

ISABEL CRISTINA MARQUES FENSTERSEIFER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E IMUNOMODULATÓRIA DE
CICLOTÍDEOS**

Brasília
2014



ISABEL CRISTINA MARQUES FENSTERSEIFER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E IMUNOMODULATÓRIA DE
CICLOTÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Octavio Luiz Franco

Brasília
2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1014733.

F341a Fensterseifer, Isabel Cristina Marques.
Avaliação da atividade antibacteriana e imunomodulatória
de ciclotídeos / Isabel Cristina Marques Fensterseifer. --
2014.
80 f. : il. ; 30 cm.
Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação Strictu
Sensu em Patologia Molecular, 2014.
Inclui bibliografia.
Orientação: Octavio Luiz Franco.
1. Pele - Doenças. 2. Stafilococos áureos. 3. Antibióticos.
I. Franco, Octávio Luiz. II. Título.

CDU 616.5-003.6

ISABEL CRISTINA MARQUES FENSTERSEIFER

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E IMUNOMODULATÓRIA DE
CICLOTÍDEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia Molecular.

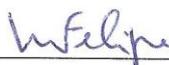
Aprovada em 17/02/2014.

BANCA EXAMINADORA



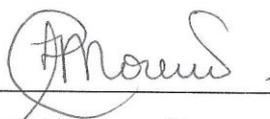
Professor Doutor Octavio Luiz Franco
(Universidade de Brasília – Brasília/DF)

ORIENTADOR



Professora Doutora Maria Sueli Soares Filipe
(Universidade de Brasília – Brasília/DF)

EXAMINADORA



Professora Doutora Susana Elisa Moreno
(Universidade Católica de Brasília – Brasília/DF)

EXAMINADORA

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais – Josefa Maria Coelho Marques e Romeo Fensterseifer – por todo o apoio e a confiança, sem eles definitivamente não teria chegado até aqui.

Agradeço aos meus irmãos – James Fensterseifer e Guilherme Marques Fensterseifer – e a minha cunhada – Adla Marques – pelo apoio durante essa caminhada.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Octávio Luiz Franco, pelas oportunidades que me ofereceu, pela confiança depositada em mim durante todos esses anos e pela paciência.

Agradeço a CAPES, ao CNPq e a FAPDF pelo financiamento do projeto.

Agradeço ao meu colega que percorreu todo esse caminho comigo, Osmar Nascimento Silva, me dando todo o apoio como pesquisador e como amigo.

Agradeço aos alunos de iniciação científica – Elaine Araújo, Diego Gomes, Hortência Holanda, Natasha Novaes, Guilherme Fensterseifer, Paulo Renato Miranda, Renata Cassé e Mayra Martins – que me ajudaram na realização dos experimentos e nas horas de desespero quando algo não respondia como o esperado.

Agradeço ao apoio contínuo dos amigos William Farias Porto, Heloisa Franzener, Patrícia Berezowski Machado, Nathalia Megale e Mayra Martins que sempre me apoiam e estimulam a prosseguir em cada passo.

Agradeço a veterinária – Tânia Santana – por todas as coletas bem realizadas e conversas de descontração.

Agradeço a técnica do laboratório – Kênia Chaves – por todas as cotações e compra de materiais realizadas durante todo o processo.

RESUMO

Referência: FENSTERSEIFER, I.C.M. **Avaliação da atividade antibacteriana e imunomodulatória de ciclotídeos**. 2014. 80 p. Dissertação (Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014

A pele é o maior e o mais exposto órgão do corpo humano. Embora seja extremamente eficaz na proteção contra intempéries do ambiente externo, infecções na pele são comuns, podendo ser causadas por bactérias, fungos ou vírus. A principal bactéria associada à infecção cutânea consiste na *Staphylococcus aureus*. Embora a maioria das infecções possa ser facilmente tratada, outras não apresentam a mesma facilidade. Isto tem sido observado especialmente em infecções adquiridas em feridas cirúrgicas, que são o tipo de infecção hospitalar mais comum e uma importante causa de morbidade e mortalidade. Essas infecções cada vez mais vêm sendo ocasionadas por patógenos resistentes aos tratamentos convencionais enfatizando a importância de se identificar novas terapias antimicrobianas mais eficazes. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm emergido como um novo grupo promissor para serem avaliados na intervenção terapêutica de doenças infecciosas. Dentre os PAMs se destacam os ciclotídeos que são peptídeos cíclicos isolados inicialmente de plantas que possuem em sua estrutura seis resíduos de cisteína altamente conservados, que formam três pontes de dissulfeto interligadas. Essa estrutura faz com que estes peptídeos sejam altamente estáveis e tem atraído um interesse como modelos baseados em peptídeos para aplicações de concepção de drogas. Aqui os ciclotídeos CyO2, KB1 e KB2 foram avaliados com o objetivo de caracterizar suas atividades citotóxica, imunomodulatória e antiestafilocócica *in vitro* e *in vivo* em um modelo de infecção subcutânea. Nos ensaios *in vitro* foi observado que os ciclotídeos não apresentaram atividade citotóxica para os monócitos RAW 264.7 e apresentaram atividade antiestafilocócica variando de forte (CyO2 e KB2) a moderada (KB1). Nos ensaios de avaliação da atividade imunomodulatória, a citocina TNF- α apresentou variação significativa somente nos grupos tratados com CyO2, onde os níveis desta citocina foram reduzidos. Nos ensaios *in vivo*, os ciclotídeos reduziram significativamente a carga bacteriana total corroborando com a atividade antiestafilocócica *in vitro*. Além disso, o ciclotídeo KB2 induziu a um aumento na secreção de TNF local na maior concentração testada (3,0 mg.kg⁻¹). Em conclusão, os ciclotídeos CyO2, KB1 e KB2 podem constituir uma nova alternativa terapêutica para o tratamento local de infecções, sendo necessários mais estudos para avaliar a aplicabilidade destes PAMs.

Palavras chaves: Ciclotídeos, peptídeos antimicrobianos, ferida subcutânea, atividade antibacteriana, atividade antiestafilocócica.

ABSTRACT

Reference: FENSTERSEIFER, I.C.M. **Evaluation of immunomodulatory and antibacterial activity of cyclotides**. 2014. 80 p. Dissertation (Molecular Pathology) - University of Brasilia, Brasilia, 2014

The skin is the largest and the most exposed organ of the human body. While it is extremely effective in protecting against external environment setbacks, skin infections are common and may be caused by bacteria, fungi or virus. The main bacterium associated with skin infection is *Staphylococcus aureus*. Although the majority of infections can be easily treated, others did not demonstrate the same facility. This could occurs, especially in infections acquired in surgical wounds, which are the most common hospital-acquired infections and are major cause of morbidity and mortality. These infections are increasingly caused by pathogens resistant to conventional treatments, which emphasizes the importance of identifying new and more effective antimicrobial therapies. Antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as a promising new therapy to be evaluated in the treatment of infectious diseases. Among the AMPs, the cyclotides have been focused, being cyclic peptides originally isolated from plants sources, showing six highly conserved cysteine residues in their structure, which form three interconnected disulfide bonds. This structure produced highly stable peptides and has attracted interest as a peptide-based model for drugs designing. Here the cyclotides CyO2, KB1 and KB2 were evaluated in order to characterize their cytotoxic, immunomodulatory and antistaphylococcal activities *in vitro* and *in vivo* by using in a model of subcutaneous infection. *In vitro* essays showed no cytotoxicity activity to RAW 264.7 monocytes with all cyclotides. Otherwise antistaphylococcal activities ranging from strong (CyO2 and KB2) to moderate (KB1) were also observed. In trials evaluating the immunomodulatory activity, the cytokine TNF- α showed a significant variation only in groups treated with CyO2, where cytokine levels were reduced. At *in vivo* assays, the cyclotides significantly reduced the total bacterial load corroborating with the *in vitro* antistaphylococcal activity. Furthermore, the KB2 cyclotide induced an increase in local TNF secretion at the highest concentration tested (3.0 mg.kg⁻¹). In conclusion, the cyclotides CyO2, KB1 and KB2 could represent a novel therapeutic approach for the local treatment of infections, more studies being needed to evaluate the applicability of these AMPs.

