

Introdução

O Brasil é o maior produtor de laranja doce no mundo, cujas exportações de suco concentrado representam 80% do mercado mundial. Esta produtividade tem sido constantemente desafiada por problemas fitossanitários que exigem o uso contínuo de produtos químicos, os quais favorecem a seleção de microrganismos resistentes, aumentam o risco ambiental e podem ser uma importante barreira na comercialização do fruto/suco gerando grande impacto econômico. Deste modo, é necessário a busca por alternativas viáveis como os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que são moléculas efetoras da imunidade inata encontradas em múltiplos organismos incluindo vertebrados, insetos e plantas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunotoxicidade de potenciais AMPs encontrados no genoma do citrus que apresentam atividade antimicrobiana contra *Xanthomas citri*.

Metodologia

A atividade imunotóxica dos AMPs foram quantificados *in vitro* utilizando os seguintes ensaios:

- Ensaio de hemólise efetuado segundo o protocolo descrito por Onuma *et al.*, 1999 utilizando hemácias humanas do grupo O, Rh⁺.
- Degranulação de mastócitos efetuada segundo protocolo descrito por Yufang, M. *et al.*, 2010
- Atividade de superóxido desmutase (SOD) realizado através do kit 19160 SOD determination, da marca Sigma-Aldrich.
- Linfoproliferação através da incorporação de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ou Thiazol blue) nas células em multiplicação, adaptado de Abe & Matsuki, 2000.

Resultados e discussões

O principal ensaio de citotoxicidade das AMPs para as células eucarióticas é o ensaio de hemólise, e como mostra a Tabela 01 os AMPs dos citrus (Pp 1105 e Pp 1106) não apresentam atividade hemolítica.

Tabela 01: Porcentagem de hemólise nas diferentes amostras de AMPs

PEPTÍDEOS	Hemólise (%)			
	25.10 ⁻³ M	50.10 ⁻³ M	75.10 ⁻³ M	100.10 ⁻³ M
Pp 1105 (citros)	0,8	0,4	0,2	0,5
Pp 1106 (citros)	0,6	0,1	0,1	0,1
CJ 0714	14,0	52,7	83,0	97,4
EC 0604	87,7	99,6	99,9	99,3
PE 1113 -1a (SC 0902)	1,1	3,5	9,7	27,9
Oxitocina(-)	0,4	0,4	0,3	1,2

Mecanismos imunológicos e não imunológicos podem promover a ativação dos mastócitos, induzindo a degranulação e a liberação de mediadores como a histamina e a heparina que resultam inúmeros efeitos biológicos e são denominados de reações alérgicas ou reações de hipersensibilidade do tipo I. Como mostra a Figura 01, os AMPs de citrus Pp 1105 e Pp 1106 não induzem degranulação de mastócito, logo parecem não possuir capacidade de induzir respostas alérgicas em vertebrados, embora, Pp 1105 na concentração de 100.10⁻³M apresente uma reduzida capacidade (20%) de ativar os mastócitos.

