LUIZ ANTONIO GERARDI JUNIOR

**Avaliação da atividade imunomoduladora da
microplusina sobre macrófagos murinos *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração : Biotecnologia

Orientador: Dra. Monamaris Marques Borges

São Paulo
2010

RESUMO

GERARD JR., L. A. **Avaliação da atividade imunomoduladora da microplusina sobre macrófagos murinos *in vitro***. 2010 72 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O aumento de resistência bacteriana a antibióticos torna urgente a exploração de meios alternativos para o combate a infecções. Peptídeos de defesa do hospedeiro antimicrobiano (PDHA) são componentes do sistema imune inato em todas as formas de vida nos quais foram investigados. Eles variam na sua sequência de aminoácidos, potência e atividade antimicrobiana. Algumas evidências mostraram que estes peptídeos possuem papel complexo e diverso como antimicrobiano, ou modulador da resposta imune inata durante a proteção contra infecções e sepsis. Embora a maioria dos estudos sobre os efeitos destes peptídeos esteja focado no seu papel sobre a resposta imune inata, em animais superiores eles estão também envolvidos com o sistema imune adaptativo, onde atuam no controle e resolução da resposta inflamatória. Estas moléculas podem ser expressas constitutivamente, ou induzidas por componentes bacterianos, citocinas, ou a combinação de ambos, usando vias que envolvem receptores Toll e a transcrição de genes controlados por NFkB. Além da ação direta destes peptídeos no microrganismo, vários estudos demonstraram seu efeito imunomodulador em células de mamíferos, uma vez que eles estimulam a liberação de citocinas, são quimiotáticos para células efectoras, neutralizam atividades induzidas por LPS, induzem sinal de transdução, transcrição de genes e a liberação de componentes derivados do oxigênio. Apesar da grande diversidade dos peptídeos antimicrobianos descritos em invertebrados, poucos foram isolados de aracnídeos. A microplusina é um peptídeo antimicrobiano quelante de cobre, originário de Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, com massa molecular de 10 204 Da, contendo seis resíduos de cisteína e com atividade bacteriostática sobre *Micrococcus luteus*, mas não apresentou atividade sobre *E. coli* e *Candida albicans*. A atividade contra *M. luteus* foi devido a sua habilidade de ligar-se e sequestrar cobre, bloqueando assim a multiplicação do microrganismo. Macrófagos possuem papel importante na regulação do sistema imune, principalmente durante o início da resposta imune. A liberação de mediadores pró-

inflamatórios como citocinas e óxido nítrico após a ativação destas células, durante a resposta inata é crucial durante vários eventos fisiopatológicos que podem ser implicados na morte de microrganismos e inflamação. IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória, envolvida na resposta inata e adquirida, tendo importante função na sensibilização e ativação dos macrófagos frente ao desafio com produtos patogênicos. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito direto da microplusina em cultura de macrófagos derivados de medula óssea (M ϕ DM) tratados ou não com LPS ou IFN- γ . Nossos dados mostraram que este peptídeo não teve efeito citotóxico em macrófagos, não estimulou a síntese de NO e IL-1 β , mas aumentou a produção de TNF- α e IL-6 após estímulo. O pré-tratamento de macrófagos com microplusina, antes da adição do LPS, não modificou o nível de nitrito, TNF- α ou IL-6 em resposta ao LPS. Se os macrófagos foram pré-tratados com microplusina e incubados com IFN- γ houve aumento significativo da produção de NO e TNF- α , confirmando a natureza pró-inflamatória deste peptídeo, e seu potencial contra microrganismos patogênicos. Isto indica que a microplusina é um agente imunomodulador da resposta imune inata e pode auxiliar no controle de infecções por microrganismos patogênicos.

Palavras-chave: Microplusina. Peptídeo antimicrobiano. Resposta imune inata. Macrófago. Citocinas. Óxido nítrico.

ABSTRACT

GERARD JR., L. A. **Evaluation of immunomodulatory activity of microplusin in murine macrophage *in vitro***. 2010. 72 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The emergence of bacterial resistance to antibiotics has led to an increased urgency to explore alternative means of combating pathogenic infections. Antimicrobial and host defense peptides are found to be potent components of the innate immune system in all complex life forms in which they have been investigated. They vary substantially in their amino acid sequences, potency, antimicrobial activity and evidence suggests that these peptides play diverse and complex roles both as antimicrobial peptides or as modulators of innate immune responses to protect against infection and sepsis. Although studies of their immunomodulatory effect are focused on the innate immune response, in higher animals they are also involved with the adaptive immune system, where they act in the control and resolution of the inflammatory response. These molecules may be expressed constitutively or induced by bacterial components, cytokines or the combination of both using pathways involving Toll receptors and transcription of genes controlled by NFκB. Besides the direct action of these peptides on microorganisms, several studies have demonstrated their immunomodulatory effect on mammalian cells, since they stimulate the release of cytokines, are chemotactic for effector cells, neutralize activities induced by LPS, induce signal transduction, gene transcription and release of oxygen-derived compounds. Despite the great diversity of antimicrobial peptides described in invertebrates, few have been isolated from arachnids. Microplusin is a copper II-chelating antimicrobial peptide from the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with molecular mass of 10 204 Da, contains six cysteine residues and has a bacteriostatic activity against *Micrococcus luteus*, but no activity against *E. coli* and *Candida albicans*. The activity against *M. luteus* is due to its ability to bind and sequester copper II that blocks the organism multiplication. Macrophages play an important role in the regulation of the immune system, mainly during the early phase of the immune response. The release of pro-inflammatory mediators such as cytokines and nitric oxide occurs after activation of these cells during the innate response and play a crucial role during several physiopathologic events that might be implicated in microorganisms

killing and inflammation. IFN- γ is a pro-inflammatory cytokine involved in the innate and acquired immune response and plays the most important function in sensitizing macrophages to activation by challenge with pathogen products. The aim of the present work was to analyze the direct effect of microplusin in the culture of murine bone marrow derivated macrophages (BDM ϕ) treated or not with LPS or IFN- γ . Our data showed that microplusin had no cytotoxic effect on macrophages, did not stimulate the synthesis of NO and IL-1 β , but increased the production of TNF- α and IL-6 after stimulation. The pre-treatment of macrophages with microplusin before LPS addition did not change the level of nitrite, TNF- α or IL-6 in response to LPS. If the microplusin pre-treated macrophages were incubated with IFN- γ there was evidence that microplusin led to significant increase of NO and TNF- α production confirming the pro-inflammatory characteristic of microplusin and its potential against pathogenic microorganisms. This indicates microplusin to be a potential immunomodulating agent of innate immunity and may help to control infections by pathogenic microorganisms.