Key words: cyclotides, antimicrobial peptides, subcutaneous wound, antibacterial activity, antistaphylococcal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Staphylococcus aureus* e doenças estafilocóccias. A) Fotomicrografia eletrônica de varredura (MEV), mostrando um agrupamento de *S. aureus*, aumentado 20.000x. B) Fotografia de um abscesso cutâneo no pé (vista lateral) causado por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Fotos adaptadas de: Public Health Image Library (PHIL). Crédito da foto (A): Major Kirk Waibel, MD.15

Figura 2. Estrutura geral da pele e anexos. Podem-se visualizar as três camadas da pele: Epiderme, Derme e Hipoderme, e alguns anexos desse tecido como folículo capilar e glândula sebácea. Disponíveis em: http://www.clinicadevitiligo.com.br/images/pele_1.gif.....18

Figura 3. Eventos da imunidade inata cutânea. Lesões epiteliais ou invasão do tecido por patógenos leva a liberação de citocinas primárias e ativação das células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos, e células de defesa residentes no epitélio, células de Langerhans (CL), células dendríticas (CD) dérmicas e mastócitos. As CL e CD são estimuladas para seguir para os linfonodos locais para realização da apresentação de antígenos as células T naives e de memória. As citocinas e quimiocinas produzidas através das cascatas de ativação do endotélio, regulam positivamente a expressão de moléculas de adesão, incluindo a E-selectina e moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM1), e dirigem o recrutamento de componentes da imunidade inata adicionais de acordo com os sinais específicos que são gerados. Adaptado de Kupper e Fuhlbrigge (2004).....20

Figura 4. Modelos de mecanismos de ação de PAMs. A) Modelo Barril. B) Modelo Carpete. C) Poro toroidal. D) Poro Toroidal Desordenado. E) Modelo afinador de Membrana. F) Acumulador de Lipídeos Carregados. G) Formação de intermediários de membrana não dupla camada. H) Direcionamento a lipídeos oxidados. I) Carreador de ânions. J) Despolarização não lítica. K) Modelo de Eletroporação. Esses eventos não são excludentes, podendo ocorrer em paralelo. Adaptado de Nguyen, Haney e Vogel (2011)25

Figura 5. Estrutura molecular do ciclotídeo kalata B1. A) A estrutura tridimensional está demonstrada em *cartoon*, construído com Pymol, mostrando as ligações dissulfeto em amarelo (molécula manipulada a partir do banco de dados PDB). B) Diagrama esquemático evidenciando os resíduos de aminoácido que

formam os *loops* (azul) do ciclótideo kalata B1 e os resíduos de cisteína envolvidos na CCK (amarelo). Adaptado de Gruber *et al.* (2007)26

Figura 6. Diferença entre as famílias Möbius e braceletes dos ciclótideos.

A) Ilustração esquemática das configurações *trans*-Pro e *cis*-Pro, diferenciação das subfamílias braceletes e Möbius, respectivamente. B) Estrutura tridimensional da kalata B1, em destaque em azul os resíduos da cadeia lateral Trp¹⁹, em rosa, e Pro²⁰, em amarelo. C) Sobreposição das estruturas de uma braceletes (cicloviolacina O2 em cinza) e de uma Möbius (kalata B1 em azul), em destaque temos o *loop*5, com a visualização da diferença de torção deste *loop* entre as duas subfamílias. ...28

Figura 7. Distribuição de novos fármacos aprovados pelo FDA – 2009 a 2011 – separados por espécie química. Adaptado de Albericio e Kruger (2012) ..36

Figura 8. Avaliação do efeito do ciclótideo CyO2 sobre a viabilidade/proliferação celular de células da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas por 24 e 48 h com o ciclótideo CyO2 nas concentrações de 29,4-437,8 nM. Os valores representam a média ± DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * p<0,5 ** p<0,01, *** p<0,001 comparando o grupo não tratado e a amostra tratada por 48 h.51

Figura 9. Avaliação do efeito do ciclótideo KB1 sobre a viabilidade/proliferação celular de células da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas por 24 e 48 h com o ciclótideo KB1 nas concentrações de 29,7-475,4 nM. Os valores representam a média ± DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * p<0,5 ** p<0,01, *** p<0,001 comparando o grupo não tratado e a amostra tratada por 48 h.50

Figura 10. Avaliação do efeito do ciclótideo KB2 sobre a viabilidade/proliferação celular de células da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas por 24 e 48 h com o ciclótideo KB2 nas concentrações de 29,7-475,4 nM. Os valores representam a média ± DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * p<0,5 ** p<0,01, *** p<0,001 comparando o grupo não tratado. A p<0,5, aa p<0,01, aaa p<0,001 comparando os tratamentos nos tempos diferentes, 24 h e 48 h.49

Figura 11. Avaliação da secreção de TNF-α no sobrenadante da cultura de monócitos RAW 264.7 tratada com CyO2. As células foram estimuladas por 6, 12, 24 e 48 h com o ciclótideos. Os valores representam a média ± DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * p<0,5, ** p<0,01, ***

p<0,001 comparando o grupo não tratado e a amostra tratada nos respectivos tempos.....52

Figura 12. Avaliação da secreção de TNF- α no sobrenadante da cultura de monócitos RAW 264.7 tratadas com KB1. As células foram estimuladas por 6, 12, 24 e 48 h com o ciclotídeo KB1 (29,7 – 475,4 nM). Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * p<0,5, ** p<0,01, *** p<0,001 comparando o grupo não tratado e a amostra tratada nos respectivos tempos.53

Figura 13. Avaliação da secreção de TNF- α no sobrenadante da cultura de monócitos RAW 264.7 tratadas com KB2. As células foram estimuladas por 6, 12, 24 e 48 h com o ciclotídeos KB2 (29,1 – 465,2 nM). Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * p<0,5, ** p<0,01, *** p<0,001 comparando o grupo não tratado e a amostra tratada nos respectivos tempos.54

Figura 14. Recuperação da carga bacteriana da ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923 após 7 dias de tratamento. As feridas foram inoculadas com 2.10^9 células/mL da bactéria e tratadas com: (A) Vetaglós® (Gentamicina 5 mg.kg⁻¹, sulfanilamida 50 mg.kg⁻¹, Sulfadiazina 50 mg.kg⁻¹), CyO2 (0,75 mg.kg⁻¹, 1,5 mg.kg⁻¹, 3,0 mg.kg⁻¹, 6,0 mg.kg⁻¹) e DMSO 2,5 % por 7 dias. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com p<0,05 como significativo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 em relação ao controle negativo.55

Figura 15. Recuperação da carga bacteriana da ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923 após 7 dias de tratamento. As feridas foram inoculadas com 2.10^9 células/mL da bactéria e tratadas com: (A) vetaglós® (Gentamicina 5 mg.kg⁻¹, sulfanilamida 50 mg.kg⁻¹, Sulfadiazina 50 mg.kg⁻¹), KB1 (1,5 mg.kg⁻¹, 3,0 mg.kg⁻¹) e DMSO 2,5 % por 7 dias. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com p<0,05 como significativo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 em relação ao controle.56

Figura 16. Recuperação da carga bacteriana da ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923 após 7 dias de tratamento. As feridas foram inoculadas com 2.10^9 células/mL da bactéria e tratadas com: (A) vetaglós® (Gentamicina 5 mg.kg⁻¹, sulfanilamida 50 mg.kg⁻¹, Sulfadiazina 50 mg.kg⁻¹

¹), KB2 (0,75 mg.kg⁻¹, 1,5 mg.kg⁻¹, 3,0 mg.kg⁻¹) e DMSO 2,5 %. Os valores representam a média ± DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com p<0,05 como significativo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 em relação ao controle.....57

Figura 17. Efeitos do ciclotídeo CyO2 sobre a secreção de TNF-α no soro e ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923.