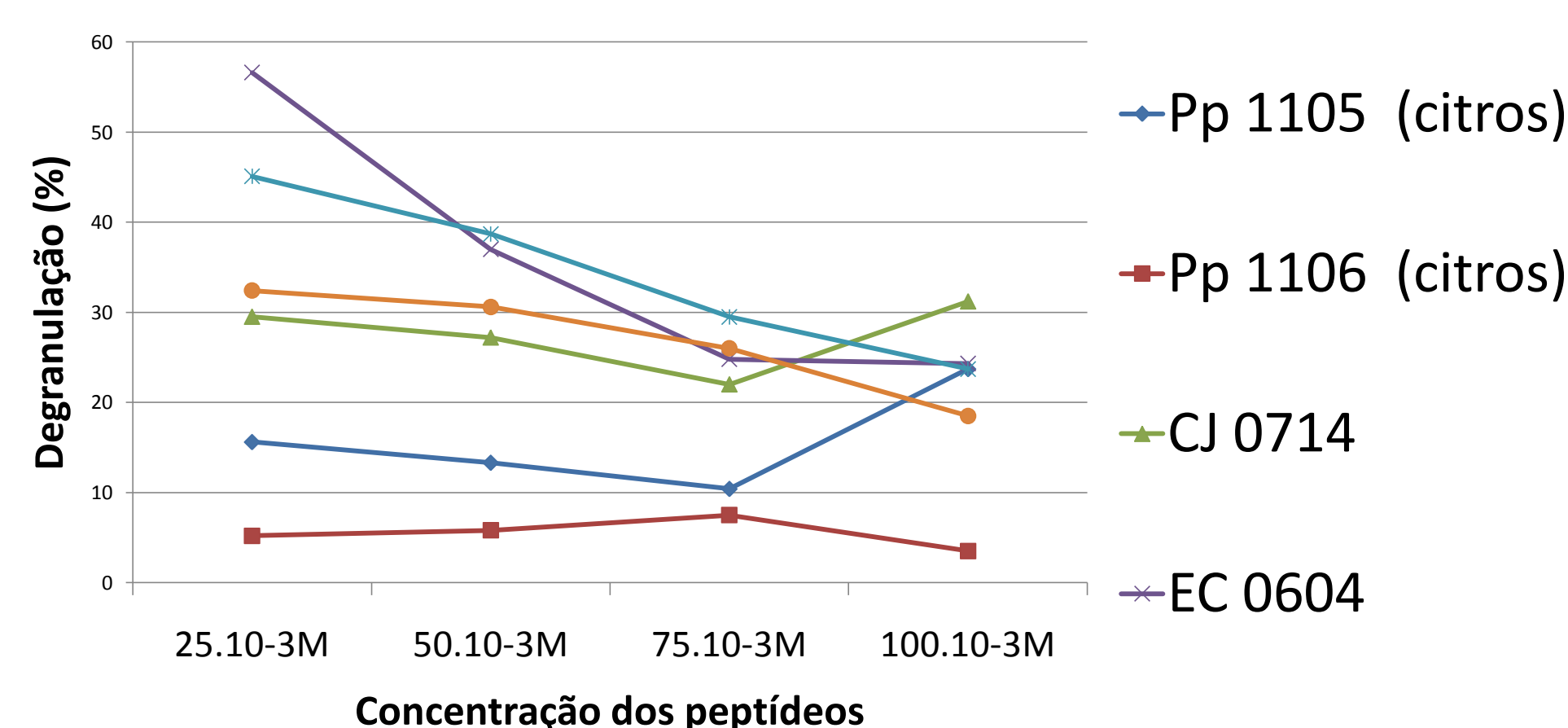


Figura 1: Porcentagem de degranulação dos mastócitos determinada pelo liberação de β-D-glicosaminidase em mastócitos lisados, obtidos de lavagem peritoneal de ratos Wistar adultos com uma solução de PBS. O lavado é cultivado em placa de 96 poços na presença de 10μl dos AMPs (25.10⁻³M, 50.10⁻³M, 75.10⁻³M e 100.10⁻³M), a 37° por 15 minutos. Após centrifugação 50 μl do sobrenadante é adicionado em 50 μl de 3mgp-nitrophenil-N-acetil-β-D-glicosaminidina, dissolvida em acetato de sódio e uma há uma segunda encubação à 37° por 6 horas. A reação termina com a adição de 100μl de carbonato de sódio.

O superóxido é uma das principais espécies reativas de oxigênio produzidas pela respiração celular e a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e que tem importância fisiológica fundamental na maioria das células expostas ao oxigênio.