Key words: Microplusin. Antimicrobial peptides. Innate immune response. Macrophage. Cytokines. Nitric oxide.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Peptídeos de defesa do hospedeiro antimicrobiano

O aumento crescente do número de microrganismos multi-drogas resistente tem incentivado a pesquisas para o encontro de novos antibióticos. Abordagens que colaborem para elucidar o papel destes candidatos à terapia anti-infecciosa podem definir mecanismos de ação importantes, gerados pela ação destas moléculas sobre as células de mamíferos.

A resposta inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções, sendo formada por uma rede de interações celulares e moleculares responsáveis pela erradicação do patógeno. Esta resposta envolve diversas vias de sinalizações, que iniciam uma rápida resposta contra agentes estranhos (TOSI, 2005).

Os peptídeos de defesa do hospedeiro antimicrobianos (PDHA) constituem um dos principais componentes da imunidade inata, sendo candidatos naturais como alvo do desenvolvimento de antibióticos por não induzirem ao aparecimento de resistência. Embora estes componentes possam matar diretamente microrganismos alguns estudos mostraram que eles podem atuar indiretamente estimulando atividades imunomoduladoras através da ativação da imunidade inata ou ligando a imunidade inata e adaptativa (Figura 1. 1). Esta complexidade de ações levou a denominação de peptídeos antimicrobianos (PAM) aqueles que possuem ação direta sobre microrganismos, enquanto os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDH) foram designados os com capacidade de modular a resposta imune podendo ou não ter ação direta sobre microrganismos (BROWN; HANCOCK, 2006; YANG et al., 1999; ZASLOFF, 2002). Devido a esta diversidade de ações neste trabalho serão denominados de peptídeo de defesa do hospedeiro antimicrobiano (PDHA).

Os PDHA são moléculas efectoras do sistema imune inato de vertebrados e invertebrados, sendo encontrados em uma grande variedade de seres, incluindo plantas, insetos, crustáceos, moluscos, anfíbios, pássaros, peixes, humanos e outros mamíferos, atuando como antibióticos naturais contra uma grande variedade de microrganismos (BROWN; HANCOCK, 2006; BULET et al., 2004).

Figura 1.1 – Papel biológico dos peptídeos de defesa do hospedeiro antimicrobianos.

Os peptídeos atuam diretamente matando o microrganismo, modulando a resposta imune inata ou ambos.

FONTE: Modificado de Hancock e Sahl (2006).

Em mamíferos estes peptídeos foram descritos principalmente em células epiteliais da língua, traquéia, pulmão e neutrófilos, dentre outras células, sendo fundamentais para a ação microbicida (HANCOCK; CHAPPLE, 1999; ZASLOFF, 2002).

Os PDHA de artrópodes estão sendo bastante explorados atualmente. Estes animais possuem apenas sistema imune inato, com dois tipos de defesa: a humoral, que produz moléculas efetoras, como os peptídeos antimicrobianos, reagentes intermediários de oxigênio/nitrogênio e uma cascata enzimática que regula a coagulação ou melanização da hemolinfa. O outro mecanismo de defesa é mediado por um grupo de células denominadas hemócitos. Estas células são responsáveis pelos processos de fagocitose, nodulação e encapsulação que caracterizam a resposta imune celular dos artrópodes (LAVINE; STRAND, 2002; VIZIOLI; SALZET, 2002).

1.2 Características gerais dos peptídeos de defesa do hospedeiro antimicrobiano

Em sua maioria estes peptídeos são pequenas moléculas catiônicas com uma carga global positiva (geralmente de +2 à +9) contendo de 10 a 50 aminoácidos e uma porção ($\geq 30\%$) de resíduos hidrofóbicos (HANCOCK; SAHL, 2006). Os peptídeos catiônicos são classificados principalmente de acordo com sua conformação estrutural secundária e podem dividir-se em vários grupos conforme pode ser observado na Tabela 1.

Dentre estes peptídeos destacam-se três subgrupos: 1) os peptídeos α -hélice que são os mais difundidos e melhor caracterizados (a exemplo da catelicidina humana LL-37, magainina que está presente na secreção da pele de anfíbios, a melitina do veneno de abelhas e as cecropinas presentes em insetos dípteros; 2) os peptídeos de folha β (como as defensinas α e β humanas) e 3) os peptídeos de cadeias longas ricos em resíduos de aminoácidos como glicina, prolina, triptofano, arginina ou histidina (a exemplo da indolicidina isolada de bovinos).

Os PDHA possuem regiões conservadas e são altamente flexíveis, podendo adaptar-se dependendo da natureza iônica da membrana do organismo encontrado. A interação destes peptídeos com a membrana das células eucarióticas e procarióticas diferem basicamente devido a diferenças correlacionadas como a alta concentração de carga negativa nos lipídeos presentes na superfície da membrana das células procarióticas, enquanto nas células eucarióticas há predominância de lipídeos neutros, como por exemplo, o colesterol. Além disto, o potencial elétrico entre estas membranas difere, sendo na célula bacteriana superior ao da célula eucariótica (MCPHEE; HANCOCK, 2005).

Tabela 1 – Diversidade dos PDHA e suas conformações estruturais.