Animais tratados com CyO2, (A) soro e (B) ferida. Os valores representam a média ± DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com p<0,05 como significativo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 em relação ao controle não infectado.

.....59

Figura 18. Efeitos do ciclotídeo KB1 sobre a secreção de TNF-α no soro e ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923.

Animais tratados com KB1, (A) soro e (B) ferida. Os valores representam a média ± DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com p<0,05 como significativo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 em relação ao controle não infectado.

.....60

Figura 19. Efeitos do ciclotídeo KB2 sobre a secreção de TNF-α no soro e ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923.

Animais tratados com KB2, (A) soro e (B) ferida. Os valores representam a média ± DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com p<0,05 como significativo. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 em relação ao controle não infectado.

.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeo aprovados pelo FDA no período de 2009 a 2011. Os peptídeos foram listados pelos nomes genéricos, nomes comerciais, doença alvo e propriedades.37

Tabela 2. Apresentação dos grupos experimentais utilizados nos ensaios antibacterianos *in vivo*, modelo de ferida subcutânea contaminada com *S. aureus*......45

Tabela 3. Avaliação da atividade antiestafilocócica *in vitro* dos ciclótídeos KB1, KB2, KB7 e CyO2 contra *S. aureus* ATCC25923. As células bacterianas foram incubadas com o ciclótídeo nas concentrações de 25-100 μ M por 6 h.48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.1.1	Infecções por <i>S. aureus</i> no Brasil	15
1.2	A PELE COMO MECANISMO DE DEFESA	17
1.2.1	A resposta imune inata contra <i>S. aureus</i>	18
1.2.2	Resposta imune adaptativa contra <i>S. aureus</i>	21
1.3	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES CUTÂNEAS	22
1.4	CICLOTÍDEOS	25
1.4.1	Atividades biológicas dos ciclotídeos	28
1.5	A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E O USO DE PEPTÍDEOS	35
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS	41
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i>	41
4.3	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	42
4.4	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	42
4.4.1	Considerações éticas	42
4.4.2	Animais	43
4.4.3	Modelo de infecção de ferida cirúrgica	43
4.5	DOSAGEM DE TNF- α	46
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4.7	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	47
5	RESULTADOS	48
5.1	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i>	48
5.2	ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS RAW 264.7	49
5.3	AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE TNF- α POR MONÓCITOS APÓS ESTÍMULAÇÃO COM OS CICLOTÍDEOS	51
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA <i>IN VIVO</i>	54

5.5	AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE TNF- α EM CAMUNDONGOS COM FERIDAS INFECTADAS POR <i>S. aureus</i>	58
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A pele tem a maior área de superfície de todos os órgãos do corpo e é o órgão mais exposto. Embora a pele seja extremamente eficaz na proteção contra intempéries do ambiente externo, infecções na pele são comuns, podendo ser causadas por bactérias, fungos ou vírus. Essas infecções são muitas vezes o resultado de uma ruptura na integridade da pele, que podem ser acompanhadas pela entrada de patógenos na derme, resultando nas infecções (O'DELL, 1998).

Infecções bacterianas da pele ocorrem com maior frequência após lesões prévias, especialmente quando esses ferimentos não são tratados assepticamente. Com menor frequência, as infecções ocorrem de forma espontânea, o que muitas vezes é clinicamente confuso e leva a atrasos no diagnóstico (NICHOLS e FLORMAN, 2001). As principais bactérias associadas a infecções da pele são comumente *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* ou *Streptococcus pyogenes* (ALY, 1996; NICHOLS e FLORMAN, 2001). A maioria das infecções são facilmente tratadas, outras nem tanto, em especial as infecções adquiridas em feridas cirúrgicas, que são o tipo de infecção hospitalar mais comum e uma importante causa de morbidade e mortalidade, sendo a infecção dessas feridas por *S. aureus* uma das formas mais comuns e letais de infecções hospitalares (ECKMANN e DRYDEN, 2010; HWANG *et al.*, 2013).

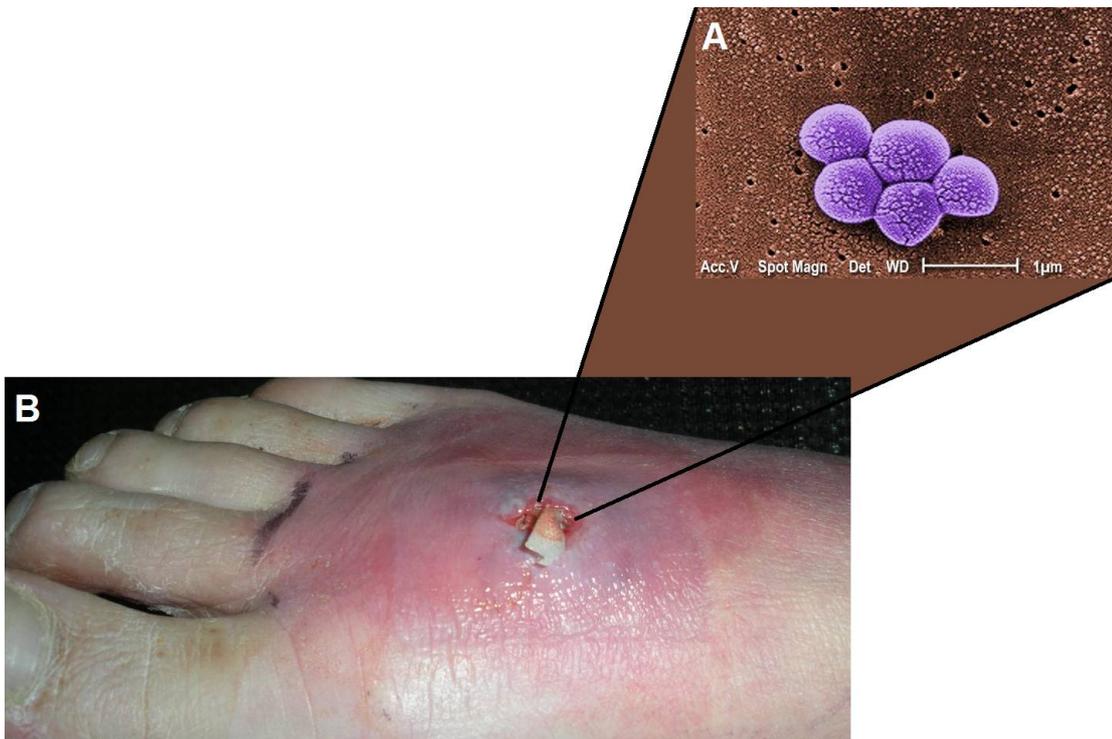
1.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno extracelular, Gram-positivo e coagulase positivo, na forma de cocus (~1µm) (Figura 1A) (FOSTER, 1996). O *S. aureus* é um importante patógeno humano, sendo responsável por uma variedade de doenças, que se manifestam muitas vezes de forma assintomática. Ele é capaz de invadir o hospedeiro quando a pele ou mucosas estão comprometidas. Esse patógeno é um importante causador de furúnculos, impetigo e outras infecções superficiais da pele (Figura 1B) (FOSTER, 1996). Ele também pode causar infecções mais graves, particularmente em pessoas debilitadas por doenças crônicas, lesões traumáticas, queimaduras ou imunossupressão. Estas infecções incluem pneumonia, abscessos profundos, osteomielite, endocardite, flebite, mastite e meningite e, são frequentemente associadas a pacientes hospitalizados. *S. aureus*

