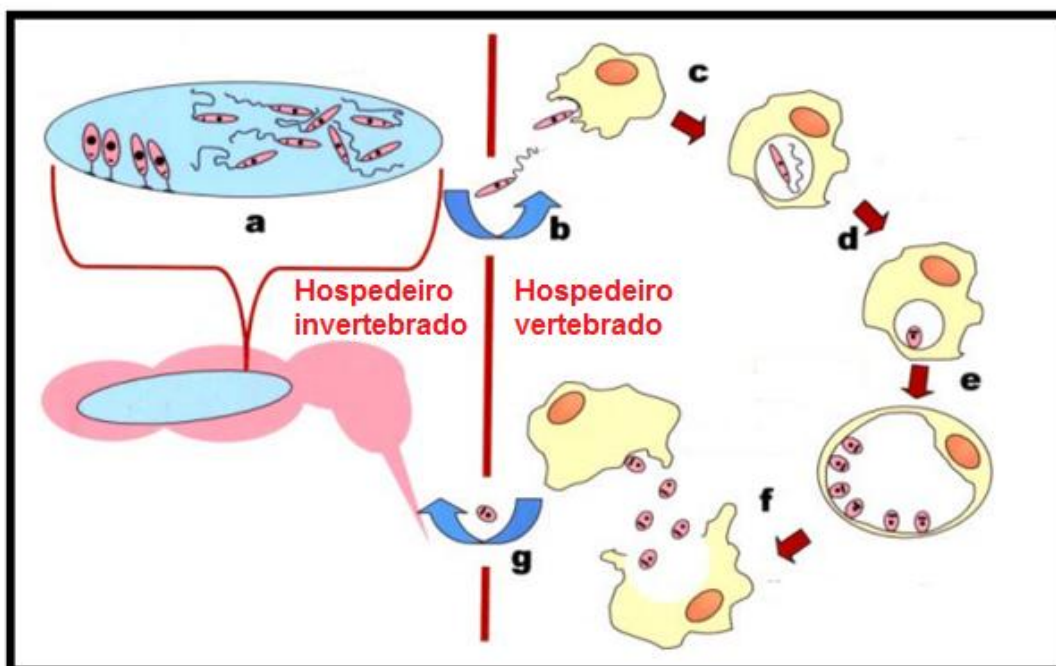


Figura 5 - Representação esquemática do ciclo de vida da *Leishmania* sp. no hospedeiro vertebrado e no hospedeiro invertebrado (adaptada de VANNIER-SANTOS *et al.* 2002).

O controle da infecção pelo hospedeiro envolve uma série de eventos do sistema inato e adaptativo que ainda não são bem conhecidos (CHANG *et al.*, 2003; LIESE *et al.*, 2008; MCGWIRE e SATOSKAR, 2013). As duas formas também se diferenciam pelas mudanças nas superfícies das moléculas, como GP63 e os lipofosfoglicanos (LPG, do inglês *lipophosphoglycan*), promovendo uma diferença na suscetibilidade das drogas utilizadas para o tratamento de cada tipo de forma do parasita (MARR *et al.*, 2012). Além disso, a complexidade do ciclo e as diferentes formas de desenvolvimento são determinantes para o sucesso da adaptação e do movimento destes parasitas entre o vetor e hospedeiro vertebrado. Assim, o ciclo de vida desses protozoários é caracterizado principalmente por alterações na forma da célula, ciclo celular, metabolismo, revestimento de superfície e replicação do DNA e a expressão gênica (BARRETT *et al.*, 2003; SIMPSON *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que o homem participa do ciclo de vida da *Leishmania* como um hospedeiro acidental, visto que os hospedeiros naturais e reservatórios deste protozoário são os cães e alguns animais silvestres como roedores, marsupiais e preguiças. Assim as leishmanioses são zoonoses, adquiridas eventualmente

quando o homem frequenta o ecossistema em que esses organismos vivem (REY, 1992; BANULS *et al.*, 2007).

1.3.3. Leishmaniose

As leishmanioses são doenças tropicais consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde. Esta doença é considerada endêmica em 98 países que estão distribuídos nos continentes da África, Ásia, América do Sul e Central e sudeste da Europa (CHADBOURNE *et al.*, 2011; ALVAR *et al.*, 2012; BARRETT e CROFT, 2012; MARR *et al.*, 2012). Esta possui diferentes formas clínicas e apresenta cerca de dois milhões de casos por ano mundialmente, sendo que 350 milhões de pessoas vivem em situação de risco de infecção (STUART *et al.*, 2008; ALVAR *et al.*, 2012; MCGWIRE e SATOSKAR, 2013). Assim essa doença é considerada uma doença reemergente e segunda causa de morte entre as infecções parasitárias (CECÍLIO *et al.*, 2014).

1.3.3.1. Sintomas clínicos

A leishmaniose pode ser causada por 21 espécies de protozoários sendo estas responsáveis por três principais manifestações clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral. Cada uma das formas é determinada pela espécie causadora da doença e pela susceptibilidade genética do hospedeiro (CUERVO *et al.*, 2010; MCGWIRE e SATOSKAR, 2013). O protozoário que escolhemos como padrão para os nossos estudos é a espécie *L. amazonensis*, principal causadora da leishmaniose cutânea difusa da América do Sul (REITHINGER *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2009).

A forma cutânea da doença é uma infecção provocada por várias espécies, sendo as mais conhecidas no Brasil a *Leishmania guyanensi*, *Leishmania braziliense* e *Leishmania amazonensis*. Esta doença começa com úlceras cutâneas que se espalham causando uma enorme destruição no corpo, especialmente no nariz e na boca e em cerca de 90% dos casos se curam espontaneamente dentro de 3 a 18 meses. A úlcera típica é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele, com formato arredondado ou ovalado. As bordas são bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras. A infecção bacteriana associada pode causar dor local e produzir exsudato seropurulento, que pode recobrir total ou parcialmente o fundo da úlcera. Na forma difusa da doença, ocasionada pela *L.*

amazonensis, as lesões nodulares entram em erupção em vários locais distantes do local de picada do inseto (DAVID e CRAFT, 2009; MCGWIRE e SATOSKAR, 2013).

1.3.3.2. Tratamento

Tem sido descrito que a eficácia das drogas utilizadas para o tratamento de leishmaniose é limitada por uma série de fatores, mas especificamente existem quatro fatores característicos do gênero *Leishmania*: a localização intracelular do protozoário (no caso de amastigotas), os diferentes requisitos da farmacocinética que direcionam a droga para o fígado, baço, medula óssea, em casos de leishmaniose visceral ou direcionam para a pele em casos de leishmaniose cutânea, diferenças intrínsecas de cada espécie de *Leishmania* em relação à sensibilidade às drogas e a influência da supressão imunológica associada à leishmaniose (NATERA *et al.*, 2007; BARRETT e CROFT, 2012).

O tratamento da leishmaniose, como para as outras patologias causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, é baseado em drogas. Estas apresentam, em alguns casos, sérios efeitos colaterais e estão se tornando cada vez mais ineficazes devido ao desenvolvimento de resistência (BARRETT e CROFT, 2012; MOHAPATRA, 2014). O desenvolvimento de uma vacina continua sendo um propósito importante, porém ainda é necessária uma melhor compreensão da patogênese e de melhores modelos animais (ALVAR *et al.*, 2012). Existe uma busca exaustiva por novos medicamentos eficazes para substituir ou complementar aqueles usuais, como antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas (ROCHA *et al.*, 2005; MCGWIRE e SATOSKAR, 2013). Nos últimos anos um dos compostos que tem sido estudado como agente leishmanicida são os AMPs (COBB e DENNY, 2010; MCGWIRE e KULKARNI, 2010; CHADBOURNE *et al.*, 2011).

Dentre os quesitos que despertam a atenção dos pesquisadores para o uso de AMPs como agente antileishmania, podem-se destacar a baixa toxicidade nas células de mamíferos em concentrações necessárias para a morte do parasita e o mecanismo de ação dos AMPs, os quais rompem a membrana, mecanismo diferente das outras drogas usadas e assim tornando-se uma possível alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose (COBB e DENNY, 2010). Dentre os AMPs já descritos com atividade antileishmania podem-se citar: dermaseptinas (AMPs isolados da pele de sapos), cecropinas (AMPs isolados de insetos), gomesinas

(AMPs isolados de aranha) e defensinas (AMP isolados de plantas) (ALBEROLA *et al.*, 2004; PÉREZ-CORDERO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013).

1.3.4. Interações entre AMPs-*Leishmania*

O principal modo de interação dos AMPs com a *Leishmania* é a ruptura da superfície das membranas dos parasitas. Os AMPs catiônicos são atraídos e se inserem dentro da membrana carregada negativamente do parasita. A permeabilização provoca lesões pequenas e grandes na membrana que conduz a alteração do pH intracelular e extracelular, ao descontrole do fluxo de íons dentro e fora da célula, bem como o trânsito de moléculas maiores. Alguns AMPs podem penetrar nas células e provocar um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} a partir de armazenamentos intracelulares dentro do acidocalcissomas, glicossomos e no retículo endoplasmático. Alguns AMPs podem provocar um colapso no potencial mitocondrial e parar a produção de ATP, possivelmente, na totalidade ou em parte, pelo efeito tóxico de Ca^{2+} intracelular livre. O ATP também pode ser perdido através da membrana celular permeabilizada (MCGWIRE e KULKARNI, 2010) (Figura 6). Adicionalmente, em alguns casos, a interação pode estar relacionada com os eventos de sinalização celular intracelular com algum tipo de interação alvo-ligante ou ruptura da membrana (MCGWIRE e KULKARNI, 2010). Outros AMPs podem penetrar nas células sem distúrbios detectáveis na superfície celular (ALBEROLA *et al.*, 2004; LUQUE-ORTEGA *et al.*, 2008; KULKARNI *et al.*, 2009; PÉREZ-CORDERO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013). Ainda não está claro com quais estruturas subcelulares os AMPs podem interagir. Foram relatados exemplos de interação com a mitocôndria (FOUND, 2002; LUQUE-ORTEGA *et al.*, 2008; KULKARNI *et al.*, 2009) e com glicossomos e retículo endoplasmático (MORENO e DOCAMPO, 2003). Em alguns casos os AMPs podem causar a morte do parasita por necrose, apoptose e autofagia (BERA *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2006; KULKARNI *et al.*, 2009) (Figura 6).

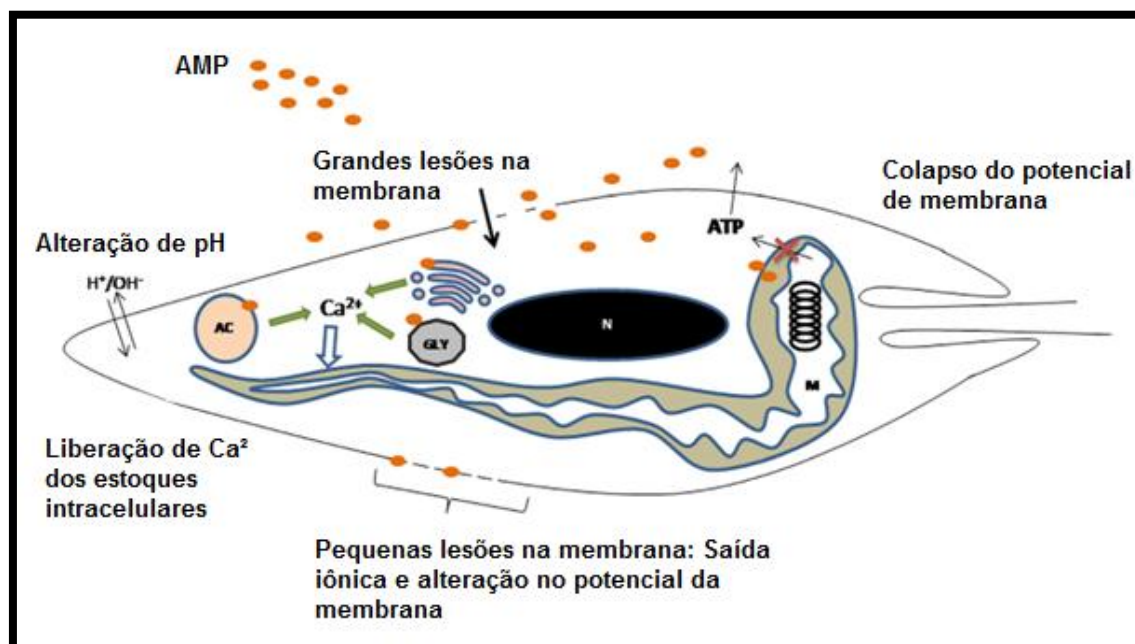


Figura 6 - Representação esquemática da interação do AMP com os parasitas da ordem *Kinetoplastidae*. Mostraram os possíveis alvos e efeitos como dano na membrana plasmática, liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, alteração do pH intracelular, fluxo de íons pela membrana, colapso do potencial de membrana, colapso do potencial mitocondrial e paralisação da produção de ATP (X laranja). AMPs– bolinhas laranja; AC– acidocalcissomas; GLY– glicossomas; retículo endoplasmático– estruturas em camada de roxo; M– mitocôndria; cinetoplasto– múltiplos círculos empilhados; N – Núcleo ; adaptado de MCGWIRE e KULKARNI (2010).

Tem sido demonstrado na literatura que a *Leishmania* apresenta mecanismos de evasão do sistema de defesa do hospedeiro, os quais têm sido reconhecidos como potenciais fatores de virulência para impedir o sistema de defesa de macrófagos e conseqüentemente permitir a sua sobrevivência e progressão no ambiente hostil do fagolisossomo. Além disso, *Leishmania* também utiliza esses mecanismos para impedir a ação dos AMPS. Dentre esses mecanismos pode-se citar as proteínas de superfície como o fosfolípido glicosilinositol, o lipofosfoglicano e a protease cisteínica GP63 (leishmanolisina), a qual é a mais estudada em relação ao mecanismo de evasão dos AMPs (CHANG e MCGWIRE, 2002; KULKARNI *et al.*, 2006; ISNARD *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013).

1.3.5. Perspectivas do uso terapêutico do AMP sobre *Leishmania*

A maioria dos estudos feitos com AMPs atuando sobre *Leishmania* são através da utilização das formas promastigotas ao invés da forma amastigota (forma mais relevante clinicamente). Isso acontece devido ao fato de que os experimentos

realizados em testes com a forma promastigota são muito mais simples de se realizar. Apesar de serem estudos básicos e essenciais, o sucesso terapêutico é adquirido através dos avanços nos estudos intracelulares e com experimentos *in vivo* (MARR *et al.*, 2012).

A compreensão do modo de ação do AMP é essencial para o desenvolvimento de novas drogas, o que pode ser feita uma combinação dos diferentes modos de ação de AMPs, para a síntese de uma nova droga com características mais desejáveis para provocar a ativação do sistema imune do hospedeiro. Uma das idéias seria realizar a alteração estrutural para evitar a degradação pela leishmanolisina ou para aumentar a atração com a membrana, assim aumentando a atividade leishmanicida do AMP sintético (MARR *et al.*, 2012).

Como exposto, a busca por novos agentes com possibilidade de uso terapêutico para leishmaniose é urgente. Neste cenário se destacam os AMPs. Adicionalmente por estudos de AMPs em *B. excelsa* ainda não terem sido relatados, iniciamos este estudo onde em um trabalho prévio (FARDIN, 2013), foram obtidas frações ricas em peptídeos extraídos da semente de *B. excelsa* através da maceração destas em tampão fosfato. Este extrato bruto foi fracionado em uma cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose. As frações obtidas, R1, R2 e R3 apresentaram peptídeos variando de 6 a 10 KDa. Todas estas frações foram testadas sobre o protozoário *L. amazonensis* e a fração R2 apresentou forte atividade inibitória sobre o mesmo. Devido a forte atividade desta fração, ela foi selecionada para outra etapa cromatográfica (em coluna de fase reversa C18 por cromatografia líquida de alto desempenho) onde foram obtidas as frações H3 e H4, que também apresentaram peptídeos e atividade inibitória sobre células de *L. amazonensis* (Figura 7). Neste trabalho demos continuidade à purificação e à caracterização dos peptídeos contidos na fração R2 e também o estudo da sua atividade biológica e mecanismo de ação sobre *L. amazonensis*.