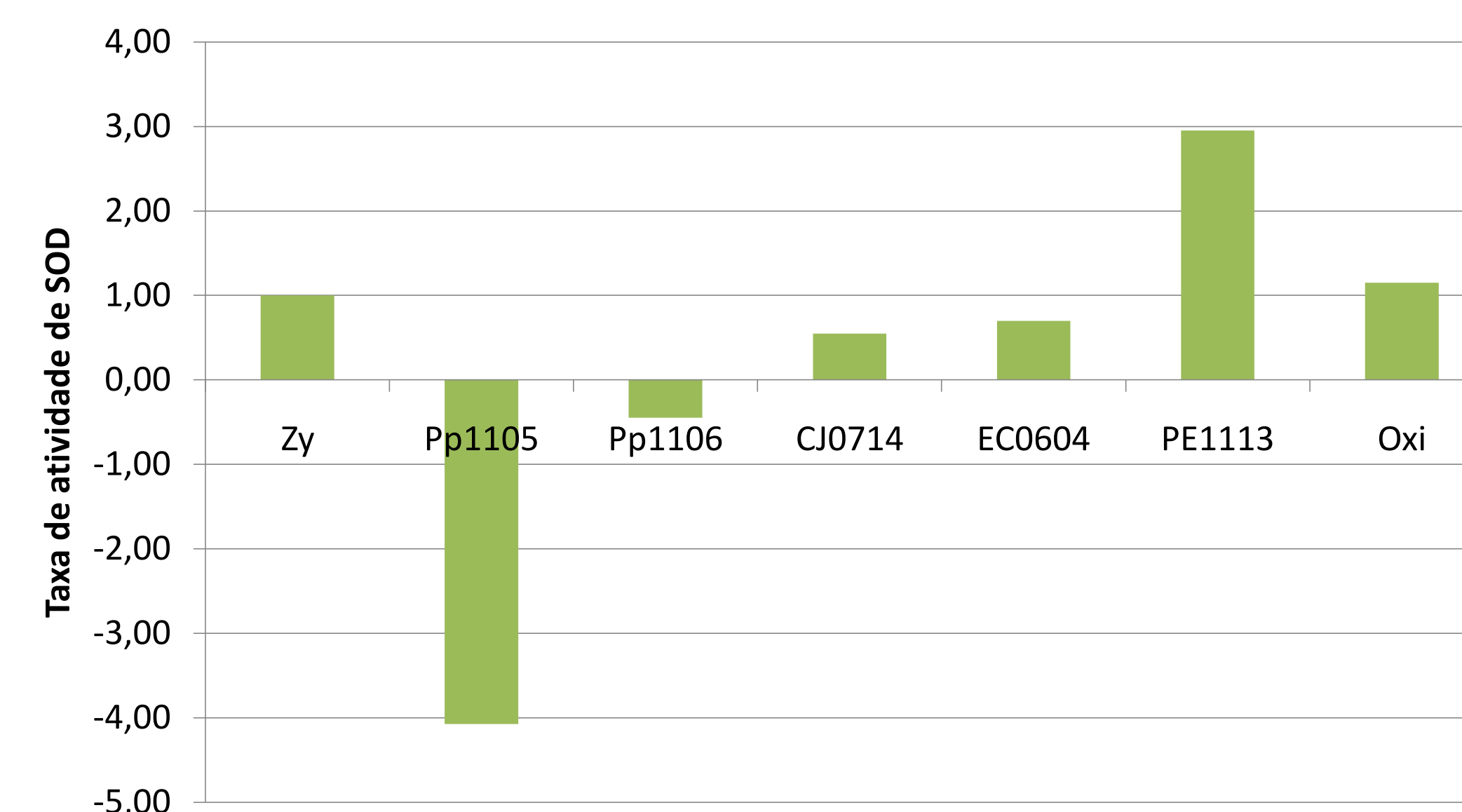


Figura 2: Determinação da atividade da enzima SOD, através de ensaio com WST-1 (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-dissulfophenyl]-2H-tetrazolium monosodium salt), que forma um corante solúvel em água, através da redução do superóxido. A absorbância a 440nm é proporcional à quantidade de anions superóxido, logo, a atividade de inibição da enzima SOD pode ser quantificada medindo a diminuição no desenvolvimento da cor.

Dentre os AMPs testado, apenas os peptídeos antimicrobianos de citrus, Pp 1105 e Pp 1106 apresentaram atividade inibitória da enzima superóxido dismutase (SOD).

A atividade imunomodulatória dos AMPs foram testados em ensaios de linfoproliferação em células esplênicas murinas.