também está associado a infecções relacionadas com dispositivos de permanência longa, como próteses articulares, aparelhos cardiovasculares e válvulas cardíacas artificiais (FOSTER, 1996; MCCAIG *et al.*, 2006). Embora mais comumente capaz de gerar infecções na pele, o *S. aureus* pode infectar qualquer tecido do corpo e progredir para infecções sistêmicas invasivas que podem levar à morte (LINARES, 2001; TODD, 2005).

O aumento da incidência de sepse mediada por *S. aureus* durante as últimas décadas acredita-se ser consequência da propagação de cepas de bactérias multirresistentes, como *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) (LINARES, 2001) ou *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (MARTIN, 1994; FOSTER, 1996) e tem estimulado inúmeros estudos epidemiológicos.

Figura 1. *Staphylococcus aureus* e doenças estafilocóccias. A) Fotomicrografia eletrônica de varredura (MEV), mostrando um agrupamento de *S. aureus*, aumentado 20.000x. B) Fotografia de um abscesso cutâneo no pé (vista lateral) causado por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Fotos adaptadas de: Public Health Image Library (PHIL). Crédito da foto (A): Major Kirk Waibel, MD.



1.1.1 Infecções por *S. aureus* no Brasil

Um estudo realizado no estado da Paraíba – Brasil mostrou que aproximadamente 40 % das infecções causadas por *S. aureus* foram encontradas

em sítios de feridas cirúrgicas, aproximadamente 20 % foram encontradas em secreções orofaríngeas, aproximadamente 25 % em drenos e cateteres, e os outros 15 % foram divididos em infecções urinárias, de olhos e ouvidos (CATÃO *et al.*, 2013). Outro estudo realizado com 4.375 pacientes em um hospital de ensino em Brasília – DF mostrou que dos pacientes que passaram por diversos procedimentos cirúrgicos como: apendicectomia; colecistectomia; exérese de tumor; gastroplastia; herniorrafia; laparotomia; entre outros, 147 apresentaram infecção de sítio cirúrgico. Desses pacientes que apresentaram infecção de sítio cirúrgico, aproximadamente 40 % foram causadas pelo *S. aureus*, outros microrganismos associados a essa patologia descritos no estudo foram *Klebsiella pneumoniae* (8,3 %), *Escherichia coli* (7,2 %), *Proteus vulgaris* (7,2 %), *Enterococcus faecalis* (5,9 %) e *P. mirabilis* (4,8 %) (BATISTA e RODRIGUES, 2012).

Já no Estado de São Paulo 40 pacientes submetidos à cirurgia arterial periférica no Departamento de Cirurgia Vascular da Santa Casa apresentaram infecção de ferida operatória, destes 62,5 % foram causadas por *S. aureus* ou *Staphylococcus* coagulase-negativa, outros patógenos associados foram *Enterobacter sp.*, *P. mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Streptococcus viridans*. Foi observado que das feridas contaminadas com *S. aureus*, em 68,7 % dos casos o patógeno era resistente a pelo menos um antibiótico (LICHTENFELS *et al.*, 2010).

O uso irracional de antibióticos, tanto pela população como pela comunidade médica, tem selecionado cepas resistentes dessa bactéria a diversos antibióticos. O principal tratamento para infecções causadas por *S. aureus*, inicialmente, eram os beta-lactâmicos. Entretanto este microrganismo foi capaz de desenvolver resistência a esses compostos (REMONATTO *et al.*, 2007). O *S. aureus* resistente a metilina chamado de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), que até meados da década de 90, era associado a ambientes hospitalares, foi relatado nos últimos anos em pacientes da comunidade. A principal diferença entre a bactéria de origem hospitalar e a bactéria de origem na comunidade é que a primeira apresenta um mecanismo de resistência mais rebuscado, sendo resistente a diversos antibióticos, enquanto a segunda apresenta resistência principalmente a metilina podendo ser tratada com outras substâncias (REMONATTO *et al.*, 2007). Um estudo interessante, realizado com pacientes atendidos no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Pernambuco – Brasil mostrou que 34,5 % das infecções eram causadas por MRSA e 65,5 % por *S.*

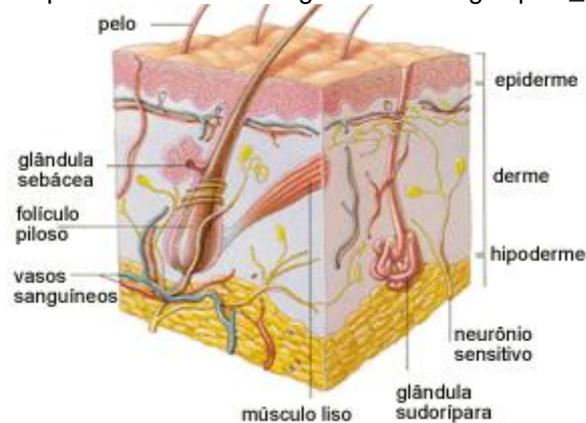
aureus sensível a metilicina. Esse estudo mostrou também que o número de infecções causadas por *S. aureus*, independente da cepa, foi maior em pacientes previamente internados, 53,9 %, do que aqueles que vieram já colonizados da comunidade, 12,2 % (CAVALCANTI; *et al.*, 2006).

Como o *S. aureus* é um patógeno importante em infecções cutâneas, para um melhor entendimento do processo infeccioso, tem sido importante entender os mecanismos de defesa do hospedeiro na pele.

1.2 A PELE COMO MECANISMO DE DEFESA

A pele consiste no órgão que separa o corpo do ambiente externo. Desta forma pode ser considerado o primeiro órgão de defesa do organismo contra agentes patogênicos microbianos, injúrias químicas e físicas (NESTLE *et al.*, 2009). A pele pode ser dividida em epiderme, derme e hipoderme (Figura 2). A epiderme consiste na parte do tecido com maior renovação. Os queratinócitos, são as células mais frequentes na epiderme, são responsáveis pela produção de queratina presente na pele além de auxiliar sua divisão em quatro camadas: camada córnea; camada granulosa; camada espinhosa; e camada basal. A camada córnea é a camada da epiderme que fica exposta ao ambiente externo do corpo, é constituída basicamente por células mortas e por queratina. A pele é continuamente renovada através da migração de queratinócitos da camada basal até a camada córnea. Abaixo da epiderme encontra-se a derme, onde estão presentes os vasos sanguíneos capazes de nutrir e trazer oxigênio a todo o tecido epitelial. Existem diversos tipos diferentes de células do sistema imune que residem na epiderme e derme, como células de Langerhans na epiderme e macrófagos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos T e B, plasmócitos e células *Natural Killers* (NK) na derme (KUPPER e FUHLBRIGGE, 2004).