Peptide	Class	Host/synthetic
CA-MA	α -Helix	Synthetic
CA-MA analogue (P1)	α -Helix	Synthetic
CA-MA analogue (P2)	α -Helix	Synthetic
CA-MA analogue (P3)	α -Helix	Synthetic
CA-MA analogue (P4)	α -Helix	Synthetic
Carnobacteriocin B2	α -Helix	<i>Carnobacterium piscicola</i>
G-10 Novispirin	α -Helix	Synthetic
Magainin 2	α -Helix	<i>Xenopus laevis</i>
Magainin 2 analogue	α -Helix	Synthetic
Moricin	α -Helix	<i>Bombyx mori</i>
Ovispirin-1	α -Helix	Synthetic
Sheep myeloid antimicrobial peptide (Smap-29)	α -Helix	<i>Ovis aries</i>
T-7 Novispirin	α -Helix	Synthetic
γ -1-P thionin	β -Sheet	<i>Triticum nudum</i>
θ -Defensin 1	β -Sheet	<i>Macaca mulatta</i>
<i>A. hippocastanum</i> antimicrobial protein 1 (Ah-Amp1)	β -Sheet	<i>Aesculus hippocastanum</i>
Androctonin	β -Sheet	<i>Androctonus australis</i>
Bovine neutrophil β -defensin 12 (BNBD-12)	β -Sheet	<i>Bos taurus</i>
Circulin A	β -Sheet	<i>Chassalia parviflora</i>
Drosomycin	β -Sheet	<i>Drosophila melanogaster</i>
Gomesin	β -Sheet	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>
Helioicin	β -Sheet	<i>Heliothis virescens</i>
Helioicin analogue	β -Sheet	Synthetic
Hepcidin-20	β -Sheet	<i>Homo sapiens</i>
Hepcidin-25	β -Sheet	<i>Homo sapiens</i>
Human β -defensin 1 (Hbd-1)	β -Sheet	<i>Homo sapiens</i>
Human β -defensin 2 (Hbd-2)	β -Sheet	<i>Homo sapiens</i>
Human β -defensin 3 (Hbd-3)	β -Sheet	<i>Homo sapiens</i>
Human defensin (HNP-3)	β -Sheet	<i>Homo sapiens</i>
Insect defensin A	β -Sheet	<i>Protophormia terraenovae</i>
Lactoferricin B	β -Sheet	<i>Bos taurus</i>
Leucocin A	β -Sheet	<i>Leuconostoc gelidum</i>
Mediterranean mussel defensin (MGD-1)	β -Sheet	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
Mouse β -defensin 7 (Mbd-7)	β -Sheet	<i>Mus musculus</i>
Mouse β -defensin 8 (Mbd-8)	β -Sheet	<i>Mus musculus</i>
<i>P. sativum</i> defensin 1 (Psd1)	β -Sheet	<i>Pisum sativum</i>
Pafp-S	β -Sheet	<i>Phytolacca americana</i>
Protegrin-1 (Pg1)	β -Sheet	<i>Sus scrofa</i>
Rabbit kidney defensin (RK-1)	β -Sheet	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
Ramoplanin	β -Sheet	<i>Actinoplanes</i> sp.
Sapecin	β -Sheet	<i>Sarcophaga peregrina</i>
Tachyplesin I	β -Sheet	<i>Tachyplesus tridentatus</i>
Tachyplesin I analogue (Tpy4)	β -Sheet	Synthetic
Tachystatin A	β -Sheet	<i>Tachyplesus tridentatus</i>
Ac-AMP2	Extended	<i>Amaranthus caudatus</i>
Indolicidin	Extended	<i>Bos taurus</i>
Indolicidin analogue (CP10A)	Extended	Synthetic
Pw2	Extended	Synthetic
Tritrpticin	Extended	Synthetic (potential porcine cathelicidin)
Thanatin	Loop	<i>Podisus maculiventris</i>

FONTE: Modificado de Mcphee e Hancock (2005).

Alguns trabalhos mostraram que há outros PDHA que possuem caráter aniônico cujas informações na literatura são limitadas. Estes peptídeos são ricos em ácido aspártico e glutâmico com predominância de cargas negativas (BROGDEN, 2005). Poucos destes foram caracterizados, dentre estes, podemos citar a dermicidina, predominantemente secretada por células epiteliais e presente em grânulos de neutrófilos; os peptídeos DCD1 e DCD-1L, derivados da dermicidina presente no suor humano (SCHITTEK et al., 2001); a maximina H5 identificada no anfíbio *Bombina máxima* (LAI et al., 2006); a proenkephalina e a enkeletina isoladas dos grânulos de secreção de células da medula adrenal bovina (GOUMON et al., 1998); o peptídeo sintético de estrutura em α -hélice AP1 (DENNISON et al., 2006); e mais recentemente, a microplusina, isolada da hemolinfa e ovos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FOGAÇA et al., 2004).

1.3 Modelos de ação dos PDHA sobre a membrana dos microrganismos

Os estudos sobre mecanismos de interação dos peptídeos com a célula alvo referem-se principalmente aqueles sobre células procarióticas. Estes peptídeos partilham mecanismos de ação comuns. Alguns modelos propostos usaram os peptídeos catiônicos, que representam a maioria dos peptídeos estudados. Estes peptídeos têm sua ação direta relacionada a uma interação eletrostática com a membrana alvo e vários parâmetros físicos irão determinar a forma de interação dos destes com a membrana celular (MCPHEE; HANCOCK, 2005). Um dos fatores determinantes para esta interação é a carga total do peptídeo. Além disto, seu caráter hidrofóbico que facilita sua interação com as cargas negativas dos fosfolípidios presentes na membrana do microrganismo, favorecendo a inserção do peptídeo, e promovendo a lise e morte da bactéria (BROGDEN, 2005). Outro fator é que quanto maior a hidrofobicidade, maior é a atividade do peptídeo. (MCPHEE; HANCOCK, 2005).

Para ser ativo o PDHA deve perturbar a membrana. Esta perturbação pode levar a completa dissolução da membrana, formação de poros, perda de eletrólitos ou ainda ao extravasamento do conteúdo intracelular (MCPHEE; HANCOCK, 2005). A relação peptídeo/lípido na membrana bacteriana varia dependendo da composição de ambos e permite que as moléculas de peptídeos sejam orientadas perpendicularmente e

inseridas na bicamada, formando poros (YANG et al., 2001). Vários modelos foram propostos para explicar esta interação do peptídeo com os microrganismos como pode ser visto nas Figuras 1.2, 1.3 e 1.4 descritas abaixo. Dentre os modelos destacam-se:

a) Formação de poros do tipo “barril”- Onde a região hidrofóbica dos peptídeos se alinha com a região lipídica da bicamada, e a parte hidrofílica dos peptídeos forma a região interior do poro, que podem atuar como canais iônicos permitindo a entrada e saída de íons da célula conforme esquema apresentado na Figura 1. 2.

Figura 1.2 – Modelo de formação de poros do tipo “barril”. Neste modelo a região hidrofóbica dos peptídeos alinham-se com a região lipídica da bicamada, e a parte hidrofílica dos peptídeos forma a região interior do poro, que podem atuar como canais iônicos permitindo a entrada e saída indiscriminada de íons da célula

FONTE: Modificado de Brodgen (2005).

b) Formação do modelo do tipo “carpete”- Nesse modelo os peptídeos atraídos eletrostaticamente para os grupos fosfolipídicos aniônicos da bicamada ficam orientados paralelamente e, em alta concentração, agem como detergente desestruturando a bicamada e formando micelas (Figura 1. 3).

Figura 1.3 – Modelo de formação de poros do tipo “carpete”. Nesse modelo os peptídeos orientados paralelamente podendo agir como detergente desestruturando a bicamada e formando micelas.
FONTE: Modificado de Brodgen (2005).

c) Formação de poros do tipo “toroidal”- Nesse modelo os peptídeos formam um tapete sobre a membrana. Os peptídeos se inserem perpendicularmente formando complexos com os grupos lipídicos da membrana, causando o dobramento desta e a formação de poros do tipo toroidal (Figura 1. 4). Este modelo difere do modelo do tipo “barril”, pois na formação dos poros toroidais os peptídeos estão sempre associados com as cabeças dos grupos lipídicos enquanto são inseridos perpendicularmente na bicamada.