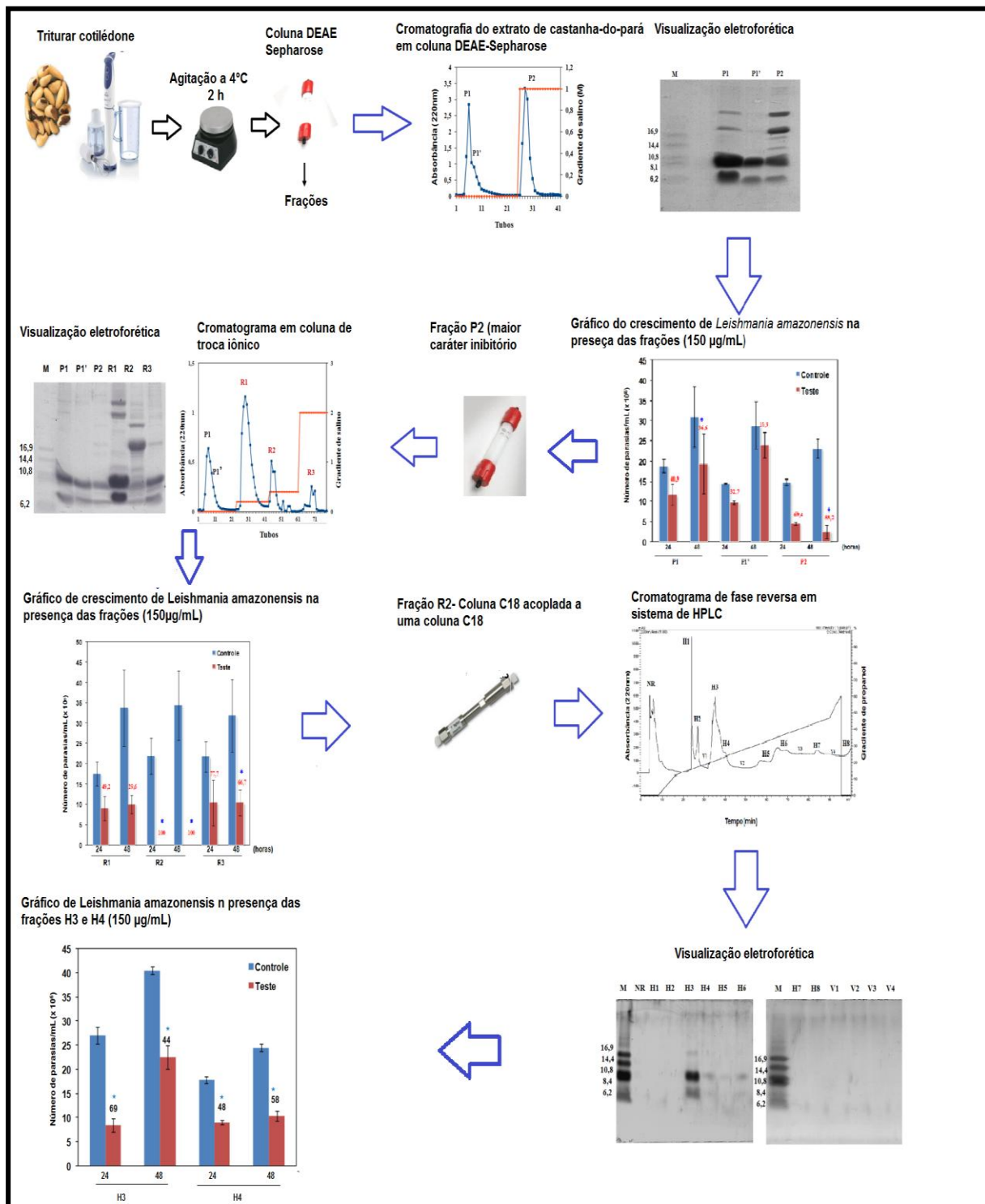


Figura 7 - Representação esquemática do resumo dos resultados obtidos previamente (FARDIN, 2013). Os resultados mostrados abrangeram desde a extração proteica da semente de *Bertholletia excelsa* (castanha-do-pará) até a obtenção de frações proteicas e teste delas sobre células de *Leishmania amazonensis*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar peptídeos biologicamente ativos de sementes de *Bertholletia excelsa* (castanha-do-pará) sobre a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*, e estudar o seu mecanismo de ação.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair, purificar peptídeos biologicamente ativos de sementes de *B. excelsa* (castanha-do-pará) e analisá-los por eletroforese;
- Caracterizar os peptídeos através de sequenciamento de proteínas;
- Monitorar a curva de crescimento de *L. amazonensis* com determinação da mínima concentração inibitória (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*) na presença dos peptídeos obtidos e diferenciar se o efeito inibitório determinado na MIC sobre *L. amazonensis* foi microbioestático ou microbicida;
- Identificar o possível mecanismo de ação dos peptídeos com relação a integridade da membrana de células de *L. amazonensis*, alteração na funcionalidade mitocondrial, indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio e produção endógena de óxido nítrico através de estudos de cinética e microscopia de fluorescência;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Obtenção e manutenção das sementes

As sementes de *Bertholletia excelsa* Humboldt e Bonpland (castanha-do-pará) foram obtidas no comércio da cidade de Campos do Goytacazes-RJ, originadas da Indústria Frutifique e Com. Ltda (Cariacica, ES) e foram mantidas em frascos fechados à temperatura ambiente até o uso para extração proteica.

3.1.2. Manutenção da *Leishmania amazonensis*

A linhagem LV79 de *L. amazonensis* (no estágio promastigota) utilizada foi cedida pelo Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em colaboração com o prof. Edésio José Tenório de Melo. O cultivo foi feito no mesmo laboratório em meio Warren's suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,4% de hemina, sendo as células incubadas a 28 °C (estufa DBO, ELETROLAB) com repiques semanais após quatro dias do início do crescimento das células.

3.2. Obtenção dos peptídeos

A extração e a purificação até a obtenção das frações proteicas foram feitas como descrito anteriormente em FARDIN (2013). Abaixo segue uma breve descrição destes procedimentos.

3.2.1. Extração proteica em tampão fosfato

O método de extração consistiu na trituração do cotilédone da semente de *B. excelsa* em um processador de alimentos (Mix 3x1, Philips) juntamente com o tampão de extração fosfato (10 mM de Na_2HPO_4 , 15 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5% de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*), 100 mM de cloreto de potássio, 200 mM de PMSF (do inglês *phenylmethanesulfonyl fluoride*) e inibidores de proteases (2 mM de Fluoreto de 4-

(2-aminoetil)-benzenosulfonila, 0,3 μM de aprotinina, 130 μM de bestatina, 1 mM de EDTA, 14 μM de E-64 e 1 μM leupeptina (*Protease inhibitor cocktail for general use*, Sigma) e a extração ficou sob agitação por 2 h à temperatura de 4 °C. Após este processo, a extração foi dividida em tubos de centrífuga e colocadas para centrifugação por 15.440 x g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi aquecido em banho-maria a 80 °C por 10 min e após o aquecimento o sobrenadante foi novamente centrifugado, nas mesmas condições. Por fim, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e liofilizado para então ser utilizado em cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose. O método foi adaptado de TERRAS *et al.* (1992).

3.2.2. Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose

A coluna (3 x 20 cm), preenchida com 30 mL da resina de troca iônica, especificamente a de DEAE-Sepharose (troca aniônica), foi empacotada com fluxo constante de 60 mL/h, e para sua ativação foi lavada (sempre com o volume três vezes o da resina) sequencialmente com água destilada, 0,1 M de NaOH, novamente com água destilada, 0,1 M de HCl, e por fim equilibrada com tampão 20 mM de Tris (*hydroxymethyl*)aminomethane)-HCl, pH 8,0 (tampão de equilíbrio da coluna).

A amostra que foi aplicada na coluna foi preparada da seguinte forma: 30 mL de Tris-HCl 20 mM pH 8,0, foram adicionados para ressuspensão de 0,5 g do pó da amostra liofilizada. Esta solução foi centrifugada a 15.440 x g por 10 min à 4 °C e o sobrenadante foi aplicado na coluna. Foram coletadas frações de 3 mL a um fluxo constante de 60 mL/h. A amostra foi eluída inicialmente em 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0, e a eluição da fração retida foi feita com um gradiente descontínuo de molaridade salina, 0,1, 0,2 e 1 M, diluídos em 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0. A análise da eluição das frações da cromatografia de troca iônica foi feita em espectrofotômetro (LGS 53, Bel Photonics) a 220 nm. As frações resultantes foram liofilizadas para análise em gel.

A fração eluída com 0,2 M de NaCl corresponde à fração R2, fração que foi usada nas demais etapas do trabalho.

3.2.3. Cromatografia de fase-reversa em sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*)

A fração R2 foi filtrada em filtro de 0,2 µm (Millex-GV, Millipore) e diretamente injetada na coluna C18 (Shim-pack VP-ODS, Shimadzu), acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelligard, Sigma). A coluna foi inicialmente equilibrada em solução A (0,1% de TFA [do inglês, *trifluoroacetic acid*] em água ultra pura). A corrida foi desenvolvida com gradiente, onde de 0 a 8 min passou a solução A, de 8 a 16 min passou a concentração da solução B (0,1% TFA em 100% de 2-propanol) a 12%, de 16 a 90 min, elevou-se a concentração de B a 47%, de 90 a 95 min, elevou a concentração de B a 60% e de 95 min a 100 min, retornou-se a concentração de B para 0%. A eluição dos picos foi acompanhada a 220 nm. As frações resultantes foram liofilizadas para análise em gel.

3.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O processo de purificação dos peptídeos foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo a metodologia descrita por SCHÄGGER e VON JAGOW (1987) . Foram usadas placas de vidro de 8x10 cm e 7x10 cm e espaçadores de 0,75 mm (Mini protean tetra cell, Bio-Rad). As determinações quantitativas de proteínas foram feitas pelo método de BRADFORD (1976) e ácido bicinonínico, sendo usada a albumina de ovo de galinha (Sigma) como padrão proteico. As frações proteicas obtidas das cromatografias foram concentradas por liofilização, ressuspensas em um pequeno volume de água destilada e submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes. A uma alíquota de 10 µL de cada fração, correspondendo a 10 µg/µL de proteína, foram adicionados 4 µL de tampão de amostra duas vezes concentrado (0,125 M de Tris-HCl pH 8,0, 2,5% de SDS, 0,25% de azul de bromofenol e 15% de sacarose) e 5% de β-mercaptoetanol. As amostras foram então aquecidas por 5 min a 90 °C e posteriormente centrifugadas por 15.000 x g por 3 min a temperatura ambiente.

Após este procedimento, 15 µL das amostras preparadas foram aplicadas no gel de concentração. A corrida foi feita a uma voltagem constante de 20 V por um período de aproximadamente 16 h. Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado em uma solução corante

(0,1% de *Coomassie Brilliant Blue R 250*, 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial em água destilada) por 2h. Após esse período, o gel foi transferido para uma solução descorante (10% de ácido acético glacial e 30% de metanol em água destilada) e mantido até a visualização das bandas de proteína. Foi usado o marcador de baixa massa molecular composto das seguintes massas moleculares de proteínas em Da 19.950, 14.440, 10.600, 8.160, 6.210, 3.480 e 2.510 (MW-SDS-17S, Sigma[®]).

3.3. Análise da atividade biológica das frações proteicas sobre *L. amazonensis*

3.3.1. Ensaio de toxicidade dos protozoários - sinergismo

Para verificar uma provável ação sinérgica das frações H3 e H4, foi feito um ensaio utilizando as concentrações de 45 µg/mL de cada, estas foram liofilizadas e dissolvidas em 3 µL de dimetil sulfóxido (DMSO do inglês *dimethyl sulfoxide*) (equivalente à concentração final de 1,5%). A esta mistura foram adicionados 97 µL de meio Warren's perfazendo 100 µL e este foi esterilizado por filtração em filtro de 0,22 µm (Millex-GV, Millipore). As células do protozoário foram preparadas do seguinte modo: uma cultura do protozoário no segundo dia de crescimento teve as células contadas em câmara de Neubauer e em microscópio óptico (Axioplan, Zeiss) e ajustadas para $1,5 \times 10^6$ células/mL em 100 µL de meio Warren's. A uma placa de cultura de células de 96 poços (NUNC, Nunclon Surface) foram adicionados os 100 µL de meio contendo as frações proteicas e 100 µL de meio contendo os protozoários, sendo o volume final do ensaio de inibição de 200 µL e a placa incubada a 28 °C. O controle foi feito com meio contendo DMSO na mesma concentração que foi usada para ressuspender as frações proteicas. A toxicidade foi avaliada fazendo contagens em 24 e 48 h das células dos parasitas em câmara de Neubauer e em microscópio óptico. Foi feito um gráfico em função do número de células e do tempo. Para os demais ensaios de toxicidade utilizou-se a mesma metodologia, porém cada ensaio foi feito com sua respectiva concentração da fração proteica utilizada.

3.3.2. Determinação da concentração mínima inibitória

Este procedimento foi feito com a fração R2 e nas mesmas condições descritas no item 3.3.1. A menor concentração da fração R2 que provoca a inibição de mais de 100% das células de *Leishmania* (RA *et al.*, 2015), determinada pela contagem de células em câmara de Neubauer, foi definida como a mínima concentração inibitória (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*). Para isso células de *L. amazonensis* foram crescidas na presença de uma diluição seriada das frações proteicas tomando como base a concentração de 150 até 37,5 µg/mL (WIEGAND *et al.*, 2008).

3.3.3. Avaliação do mecanismo de ação

3.3.3.1. Análise da viabilidade celular

Após a determinação da MIC, para avaliar se a fração R2, na concentração definida como sendo a MIC, foi capaz de eliminar as células de *L. amazonensis* (microbicida) ou se foi capaz de inibir a multiplicação desses protozoários (microbiostático), as células tratadas com a fração R2 foram lavadas em meio Warren's e colocadas novamente para crescer no meio Warren's a 28 °C. A quantificação das células foi realizada após o tempo de 24 e 48h e foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Este ensaio foi feito do mesmo modo descrito no item 3.3.1.

3.3.3.2. Cinética e microscopia de fluorescência da permeabilização da membrana plasmática de *L. amazonensis* pela fração R2

A cinética de permeabilização da membrana de células de *L. amazonensis* tratadas com a fração R2 foi avaliada através da utilização do corante fluorescente *Sytox green* (Molecular Probes, Life Technologies- 900 Da). Este corante possui alta afinidade por ácidos nucleicos, penetrando nas células cuja membrana se encontra comprometida e não atravessando membranas íntegra. Ao se ligar a ácidos nucleicos, se torna fluorescente (THEVISSSEN *et al.*, 1999; MAKOVITZKI *et al.*, 2008).

O ensaio de cinética foi preparado como no item 3.3.1, sendo que junto a fração R2 (na MIC) e nos 200 μ L de volume final do ensaio também foram adicionados 7 μ L (concentração final de 0,2 μ M) de *Sytox Green*, em placa de cultura de células de 96 poços (Special Optics Plate black with ultra thin clear botton, Corninng). O intervalo entre a adição do corante e a leitura do ensaio foi de aproximadamente de 5 min e o experimento foi feito em abrigo de luz. A captação do corante foi medida através de fluorescência das células marcadas na placa usando um leitor de microplacas (Chameleon, Hidex) equipado com filtros de emissão e excitação com comprimentos de onda de 485 e 535, respectivamente. As leituras foram feitas a cada 2 min por 2 h (VAN DER WEERDEN *et al.*, 2010), utilizando um filtro com variação de 465-535 de emissão e 405-564 de excitação. O controle foi feito com a adição do corante e DMSO, porém sem a fração R2.

Para análises dessas células por microscopia, após este período de 2 h, uma alíquota da cultura de 30 μ L foi adicionada sobre uma lamínula tratada com 0,1% de poli-L-lisina (preparada com a poli-L-lisina 24 h antes do teste), e deixada incubada por 10 min para a fixação das células. Após este período a lamínula foi vertida sobre a lâmina e observada no microscópio óptico equipado com filtros de excitação e emissão máxima de 490 e 500 nm, respectivamente.

Para todas as análises de microscopia de fluorescência foi usado o microscópio Axioplan (Zeiss) acoplado à câmera Olympus DP72 e para visualização das imagens foi utilizado o programa *Soft Imaging System Cell*. Todas as imagens de fluorescência foram captadas com o mesmo tempo de exposição.

3.3.3.3. Cinética e microscopia de fluorescência da alteração na função mitocondrial de *L. amazonensis* pela fração R2

A funcionalidade mitocondrial em células de *L. amazonensis* tratadas com a fração R2 foi feito como descrito no item 3.3.3.2, com a seguinte diferença: foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Rodamina 123 (Sigma®). A Rodamina é um fluorocromo com carga positiva em pH fisiológico que marca seletivamente mitocôndrias de células com atividade funcional normal (O'CONNOR *et al.*, 1988). Utilizou-se 10 μ L de solução de uso da Rodamina 123 (estoque: 50 mg/mL, diluída em etanol e de uso: 10 μ g/mL diluída em meio Warren's). Os filtros de excitação e emissão de 506 e 530 nm, respectivamente.

3.3.3.4. Cinética e microscopia de fluorescência da indução da produção endógena de ROS em *L. amazonensis* pela fração R2

A indução da produção endógena de ROS em células de *L. amazonensis* tratadas com a fração R2 foi analisada como descrito no item 3.3.3.2, com a seguinte diferença: foi utilizado o corante fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato na concentração final de 200 μ M, segundo metodologia descrita por Aerts *et al.*, (2007) com algumas modificações. Este corante é um composto estável, não fluorescente, lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. As ROS produzidas oxidam este corante, o qual emite fluorescência.

3.3.3.5. Cinética e microscopia de fluorescência da indução da produção endógena de óxido nítrico em células de *L. amazonensis*

A indução da produção endógena de NO em células de *L. amazonensis* tratadas com a fração R2 foi analisada como descrito no item 3.3.3.2, com a seguinte diferença: foi usado o corante fluorescente 3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato à concentração final de 8 μ M, segundo metodologia descrita por AERTS *et al.* (2007) com algumas modificações.

3.4. Caracterização dos peptídeos

3.4.1. Sequenciamento de proteínas

3.4.1.1. Preparo de amostras e condições de corrida

Para o sequenciamento, as proteínas da fração H3, obtidas da cromatografia de fase reversa, foram primeiramente desnaturadas com 6 M de cloreto de guanidina contendo tampão 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0. Depois da redução com 5 mM de dithiothreitol (GE Healthcare, Life Sciences) por 1h a 50 °C, a amostra foi incubada com 10 μ L de iodoacetamida por 1h a 50 °C e os produtos foram separados por HPLC (coluna C18) como descrito no item 3.2.3. Como padrão da desnaturação, foi inicialmente cromatografada a mesma fração sem passar pelo processo de redução e alquilação, nas mesmas condições em que foi cromatografada a amostra reduzida e alquilada. Após a cromatografia, as amostras

foram submetidas à eletroforese descontínua em gel de tricina (item 3.3.1) com as seguintes diferenças. O gel precisou ser montado 24h antes do uso. Antes da amostra ter sido aplicada no gel foi feita uma pré-corrída, de 45 min a 8 mA, sendo que neste caso o tampão catodo continha 5 μ M de glutathiona reduzida. Após a pré-corrída o tampão catodo foi trocado por um novo, desta vez, além de conter 5 μ M de glutathiona reduzida, continha também 0,1 mM de tioglicolato de sódio; e assim a amostra foi aplicada. Foi feito um gel espelho para ser corado com Coomassie.