Figura 2. Estrutura geral da pele e anexos. Podem-se visualizar as três camadas da pele: Epiderme, Derme e Hipoderme, e alguns anexos desse tecido como folículo capilar e glândula sebácea. Disponíveis em: http://www.clinicadevitiligo.com.br/images/pele_1.gif



A imunovigilância desse órgão é um desafio para o sistema imunológico, já que uma resposta imune insuficiente pode gerar uma elevada gama de infecções, como celulite; foliculite; abscessos subcutâneos que são causados principalmente por *S. aureus*; enquanto uma super-expressão da resposta imune pode gerar inflamação crônica e o desenvolvimento de patologias autoimunes, como vitiligo. Dessa forma, a manutenção do sistema imunológico na pele é de grande importância para a sobrevivência do indivíduo. Além disso, a sua localização é conveniente para atuação como primeira resposta à invasão de agentes patogênicos (NESTLE *et al.*, 2009). A resposta imunológica cutânea contra o *S. aureus* envolve tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (KUPPER e FUHLBRIGGE, 2004). A resposta inata é responsável pela proteção inicial do organismo contra infecções em geral, em indivíduos saudáveis ela estará sempre presente e preparada para impedir a entrada de patógeno, ou eliminar rapidamente aqueles que por ventura conseguirem alcançar os tecidos. Já a resposta adaptativa é a defesa estimulada pelos microrganismos que conseguiram ultrapassar a resposta inata, ela é capaz de adaptar-se às variações dos microrganismos invasores (ABBAS *et al.*, 2011).

1.2.1 A resposta imune inata contra *S. aureus*

Quando os microrganismos atravessam as barreiras físicas e químicas e invadem o organismo hospedeiro uma resposta imunológica é recrutada para reconhecer e eliminar os patógenos. O sistema imunitário inato é a principal linha de defesa do hospedeiro e depende de componentes solúveis e células efetoras para controlarem uma infecção durante os primeiros dias. Os glóbulos brancos, principais

componentes da imunidade inata, são caracterizados por sua capacidade fagocitária, capazes de fagocitar e degradar microrganismos patogênicos através de receptores de reconhecimento padrões (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), presentes na superfície de micróbios (HIRSCHFELD *et al.*, 1999; JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; KAMDAR *et al.*, 2013). Isto resulta na produção e secreção de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (Figura 3) (KRISHNA e MILLER, 2012b).

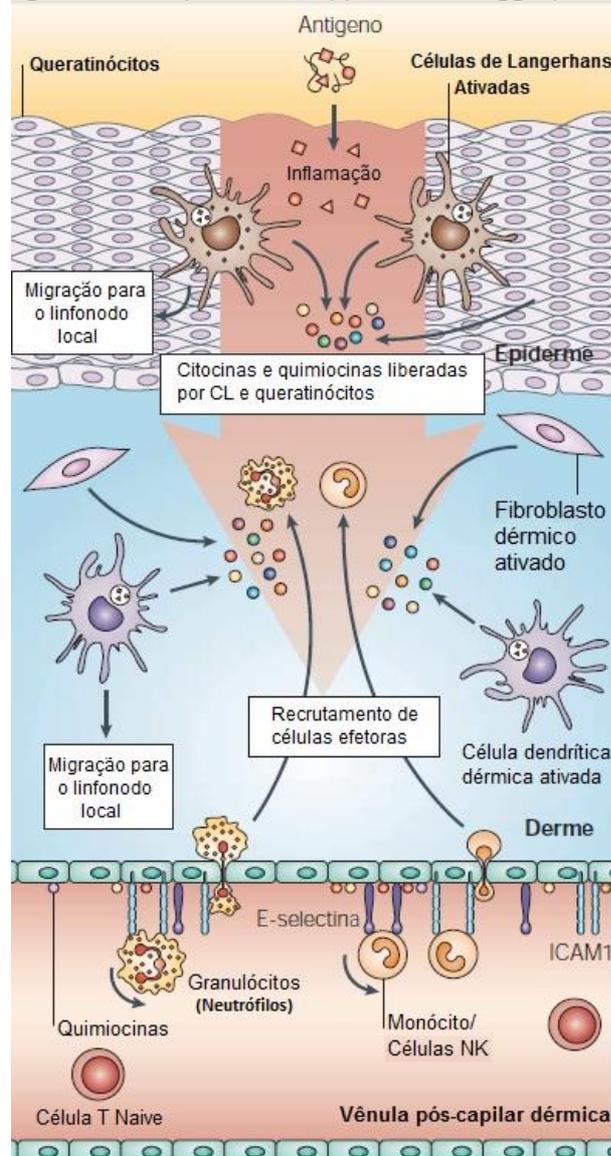
Os queratinócitos, residentes da epiderme possuem mecanismos de detecção de componentes conservados dos microrganismos de forma a iniciar precocemente a resposta imune inata. Eles agem como barreira física da pele e como célula estimuladora do sistema imune. São capazes de expressar PRRs, como receptores do tipo *Toll* (TLR) 1, 2 e 6, aptos a reconhecer os lipopeptídeos bacterianos, ácido lipoteicóico e peptídeo glicano, e receptores do tipo NOD2, que identificam o muramildipeptídeo (MILLER, 2008). Esses PRRs são responsáveis pela promoção da resposta imune inata, através da produção de citocinas e quimiocinas, que promovem o recrutamento de neutrófilos, e de peptídeos antimicrobianos, como β -defensinas humanas 2 (hBD2) e 3 (hBD3) e a catelecidina LL-37 (BRAFF *et al.*, 2005).

As células do sistema imune presentes na epiderme e derme também participam dessa resposta inicial, de forma que queratinócitos e células de defesa contribuem como mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos, incluindo *S. aureus*. Essas lesões cutâneas contaminadas por *S. aureus*, são, no geral, lesões piogênicas caracterizadas por eritema, calor e endurecimento com frequente ulceração e drenagem de material purulento (ELSTON, 2007). Microscopicamente estão presentes principalmente neutrófilos, células responsáveis pela eliminação dessa infecção.

Os neutrófilos são a primeira resposta fagocítica a infecção cutânea por *S. aureus* (SEGAL, 2005a). Dessa forma, pacientes com deficiência no número de neutrófilos, como na neutropenia congênita grave, ou na sua função, como na doença granulomatosa crônica, apresentam uma maior predisposição a infecções por *S. aureus*, podendo atacar diversos órgãos incluindo a pele (BOUMA *et al.*, 2010). Algumas situações geram uma seleção da infecção para a pele, como defeitos na sinalização IL-1/TLR, por exemplo, deficiência em IRAK4 e MyD88, ou

pacientes com respostas alteradas de células T, por exemplo em síndrome da hiper IgE, dermatite atópica e infecção pelo HIV.

Figura 3. Eventos da imunidade inata cutânea. Lesões epiteliais ou invasão do tecido por patógenos leva a liberação de citocinas primárias e ativação das células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos, e células de defesa residentes no epitélio, células de Langerhans (CL), células dendríticas (CD) dérmicas e mastócitos. As CL e CD são estimuladas para seguir para os linfonodos locais para realização da apresentação de antígenos as células T naives e de memória. As citocinas e quimiocinas produzidas através das cascatas de ativação do endotélio, regulam positivamente a expressão de moléculas de adesão, incluindo a E-selectina e moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM1), e dirigem o recrutamento de componentes da imunidade inata adicionais de acordo com os sinais específicos que são gerados. Adaptado de Kupper e Fuhlbrigge (2004).