Figura 1.4 - Modelo de formação de poros do tipo “toroidal”. Nesse modelo há a formação de um tapete sobre a membrana, os peptídeos se inserem perpendicularmente formando complexos com os grupos lipídicos da membrana, causando um dobramento desta e a formação de poros do tipo toroidal.
FONTE: Modificado de Brodgen (2005).

Os PDHA são expressos como pró-peptídeos, necessitando de proteólise para serem liberados com atividade biológica. Em geral são expressos constitutivamente ou induzidos por componentes bacterianos, tais como, LPS, citocinas, ou a associação de ambos, utilizando vias que envolvem os receptores Toll e a transcrição de NF κ B, exemplo disto, são as defensinas humanas (HBD)1,2 e 3 (HANCOCK et al., 2006; WEHAMP et al., 2003). Alguns peptídeos podem agir de modo diferente utilizando como alvo moléculas intracelulares que resultam na interferência de vias metabólicas tais como: inibição da síntese de parede celular, de ácidos nucléicos, proteínas ou da atividade enzimática bacteriana (Tabela 2). Muitos destes peptídeos foram capazes de inibir a replicação do vírus da influenza A, estomatite vesicular (VSV) e da imunodeficiência humana 1 (HIV-1). Alguns peptídeos antimicrobianos catiônicos demonstraram atividade anticancerígena e foram capazes de promover a cicatrização de feridas (GANZ; LEHRER, 1999; POWERS; HANCOCK, 2003).

Tabela 2 - Modelos de interações de PDHA com a membrana e o citoplasma de microrganismos.

Model of antimicrobial activity	Synonym	Examples of peptides
<i>Transmembrane pore-forming mechanisms</i>		
Toroidal pore	Wormhole, disk	Magainin 2 ⁷⁰ , protegrin-1 ⁶² , melittin ^{55,81} , LL-37 ⁶⁵ and MSI-78 ⁹⁰
Carpet		Dermaseptin S ⁸⁵ , cecropin ^{156,157} , melittin ¹⁵⁸ , caerin 1.1 ¹⁵⁹ and ovispirin ⁶⁴
Barrel stave	Helical-bundle model	Alamethicin ^{61,81}
<i>Modes of intracellular killing</i>		
Flocculation of intracellular contents		Anionic peptides ³⁰
Alters cytoplasmic membrane septum formation		PR-39 ¹⁰⁸ , PR-26 ¹⁰⁹ , indolicidin ¹¹⁰ and microcin 25 ¹¹¹
Inhibits cell-wall synthesis		Mersacidin ¹¹²
Binds nucleic acids		Buforin II ¹¹³ and tachyplesin ¹¹⁴
Inhibits nucleic-acid synthesis		Pleurocidin ¹¹⁵ , dermaseptin ¹¹⁵ , PR-39 ⁷³ , HNP-1, -2 ⁴⁴ and indolicidin ¹¹⁰
Inhibits protein synthesis		Pleurocidin ¹¹⁵ , dermaseptin ¹¹⁵ , PR-39 ⁷³ , HNP-1, -2 ⁴⁴ and indolicidin ¹¹⁰
Inhibits enzymatic activity		Histatins ¹¹⁷ , pyrrocoricin, drosocin and apidaecin ¹¹⁸

FONTE: Modificado de Brodgen (2005).

1.4 Modulação da resposta imune por PDHA

Outra possibilidade de atuação dos PDHA é a capacidade de auxiliar o controle de infecções, onde alguns peptídeos apesar de possuírem fraca atividade microbida direta sobre o agente infeccioso podem, sob condições fisiológicas, proteger animais contra infecções devido a sua habilidade para modular funções imunes que auxiliam no combate destas infecções (BOWDISH et al., 2005; GANZ; LEHRER, 1999).

Há várias demonstrações de atividade destes peptídeos sobre as funções imunes inatas e modulação seletiva da resposta inflamatória às endotoxinas (JENSSEN et al., 2006; MCPHEE, 2005; YEAMAN; YOUNT, 2003). Alguns trabalhos demonstraram que os peptídeos de invertebrados podem neutralizar a atividade de LPS, induzir sinais de transdução, estimular a transcrição de genes e promover a liberação de espécies reativas de oxigênio (BOWDISH et al., 2005; HANCOCK et al., 2006; HANCOCK; SAHL, 2006). Estas atividades associam estes peptídeos a aspectos da imunidade inata envolvidas no controle da inflamação aguda. Por exemplo, aumentam a liberação de quimiocinas que resulta no recrutamento de neutrófilos, monócitos, mastócitos e células T auxiliares (T helper cells) para o sítio da infecção (FINLAY; HANCOCK, 2004). Podem também, estimular a degranulação de mastócitos, promovendo a liberação de histamina, com conseqüente aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Além disto, aumentam a produção de integrinas envolvidas na resposta quimiotática, o que favorece a fagocitose via estes receptores (MCPHEE; HANCOCK, 2005).

Foi também demonstrado que estes peptídeos podem induzir a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), gerando óxido nítrico (NO), um dos principais causadores da morte bacteriana (ZUGHAIER et al., 2005). Outros trabalhos mostraram que estes peptídeos podem estimular a formação e reparo de tecidos, o crescimento de fibroblastos e promover a angiogênese em células endoteliais. (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007).

Uma das principais características de alguns destes peptídeos é a sua natureza antiinflamatória. Eles exercem atividade supressora da resposta imune através de sinalizações via os receptores Toll-like (TLRs) envolvidos na imunidade inata (KANDLER et al., 2006; HANCOCK; SAHL, 2006).

Os receptores Toll foram originalmente descritos como envolvidos na indução da imunidade inata em *Drosophila*. Foi demonstrado que os elementos da via de sinalização envolvendo receptores Toll em *Drosophila* estão relacionados aos mesmos receptores em mamíferos e estas vias convergem sobre a translocação e transcrição de um fator denominado fator nuclear kappa B (NFkB), com subsequente regulação da expressão de muitos outros genes (ARMANT; FENTON, 2002).

Trabalhos adicionais mostraram que há uma família de TLR em mamíferos onde os vários receptores reconhecem moléculas conservadas de microrganismos muitas das quais originárias de agentes infecciosos. Contudo, sabe-se que a estimulação de TLRs envolve eventos que são favoráveis ao organismo como a indução de quimiocinas para atrair fagócitos, ou potencialmente prejudiciais, como a alta produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) que ocorre durante o desenvolvimento da sepsis, e representa uma super-estimulação da imunidade inata provocada pelo excesso de componentes bacterianos na circulação (ZUGHAIER et al., 2005).