3.4.1.2. Eletrotransferência para membrana de polivinilidenodifluoreto

A eletrotransferência foi realizada segundo metodologia descrita por TOWBIN *et al.* (1979). Ao término da corrída, o gel foi retirado das placas e imerso em tampão de transferência (glicina 182 mM, Tris 25 mM e metanol 20%) por 20 min. De forma semelhante, a membrana de polivinilidenofluoreto (PVDF, do inglês *polyvinylidene difluoride*, IMMOBILON) (cortada nas mesmas dimensões do gel) foi imersa por 3 segundos em metanol 100%, imersa em água para retirar o excesso de metanol e, então, imersa no tampão de transferência por 20 min. Passado este tempo, as proteínas do gel foram eletrotransferidas para a membrana de PVDF. Para a eletrotransferência foi utilizada a seguinte metodologia: sobre a célula de transferência foi montado um “sanduíche” composto respectivamente de oito folhas de papel de filtro (previamente embebidas em tampão de transferência), a membrana, o gel e mais uma camada de oito folhas, embebidas em tampão de transferência. Uma vez montado o “sanduíche”, a célula de transferência foi fechada, e sobre ela aplicada uma corrente constante de 1 mA/cm² de membrana por 2h, no sentido gel-membrana. Após a transferência, o “sanduíche” foi cuidadosamente desfeito, a membrana submetida à coloração reversível com Ponceau S (0,1%), para determinação do sucesso da transferência e a banda de interesse recortada da membrana. Em seguida, esta foi lavada em água destilada (para que fosse retirado o excesso de corante), seca a temperatura ambiente e submetida ao sequenciamento.

3.4.1.3. Determinação da sequência de aminoácidos

Foi empregada a metodologia introduzida e desenvolvida por feito em um sequenciador automático de proteínas (PPSQ-23A, Shimadzu). Este é um processo cíclico de três etapas, onde resíduos de aminoácidos são clivados um a um, a cada ciclo, a partir do N-terminal da proteína como derivados feniltioidantoína. A primeira etapa do ciclo é o acoplamento do fenilisotiocianato com resíduos N-terminal; a segunda, a clivagem do resíduo N-terminal via ciclização em meio ácido; a terceira, a conversão do derivativo tiozolinona formando um derivativo mais estável, a tioidantoína, a qual pode ser identificada por cromatografia (ALLEN JR, 1987).

Ácidos de PTH-aminoácidos foram detectados a 269 nm após separação numa coluna C18 de fase inversa (4,6 x 2,5 mm) em condições isocráticas, de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram comparadas com sequências em bancos de dados relatados de aminoácidos e foram apresentados para o alinhamento automático utilizando o sistema de busca NCBI-BLAST.

3.4.2. Ensaio de inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana

O ensaio de atividade enzimática da α -amilase foi realizado de acordo com o método de BERNFELD (1955). A mistura de reação para a determinação da atividade enzimática foi feita em água a 37 °C por 15 min usando 1% de amido (Sigma) como substrato e a α -amilase salivar humana. As amostras foram retiradas do banho e após o resfriamento foram adicionados 200 μ L da solução DNS (4,5% de hidróxido de sódio, 1% de 3,5-ácido dinitrosalicílico, 45 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 2g de fenol cristalino). As amostras do ensaio foram então fervidas por 5 min e 200 μ L de água foram adicionadas a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro (LGS53, BEL Photonic). Após o ensaio, uma unidade de α -amilase foi definida como uma variação de 0,1 de ABS a 540 nm por 15 min de reação.

Para o ensaio de inibição da atividade α -amilásica foi feito o mesmo procedimento, sendo que foi feito um pré tratamento de α -amilase por 15 min a 37 °C com diferentes concentrações da fração R2 (150, 75 e 37,5 μ g/mL) em um volume final de 50 μ L. Após esse período foram adicionados 12,5 μ L de solução de amido 1% e novamente as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por

15 min. Os experimentos foram realizados em triplicata e foi calculado o desvio padrão para cada experimento.

3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida na ausência de β -mercaptotanol

Para determinar se as proteínas da fração R2 eram subunidades de proteína maior, foi feito um gel de eletroforese como descrito no item 3.2.4, sendo que no preparo de amostra, esta foi misturada ao tampão de amostra no qual foi omitido o uso de β -mercaptoetanol e adicionalmente esta amostra não foi aquecida. Como controle foi adicionado no gel uma amostra da fração R2 tratada com β -mercaptoetanol e aquecida. Este experimento foi feito três vezes com n=1 cada.

3.4.4. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

O perfil proteico foi avaliado por eletroforese bidimensional seguindo as recomendações do fabricante e de acordo com as metodologias descritas por O'FARRELL (1975), e BJELLQVIST *et al.* (1982) e GÖRG *et al.* (1999).

No preparo da amostra, a fração R2 em pó (concentração de 50 μ g) foi ressuspendida em 125 μ L de tampão de reidratação e adicionou-se 0,7 μ L de tampão IPG. Esta foi então submetida a um processo de focalização isoeletrica. Primeiramente, as proteínas foram separadas pelo ponto isoeletrico em fitas de 7 cm, com pH variando entre 3 e 10. Para isso, aplicou-se a amostra numa canaleta. Em seguida, as fitas foram colocadas em contato com as amostras e cobertas com óleo mineral (1,0 mL). A re-hidratação ocorreu junto com o processo de focalização, feito no sistema focalizador *Ettan IPG phor 3* (GE Healthcare) por 24h à temperatura ambiente. Neste sistema aplicou-se o seguinte programa: (1) 200 V até 200 Vh, (2) 500 V até 1000 Vh, (3) 10000 V até 2000 Vh, (4) 4000 V até 01:00 HH:MM, (5) 8000 V ATÉ 30000 Vh e 100V até 10:00 HH:mm. No final da execução do programa, a linha de azul de bromofenol tinha atingido o final da fita. Foram acumulados 36.700 Vh no total de 24h. Após a focalização, as fitas foram equilibradas com 25 mg de ditioneitol (DTT, do inglês *dithiothreitol*) dissolvidas em uma solução de equilíbrio, sob leve agitação por 15 min e depois usando a mesma solução, entretanto o DTT foi substituído por 62,5 mg de iodoacetamida, também sob agitação, durante 15 min.

Para a separação na segunda dimensão, isto é, por massa molecular, cada fita foi cuidadosamente inserida sobre um gel de poliacrilamida, onde também foi inserido um pedaço de papel de filtro contendo 15 μL do marcador de baixa massa molecular. A seguir, foi aplicada uma solução aquecida de agarose para fixar a fita e o papel com o padrão de proteínas e evitar bolhas entre eles e o gel de poliacrilamida. A segunda separação foi realizada aplicando-se 20 V e 400 mA. Por fim o gel foi corado e descorado como relatado no item 3.2.4. Este experimento foi feito três vezes com $n=1$ cada.

4. RESULTADOS

Esta dissertação é continuação do trabalho de FARDIN, 2013. Assim os resultados prévios mostrados na figura 7 indicam o que foi feito anteriormente e de onde este projeto se inicia.

4.1. Atividade sobre *L. amazonensis*

Nosso resultado anterior (FARDIN, 2013) mostrou que a fração R2, na concentração de 150 µg/mL, inibia completamente a proliferação das células de *L. amazonensis in vitro*. Adicionalmente as frações separadas, derivadas da fração R2, chamadas de H3 e H4, não apresentaram este efeito de inibição total (FARDIN, 2013). A partir deste resultado, sugerimos que estas frações, derivadas da fração R2, agiam em conjunto para inibir totalmente a proliferação de *L. amazonensis in vitro*. Para verificarmos esta hipótese, inicialmente foi feito um ensaio de sinergismo com as frações H3 e H4. Neste ensaio foram usados 45 µg/mL de cada fração, o que dá uma concentração final de 90 µg/mL. No trabalho prévio, havíamos usado 150 µg/mL da fração R2 e foi obtido 100% de inibição da proliferação do protozoário. Na figura 7 observamos que o grau de inibição obtido com as frações H3 e H4 separadas, passou de 44 e 58%, respectivamente, no tempo de 48h (FARDIN, 2013) para 97,7% quando as frações H3 e H4 encontravam-se reunidas (figura 8), no mesmo tempo. Apesar de não termos usados a mesma concentração da fração R2 (150 µg/mL), devido à dificuldade de acumular as frações separadas, percebemos que as duas frações reunidas quase alcançaram a inibição de 100%, portanto concluímos com este ensaio que as frações agiam em sinergismo.

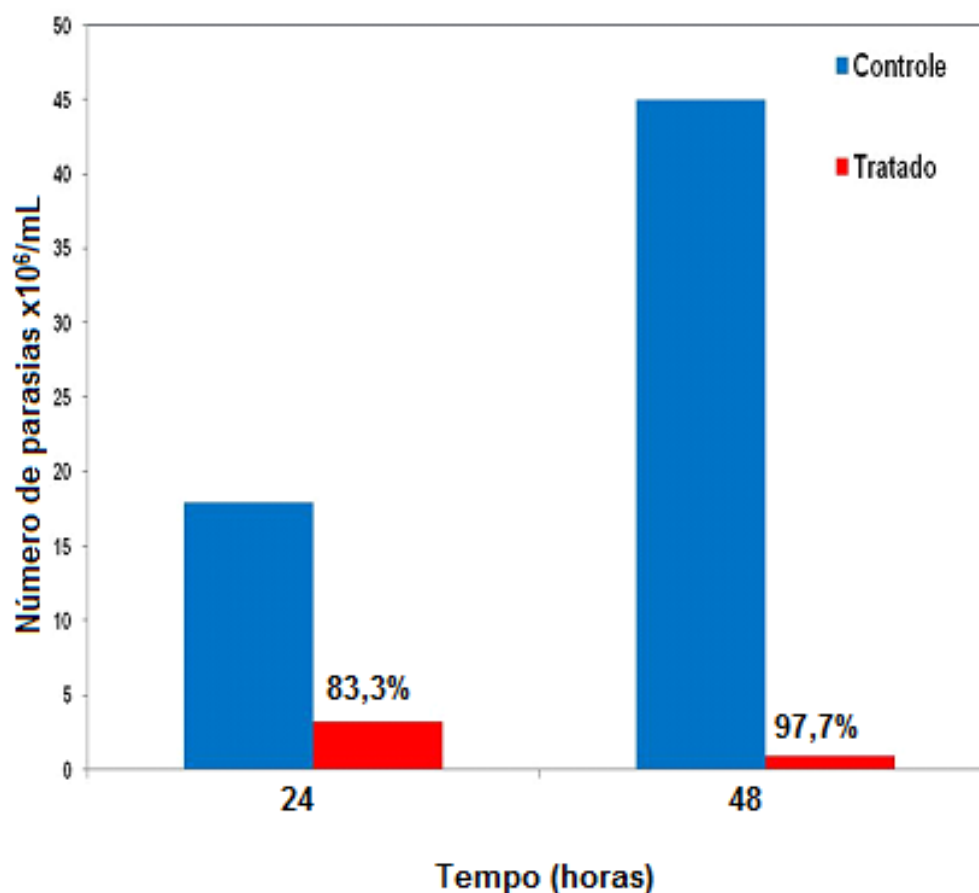


Figura 8 - Ensaio de sinergismo das frações H3 e H4 obtidas a partir da fração R2 de sementes de castanha-do-pará em cromatografia de fase reversa em sistema HPLC sobre *Leishmania amazonensis*. Acima da barra do teste são mostrados os valores percentuais de inibição do crescimento dos protozoários em relação ao seu respectivo controle. Concentração de 90 µg/mL (H3 + H4), sendo 45 µg/mL de cada fração. Número de células iniciais: $1,4 \times 10^6$ células/mL. Experimento feito apenas uma vez.

A partir deste resultado, escolhemos por trabalhar com a fração anterior que provocava 100% de inibição da proliferação celular, a fração R2. Assim foi realizada a determinação da mínima concentração inibitória (MIC) da fração R2 sobre *L. amazonensis*. Para tal foi feito uma curva utilizando as concentrações de 150, 75 e 37,5 µg/mL. O ponto de 150 µg/mL, como foi visto em FARDIN (2013), apresentou 100% de inibição da proliferação celular e foi o único ponto em que obtivemos este resultado máximo de inibição, observado desde o tempo de 24 h. Portanto, foi adotado como MIC, dentro das condições testadas, o valor de 150 µg/mL (Figura 9).

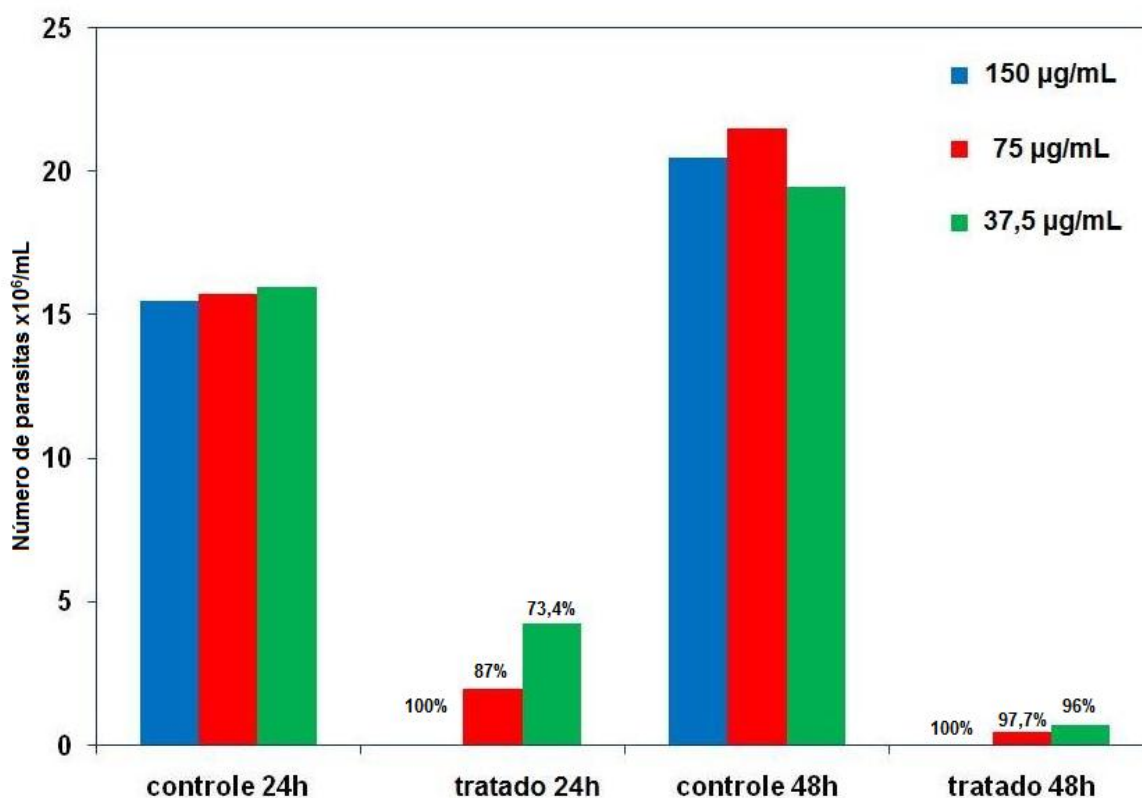


Figura 9 - Ensaio de avaliação da mínima concentração inibitória da fração R2 sobre *Leishmania amazonensis*. Acima da barra do teste são mostrados os valores percentuais de inibição do crescimento dos protozoários em relação ao seu respectivo controle. Número de células iniciais: $1,5 \times 10^6$ células/mL. Experimento feito com $n=1$.

4.2. Mecanismo de ação

Após a determinação da MIC (150 µg/mL) foi feito um teste para a determinação da viabilidade celular com o intuito de determinarmos se o efeito inibitório era causado por morte celular ou pela inibição do crescimento celular. Na figura 10 foi observado que existe um pequeno retorno da viabilidade celular, caracterizado por 4,7% e 8,7% de retorno do crescimento celular para os tempos de 24 e 48 h, respectivamente.

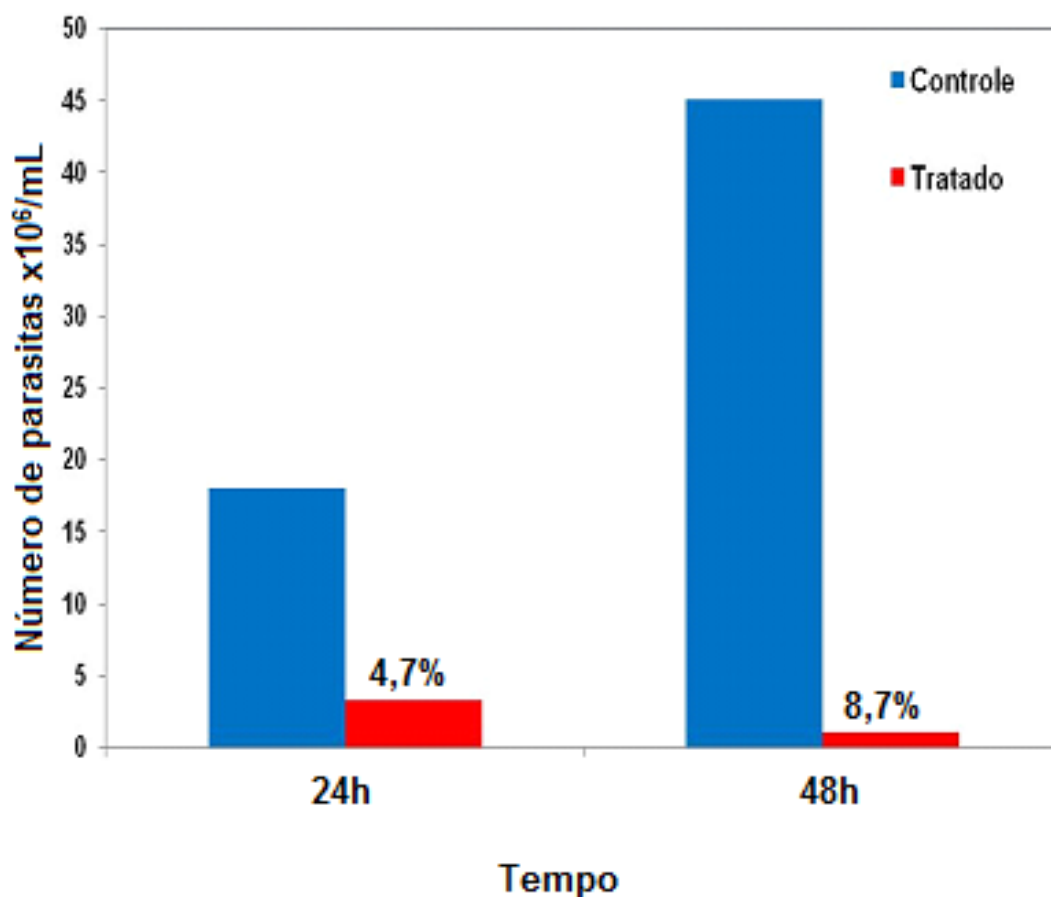


Figura 10 - Ensaio de avaliação da viabilidade celular de *Leishmania amazonensis* tratadas com a fração R2 na concentração de 150 µg/mL. Acima da barra do teste são mostrados os valores percentuais de inibição do crescimento dos protozoários em relação ao seu respectivo controle. Número de células iniciais: $1,5 \times 10^6$ células/mL. Experimento feito com n=1..