O recrutamento de neutrófilos, a partir da circulação para um local de infecção por *S. aureus* na pele, envolve o reconhecimento do agente patogênico pelos PRRs e de produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 α , IL-1 β , TNF- α

e IL-6 (SEGAL, 2005a). Os neutrófilos utilizam de vários mecanismos para facilitar a morte bacteriana, eles realizam a fagocitose de bactérias previamente opsonizadas através de receptores para Fc e sistema complemento. Nos fagossomas dos neutrófilos existem diversas substâncias que contribuem para a eliminação bacteriana, incluindo: (1) espécies reativas de oxigênio, como oxigênio (O_2); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) que induzem a morte bacteriana de forma direta; (2) peptídeos antimicrobianos, como a catelicidina LL-37, lisozima, azurocidina e α -defensina, que possuem ação direta contra *S. aureus* bem como (3) proteases, como a catepsina G, a elastase, gelatinase, colagenase, proteinase-3 e hidrolases ácidas capazes de degradar proteínas e componentes bacterianos (SEGAL, 2005a; KIM *et al.*, 2011).

1.2.2 Resposta imune adaptativa contra *S. aureus*

Em contraste com as moléculas de reconhecimento da imunidade inata, o reconhecimento da imunidade adaptativa é mediado por uma diversidade de receptores de antígenos presentes em linfócitos B e T, caracterizados pela especificidade e memória, resultando em uma proteção de longa duração contra as infecções secundárias (FOURNIER e PHILPOTT, 2005). O sistema imunitário adaptativo pode ser dividido em duas respostas mediadas por anticorpos, utilizando linfócitos B, ou por células, utilizando linfócitos T (GIRARDI, 2007).

A resposta imune contra *S. aureus*, mediada por linfócitos B, envolve a produção de anticorpos específicos contra componentes da bactéria. Esses anticorpos possuem uma importante função na opsonização bacteriana, facilitando a fagocitose das bactérias por células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos. Durante a infecção do *S. aureus* ou MRSA em humanos, observa-se a produção de anticorpos contra diversos fatores bacterianos como: (1) toxinas, como α -toxina, β e γ hemolisinas e enterotoxinas; (2) fatores de virulência, como aureolisina, IsdA e superantígenos; (3) componentes da parede celular, como polissacarídeos capsulares, ácido lipoteicoico e peptidoglicano (HOLTFRETER *et al.*, 2010).

A resposta imune mediada por linfócitos T envolve, atualmente, linfócitos T auxiliares (Th) do tipo 1, 2 e 17. Os linfócitos Th1 produzem IFN- γ e promovem respostas imunitárias mediadas por células, os Th2 produzem IL-4 e IL-13, e promovem respostas imunitárias mediadas por anticorpos, e os Th17 produzem IL-

17, IL-21, IL-22 e IL-26, e geram o recrutamento de neutrófilos e formação de abscessos (KRISHNA e MILLER, 2012a).

Mesmo com todas essas artimanhas do organismo para tentar impedir a infecção causada por *S. aureus*, ele também possui mecanismos para escapar das defesas anteriormente descritas do organismo. O *S. aureus* apresenta mecanismos para impedir a ação de neutrófilos, esses mecanismos incluem: (1) impedir o recrutamento de neutrófilos (SEGAL, 2005b); (2) produzir fatores que inibem sua fagocitose (FOSTER, 2005); (3) produzir toxinas citolíticas que geram danos às membranas das células imunitárias do hospedeiro que levam à lise osmótica e a prevenção de fagocitose (ROOIJAKKERS *et al.*, 2005); (4) produzir pigmento carotenoide, responsável pela coloração dourada da bactéria também apresenta uma importante atividade antioxidante protegendo-a das espécies reativas de oxigênio (LIU *et al.*, 2005).

Quando a defesa do hospedeiro consegue ser driblada, é preciso que haja o tratamento da infecção com medicamentos antibióticos. Porém como visto anteriormente, muitas das cepas de *S. aureus* estão se tornando cada vez mais resistentes a um maior número de tratamentos. Assim, novas alternativas para tratar esse problema têm sido procuradas, e uma delas, abordada neste trabalho, são os peptídeos antimicrobianos.

1.3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES CUTÂNEAS

Os microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais representam uma grande ameaça à saúde pública. No mundo inteiro têm sido reportados casos de bactérias resistentes aos antibióticos de última geração, tornando as infecções intratáveis, agravando os números de mortalidade e morbidade e aumentando os custos de tratamento e internação (AKOVA, 2006). A partir desta problemática, vários grupos de pesquisa têm se mobilizado na busca e desenvolvimento de novas drogas que possam ser usadas em conjunto com as drogas existentes, representando uma esperança no tratamento contra os agentes infecciosos (PRATES, 2000). Dentre as várias estratégias que têm sido estudadas, visando combater estes microrganismos resistentes, podemos citar a modificação de moléculas já existentes (TEVYASHOVA *et al.*, 2009); o estudo do genoma e

proteoma dos microrganismos buscando novos alvos (DU, 2010); e a bioprospecção e caracterização de novas moléculas que funcionem como alternativa às moléculas já existentes (TEIXEIRA, 2006). Entre elas destacam-se os peptídeos antimicrobianos (PAMs) que representam um modelo para o desenvolvimento de possíveis novas classes de fármacos antibióticos. Podem ser encontrados em todos os organismos vivos estudados (PESCHEL e SAHL, 2006). Os PAMs têm muitas das características desejáveis para uma nova classe de antibióticos, podendo complementar a terapia convencional com antibióticos. Essas moléculas mostram uma ação similar aos antibióticos clássicos, neutralizando endotoxinas e sendo ativos em modelos animais (HANCOCK e SAHL, 2006).

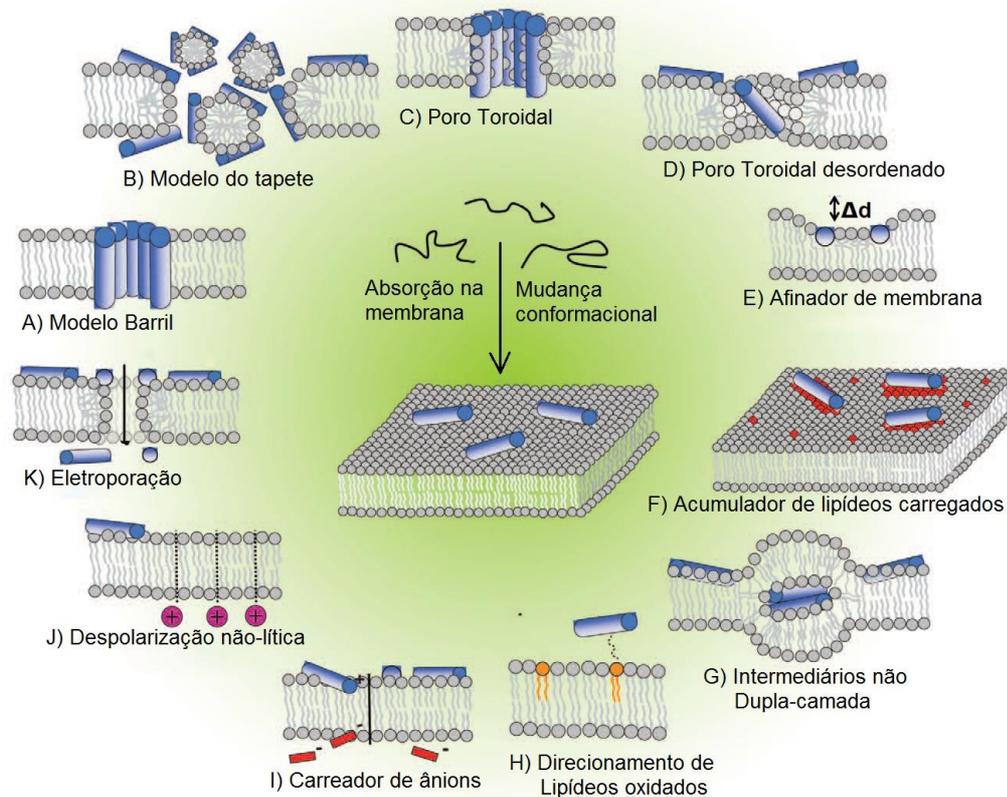
Os PAMs, em geral, são caracteristicamente definidos por conter uma cadeia curta de aminoácidos (menos de 50) e possuírem atividade antimicrobiana. A maioria apresenta uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos e carga total positiva (+2 a +7) em pH fisiológico, devido a grande proporção de resíduos de lisina e arginina (BOIX e NOGUES, 2007). Estes peptídeos tendem a se apresentar sem estrutura definida em solução aquosa, adotando uma forma anfipática ao interagir com membranas, atributo crucial tanto para atividade quanto para citotoxicidade. Apesar da estrutura tridimensional e propriedades físicas serem bastante semelhantes entre os diversos PAMs, em geral há pouca homologia entre sequências primárias, principalmente entre peptídeos de classes distintas, sendo classificados normalmente em famílias estruturais baseadas em estruturas secundárias (HADLEY e HANCOCK, 2010).