Esta síndrome mata milhares de pessoas no mundo, segundo dados do Instituto Latino Americano de Septicemia, só no Brasil são aproximadamente 400.000 casos por ano, sendo que 68% dos internados em UTI com septicemia vão a óbito. Este problema vem gerando enorme gasto para o setor público e privado de saúde. (SILVA et al., 2004).

Outra abordagem de interesse terapêutico é a utilização dos PDHA baseado no fato de alguns peptídeos se ligam e neutralizam o LPS, bloqueando diretamente os estímulos iniciais da cascata de citocinas pró-inflamatórias que ocorre durante a sepsis (LEON et al., 2008; VALLESPI et al., 2000). Exemplo disto é o peptídeo regulador de defesa inata (IDR-1) que modula seletivamente a resposta imune inata controlando a inflamação e combatendo infecções. O peptídeo IDR-1 foi efetivo contra várias infecções *in vitro* quando administrado local ou via sistêmica. Este peptídeo não agiu diretamente como antimicrobiano e sim ativando vias de sinalização que induziram o aumento de quimiocinas envolvidas no recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção e a supressão dos efeitos do LPS bloqueando a síntese de citocinas pró-inflamatórias envolvidas no quadro de sepsi (SCOTT et al., 2007). Outro peptídeo gástrico, a ghrelina, inibiu a produção de IL-1 β e TNF- α , diminuindo a ativação de NFkB

induzida por LPS além de aumentar a produção de IL-10 e a resposta anti-inflamatória. Mostrando que a ghrelina pode atuar na proteção contra condições patológicas durante o processo inflamatório (SCOTT et al., 2007; WASEEM et al., 2008).

Ensaios com o peptídeo catiônico de estrutura em α -hélice, CEMA (cecropin-melittin hybrid), um híbrido da cecropina de mariposa e da melitina de abelha, comprovaram que este peptídeo pode regular diretamente funções em macrófagos, modulando seletivamente a resposta desta célula ao LPS além de matar diretamente bactérias. O CEMA liga-se ao LPS inibindo a expressão de vários genes envolvidos no bloqueio de moléculas pró-inflamatórias como IL-1 β , proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP-1 α), MIP-1 β e do ligante CD40 (SCOTT et al., 2000).

Ao contrário, os peptídeos de natureza aniônica são menos abundantes na literatura assim como a caracterização de seu modo de ação. Porém, trabalhos com dermicidina, enkelitina e AP1 sugerem que a carga negativa e as características anfifílicas destes peptídeos são essenciais para a sua atividade antimicrobiana, que ocorre geralmente pelo comprometimento da estabilidade da membrana lipídica dos microorganismos (DENNISON, 2006).

Peptídeos aniônicos com cadeia em α -hélice podem exercer sua atividade microbicida através do uso de sua estrutura helicoidal orientada obliquamente. Dennison, et al. (2006) demonstrou que no peptídeo AP1 essa conformação estrutural propicia uma distribuição assimétrica de hidrofobicidade ao longo do eixo helicoidal α , fazendo com que o peptídeo penetre na membrana do microrganismo em um ângulo raso (30-60°), desestruturando a membrana lipídica e comprometendo a integridade da bicamada.

Nos últimos anos, vários peptídeos antimicrobianos tem sido sintetizados com o objetivo de criar moléculas com características favoráveis a uma maior seletividade contra microrganismos patogênicos e que resistam à degradação por proteases, a exemplo do PDH Bac2A, uma variante da batenecina de bovinos, que teve sua eficiência otimizada ao ser modificada por uma substituição de aminoácidos; ou ainda, a síntese de peptídeos menores a partir de peptídeos complexos que podem ser facilmente sintetizados para produção em larga escala (HILPERT et al., 2006; JENSSEN et al., 2006; MARSHALL; ARENAS, 2003).

1.5 Microplusina

Apesar da grande variedade dos peptídeos de defesa antimicrobianos descritos em vertebrados e invertebrados, poucos foram isolados de aracnídeos. Um desses peptídeos, descrito recentemente, foi denominado microplusina. (FOGAÇA et al., 2004; MANDARD et al., 2002; PEREIRA et al., 2007).

A microplusina é um peptídeo antimicrobiano aniônico, foi isolado da hemolinfa e ovos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, possui massa molecular de 10.204 Da contendo seis resíduos de cisteína envolvidos na formação de três pontes internas de dissulfeto e caráter ácido com pI de 5,2 (FOGAÇA et al., 2004). Além dos resíduos de cisteína, também possui resíduos de histidina, dois na porção N terminal, e quatro na porção C terminal. Este peptídeo possui 61% de identidade com a hebraína isolada do carrapato *Amblyomma hebraeum*, com perfeito pareamento entre suas cisteínas, e 30-37% de similaridade com peptídeos antimicrobianos de outras espécies de carrapato, tais como, *Ixodes scapularis*, *I. ricinus*, *Ornithodoros coriaceus*, *O. parkeri* e *Argas monolakensis*. Esse perfil de similaridade sugere que essas moléculas podem formar uma nova família de peptídeos antimicrobianos (SILVA, 2009)

Estudo do perfil de expressão gênica da microplusina revelou que a mesma é expressa naturalmente nos hemócitos, corpo gorduroso (órgão análogo ao fígado em vertebrados), no trato reprodutivo das fêmeas e nos ovos do carrapato. A presença da microplusina nos dois últimos parece estar relacionada à suscetibilidade à infecção do trato reprodutivo das fêmeas durante a reprodução e dos ovos que são depositados no solo. (ESTEVES et al., 2009).

A regulação da transcrição do RNAm da microplusina no trato reprodutivo das fêmeas do carrapato é estágio dependente aumentando ao longo do desenvolvimento do ovário, atingindo um valor mais alto três dias após as fêmeas começarem a ovoposição fora do hospedeiro. Nos ovos, o aumento da expressão gênica é observado nove dias após o início da postura, atingindo o nível mais alto pouco antes da eclosão das larvas, após esse período, o nível da expressão diminui (ESTEVES et al., 2009).

A microplusina apresentou atividade bacteriostática contra *Micrococcus luteus* (bactérias Gram-positivas, MIC = 0,76µM), no entanto, não apresentou atividade contra

E. coli e *Candida albicans* quando testadas até 25 μ M por 16 horas (FOGAÇA et al., 2004).

O modo de ação da microplusina não está relacionado com a permeabilização da membrana da bactéria, mas sim, a sua capacidade de ligar-se ao cobre, elemento que pode estar envolvido no metabolismo de algumas bactérias, como por exemplo, a Gram-positiva *M. luteus*. Este mecanismo é parte dos peptídeos antimicrobianos, que assim como a microplusina possuem estrutura em α -hélice, (SILVA, 2009).