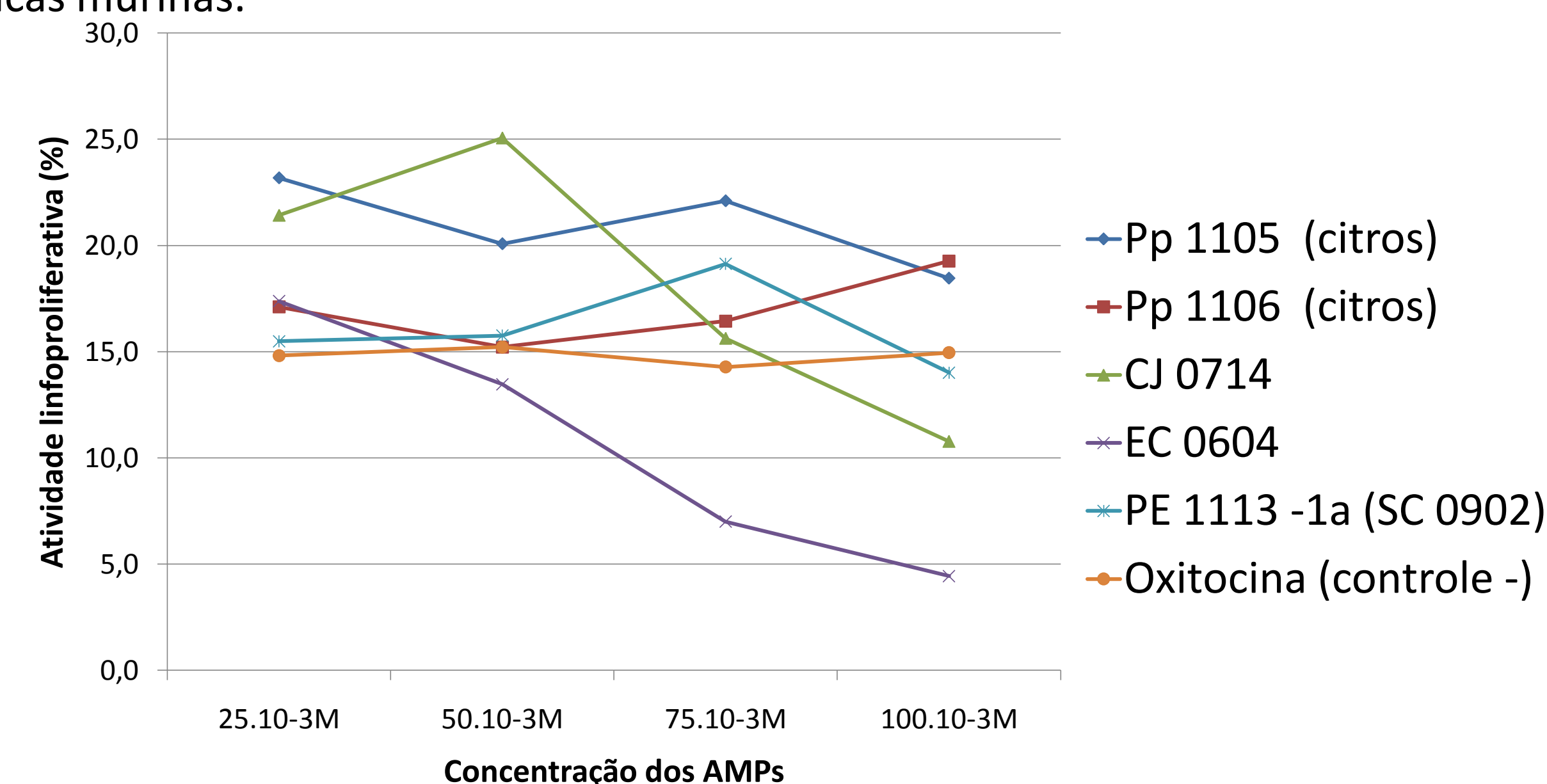


Figura 3: Células esplênicas murinas na concentração de 0,5.10⁶ células/poço obtidas pelo rompimento mecânica da cápsula do órgão. Foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços na presença de 20μl dos AMPs nas concentrações anteriormente citadas, a 37 C e 5% CO₂ durante 48 horas. Após a incubação, adicionou-se 10μl de MTT 5mg/ml e encubou-se novamente por 4 horas, quando é adicionado 20μl de SDS 20% e deixado overnight antes da leitura em 540nm.

A proliferação foi quantificada pelo ensaio colorimétrico da redução de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ou Thiazol blue) e expresso em porcentagem de proliferação

Conclusão

Os AMPs de citrus não apresentam função de citotoxicidade nem imunomodulatório quando testados *in vitro* logo teoricamente poderiam introduzidas em plantas como os citrus através de transgenia e parecem não fornecem riscos a saúde dos/aos vertebrados.

Referências

- Onuma, Y.; *et al* Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism, *Toxicon*, Volume 37, Issue 1, January 1999, Pages 55-65.
- Yufang, M.; *et al* Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*, *Genomics*, Volume 95, Issue 1, January 2010, Pages 66-71.
- Abe K. & Matsuki N. 2000. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci. Res.* 38:325-329.