Além da ação antimicrobiana contra bactérias e fungos, já foram reportados PAMs com as mais diversas ações, entre elas atividades deletérias contra vírus (YE e NG, 2002), protozoários (LOFGREN *et al.*, 2008), nematóides (PARK *et al.*, 2004) e insetos (KELEMU *et al.*, 2004). Alguns outros apresentam ação citotóxica seletiva para células tumorais e espermáticas (REDDY *et al.*, 2004). Por fim, encontramos ainda PAMs que neutralizam lipopolissacarídeos (LPS) tóxicos resultantes da lise de bactérias Gram-negativas, que provocam o choque séptico (ROSENFELD *et al.*, 2008) e outros que modulam a resposta imune inata e adaptativa em humanos (KAMYSZ *et al.*, 2003). Devido a todas essas características, os diferentes mecanismos de ação propostos e ao fato de que eles podem ser modificados para um aumento da especificidade e atividade, os PAMs se apresentam como uma

alternativa aos antibióticos convencionais no contexto atual marcado pelo grande número de cepas resistentes.

Os PAMs possuem diversos mecanismos de ação descritos para explicar sua atividade (Figura 4). Três modelos são considerados clássicos para explicação do modo de ação dessas espécies sobre a membrana das células do organismo alvo, baseando-se na possível interação dessas moléculas com as membranas e a formação de poros quando alcançam uma concentração limiar. No modelo de barril (Figura 4A) os PAMs se inserem de forma paralela na membrana formando um poro. No modelo de tapete (Figura 4B) esses peptídeos inserem porções na membrana e induzem a formação de poros. No modelo de poro toroidal (Figura 4C), também ocorre a formação de poros com os peptídeos inseridos na membrana de forma paralela, porém nesse caso eles são intercalados com lipídeos (NGUYEN *et al.*, 2011). Com o aumento de estudos sobre peptídeos antimicrobianos, novos modelos foram propostos para tentar entender seus mecanismos de ação. O modelo de poro toroidal desordenado (Figura 4D) ocorrendo quando uma menor concentração de peptídeos, comparada ao poro toroidal, dispostos de forma desordenada, forma um poro na membrana celular. No modelo de afinamento da membrana (Figura 4E) a atração entre os fosfolipídios carregados geram regiões nas membranas mais finas e mais frágeis. E no modelo de remodelamento da membrana (Figura 4F) formam domínios ricos em lipídeos aniônicos circundando os PAMs. Em alguns casos, a presença dos peptídeos pode induzir a formação de intermediários de membrana não dupla-camada (Figura 4G), ou a presença de lipídeos oxidados por espécies reativas de oxigênio, podem aumentar a adsorção do peptídeo (Figura 4H). Outro modelo que tenta explicar o mecanismo de ação dessas moléculas é o modelo de atração de ânions (Figura 4I), que sugere que os PAMs são capazes de atrair pequenos ânions, fazendo-os atravessar a membrana de forma a causar perda do potencial eletrostático celular. Em outro modelo, a perda do potencial eletrostático pode ocorrer sem a atração de íons (Figura 4J). E, no modelo da eletroporação (Figura 4K), os peptídeos afetam o potencial de membrana de forma a diminuir a permeabilidade dela a várias moléculas (NGUYEN, HANEY e VOGEL, 2011).

Figura 4. Modelos de mecanismos de ação de PAMs. A) Modelo Barril. B) Modelo Carpete. C) Poro Toroidal. D) Poro Toroidal Desordenado. E) Modelo afinador de Membrana. F) Acumulador de Lipídeos Carregados. G) Formação de intermediários de membrana não dupla camada. H) Direcionamento a lipídeos oxidados. I) Carreador de ânions. J) Despolarização não lítica. K) Modelo de Eletroporação. Esses eventos não são excludentes, podendo ocorrer em paralelo. Adaptado de Nguyen, Haney e Vogel (2011)



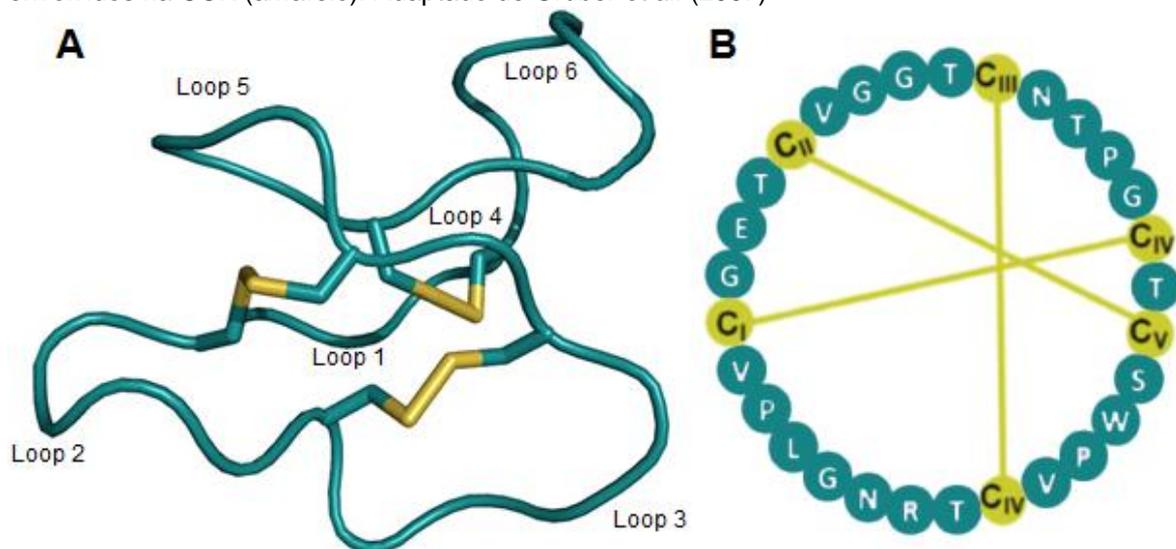
Nas plantas os peptídeos antimicrobianos são caracterizados por serem ricos em glicina e cisteína, sendo que esta última pode ser encontrada na forma de pontes de sulfeto, que contribuem aumentando a estabilidade da estrutura. Em geral eles apresentam carga total positiva, além de uma região hidrofóbica (Hammami *et al.*, 2009). Existem várias classes de peptídeos antimicrobianos em plantas, dentre elas estão as defensinas, tioninas, snakinas e ciclótídeos (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1998; HAMMAMI *et al.*, 2009).