M. luteus teve seu crescimento inibido pela adição de microplusina ao meio de cultura e, posteriormente, após a adição de cobre ao meio, teve seu crescimento restabelecido. Sugerindo que a microplusina age como um seqüestrador de cobre, privando as bactérias de obtê-lo do meio e comprometendo o seu crescimento. A afinidade pelo cobre está relacionada aos resíduos de histidina nas porções terminais N e C da molécula (SILVA, 2009).

Até o momento desconhecemos qualquer atividade imunomoduladora que esse composto possa desempenhar sobre o sistema imune inato de mamíferos. Diante deste fato resolvemos caracterizar o possível papel dessa molécula como imunomoduladora da atividade de macrófagos e seu possível papel na inflamação.

1.6 Macrófagos e Inflamação

O sistema imune inato tem como função proteger o organismo contra agentes estranhos como microrganismos, células alteradas ou transformadas. Este sistema consiste na primeira barreira de proteção do organismo e reflete no desenvolvimento da imunidade específica formada posteriormente.

A resposta imune inata consiste de uma rede de mecanismos de interações celulares e moleculares responsáveis pelo reconhecimento e erradicação de patógenos envolvendo diversas vias de sinalizações capazes de rapidamente montar uma resposta biológica. Frente a ameaça de uma infecção, moléculas oriundas de microrganismos são discriminadas através de receptores celulares que reconhecem moléculas padrões preservadas entre alguns microrganismos dentre elas LPS, CpG e flagelina dentre outras. A resposta inata a infecções é iniciada em parte devido ao

reconhecimento destas moléculas por seus receptores na superfície de diversos tipos celulares. Após este contato inicia-se um processo inflamatório local importante para contenção do agente estranho. Várias células e moléculas participam deste processo, dentre elas neutrófilos, monócitos, macrófagos, células *natural killer* (NK), NK-T, linfócitos T $\gamma\delta$, além de mediadores tais como complemento, citocinas, quimiocinas e proteínas de defesa do hospedeiro geradas em alerta a presença do agente infeccioso. Estes componentes rapidamente formam um complexo para prevenir a infiltração do microrganismo e o estabelecimento da infecção. Se esta resposta inflamatória for excessiva e prolongada pode causar sérios danos ao organismo ou até mesmo a morte (TOSI, 2005).

Dentre as principais células do sistema imune inato os macrófagos desempenham papel fundamental no processo inflamatório. Essas células são produzidas na medula óssea, primariamente como monócitos e posteriormente são liberadas na corrente sanguínea. Monócitos do sangue migram para diversos tecidos e se diferenciam em macrófagos, que durante o processo inflamatório são ativados e desempenham três funções primordiais: apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação através da produção de várias citocinas e fatores de crescimento (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Os macrófagos, assim como outras células efetoras do sistema imune inato, reconhecem microorganismos através de vários grupos de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que interagem com componentes microbianos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PRRs são expressos constitutivamente na superfície de vários tipos celulares independente de memória imunológica e ativam vias de sinalização específicas, levando a distintas respostas anti-patogênicas (AKIRA et al., 2009).

Alguns componentes do sistema de defesa inata são altamente conservados entre as espécies, de insetos a mamíferos. Este padrão de conservação levou a descrição dos receptores Toll, baseado na ligação inespecífica destes às moléculas padrões conservadas entre os patógenos, PAMPs (AKIRA et al., 2006). Em mamíferos esses receptores foram denominados receptores Toll-Like (TLRs) em função do alto

grau de homologia que apresentaram em comparação aos receptores Toll descritos inicialmente em moscas do gênero *Drosophila* (TOSI, 2005).

Os TLRs são expressos em várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B, T e em células não imunes como fibroblastos e células epiteliais. Sua expressão pode ser modulada rapidamente em resposta a patógenos e citocinas e a estresses ambientais (AKIRA, 2009, AKIRA et al., 2006, TOSI, 2005).

O genoma humano codifica pelo menos dez TLRs, onde cada qual reconhece diferentes PAMPs presentes em microorganismos como, por exemplo, peptidoglicanos da parede celular bacteriana que são reconhecidos pelo TLR2, flagelina reconhecida pelo TLR5 e sequências CpG não metiladas de DNA bacteriano que se ligam ao TLR9 (AKIRA et al., 2006; OSHIUMI et al., 2008)

O principal PAMP envolvido no estímulo da resposta inflamatória local e sistêmica é o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram-negativas que se liga ao TLR4 na superfície de macrófagos. O reconhecimento do LPS se dá através de um complexo de proteínas e começa com a ligação do LPS ao LBP (proteína de ligação ao LPS) livre no plasma. O complexo LBP-LPS liga-se com alta afinidade a proteína de membrana denominada CD14. Após esta ligação o LBP se dissocia do complexo. O CD14 então se associa diretamente com o domínio extracelular do TLR4 (HUME et al., 2001). Em seguida uma proteína extracelular adicional, denominada MD2, se liga ao complexo LPS-CD14-TLR4, dando início a uma cascata de sinalizações. Esse processo leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras (MyD88, IRAK, TRAF6) para a cauda citoplasmática do TLR4. Essas proteínas vão gerar sinalização para diversos reguladores transcricionais como NF- κ B, AP1 (proteína de ativação 1), C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) e IRF-3 (fator regulador de interferon-3) que por sua vez ativarão promotores de genes, presentes nos macrófagos e responsáveis pela codificação de proteínas fundamentais na resposta imune inata (AUNG et al., 2006; MIGGIN; O'NEILL, 2006; TURKEY; BROIDE, 2010; BLASIUS; BEUTLER, 2010).

Os macrófagos ativados ao se ligarem a microorganismos podem fagocitá-los. Nesse processo além dos TLRs, outros receptores podem estar envolvidos tais como: os receptores acoplados a proteína G, receptores para Fc de imunoglobulinas, para o

fragmento C3 do complemento além de outros receptores para citocinas, principalmente de IFN- γ . Esses receptores estimularão a produção de enzimas, intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e intermediários reativos de nitrogênio, dentre eles o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO), radicais de hidrogênio ($OH^\cdot$), ânion superóxido ($O_2^\cdot$), e oxigênio (O_2). Essas moléculas podem matar os microorganismos fagocitados criando um ambiente tóxico para os mesmos. (NATHAN; SHILOH, 2000; GUZIK et al., 2003).