A partir da determinação da MIC da fração R2, começamos a investigar o seu possível mecanismo de ação sobre as células dos protozoários, sendo analisada a permeabilidade de membrana, funcionalidade mitocondrial e indução endógena de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Inicialmente foi feita uma avaliação da cinética desses mecanismos e posteriormente as células foram analisadas por microscopia de fluorescência.

Na figura 11 observamos o gráfico da cinética da permeabilização da membrana e da funcionalidade mitocondrial. O gráfico mostra que a permeabilização se inicia com aproximadamente 8 min da interação das células com a fração R2 e a partir deste momento a fluorescência aumenta até, aparentemente, os 60 min onde parece atingir um platô. A funcionalidade mitocondrial apresenta o mesmo perfil da permeabilização de membrana, porém há um estímulo da mitocôndria, indicada pelo

aumento da fluorescência, que se inicia um pouco antes, aos 6 min da interação inicial e é mais intenso do que a permeabilização, e também aos 60 min parece atingir um platô.

Na figura 12 observamos o gráfico da cinética da indução de ROS e NO. Ambos apresentam o mesmo perfil da permeabilização de membrana e funcionalidade mitocondrial. Ambos se iniciam aproximadamente após 9 min de interação e seguem sobrepostos até os 120 min, sendo que aparentemente aos 60 min parecem atingir um platô.

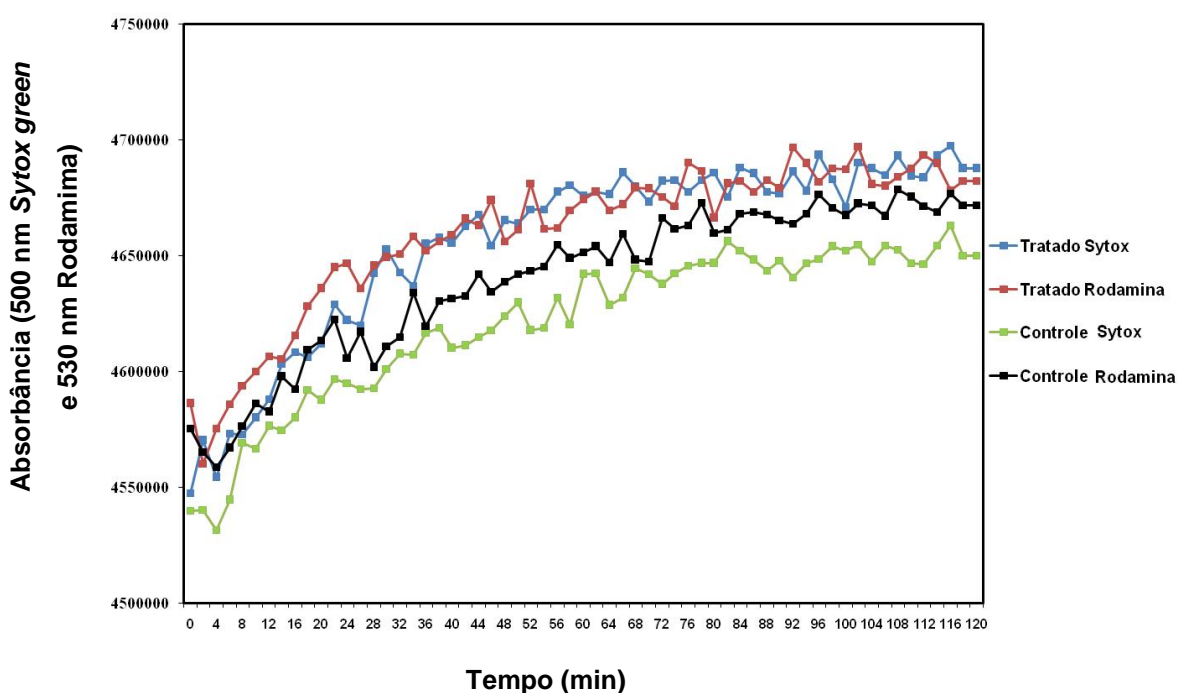


Figura 11- Ensaio de cinética da permeabilização de membrana e da alteração da funcionalidade mitocondrial em células de *Leishmania amazonensis*. Estas foram incubadas na presença de 150 µg/mL da fração R2. A fração R2 foi adicionada às células de *L. amazonensis* e imediatamente iniciaram as leituras a cada 2 min por um período total de 120 min.

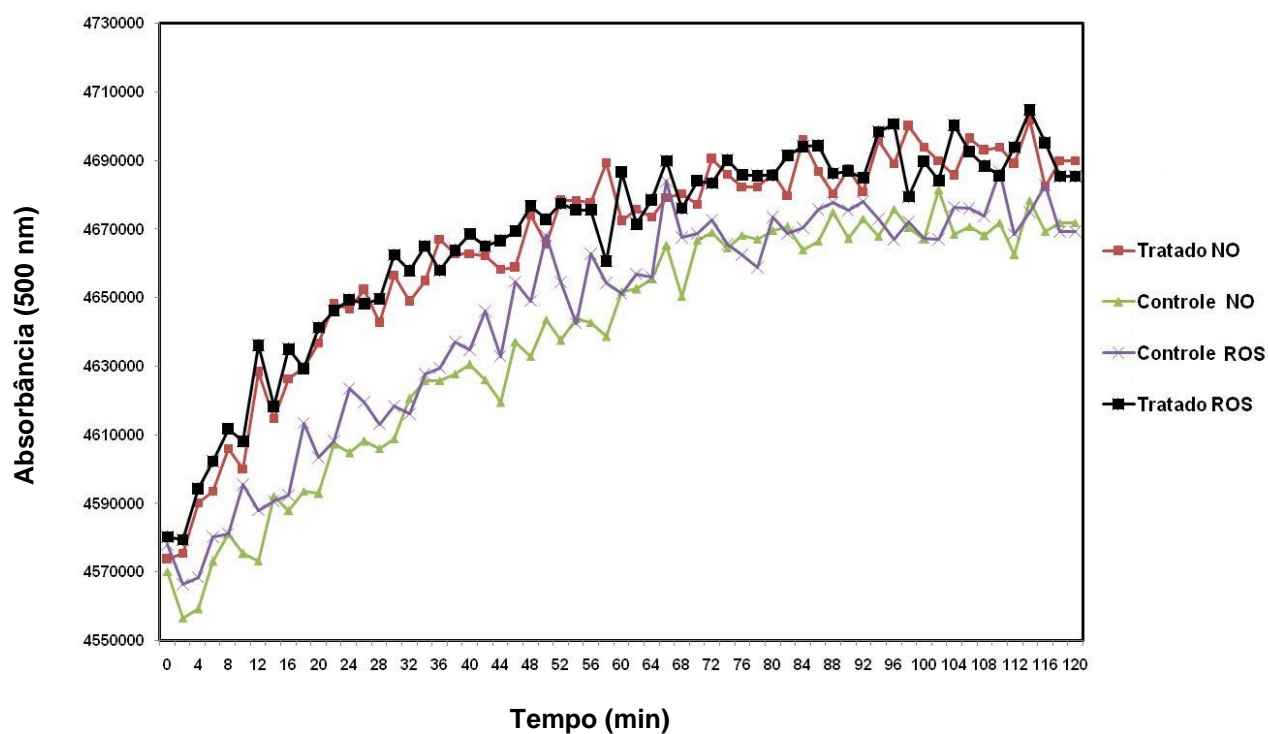


Figura 12 -Ensaio de cinética da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células de *Leishmania amazonensis*. Estas foram incubadas na presença de 150 µg/mL da fração R2. A fração R2 foi adicionada às células de *L. amazonensis* e imediatamente se iniciou as leituras a cada 2 min por um período total de 120 min.

Após a realização dos testes de cinética, as células provenientes destes ensaios foram visualizadas por microscopia de fluorescência. Corroborando com os dados mostrados na figura 11 e 12 foi observado que algumas células do tratado ficaram fluorescentes, indicando que a membrana do parasita sofreu algum dano permitindo dessa forma a entrada do corante nas células (Figura 13).

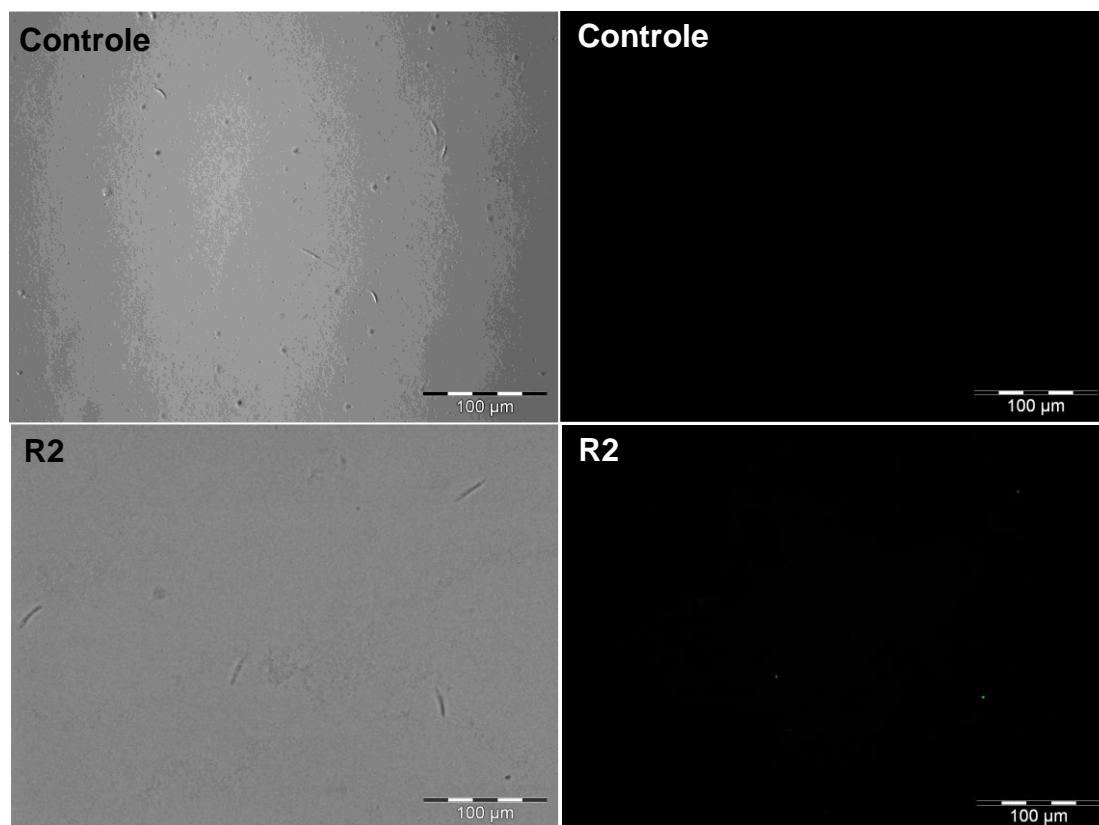


Figura 13 - Fotomicrografia por microscopia de fluorescência das células da *Leishmania amazonensis* tratadas com *Sytox green* ao final do ensaio de cinética na presença de 150 µg/mL da fração R2.

Em relação ao teste de funcionalidade mitocondrial (com rodamina 123), pode-se observar na figura 14 que as células tratadas apresentaram aumento na marcação do corante quando comparadas ao controle, corroborando com os dados obtidos pela cinética e indicando alguma alteração na funcionalidade mitocondrial.

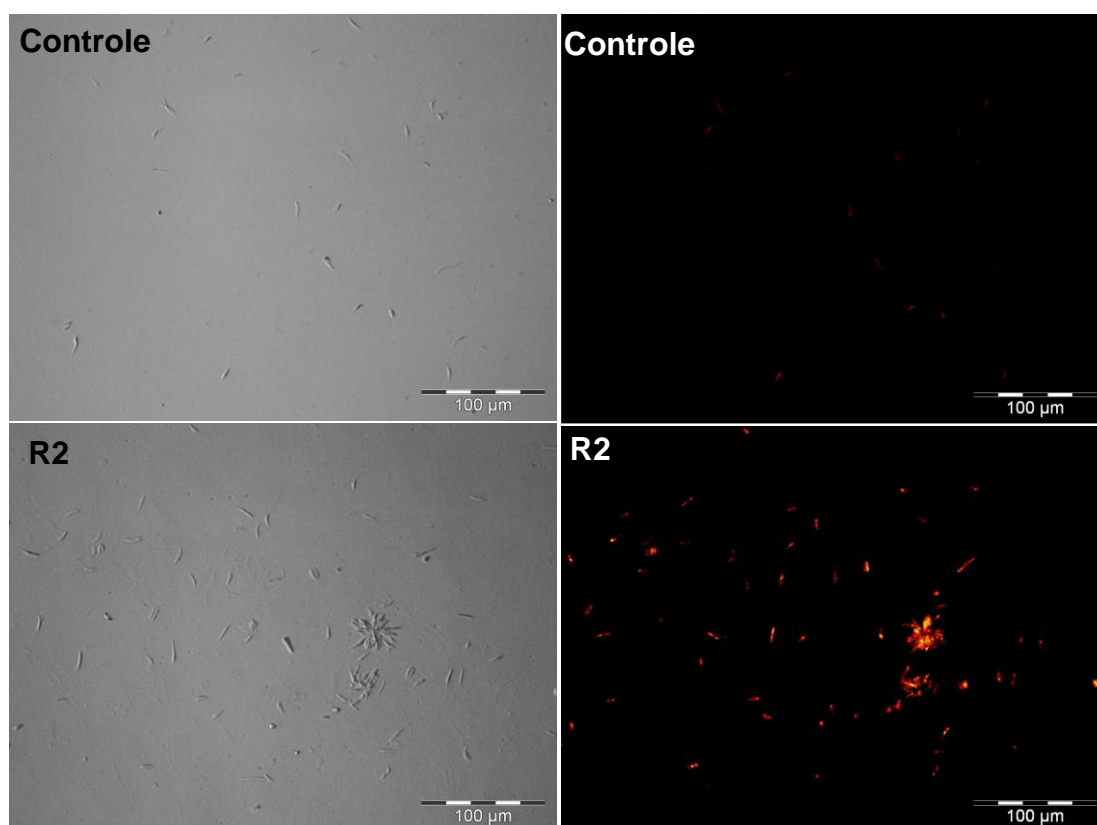


Figura 14 - Fotomicrografia por microscopia de fluorescência das células de *Leishmania amazonensis* tratadas com Rhodamina 123 ao final do ensaio de cinética na presença de 150 µg/mL da fração R2.

Em relação ao teste de indução de ROS (com 2',7' diclorofluoresceína diacetato), pode-se observar na figura 15 que as células tratadas apresentaram aumento na marcação do corante quando comparadas ao controle. Indicando aumento na produção de ROS.

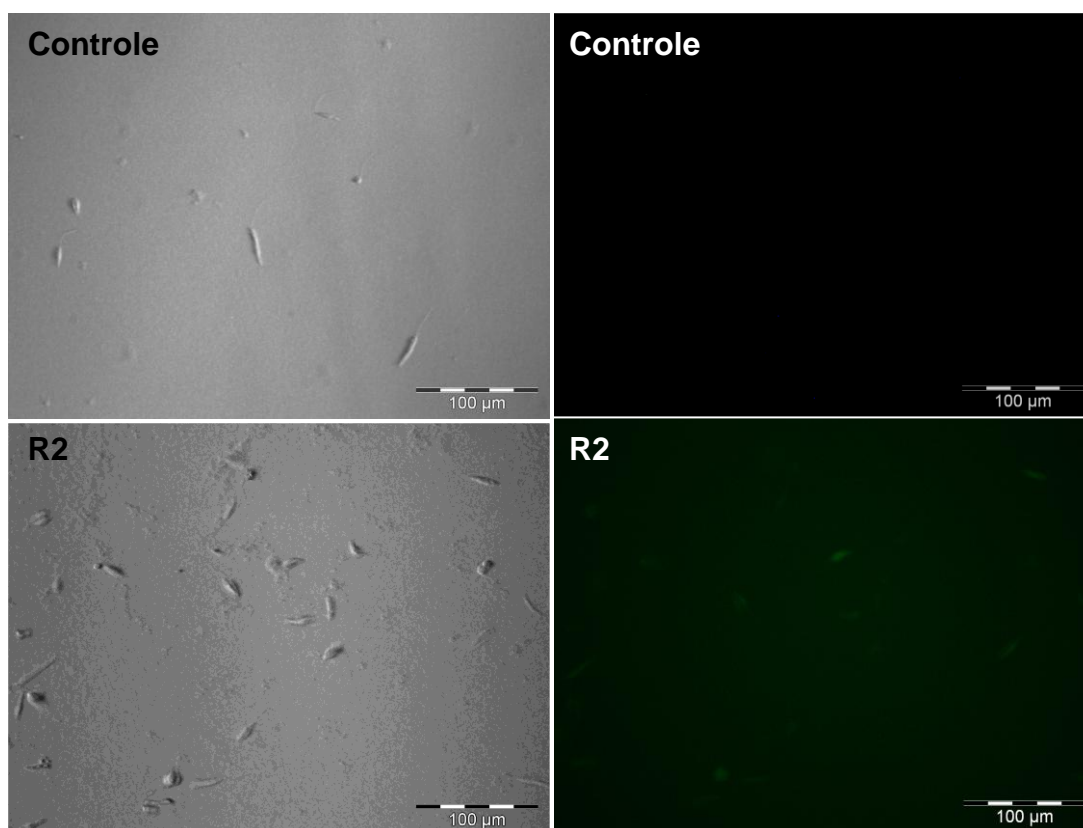


Figura 15 - Fotomicrografia em microscopia de fluorescência das células de *Leishmania amazonensis* tratadas com 2',7' diclorofluoresceína diacetato para detecção de ROS ao final do ensaio de cinética na presença de 150 µg/mL da fração R2.