Além dos TLRs, outras proteínas citoplasmáticas pertencente a classe denominada NOD (nucleotide-oligomerization domain), podem reconhecer peptideoglicanos gerados por microorganismos intracelulares e contribuir para a resposta inata aumentando a resposta inflamatória via a ativação de NF κ B (ALTHMAN; PHILLPOT, 2004).

O processo inflamatório se inicia quando microorganismos e seus produtos antigênicos rompem barreiras físicas entrando em contato com as células dos tecidos internos. Células efectoras do sistema inato (neutrófilos, macrófagos e células NK) reconhecerão esses microorganismos e iniciarão a resposta celular havendo recrutamento de leucócitos para o local do tecido afetado e acúmulo de plasma contendo várias moléculas sinalizadoras tais como citocinas, fator de ativação de plaquetas (PAF), prostaglandinas e fragmentos do sistema complemento, C5a, C3a e C4a, (GUZIK et al., 2003).

A ativação de macrófagos resulta na produção de citocinas; principalmente TNF- α e IL-1 β que atuam sobre o endotélio vascular fazendo com que suas células expressem moléculas de adesão e quimiocinas (como as selectinas, ICAM-1 e VCAM-1) que auxiliarão no recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação (CHEN et al., 2003; TOSI, 2005).

Macrófagos ativados podem produzir IL-12, uma citocina que faz a ligação entre imunidade inata e adaptativa. Esta citocina estimula as células NK e células T a produzirem IFN- γ . Este por sua vez potencia a ativação dos macrófagos, aumentando sua ação microbicida devido a produção de reativos derivados do oxigênio e nitrogênio, incluindo óxido nítrico, (SCHINDLER et al., 2001).

Os macrófagos também são ativados quando células efectoras ativadas Th1 CD4+ e T CD8+ expressam CD40L na sua superfície que reconhece seu receptor CD40 na superfície dos macrófagos. Dessa forma essa ligação via CD40 somada ao estímulo pelo IFN- γ sinergiza a produção de proteínas responsáveis pelas funções efectoras dos macrófagos (SCHINDLER et al., 2001; SINGH; AGREWALA, 2006).

A presença de IFN- γ , contribui também para o aumento da expressão de moléculas MHC da classe II e a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7-1 e B7-2 e moléculas de adesão o que favorece a apresentação de antígenos e ativação da imunidade celular.

Portanto, a contribuição dos macrófagos no desenvolvimento da resposta imune inata através da liberação de mediadores imunes e citocinas ou como célula apresentadora de antígeno é extremamente importante para o desenvolvimento da resposta adaptativa e controle de infecções (BOGDAN et al., 2000; GORDON; TAYLOR, 2005).

6 CONCLUSÕES

1- A microplusina não apresentou citotoxicidade sobre macrófagos nas concentrações de 1,5-100 µg/mL.

2- A combinação de baixa concentração de LPS (100 ng/mL) e IFN-γ (500 pg/mL) como controle positivo foi superior aos valores encontrados quando essas moléculas foram utilizadas individualmente para estimular a síntese NO_2^- .

3- A microplusina:

- ativou macrófagos diretamente, independente da adição de outros mediadores imunes, induzindo a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6, porém não foi capaz de estimular a síntese de NO_2^- e IL-1β.

- não inibiu a atividade do LPS induzida em macrófagos (efeito anti-endotóxico), uma vez que não alterou a produção de mediadores como NO_2^- , $\text{TNF-}\alpha$ ou IL-6.

- potencializou a atividade dos macrófagos estimulados por IFN-γ aumentando a síntese de NO_2^- e $\text{TNF-}\alpha$.

4- Estes dados mostram que a microplusina possui atividade pró-inflamatória, podendo contribuir para o controle da resposta imune contra microrganismos patogênicos.

REFERÊNCIAS*

AKIRA S. Mammalian Toll-like receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 5, p. 5-11, 2003.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 24, p. 783-801, 2006.

AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.**, v. 85, p.143-56, 2009.

ALTHMAN, R.; PHILLPOT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and NOD proteins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 25-32, 2004.

ARMANT, M. A.; FENTON, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. **Genome Biol.**, v. 3, p. 3011.1-3011.6, 2002.

AUNG, H. T.; SCHRODER, K.; HIMES, S. R.; BRION, K.; VAN ZUYLEN, W.; TRIEU, A.; SUZUKI, H.; HAYASHIZAKI, Y.; HUME, D. A.; SWEET, M. J.; RAVASI, T. LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. **FASEB J.**, v. 20, p.1315-1327, 2006.

BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, v. 26, p. 305-315, 2010.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 64-75, 2000.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 5460-5475, 2003.

BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D. J.; SCOTT, M. G.; HANCOCK, R. E. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 1727-1732, 2005.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro.

BROGDEN, KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 238-50. 2005.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, p. 24-30, 2006.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v. 198, p. 169-184, 2004.

CHEN, X. L.; ZHANG, Q.; ZHAO, R.; DING, X.; TUMMALA, P. E.; MEDFORD, R. M. Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, p. 573-80, 2003.

DAVIDSON, D. J.; CURRIE, A. J.; REID, G. S.; BOWDISH, D. M.; MACDONALD, K. L.; MA, R. C.; HANCOCK, R. E.; SPERT, D. P. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. **J. Immunol.**, v. 172, p. 1146-1156, 2004.

DENNISON, S. R.; HOWE, J.; MORTON, L. H.; BRANDENBURG, K.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. Interactions of an anionic antimicrobial peptide with *Staphylococcus aureus* membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 8, p. 1006-1010, 2006.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reaction nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

ESTEVEZ, E.; FOGAÇA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 33, p. 913-919, 2009.

FINLAY, B. B.; HANCOCK, R. E. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 497-504, 2004.

FOGAÇA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, p.191-200, 2004.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy.**, v. 4, p. 281-286, 2005.

GANZ, T.; LEHRER, R. I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. **Mol. Med. Today.**, v. 5, p. 292-297, 1999.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GOUGH, M.; HANCOCK, R. E.; KELLY, N. M. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4922-4927, 1996.

GOUMON, Y.; LUGARDON, K.; KIEFFER, B.; LEFÈVRE, J. F.; VAN DORSSELAER, A.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M. H. Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells. **J. Biol. Chem.**, v. 6, p. 29847-29856, 1998.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, p. 469-487, 2003.

HANCOCK, R. E.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 1317-1323, 1999.

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

HANCOCK, R. E.; BROWN, K. L.; MOOKHERJEE, N. Host defence peptides from invertebrates-emerging antimicrobial strategies. **Immunobiology**, v. 211, p. 315-322, 2006.

HILPERT, K.; ELLIOTT, M. R.; VOLKMER-ENGERT, R.; HENKLEIN, P.; DONINI, O.; ZHOU, Q.; WINKLER, D. F.; HANCOCK, R. E. Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. **Chem. Biol.**, v. 13, p.1015-1017, 2006.