Em relação ao teste de indução de NO (com 3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato), pode-se observar na figura 16 que as células tratadas apresentaram marcação do corante quando comparadas ao controle. Indicando produção de NO.

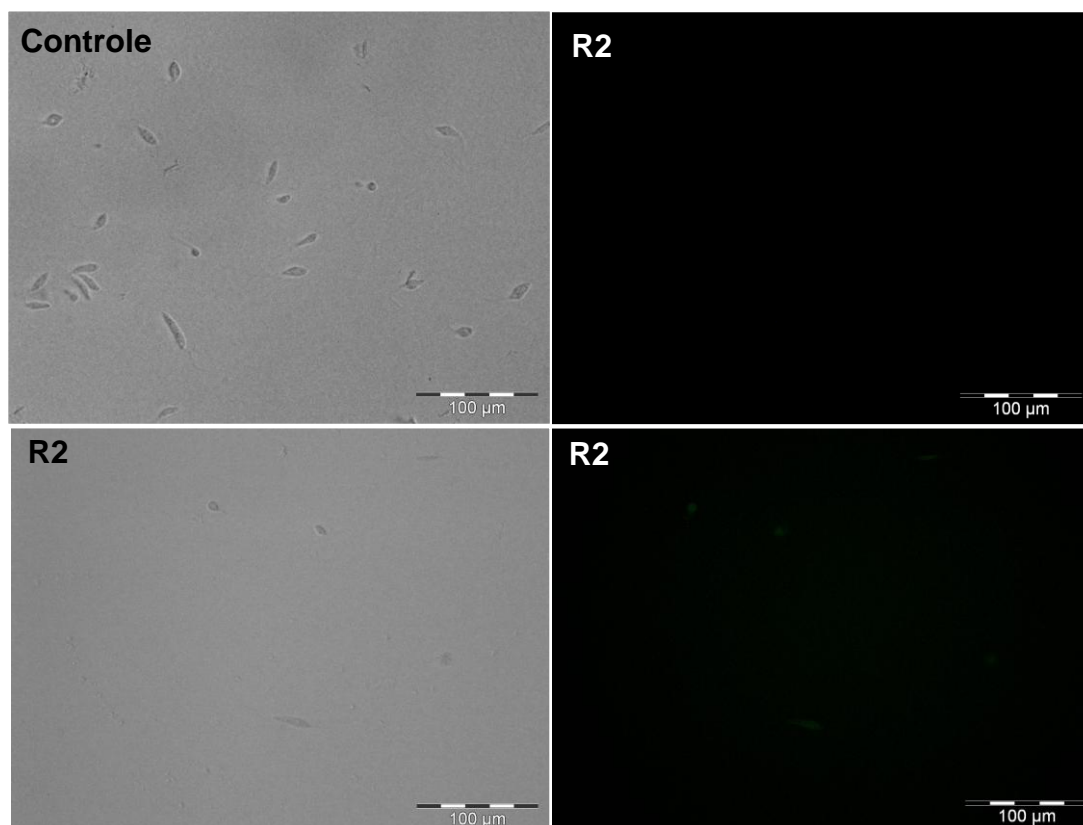


Figura 16. Fotomicrografia em microscopia de fluorescência das células de *Leishmania amazonensis* tratadas com 3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato para detecção de NO ao final do ensaio de cinética na presença de 150 µg/mL da fração R2.

4.3. Caracterização peptídica

Paralelamente aos testes de atividade biológica, a partir do resultado de sinergismo, iniciamos os experimentos para caracterizar peptídeos que compunham as frações H3 e H4, tal que a fração H3 foi escolhida para sequenciamento por ser recuperada do processo de purificação em maior quantidade. Esta foi inicialmente aplicada em uma coluna C18 acoplada a uma coluna guarda C8 por sistema HPLC, sem utilizar a metodologia de redução e alquilação (para rompimento das pontes dissulfeto), para servir de um padrão da redução e da alquilação. Na figura 17 observa-se o cromatograma obtido desta cromatografia por sistema HPLC, na qual foi visualizada a fração NR, uma fração não retida (NR) e uma fração retida (H3*) e eluída de acordo com um gradiente de propanol, sendo esta composta de um único pico.

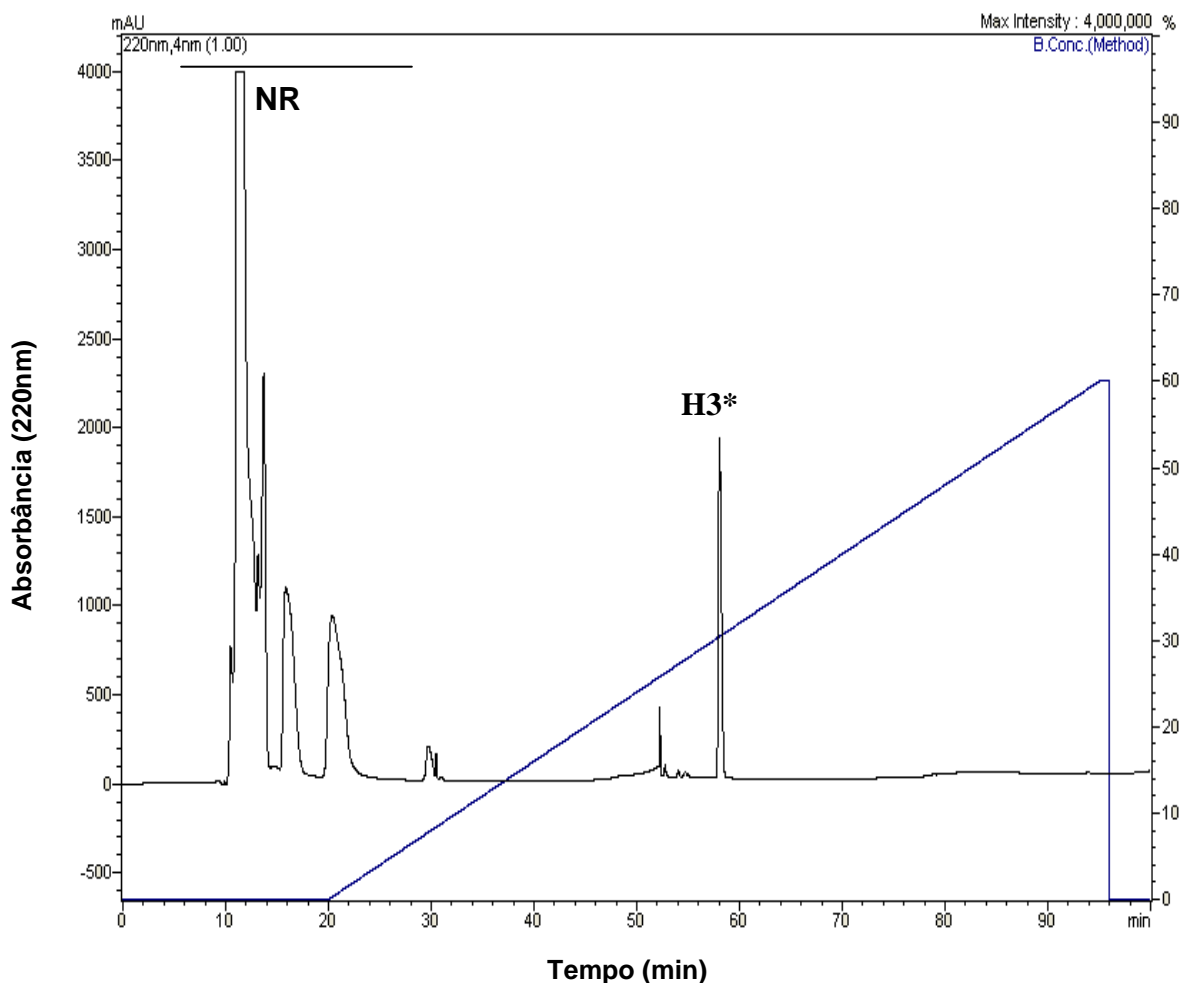


Figura 17 - Cromatograma da fração H3* em coluna de fase reversa C18 por sistema HPLC sem passar pelo processo de redução e alquilação. A coluna estava equilibrada em solução TFA 0,1%, e o gradiente foi feito com concentrações crescentes de propanol (linha oblíqua). NR - fração não retida, H3* - fração retida e eluída em gradiente de propanol. A fração H3* apresentou um pico majoritário com tempo de retenção de aproximadamente 58 min. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220 ± 4 nm.

Na figura 18 observa-se o cromatograma obtido quando foi aplicada a fração H3* após ter sido alquilada e reduzida, sendo utilizada a mesma coluna e o mesmo método. Com este tratamento obtivemos três frações, uma fração não retida (NR) e duas frações retidas e eluídas com um gradiente de propanol, denominadas A1 e A2. Este resultado indica que a proteína da fração H3*, que apresentou um único pico sem o tratamento de redução e alquilação (Figura 17), possui duas subunidades ligadas por pontes dissulfeto que foram separadas com o tratamento de redução e alquilação.

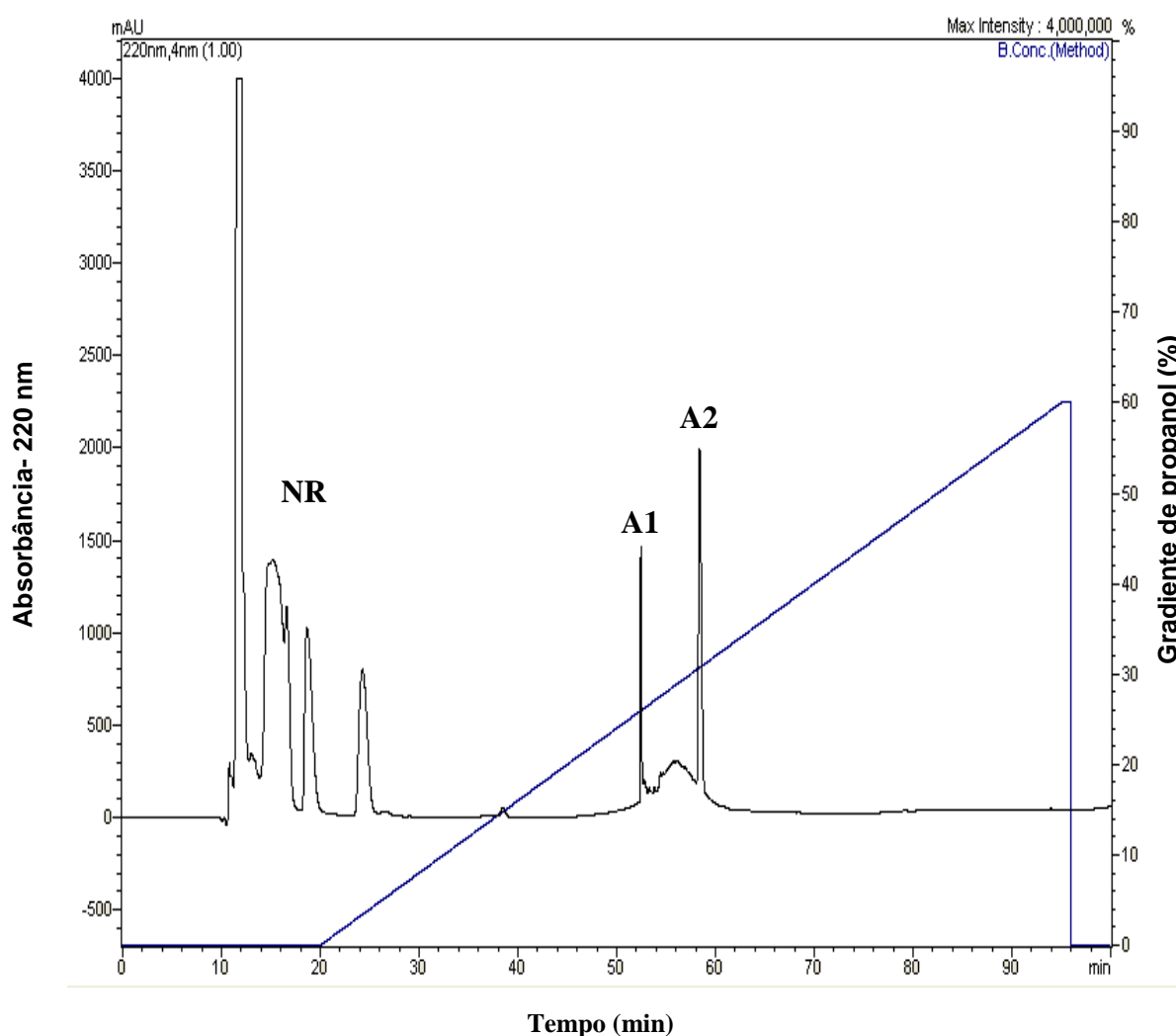


Figura 18 - Cromatograma da fração H3*, após redução e alquilação, em coluna de fase reversa C18 por sistema HPLC. A coluna estava equilibrada em solução TFA 0,1%, e o gradiente foi feito com concentrações crescentes de propanol (linha oblíqua). NR - fração não retida, A1 e A2- frações retidas e eluídas em gradiente de propanol. A fração H3*, reduzida e alquilada, resultou em dois picos majoritários com tempos de retenção de aproximadamente 53 e 58 min. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220 ± 4 nm.

Na figura 19 observou-se a eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida das amostras obtidas da cromatografia de fase reversa das amostras provenientes do tratamento com a alquilação e redução das pontes dissulfeto assim como da fração controle. A fração A1 apresentou uma banda no valor de aproximadamente 7 kDa e a fração A2 apresentou banda com aproximadamente 12 kDa. A fração H3*, que serviu de controle do tratamento de redução e alquilação, apresentou as duas bandas na mesma raia. Este resultado indica que a proteína da amostra H3* é composta por pelo menos duas subunidades.

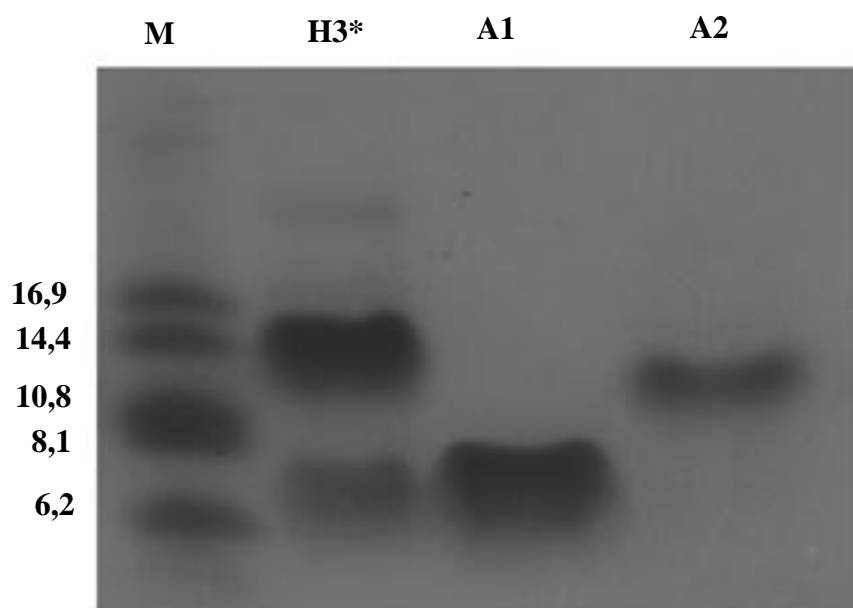


Figura 19 - Visualização eletroforética das frações H3*, A1 e A2 obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC, utilizando a metodologia de redução e alquilação. H3* - fração retida e eluída com gradiente de propanol da cromatografia de fase reversa e não submetida a redução e alquilação. A1 e A2 - frações retidas e eluídas com gradiente de propanol da cromatografia de fase reversa oriundo do H3* submetido ao método de redução e alquilação. M, marcador de baixa massa molecular indicada em kDa. Gel corado com Coomassie.

Essas bandas, submetidas ao processo de redução e alquilação (A1 e A2), foram submetidas ao processo de sequenciamento por degradação de Edman. Para a banda A1 não obtivemos resultado no sequenciamento. Já a banda A2 foi parcialmente sequenciada e foram obtidos seus nove aminoácidos iniciais (Figura 20). Tal sequência, quando comparada em banco de dados de proteínas, apresentou baixa similaridade com a família das albuminas 2S. Outras tentativas de sequenciamento foram feitas, porém não obtivemos resposta positiva do experimento. Deste modo a caracterização desta proteína como sendo uma albumina 2S foi inconclusiva.

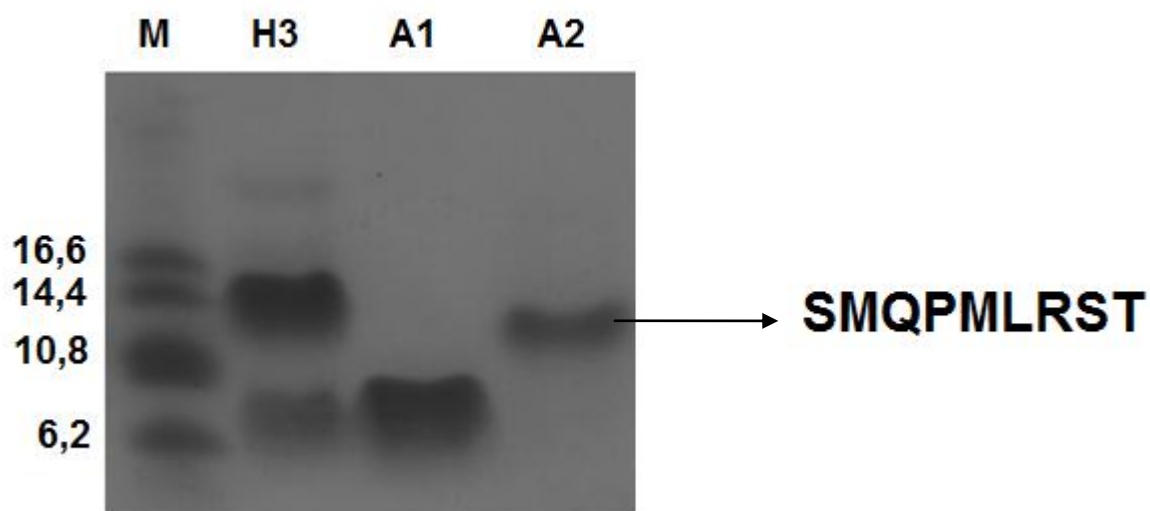


Figura 20 - Sequência da banda A2 proveniente do processo de redução e alquilação. M, marcador de baixa massa molecular indicada em kDa. Gel corado com Coomassie.

Visto que as frações H3 e H4 atuaram de maneira mais intensa quando em sinergismo e devido à dificuldade de obtenção das frações H3 e H4, escolhemos por utilizar a fração de origem, R2, para os demais ensaios.

A partir da sequência obtida, foram feitos experimentos para que pudéssemos comprovar que a fração R2 continha a albuminas 2S. Assim, foi realizado um teste da avaliação da atividade inibitória da fração R2 sobre a enzima α -amilase salivar humana. No gráfico da figura 21 é observada uma redução da atividade da enzima quando utilizada a fração R2 como inibidor.

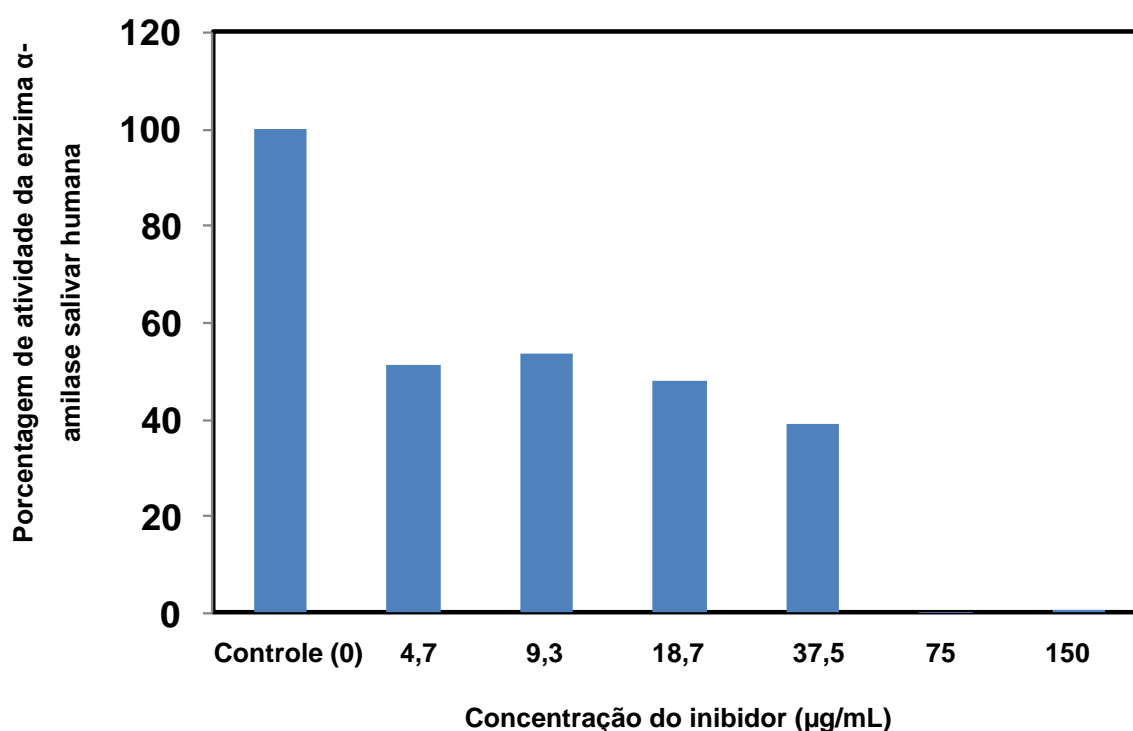


Figura 21 - Visualização gráfica do ensaio da inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana quando na presença de diferentes concentrações da fração R2. Experimento feito em triplicata.

Outro experimento realizado para comprovação da presença de uma albumina 2S foi um gel de poliacrilamida contendo a fração R2 sem a adição do β -mercaptoetanol e sem aquecimento. Como a albumina 2S é caracterizada pela presença de duas subcadeias unidas por pontes dissulfeto, acreditamos que como a fração R2 não teve suas pontes dissulfeto rompidas, as duas subunidades se uniram e originaram uma única banda proteica. Como mostrado no gel, a fração R2 não tratada com β -mercaptoetanol e sem aquecimento apresentou uma única banda proteica (Figura 22).

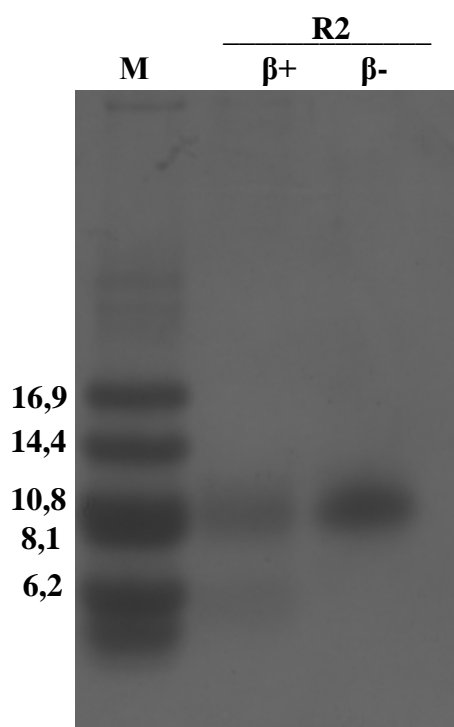


Figura 22 - Visualização eletroforética da fração R2 na presença e ausência de β -mercaptoetanol. $\beta-$, fração R2 sem tratamento com β -mercaptoetanol e aquecimento antes da aplicação no gel. $\beta+$, fração R2 com adição do β -mercaptoetanol e com aquecimento. M, marcador de baixa massa molecular indicada em kDa. Gel corado com Coomassie.

Por fim, analisamos a complexidade da amostra R2 em gel de poliacrilamida bidimensional (Figura 23). Esta amostra apresentou um perfil proteico com proteínas com pI ácidos e básicos. Pode ser visto na imagem do gel que na região de aproximadamente 6 kDa e outra com aproximadamente 10 kDa, duas faixas foram visualizadas, respectivamente. Este resultado pode indicar a presença de isoformas de proteínas.

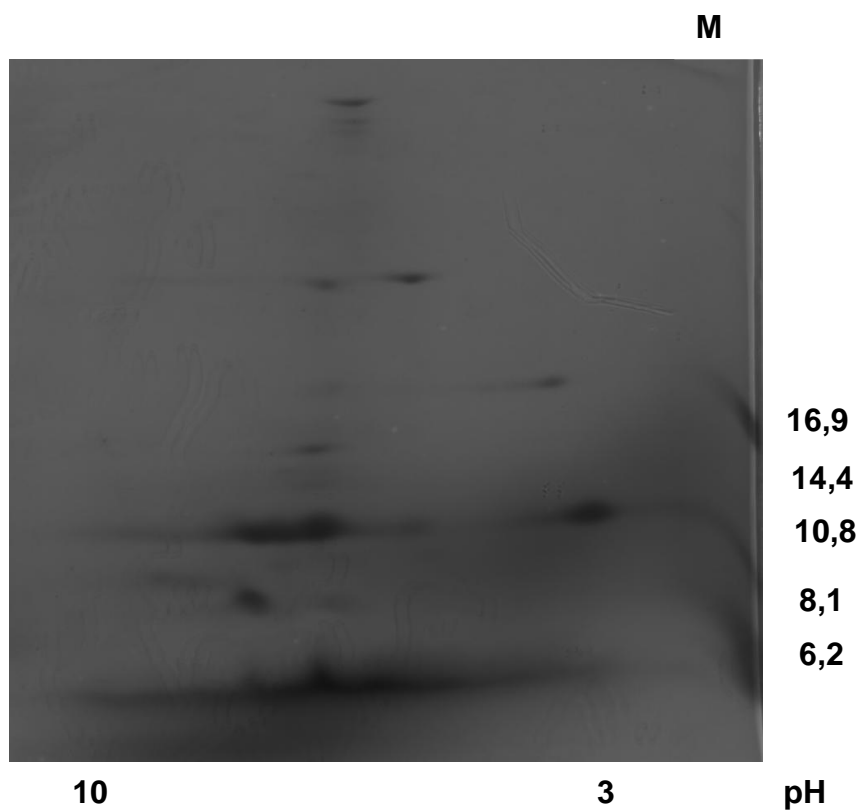


Figura 23 - Visualização eletroforética do perfil proteico da fração R2 em eletroforese bidimensional. Gel corado por Coomassie. M - Marcador de baixa massa molecular.

5. DISCUSSÃO

5.1. Atividade biológica sobre protozoário

Inicialmente, as duas frações obtidas da cromatografia de fase reversa (H3 e H4) por FARDIN (2013) tiveram, no presente trabalho, suas atividades testadas em conjunto, para verificarmos se elas agiam em sinergismo sobre a *L. amazonensis*. O resultado obtido foi de aumento da atividade inibitória quando houve a associação das duas frações. Na literatura alguns trabalhos relatam o sinergismo entre AMPs, nos quais é analisada a ação sinérgica de peptídeos com o poder de reduzir a MIC de cada peptídeo na presença do outro (YAN e HANCOCK, 2001). Em um estudo realizado por YAN e HANCOCK (2001) foi demonstrado que os AMPs indolicina bovina e protegrina de porco tiveram sua MIC reduzida quatro vezes quando os AMPs foram utilizados em associação contra bactérias. Sabe-se que a alta concentração de um AMP pode provocar toxicidade no hospedeiro podendo esta ser evitada usando os AMPs em associação. Essa associação de dois AMPs pode também ser importante para a redução de uma possível resistência a ser adquirida pelo microrganismo (FENG *et al.*, 2014). Então nossos dados assumem que a cooperação das frações proteicas, H3 e H4, foi importante para o aumento da inibição sobre as células de *L. amazonensis*.

A partir do resultado obtido do sinergismo, resolvemos retornar a utilização da fração R2 que apresentou a inibição total da proliferação celular. Esta fração teve sua MIC determinada e além da determinação da MIC, buscamos esclarecer se o efeito inibitório da fração R2 foi devido a inibição da proliferação celular ou devido à morte celular. Assim foi realizado um teste de viabilidade celular por contagem de células em câmara de Neubauer. Os resultados do presente estudo demonstraram ter havido um pequeno retorno do crescimento, no entanto, determinou-se que o efeito da fração R2 é leishmanicida. Essa conclusão foi baseada nos seguintes parâmetros. Inicialmente foi visualizada a redução do número de células de *L. amazonensis* de $1,5 \times 10^6$ células/mL, número de células inicial do ensaio no tempo de 0 h, para zero já para o tempo de 24 h nas culturas tratadas com a fração R2 a 150 µg/mL para a determinação da MIC (Figura 9). Este resultado indica que as células presentes no meio foram eliminadas. Este resultado corrobora com os resultados de um estudo feito por SOUZA *et al.* (2013), no qual foram utilizadas

células de *L. amazonensis* tratadas com defensinas de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) e o crescimento celular foi analisado em uma curva temporal entre 0, 8, 16, 24 e 32 h. Estes autores observaram que houve uma eliminação de 33,3% das células do protozoários do tempo de 0 h para 8 h. Com estes dados estes autores sugeriram que a quantidade de defensinas de *V. unguiculata* usada no ensaio de 100 µg/mL não foi suficiente para eliminar todas as células. Desta forma comparando com nosso trabalho, percebemos que o retorno do crescimento ocorreu devido ao fato de não utilizarmos a concentração letal da fração R2 e sim a MIC.

Adicionalmente, outro parâmetro que também pode ter contribuído para este retorno no crescimento é uma característica intrínseca do método de contagem que tem um limite de detecção, não sendo este que não é adequado para culturas com baixa densidade celular (MADIGAN *et al.*, 2010). Neste sentido, quando determinamos a MIC, não fomos, pelo método em questão, capazes de determinar se ainda havia células presentes na cultura ou não, porque provavelmente se havia células no meio, estas estavam abaixo do limite de detecção da técnica. Apesar do método por contagem em câmara de Neubauer ser muito utilizado, não é possível contar todos os parasitas viáveis presentes no meio. Outros autores usaram outros métodos para determinação da viabilidade celular como MARINHO *et al.* (2014). Este autor realizou o teste de viabilidade das células do protozoário através do corante Resazurin que mediu se as células estavam metabolicamente ativas quando na presença de um inibidor de calpaínas e através da redução da fluorescência das células tratadas com o inibidor foi concluído que o efeito foi leishmanicida.

Adicionalmente, outra hipótese para poder explicar este retorno do crescimento das células de *Leishmania* pode ser dada através de mecanismos que ajudam as células a minimizar a ação dos AMPs. *Leishmania* produz um glicocálice aniônico, conhecido como LPG, que se localiza na superfície da membrana e serve como barreira para impedir a entrada de AMPs (TORRENT *et al.*, 2012; EGGIMANN *et al.*, 2015). mostrou que o LPG é conhecido por modular a expressão do AMP no mosquito, vetor da *Leishmania*, assim ajudando na sobrevivência destes parasitas. Outro fator que pode ajudar a *Leishmania* a minimizar a ação de AMPs é a metaloprotease leishmanolisina (GP63). Foi reportado que a GP63 inativa proteolicamente AMPs e com isso impede a morte celular por apoptose induzida por AMP (KULKARNI *et al.*, 2006). Um estudo mostrou que uma cepa mutante de

Leishmania que não possui esta enzima se tornou mais suscetível a ação dos AMPs α -defensins e criptidina-4 (KULKARNI *et al.*, 2006).

5.2. Mecanismo de ação

Em relação ao mecanismo de ação, os AMPs podem atuar na permeabilização da membrana provocando alteração da porosidade, como consequência podem agir sobre alvos intracelulares e/ou podem gerar a ruptura da mesma (THEVISSSEN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2012).

Na tentativa de descobrir a possível causa da inibição do crescimento das células de *L. amazonensis* pela fração R2, o presente estudo mostra através do teste de cinética que a partir, aproximadamente, do décimo minuto da incubação dos protozoários, a fração R2 foi capaz de causar permeabilização da membrana de *L. amazonensis* (figura 11). Uma das consequências da permeabilização de membrana é o rápido colapso do potencial de membrana, o qual pode estar relacionado com a atividade inibitória da proliferação celular. Além disso, acredita-se que a alteração da permeabilidade esteja correlacionada com a redução dos níveis de ATP intracelular, com o desbalanço dos íons de Na^+ e K^+ e, com o aumento do *Sytox green* no meio intracelular, refletindo na perturbação da membrana (MANGONI *et al.*, 2005). Em contrapartida, a baixa marcação do corante visualizada por microscopia pode estar relacionada com o baixo tempo de exposição (120 min), visto que FARDIN (2013), verificou que no tempo de 24 h, ocorreu uma alta marcação do corante. De acordo com LEQUIN *et al.* (2006), quando aumentou-se o tempo de exposição do AMP sobre determinado microrganismo, a permeabilização da membrana consequentemente aumenta também. Por fim, a maioria dos estudos de AMPs em células de *Leishmania*, mostram que o principal mecanismo de ação é a atuação sobre a membrana e a perda da integridade da mesma (CHICHARRO *et al.*, 2001; MANGONI *et al.*, 2005; LUQUE-ORTEGA *et al.*, 2008).

Ao analisar o mecanismo de permeabilização de membrana, é conhecido que várias alterações ocorrem como consequência dessa permeabilização, como por exemplo, a alteração das bombas de ATP e consequente alteração funcional da mitocôndria das células. Em FARDIN (2013), quando as células de *L. amazonensis* foram tratadas com uma fração proteica da semente *B. excelsa*, ocorreu no tempo de 24 h, além da permeabilização de membrana, houve uma redução da atividade

mitocondrial. Já no presente estudo, a atividade mitocondrial teve um aumento bastante considerado, o qual teve início em 10 min e se prolongou por 2 h de duração do ensaio. Deste modo não foi possível determinar em qual tempo a função mitocondrial sofre diminuição. Acredita-se que esta diferença da atividade mitocondrial de 10 min a 2 h seja pelo tempo de exposição das células ter sido muito menor que o tempo mostrado por FARDIN (2013), com isso, podemos sugerir que a célula estava tentando repor o equilíbrio eletroquímico perdido quando houve adição da fração R2. GUERRERO *et al.* (2004) mostraram que células de *L. donovani* tratadas com mangaininas tiveram a funcionalidade da mitocôndria afetada. Essa alteração foi relacionada com a despolarização da membrana e com isso as ATPases ficaram ativadas para tentar recuperar a polarização e com isso, a célula sofreu um desequilíbrio químico do gasto de ATP.

Com relação à morte do parasita pela presença dos AMPs, sabe-se que diferentes tipos de AMPs podem provocar a apoptose das células de *Leishmania* através de um massivo transporte de cálcio das organelas citoplasmáticas como os acidocalcissomos e glicosomos para o citoplasma, assim gerando toxicidade mitocondrial. No entanto, é importante ressaltar que nem todo desequilíbrio químico e perturbação na membrana provocam danos à mitocôndria. Em BERROCAL-LOBO *et al.* (2009) percebeu-se que houve manutenção do potencial eletroquímico mitocondrial durante o tempo estudado, pelo menos durante o intervalo em que ocorre a queda de ATP, descartando assim a ação inibitória das tioninas sobre a mitocôndria.

A partir do processo de permeabilização da membrana e consequente alteração da função mitocondrial, outros processos de alterações celulares são desencadeados como forma da célula tentar retomar a sua atividade normal. Em HELMERHORST *et al.* (2001), o AMP histatina provocou a morte da levedura *Candida albicans* mediado pela ação mitocondrial, foi provado que esta ação promoveu a geração de ROS e a subseqüentemente morte celular, devido à oxidação de macromoléculas celulares e perda da integridade celular.