HUME, D. A.; UNDERHILL, D. M.; SWEET, M. J.; OZINSKY, A. O.; LIEW, F. Y.; ADEREM, A. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. **BMC Immunol.**, v. 2, p. 2-11, 2001.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DA SEPSE. Dados brasileiros. Disponível em: <http://www.sepsisnet.org/Index.htm>. Acesso em: 04 jun. 2010.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 491-511, 2006.

KANDLER, K.; SHAYKHIEV, R.; KLEEMANN, P.; KLESCZ, F.; LOHOFF, M.; VOGELMEIER, C.; BALS, R. The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. **Int. Immunol.**, v. 18, p. 1729-1736, 2006.

LAI, R.; LIU, H.; HUI LEE, W.; ZHANG, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 26, p. 796-799, 2006.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 1295-1309, 2002.

LEON, C. G.; TORY, R.; JIA, J.; SIVAK, O.; WASAN, K. M. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. **Pharm. Res.**, v. 25, p. 1751-1761, 2008.

LORENZINI, D. M.; DA SILVA, P. I. Jr.; FOGAÇA, A. C.; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 27, p. 781-791, 2003.

LOWENSTEIN, C. J.; ALLEY, E. W.; RAVAL, P.; SNOWMAN, A. M.; SNYDER, S.H.; RUSSELL, S. W.; MURPHY, W. J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two

upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, p. 9730-9734, 1993.

MANDARD, N.; BULET, P.; CAILLE, A.; DAFFRE, S.; VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p.1190-1198, 2002.

MARSHALL, S. H.; ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic. J. Biotechnology**, v. 6, p. 271-284, 2003.

MCPHEE, J. B.; HANCOCK, R. E. Function and therapeutic potential of host defence peptides. **J. Pept. Sci.**, v. 11, p. 677-687, 2005.

MIGGIN, S. M.; O'NEILL, L. A. New insights into the regulation of TLR signaling. **J. Leukoc. Biol.**, v.80, p.220-226, 2006.

MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 64, p. 922 – 933, 2007.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, p. 8841-8848, 2000.

OSHIUMI, H.; MATSUO, A.; MATSUMOTO, M.; SEYA, T. Pan-vertebrate toll-like receptors during evolution. **Curr. Genomics**, v. 9, p. 488-493, 2008.

PEREIRA, L. S.; SILVA, P. I. JR.; MIRANDA, M. T.; ALMEIDA, I. C.; NAOKI, H.; KONNO, K.; DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 352, p. 953-959, 2007.

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

SCHINDLER, H.; LUTZ, M. B.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. **J. Immunol.**, v. 166, p. 3075-3082, 2001.

SCHRODER, K.; SWEET, M. J.; HUME, D. A. Signal integration between IFN-gama and TLR signalling pathways in macrophages. **Immunobiology**, v. 211, p. 511-524, 2006.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gama an overview of signals, mechanisms and function. **J. Leukocyte Biol.**, v. 75, p. 163-189, 2004.

SCHITTEK, B.; HIPFEL, R.; SAUER, B.; BAUER, J.; KALBACHER, H.; STEVANOVIC, S.; SCHIRLE, M.; SCHROEDER, K.; BLIN, N.; MEIER, F.; RASSNER, G.; GARBE, C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 1133-1137, 2001.

SCOTT, M. G.; ROSENBERGER, C. M.; GOLD, M. R.; FINLAY, B. B.; HANCOCK, R. E. An alpha-helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. **J. Immunol.**, v. 15, p. 3358-3365, 2000.

SCOTT, M.G.; DULLAGHAN, E.; MOOKHERJEE, N.; GLAVAS, N.; WALDBROOK, M.; THOMPSON, A.; WANG, A.; LEE, K.; DORIA, S.; HAMILL, P.; YU, JJ.; LI, Y.; DONINI, O.; GUARNA, M. M.; FINLAY, B. B.; NORTH, J. R.; HANCOCK, R. E. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, p. 465-472, 2007.

SCOTT, M. G.; DAVIDSON, D. J.; GOLD, M. R.; BOWDISH, D.; HANCOCK, R. E. The human antimicrobial peptide LL- 37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **J. Immunol.**, v. 169, p. 3883-3891, 2002.

SILVA, E.; PEDRO, M. A.; SOGAYAR, A. C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C. L.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G.; DE SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C.; DE MATOS, G. F.; BENTO, A. M.; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. C.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit. Care**, v. 8, p. 251-260, 2004.

SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; CAMPOS, C. B.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide

from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 34735-34746, 2009.

SILVA, P. I. JR.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 33464-33470, 2000.

SINGH, V.; AGREWALA, J. N. Regulatory role of pro-Th1 and pro-Th2 cytokines in modulating the activity of Th1 and Th2 cells when B cell and macrophages are used as antigen presenting cells. **BMC Immunol.**, v. 7, p. 7-17, 2006.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 15, p. 51-70, 2006.

TOSI, M. F. Innate immune responses to infection. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 116, p. 241-249, 2005.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 125, p. 24-32, 2010.

VALLESPI, M. G.; GLARIA, L. A.; REYES, O.; GARAY, H. E.; FERRERO, J.; ARAÑA, M. J. A. Limulus antilipopolysaccharide factor-derived peptide exhibits a new immunological activity with potential applicability in infectious diseases. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, p. 669-675, 2000.

VIZIOLI, J.; SALZET, M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 494-496, 2002.

YANG, D.; CHERTOV, O.; BYKOVSKAIA, S. N.; CHEN, Q.; BUFFO, M. J.; SHOGAN, J.; ANDERSON, M.; SCHRÖDER, J. M.; WANG, J. M.; HOWARD, O. M.; OPPENHEIM, J. J. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. **Science**, v. 286, p. 525-528, 1999.

YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L. HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophys. J.**, v. 81, p. 1475-1485, 2001.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 27-55, 2003.

WASEEM, T.; DUXBURY, M.; ITO, H.; ASHLEY, S. W.; ROBINSON, M. K. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. **Surgery**, v.143, p. 334-342, 2008.

WEHAMP, J.; HARDER, J.; WEICHENTHAL, M.; MUELLER, O.; HERRLINGER, K. R.; FELLERMANN, K.; SCHROEDER, J. M.; STANGE, E. F. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 9, p. 215-223, 2003.

WELLS, C. A.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. **J. Leukoc. Biol.**, v. 78, p. 9–13, 2005.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 24, p. 389-395, 2002.

ZUGHAIER, S. M.; SHAFER, W. M.; STEPHENS, D. S. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 1251-1262, 2005.