No nosso trabalho, a fração R2 provocou produção de ROS, o que pode estar relacionado com um desequilíbrio da atividade pró-oxidante e anti-oxidante (JAMIESON, 1998). Estudos descrevem a mitocôndria como principal fonte de ROS, de modo que estas moléculas são geradas por processos de redução de oxigênio,

como por exemplo, durante a cadeia transportadora de elétrons (JEŽEK e HLAVATÁ, 2005; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Nossos resultados corroboram com estes dados, visto que ao analisar os gráficos de cinética da produção de ROS e da atividade mitocondrial (figura 11 e 12), ocorre um estímulo de ROS logo após o estímulo mitocondrial. E esse aumento da produção de ROS promove subsequentemente a morte celular por oxidação das macromoléculas e perda da integridade celular (VEERMAN *et al.*, 2004). Já é conhecido que ROS são moléculas que aparecem nos momentos iniciais do processo apoptótico. Estudos têm demonstrado que o aumento de ROS no meio pode ser tóxico aos organismos, levando à destruição de vários tipos celulares através de vias apoptóticas (AERTS *et al.*, 2007; MAIESE *et al.*, 2010; VRIENS *et al.*, 2014). Dados da literatura corroboram com esse efeito da produção de ROS por AMPs. Em HWANG *et al.* (2011) foi visto que um peptídeo semelhante à tionina, isolado de besouro, também mostrou capacidade de aumentar o nível de ROS endógeno em células de *C. albicans* (HWANG *et al.*, 2011). Porém estudos sobre a produção dessas moléculas a partir da exposição de células de *Leishmania* a AMPs ainda são pouco descritos. Em SARDAR *et al.* (2013), um AMP extraído do epitélio intestinal de inseto, teve seu mecanismo de ação avaliado pelo aumento da produção de ROS em células de *L. donovani*.

Outra via de estresse oxidativo para a indução da morte celular é a produção de NO. Estudos indicaram que o NO possui diversas funções biológicas, dentre elas a morte de patógenos. Nosso estudo mostrou o aumento da produção de NO através da marcação do corante específico (FIGURA 12), o qual também ocorreu aproximadamente aos 9 min, como na indução de ROS. Acredita-se que seja pelo mesmo motivo discutido anteriormente. Estudos mostram a produção dessas espécies quando a célula se encontra em situação de defesa. RIBEIRO *et al.* (2012) mostraram que um inibidor de tripsina de 6 kDa, denominado *CaTI*, isolado de sementes *Capsicum annuum*, foi capaz de causar a indução de NO nas células das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *C. albicans* e *Kluyveromyces marxianus*. Porém em células de *Leishmania* essa produção de NO por AMPs é ainda pouco conhecida.

Sabe-se que as doenças causadas por parasitas representam uma ameaça para a saúde humana. Apesar do desenvolvimento de diferentes fármacos com a

finalidade de erradicar essas doenças, um que seja totalmente eficaz ainda não foi descoberto. Com isso, os AMPs têm sido visualizados como ferramentas terapêuticas alternativas para o controle destas doenças, principalmente devido ao seu amplo espectro de ação (MARR *et al.*, 2012). No entanto, mais pesquisas precisam ser feitas, para que seja possível um melhor entendimento do mecanismo de ação desses peptídeos, especificamente, em relação aos seus alvos intracelulares.

5.3. Caracterização proteica

A partir do teste de sinergismo com as frações H3 e H4, iniciou-se o processo de caracterização dessas frações. Apesar da sequência de aminoácidos obtida ter sido pequena, conseguimos verificar uma baixa homologia com albuminas 2S. Estas são o maior grupo de proteínas de reserva de sementes, tanto em plantas monocotiledôneas quanto em plantas dicotiledôneas. São depositadas nos corpos proteicos das sementes em desenvolvimento e são utilizadas como fontes de nutrientes (aminoácidos e esqueletos carbônicos) durante a germinação e crescimento do embrião (AGIZZIO *et al.*, 2006; MORENO e CLEMENTE, 2008). Vale ressaltar que em MORENO *et al.* (2004) ocorre a caracterização de albuminas 2s presente em sementes de castanha-do-pará.

Em MORENO *et al.* (2004), foi observado que um pico da fração nativa da albuminas 2S deu origem a dois picos quando a fração foi submetida a um processo de redução, sugerindo o rompimento de suas pontes dissulfeto foram rompidas. Quando comparamos com nosso trabalho, os perfis cromatográficos foram semelhantes. Além disso, sabe-se que a utilização de uma coluna de fase reversa em sistema de HPLC é capaz de separar as duas subunidades dessa proteína (AMPE *et al.*, 1986).

Diante dessas informações, foram feitos testes para comprovar a possível presença da albumina 2S. Esta proteína, pertencente a superfamília das prolaminas, tem como uma das suas atividades biológicas possíveis a atividade inibitória da enzima α -amilase salivar humana (NASCIMENTO *et al.*, 2011). A partir desta informação realizamos um teste de atividade da fração R2, no qual obtivemos resultado positivo de inibição da enzima α -amilase salivar. Em NASCIMENTO *et al.*, 2011, avaliaram a atividade inibitória de α -amilase salivar de insetos por albuminas

2S de *Ricinus communis*, observando que estas proteínas se mostraram fortes inibidores quando comparados com inibidores de outras fontes, como inibidores encontrados em insetos e mamíferos (PAYAN, 2004; PRIYA *et al.*, 2010).

Além da fração R2 apresentar atividade sobre a enzima α -amilase salivar, foi feito um gel de poliacrilamida no qual a fração R2 não foi submetida ao aquecimento e não foi adicionado o reagente β -mercaptoetanol, ambos responsáveis por degradar ligações químicas, como as pontes dissulfeto. As albuminas 2S são caracterizadas pela presença de oito resíduos de cisteínas conservados que formam quatro pontes dissulfeto, duas intercadeia e duas intracadeia das subunidades maiores (ERICSON *et al.*, 1986; NEUMANN *et al.*, 1996; MORENO e CLEMENTE, 2008; TOMAR *et al.*, 2014). Em MORENO *et al.* (2004), as albuminas 2S, quando em condições não reduzidas, apresentaram apenas 1 banda proteica, de aproximadamente 12 KDa. Quando passadas pelo processo de redução, as pontes dissulfeto foram rompidas e assim a proteína passou a apresentar duas subunidades, de aproximadamente 9 KDa e 3 KDa (MORENO *et al.*, 2004).

Estudos descrevem que essas proteínas são produzidas por uma família multigênica, sendo possível em uma mesma semente a presença de diversas isoformas da proteína, dificultando assim o processo de purificação (MURTAGH *et al.*, 2003; MILLS *et al.*, 2004). Para tentar determinar a complexidade da amostra nós realizamos um gel bidimensional. Nele conseguimos observar a presença de diversas proteínas que apresentam a mesma massa molecular, porém com pIs diferentes. Possivelmente são isoformas de albuminas 2S. Em SHARMA *et al.* (2010) foi observado que as isoformas de albuminas 2S possuem massas moleculares similares, porém diferentes cargas elétricas. Em MORENO *et al.* (2004) foi observado que as albuminas 2S possuem no mínimo sete isoformas com variação de pI. Assim conseguimos concluir, com estes resultados, que possivelmente a fração R2 contém isoformas de albuminas 2S.

6. CONCLUSÃO

- As frações H3 e H4 tiveram sua atividade aumentada quando houve a atuação em cooperação, assim concluiu-se o sinergismo entre as frações. Por este motivo foi determinado o retorno da utilização da fração R2 para os demais testes;
- A fração R2 teve seu MIC determinado em 150 µg/mL e o seu efeito inibitório foi caracterizado como leishmanicida;
- Em relação ao mecanismo de ação, a fração R2 causou alteração na permeabilização da membrana, aumento da atividade mitocondrial e aumento da produção de ROS e NO em células de *L. amazonensis*;
- A caracterização dos peptídeos da fração R2 foi indicativa da presença de isoformas de albuminas 2S visto que houve parcial homologia da sequência, atividade inibitória da enzima α -amilase comparável com outras albuminas 2S e seu perfil eletroforético é característico aos observados para tal família de proteínas.

7. REFERÊNCIAS

- ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I. R.; PAIS, J. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon*, v. 69, p. 227-239, 2013.
- AERTS, A. M.; FRANÇOIS, I. E.; MEERT, E. M.; LI, Q.-T.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 243-247, 2007.
- AGIZZIO, A. P.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, S. F.; GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant science*, v. 171, n. 4, p. 515-522, 2006.
- ALBEROLA, J.; RODRIGUEZ, A.; FRANCINO, O.; ROURA, X.; RIVAS, L.; ANDREU, D. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 48, n. 2, p. 641-643, 2004.
- ALCOCER, M.; RUNDQVIST, L.; LARSSON, G. Ber e 1 protein: the versatile major allergen from Brazil nut seeds. *Biotechnology letters*, v. 34, n. 4, p. 597-610, 2012.
- ALLEN JR, C. C. *Chromatography*: Google Patents 1987.
- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; TEAM, W. L. C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMAZÔNIA, P. D. Acre, Amazonas e Pará lideram produção de Castanha-do-Brasil no país. 2015. Disponível em: < <http://www.portalamazonia.com.br/editoria/atualidades/acre-amazonas-e-paralideram-producao-da-castanha-do-brasil-no-pais/> >.
- AMPE, C.; DAMME, J.; CASTRO, L. A.; SAMPAIO, M. J. A.; MONTAGU, M.; VANDEKERCKHOVE, J. The amino-acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK). *European journal of biochemistry*, v. 159, n. 3, p. 597-601, 1986.
- AOKI, W.; KURODA, K.; UEDA, M. Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 114, n. 4, p. 365-370, 2012.
- BADER, M. W.; SANOWAR, S.; DALEY, M. E.; SCHNEIDER, A. R.; CHO, U.; XU, W.; KLEVIT, R. E.; LE MOUAL, H.; MILLER, S. I. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, v. 122, n. 3, p. 461-472, 2005.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.
- BALLS, A.; HALE, W.; HARRIS, T. Further observations on a crystalline wheat protein. *Cereal Chem*, v. 19, p. 840-844, 1942.
- BALTZER, S. A.; BROWN, M. H. Antimicrobial peptides—promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, v. 20, n. 4, p. 228-235, 2011.
- BANULS, A.-L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in parasitology*, v. 64, p. 1-458, 2007.
- BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. *The Lancet*, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British medical bulletin*, p. lds031, 2012.

BENKO-ISEPPON, A. M.; LINS GALDINO, S.; CALSA, J.; AKIO KIDO, E.; TOSSI, A.; CARLOS BELARMINO, L.; CROVELLA, S. Overview on plant antimicrobial peptides. *Current Protein and Peptide Science*, v. 11, n. 3, p. 181-188, 2010.

BERA, A.; SINGH, S.; NAGARAJ, R.; VAIDYA, T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 127, n. 1, p. 23-35, 2003.

BERNFELD, P. [17] Amylases, α and β . *Methods in enzymology*, v. 1, p. 149-158, 1955.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.; GARCÍA-OLMEDO, F.; RIVAS, L. *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Experimental parasitology*, v. 122, n. 3, p. 247-249, 2009.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International journal for parasitology*, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, 2007.

BJELLQVIST, B.; EK, K.; RIGHETTI, P. G.; GIANAZZA, E.; GÖRG, A.; WESTERMEIER, R.; POSTEL, W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of biochemical and biophysical methods*, v. 6, n. 4, p. 317-339, 1982.

BOMMARIUS, B.; JENSSEN, H.; ELLIOTT, M.; KINDRACHUK, J.; PASUPULETI, M.; GIEREN, H.; JAEGER, K.-E.; HANCOCK, R.; KALMAN, D. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides*, v. 31, n. 11, p. 1957-1965, 2010.

BOULANGER, N.; LOWENBERGER, C.; VOLF, P.; URSIC, R.; SIGUTOVA, L.; SABATIER, L.; SVOBODOVA, M.; BEVERLEY, S. M.; SPÄTH, G.; BRUN, R. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and immunity*, v. 72, n. 12, p. 7140-7146, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F.; CAMMUE, B. P.; DE BOLLE, M. F.; THEVISSSEN, K.; DE SAMBLANX, G. W.; OSBORN, R. W.; NIELSON, K. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 16, n. 3, p. 297-323, 1997.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BRUMFITT, W.; SALTON, M. R.; HAMILTON-MILLER, J. M. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, n. 5, p. 731-734, 2002.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—a concise review. *Peptides*, v. 28, n. 5, p. 1144-1153, 2007.

CARVALHO, A.O.; Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, v. 30, n. 5, p. 1007-1020, 2009.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Plant defensins and defensin-like peptides-biological activities and biotechnological applications. *Current pharmaceutical design*, v. 17, n. 38, p. 4270-4293, 2011.

CASTRO, M. S.; FONTES, W. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, v. 12, n. 1, p. 11-16, 2005.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; DA SILVA, A. C. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Frontiers in immunology*, v. 5, 2014.

CHADBOURNE, F. L.; RALEIGH, C.; ALI, H. Z.; DENNY, P. W.; COBB, S. L. Studies on the antileishmanial properties of the antimicrobial peptides temporin A, B and 1Sa. *Journal of Peptide Science*, v. 17, n. 11, p. 751-755, 2011.

CHANG, K.-P.; MCGWIRE, B. S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid biology and disease*, v. 1, n. 1, p. 1, 2002.

CHANG, K.-P.; REED, S. G.; MCGWIRE, B. S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta tropica*, v. 85, n. 3, p. 375-390, 2003.

CHICHARRO, C.; GRANATA, C.; LOZANO, R.; ANDREU, D.; RIVAS, L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA (1-7) M (2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 45, n. 9, p. 2441-2449, 2001.

CHOI, S.-K.; PARK, S.-Y.; KIM, R.; KIM, S.-B.; LEE, C.-H.; KIM, J. F.; PARK, S.-H. Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, v. 191, n. 10, p. 3350-3358, 2009.

COBB, S. L.; DENNY, P. W. Antimicrobial peptides for leishmaniasis. *Current opinion in investigational drugs*, v. 11, n. 8, p. 868-875, 2010.

COLILLA, F.; ROCHER, A.; MENDEZ, E. Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett*, v. 270, p. 191-194, 1990.

CRUZ, I.; MORALES, M.; NOGUER, I.; RODRIGUEZ, A.; ALVAR, J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *The Lancet*, v. 359, n. 9312, p. 1124-1125, 2002.

CUDIC, M.; OTVOS JR, L. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current drug targets*, v. 3, n. 2, p. 101-106, 2002.

CUERVO, P.; DOMONT, G. B.; DE JESUS, J. B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of proteomics*, v. 73, n. 5, p. 845-867, 2010.

CUNLIFFE, R.; MAHIDA, Y. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *Journal of leukocyte biology*, v. 75, n. 1, p. 49-58, 2004.

DA SILVA, M. S.; MONTEIRO, J. P.; NUNES, V. S.; VASCONCELOS, E. J.; PEREZ, A. M.; DE HOLANDA FREITAS-JÚNIOR, L.; ELIAS, M. C.; CANO, M. I. N. *Leishmania amazonensis* Promastigotes Present Two Distinct Modes of Nucleus and Kinetoplast Segregation during Cell Cycle. *PLoS one*, v. 8, n. 11, p. e81397, 2013.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta chem. scand*, v. 4, n. 283-293, p. 7, 1950.

EGGIMANN, G. A.; SWEENEY, K.; BOLT, H. L.; ROZATIAN, N.; COBB, S. L.; DENNY, P. W. The Role of Phosphoglycans in the Susceptibility of *Leishmania mexicana* to the Temporin Family of Anti-Microbial Peptides. *Molecules*, v. 20, n. 2, p. 2775-2785, 2015.

EGOROV, T. A.; ODINTSOVA, T. I.; PUKHALSKY, V. A.; GRISHIN, E. V. Diversity of wheat antimicrobial peptides. *Peptides*, v. 26, n. 11, p. 2064-2073, 2005.

ELMAHALLAWY, E. K.; MARTINEZ, A. S.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AGIL, A.; MARI, J. M. N.; FERNANDEZ, J. G. Diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 08, p. 961-972, 2014.

ENRÍQUEZ, G.; SILVA, M. A. D.; CABRAL, E. Biodiversidade da Amazônia: usos e potencialidades dos mais importantes produtos naturais do Pará. In: (Ed.). *Biodiversidade da Amazonia: usos e potencialidades dos mais importantes produtos naturais do Para*: Numa/Ufpa, 2003.

ERICSON, M.; RÖDIN, J.; LENMAN, M.; GLIMELIUS, K.; JOSEFSSON, L.-G.; RASK, L. Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 261, n. 31, p. 14576-14581, 1986.

FAO. Edible nuts- Non-wood forest products. 1995. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/018/v8929e/v8929e.pdf> >. Acesso em: 20/05.

FARDIN, J. M. Purificação de peptídeos de sementes de castanha-do-pará e avaliação da sua atividade contra leishmania amazonensis. 2013. (Monografia)

FENG, Q.; HUANG, Y.; CHEN, M.; LI, G.; CHEN, Y. Functional synergy of α -helical antimicrobial peptides and traditional antibiotics against Gram-negative and Gram-positive bacteria in vitro and in vivo. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 34, n. 1, p. 197-204, 2014.

FERNANDES, N. P.; ALENCAR, J. D. C. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies. 4. Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* HBK), dez anos após o plantio. *Acta Amazonica*, v. 23, n. 2-3, 1993.

FOUND, H. L. Immunologic and Genetic Factors in Type 1 Diabetes. *J. Biol. Chem.*, v. 2002, n. 277, p. 43545-43548, 2002.

FRANCO, O. L.; MURAD, A. M.; LEITE, J. R.; MENDES, P. A.; PRATES, M. V.; BLOCH, C. Identification of a cowpea γ -thionin with bactericidal activity. *FEBS Journal*, v. 273, n. 15, p. 3489-3497, 2006.

GANZ, T.; LEHRER, R. I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular medicine today*, v. 5, n. 7, p. 292-297, 1999.

GARCÍA OLMEDO, F.; RODRIGUEZ PALENZUELA, P.; MOLINA FERNÁNDEZ, A.; ALAMILLO, J. M.; LOPEZ SOLANILLA, E.; BERROCAL LOBO, M.; POZA CARRION, C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyntirite in plant defence. *FEBS letters*, v. 498, n. 2-3, p. 219-222, 2001.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. F. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, v. 2, n. 1, p. 1-33, 2007.

GOMES, M. T.; LOPES, A. H.; MEYER-FERNANDES, J. R. Possible roles of ectophosphatases in host-parasite interactions. *Journal of parasitology research*, v. 2011, 2011.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; WEISS, W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, v. 20, n. 4-5, p. 712-717, 1999.

GUANÍ-GUERRA, E.; SANTOS-MENDOZA, T.; LUGO-REYES, S. O.; TERÁN, L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*, v. 135, n. 1, p. 1-11, 2010.

GUERRERO, E.; SAUGAR, J. M.; MATSUZAKI, K.; RIVAS, L. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 48, n. 8, p. 2980-2986, 2004.

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

HE, K.; LUDTKE, S. J.; WORCESTER, D. L.; HUANG, H. W. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophysical journal*, v. 70, n. 6, p. 2659, 1996.

HELMERHORST, E. J.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 25, p. 14637-14642, 2001.

HWANG, B.; HWANG, J.-S.; LEE, J.; LEE, D. G. The antimicrobial peptide, psacothasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 405, n. 2, p. 267-271, 2011.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, 2012.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 14, n. 16, p. 1511-1527, 1998.

JEŽEK, P.; HLAVATÁ, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 37, n. 12, p. 2478-2503, 2005.

KADER, J.-C. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends in plant science*, v. 2, n. 2, p. 66-70, 1997.

KAINER, K. A.; WADT, L. H.; STAUDHAMMER, C. L. Explaining variation in Brazil nut fruit production. *Forest Ecology and Management*, v. 250, n. 3, p. 244-255, 2007.

KANG, S.-J.; KIM, D.-H.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B.-J. Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. *Archives of pharmacal research*, v. 35, n. 3, p. 409-413, 2012.

KHAMIS, A. M.; ESSACK, M.; GAO, X.; BAJIC, V. B. Distinct profiling of antimicrobial peptide families. *Bioinformatics*, p. btu738, 2014.

KIDO, E.; PANDOLFI, V.; HOULLOU-KIDO, L.; ANDRADE, P.; MARCELINO, F.; NEPOMUCENO, A.; ABDELNOOR, R.; BURNQUIST, W.; BENKO-ISEPPON, A. Plant antimicrobial peptides: an overview of SuperSAGE transcriptional profile and a functional review. *Current Protein and Peptide Science*, v. 11, n. 3, p. 220-230, 2010.

KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.

KULKARNI, M. M.; MCMASTER, W. R.; KAMYSZ, E.; KAMYSZ, W.; ENGMAN, D. M.; MCGWIRE, B. S. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Molecular microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1484-1497, 2006.

KULKARNI, M. M.; MCMASTER, W. R.; KAMYSZ, W.; MCGWIRE, B. S. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 23, p. 15496-15504, 2009.

LEQUIN, O.; LADRAM, A.; CHABBERT, L.; BRUSTON, F.; CONVERT, O.; VANHOYE, D.; CHASSAING, G.; NICOLAS, P.; AMICHE, M. Dermaseptin S9, an α -helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini. *Biochemistry*, v. 45, n. 2, p. 468-480, 2006.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, v. 37, n. 2, p. 207-215, 2012.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*, v. 213, n. 3, p. 377-387, 2008.

LIMA, A. M.; GONÇALVES, E. C.; ANDRADE, S. S.; BARBOSA, M. S.; BARROSO, K. F.; DE SOUSA, M. B.; BORGES, L.; VIEIRA, J. L.; TEIXEIRA, F. M. Critical points of Brazil nuts: a beginning for food safety, quality control and Amazon sustainability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n. 4, p. 735-740, 2013.

LOCATELLI, M.; VIEIRA, A.; GAMA, M.; FERREIRA, M.; MARTINS, E.; FILHO, E.; SOUZA, V.; MACEDO, R. Cultivo da Castanha-do-Brasil em Rondônia. Disponível em: <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Castanha/CultivodaCastanhadoBrasilRO/index.htm>. Acesso em, v. 20, 2006.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3ª. 2000.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E. C.; SAUGAR, J. M.; RIVAS, L. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *The FASEB Journal*, v. 22, n. 6, p. 1817-1828, 2008.

MADANI, F.; LINDBERG, S.; LANGEL, Ü.; FUTAKI, S.; GRÄSLUND, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of biophysics*, v. 2011, 2011.

MADIGAN, M. T.; DAVID, P. C.; DAVID, S.; JOHN, M. M. *Microbial Growth*. 13ª. 2010. 2.

MAIESE, K.; CHONG, Z. Z.; HOU, J.; SHANG, Y. C. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Experimental gerontology*, v. 45, n. 3, p. 217-234, 2010.

MAKOVITZKI, A.; BARAM, J.; SHAI, Y. Antimicrobial Lipopolypeptides Composed of Palmitoyl Di- and Tricationic Peptides: In Vitro and in Vivo Activities, Self-Assembly to Nanostructures, and a Plausible Mode of Action†. *Biochemistry*, v. 47, n. 40, p. 10630-10636, 2008.

MANGONI, M. L.; SAUGAR, J. M.; DELLISANTI, M.; BARRA, D.; SIMMACO, M.; RIVAS, L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 2, p. 984-990, 2005.

MARINHO, F. A.; GONÇALVES, K. C.; OLIVEIRA, S. S.; GONÇALVES, D. S.; MATTEOLI, F. P.; SEABRA, S. H.; OLIVEIRA, A. C. S.; BELLIO, M.; OLIVEIRA, S. S.; SOUTO-PADRÓN, T. The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *PloS one*, v. 9, n. 1, p. e87659, 2014.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current opinion in pharmacology*, v. 6, n. 5, p. 468-472, 2006.

MARR, A. K.; MCGWIRE, B. S.; MCMASTER, W. R. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future microbiology*, v. 7, n. 9, p. 1047-1059, 2012.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1788, n. 8, p. 1687-1692, 2009.

MCGWIRE, B.; SATOSKAR, A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*, p. hct116, 2013.

MCGWIRE, B. S.; KULKARNI, M. M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental parasitology*, v. 126, n. 3, p. 397-405, 2010.

- MENDEZ, E.; MORENO, A.; COLILLA, F.; PELAEZ, F.; LIMAS, G. G.; MENDEZ, R.; SORIANO, F.; SALINAS, M.; HARO, C. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm. *European journal of biochemistry*, v. 194, n. 2, p. 533-539, 1990.
- MILLS, E. C.; JENKINS, J. A.; ALCOCER, M. J.; SHEWRY, P. R. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 44, n. 5, p. 379-407, 2004.
- MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Tropical parasitology*, v. 4, n. 1, p. 4, 2014.
- MOLINA, A.; SEGURA, A.; GARCÍA-OLMEDO, F. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *Febs Letters*, v. 316, n. 2, p. 119-122, 1993.
- MOOKHERJEE, N.; LIPPERT, D. N.; HAMILL, P.; FALSAFI, R.; NIJNIK, A.; KINDRACHUK, J.; PISTOLIC, J.; GARDY, J.; MIRI, P.; NASEER, M. Intracellular receptor for human host defense peptide LL-37 in monocytes. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 4, p. 2688-2696, 2009.
- MORENO, F. J.; CLEMENTE, A. 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens. *Open Biochem J*, v. 2, p. 16-28, 2008.
- MORENO, F. J.; JENKINS, J. A.; MELLON, F. A.; RIGBY, N. M.; ROBERTSON, J. A.; WELLNER, N.; MILLS, E. C. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1698, n. 2, p. 175-186, 2004.
- MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Current opinion in microbiology*, v. 6, n. 4, p. 359-364, 2003.
- MURTAGH, G.; ARCHER, D.; DUMOULIN, M.; RIDOUT, S.; MATTHEWS, S.; ARSHAD, S.; ALCOCER, M. In vitro stability and immunoreactivity of the native and recombinant plant food 2S albumins Ber e 1 and SFA-8. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 33, n. 8, p. 1147-1152, 2003.
- NASCIMENTO, V. V. D.; CASTRO, H. C.; ABREU, P. A.; OLIVEIRA, A. N. E. A. N.; FERNANDEZ, J. H.; ARAÚJO, J. L. D. S.; MACHADO, O. L. T. In silico structural characteristics and α -amylase inhibitory properties of ric c 1 and ric c 3, allergenic 2S albumins from *Ricinus communis* seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 59, n. 9, p. 4814-4821, 2011.
- NATERA, S.; MACHUCA, C.; PADRÓN-NIEVES, M.; ROMERO, A.; DÍAZ, E.; PONTE-SUCRE, A. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, n. 6, p. 637-642, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857907000672> >.
- NEUMANN, G. M.; CONDRON, R.; THOMAS, I.; POLYA, G. M. Purification and sequencing of multiple forms of *Brassica napus* seed napin large chains that are calmodulin antagonists and substrates for plant calcium-dependent protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1295, n. 1, p. 34-43, 1996.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011.
- O'CONNOR, J. E.; VARGAS, J. L.; KIMLER, B. F.; HERNANDEZ-YAGO, J.; GRISOLIA, S. Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 151, n. 1, p. 568-573, 1988.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

ODINTSOVA, T.; EGOROV, T. Plant antimicrobial peptides. In: (Ed.). *Plant Signaling Peptides*: Springer, 2012. p.107-133.

OTVOS, L. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *Journal of Peptide Science*, v. 11, n. 11, p. 697-706, 2005.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T. J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

PACOR, S.; GIANGASPERO, A.; BACAC, M.; SAVA, G.; TOSSI, A. Analysis of the cytotoxicity of synthetic antimicrobial peptides on mouse leucocytes: implications for systemic use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, n. 3, p. 339-348, 2002.

PADOVAN, L.; SCOCCHI, M.; TOSSI, A. Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Current Protein and Peptide Science*, v. 11, n. 3, p. 210-219, 2010.

PASSOS-SILVA, D. G.; RAJÃO, M. A.; NASCIMENTO DE AGUIAR, P. H.; VIEIRA-DA-ROCHA, J. P.; MACHADO, C. R.; FURTADO, C. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *Journal of nucleic acids*, v. 2010, 2010.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical reviews in biotechnology*, v. 32, n. 2, p. 143-171, 2012.

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1696, n. 2, p. 171-180, 2004.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 37, n. 11, p. 2239-2253, 2005.

PERES, C. A.; BAIDER, C.; ZUIDEMA, P. A.; WADT, L. H.; KAINER, K. A.; GOMES-SILVA, D. A.; SALOMÃO, R. P.; SIMÕES, L. L.; FRANCIOSI, E. R.; VALVERDE, F. C. Demographic threats to the sustainability of Brazil nut exploitation. *Science*, v. 302, n. 5653, p. 2112-2114, 2003.

PÉREZ-CORDERO, J. J.; LOZANO, J. M.; CORTÉS, J.; DELGADO, G. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides*, v. 32, n. 4, p. 683-690, 2011.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS pathogens*, v. 6, n. 10, p. e1001067, 2010.

POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, v. 24, n. 11, p. 1681-1691, 2003.

PRIYA, S.; KAUR, N.; GUPTA, A. K. Purification, characterization and inhibition studies of α -amylase of *Rhyzopertha dominica*. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 98, n. 2, p. 231-237, 2010.

RA, D.-C.; LA, N.; IFC, B.; JA, G.-V.; OR JR, P.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. Cm38: A New Antimicrobial Peptide Active Against *Klebsiella pneumoniae* is Homologous to Cn11. *Protein and peptide letters*, v. 22, n. 2, p. 164-172, 2015.

REDDY, K.; YEDERY, R.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 1992.

RIBEIRO, S. F.; SILVA, M. S.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; RABELO, G.; MELLO, É. O.; SANTA-CATARINA, C.; RODRIGUES, R.; GOMES, V. M. Capsicum annum L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 101, n. 3, p. 657-670, 2012.

ROCHA, L.; ALMEIDA, J.; MACEDO, R.; BARBOSA-FILHO, J. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6, p. 514-535, 2005.

ROSSI, L. M.; RANGASAMY, P.; ZHANG, J.; QIU, X. Q.; WU, G. Y. Research advances in the development of peptide antibiotics. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 97, n. 3, p. 1060-1070, 2008.

ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. *Journal of Parasitology*, v. 91, n. 5, p. 1113-1115, 2005.

SARDAR, A.; DAS, S.; AGNIHORTI, S.; KUMAR, M.; GHOSH, A.; ABHISHEK, K.; KUMAR, A.; PURKAIT, B.; ANSARI, M.; DAS, P. Spinigerin induces apoptotic like cell death in a caspase independent manner in *Leishmania donovani*. *Experimental parasitology*, v. 135, n. 4, p. 715-725, 2013.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SEO, M.-D.; WON, H.-S.; KIM, J.-H.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B.-J. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules*, v. 17, n. 10, p. 12276-12286, 2012.

SHARMA, G. M.; MUNDOMA, C.; SEAVY, M.; ROUX, K. H.; SATHE, S. K. Purification and biochemical characterization of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* L.) seed storage proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 58, n. 9, p. 5714-5723, 2010.

SIEBER, S. A.; MARAHIEL, M. A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical reviews*, v. 105, n. 2, p. 715-738, 2005.

SILVA, O. N.; MULDER, K. C.; BARBOSA, A. E.; OTERO-GONZALEZ, A. J.; LOPEZ-ABARRATEGUI, C.; REZENDE, T. M.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Frontiers in microbiology*, v. 2, 2011.

SILVEIRA, F.; LAINSON, R.; DE CASTRO GOMES, C.; LAURENTI, M.; CORBETT, C. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L.(L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.

SIMPSON, A. G.; GILL, E. E.; CALLAHAN, H. A.; LITAKER, R. W.; ROGER, A. J. Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist*, v. 155, n. 4, p. 407-422, 2004.

SOUZA, G. S.; DO NASCIMENTO, V. V.; DE CARVALHO, L. P.; DE MELO, E. J. T.; FERNANDES, K. V.; MACHADO, O. L. T.; RETAMAL, C. A.; GOMES, V. M.; CARVALHO, A. D. O. Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. *Experimental parasitology*, v. 135, n. 1, p. 116-125, 2013.

STOTZ, H. U.; THOMSON, J. G.; WANG, Y. Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signal Behav*, v. 4, n. 11, p. 1010-2, 2009.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation*, v. 118, n. 4, p. 1301, 2008.

SUAREZ-CARMONA, M.; HUBERT, P.; DELVENNE, P.; HERFS, M. Defensins: «simple» antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine & growth factor reviews*, 2014.

TERRAS, F.; SCHOOF, H.; DE BOLLE, M.; VAN LEUVEN, F.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.; BROEKAERT, W. F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 22, p. 15301-15309, 1992.

THEVISSSEN, K.; KRISTENSEN, H.-H.; THOMMA, B. P.; CAMMUE, B. P.; FRANÇOIS, I. E. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug discovery today*, v. 12, n. 21, p. 966-971, 2007.

THEVISSSEN, K.; TERRAS, F. R.; BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 12, p. 5451-5458, 1999.

THOMAS, S.; KARNIK, S.; BARAI, R. S.; JAYARAMAN, V. K.; IDICULA-THOMAS, S. CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, p. gkp1021, 2009.

TOMAR, P. P. S.; CHAUDHARY, N. S.; MISHRA, P.; GAHLOTH, D.; PATEL, G. K.; SELVAKUMAR, P.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Purification, Characterisation and Cloning of a 2S Albumin with DNase, RNase and Antifungal Activities from *Putranjiva Roxburghii*. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 174, n. 2, p. 471-482, 2014.

TORRENT, M.; PULIDO, D.; RIVAS, L.; ANDREU, D. Antimicrobial peptide action on parasites. *Current drug targets*, v. 13, n. 9, p. 1138-1147, 2012.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

UPTON, M.; COTTER, P.; TAGG, J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents. *International journal of microbiology*, v. 2012, 2012.

VAN DER WEERDEN, N. L.; HANCOCK, R. E.; ANDERSON, M. A. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 48, p. 37513-37520, 2010.

VANNIER-SANTOS, M.; MARTINY, A.; SOUZA, W. D. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current pharmaceutical design*, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

VEERMAN, E.; NAZMI, K.; VAN'T HOF, W.; DEN HERTOEG, A.; NIEUW, A. A.; BOLSCHER, J. Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Biochem. J*, v. 381, p. 447-452, 2004.

VRIENS, K.; CAMMUE, B.; THEVISSSEN, K. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules*, v. 19, n. 8, p. 12280-12303, 2014.

WANG, Z.; WANG, G. APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic acids research*, v. 32, n. suppl 1, p. D590-D592, 2004.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

WIMLEY, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology*, v. 5, n. 10, p. 905-917, 2010.

WWF. (World Wide Fund). Castanheira-do-Brasil: grandiosa e ameaçada. 2013. Disponível em: < http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/especiais/biodiversidade/especie_do_mes/fevereiro_castanheira_do_brasil.cfm >. Acesso em: 10/02/13.

YAN, H.; HANCOCK, R. E. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 45, n. 5, p. 1558-1560, 2001.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT-Food science and technology*, v. 42, n. 10, p. 1573-1580, 2009.

YE, X.; NG, T. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 285, n. 2, p. 424-429, 2001.

YEUNG, A. T.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 68, n. 13, p. 2161-2176, 2011.

YIKE, I.; ALLAN, T.; SORENSON, W. G.; DEARBORN, D. G. Highly sensitive protein translation assay for trichothecene toxicity in airborne particulates: comparison with cytotoxicity assays. *Applied and environmental microbiology*, v. 65, n. 1, p. 88-94, 1999.

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

ZOTTICH, U.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; SILVA, N. C.; SANTOS, I. S.; DO NACIMENTO, V. V.; MIGUEL, E. C.; MACHADO, O. L.; GOMES, V. M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1810, n. 4, p. 375-383, 2011.