1.4 CICLOTÍDEOS

O médico norueguês Lorents Grande estava na República do Congo a serviço da Cruz Vermelha e percebeu que as mulheres de uma tribo nativa tinham seu trabalho de parto acelerado quando um chá preparado a partir da infusão de folhas da planta *Oldenlandia affinis*, pertencente à família Rubiaceae era servido (SAETHER *et al.*, 1995; ROSENGREN *et al.*, 2003; CRAIK, 2009). Quando voltou

para a Noruega, Lorents levou consigo algumas amostras da planta e com ajuda de colaboradores, conseguiu uma caracterização parcial da substância responsável pela ação uterotônica, já que na época a substância resistiu a todos os métodos para elucidação de sua característica estrutural completa. Esta substância consistia em um peptídeo de aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, sendo este nomeado de kalata B1 (Figura 5), uma vez que *O. affinis* era popularmente conhecida como Kalata-kalata na língua nativa (SAETHER *et al.*, 1995; ROSENGREN *et al.*, 2003; CRAIK, 2009). Somente 20 anos mais tarde a estrutura primária e terciária do peptídeo conseguiu ser elucidada, demonstrando que a estrutura não possuía os terminais livres. Essa junção do C- e N- terminal deixava a estrutura cíclica, foi visualizado também que ela era mantida por três ligações dissulfídicas interligadas (COLASITO *et al.*, 1951; SAETHER *et al.*, 1995).

Figura 5. Estrutura molecular do ciclótideo kalata B1. A) A estrutura tridimensional está demonstrada em *cartoon*, construído com Pymol, mostrando as ligações dissulfeto em amarelo (molécula manipulada a partir do banco de dados PDB). B) Diagrama esquemático evidenciando os resíduos de aminoácido que formam os *loops* (azul) do ciclótideo kalata B1 e os resíduos de cisteína envolvidos na CCK (amarelo). Adaptado de Gruber *et al.* (2007)

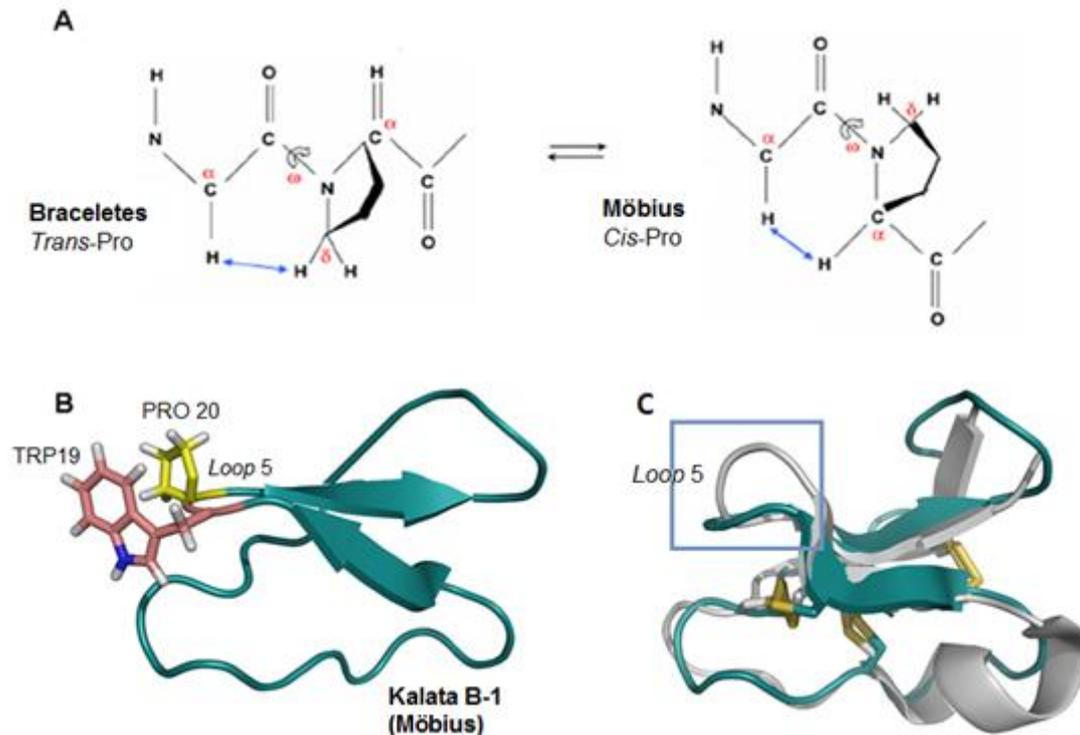


Ciclótídeos são peptídeos cíclicos que apresentam geralmente uma estrutura de 28 a 37 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de 2,8 a 3,7 kDa, e possuem seis resíduos conservados de cisteínas. São encontrados, geralmente, em espécies de plantas das famílias Curcubitaceae, Poaceae, Rubiaceae e Violaceae (CHEN *et al.*, 2005; JENNINGS *et al.*, 2005; IRELAND *et al.*, 2006b; GRUBER, 2010).

Os ciclotídeos são caracterizados por possuírem estrutura cíclica, devido à ausência de N- e C-terminal, e por possuírem seis resíduos de cisteína conservados formando três ligações dissulfídicas interligadas (CRAIK *et al.*, 2004; SIMONSEN *et al.*, 2005). Essa conformação característica de ciclotídeos é denominada “cabeça-cauda”, e para que ela ocorra é preciso: primeiramente que haja formação de um anel por duas ligações dissulfídicas, entre as Cys^I-Cys^{IV} e as Cys^{II}-Cys^V, posicionadas internamente na estrutura, e uma terceira ligação formada pelas cisteínas Cys^{III}-Cys^{VI}, que passa no meio das duas anteriores, interligando as ligações formando um “arcabouço de cisteína cíclica” ou “*cyclic cysteine knot*” (CCK) (CRAIK *et al.*, 1999; JENNINGS *et al.*, 2005; GRUBER *et al.*, 2007). Devido à conformação cíclica da cadeia polipeptídica há a formação de seis *loops* entre os resíduos de cisteínas. Esses *loops* são importantes para determinação da atividade biológica destes peptídeos, já que o número de resíduos de aminoácidos pode variar de um ciclotídeo para outro (CRAIK *et al.*, 1999; JENNINGS *et al.*, 2005).

Os ciclotídeos podem ser divididos em, basicamente, duas subfamílias conhecidas por Möbius e braceletes (Figura 6). A principal característica que diferencia uma da outra é a presença de um resíduo de prolina conservada na conformação *cis* no *loop* 5 (cinco) na subfamília Möbius gerando uma torção de 180° no *loop* (CHEN *et al.*, 2005; DALY *et al.*, 2006; GRUBER *et al.*, 2007; PELEGRINI *et al.*, 2007). Essa torção se deve à presença de um resíduo de triptofano seguido por um resíduo de prolina. Como os dois resíduos são aromáticos ocorre uma interação entre o anel pirrolidínico da prolina com o anel aromático do triptofano, essa conformação é chamada de *cis*-prolina (*cis*-Pro) (WU e RALEIGH, 1998). Atualmente foram descritos mais de 920 ciclotídeos, incluindo os descobertos diretamente em plantas e aqueles modificados para estudo de sua atividade biológica (CRAIK, 2013). Alguns desses ciclotídeos e suas atividades serão descritos a seguir.

Figura 6. Diferença entre as famílias Möbius e braceletes dos ciclótídeos. A) Ilustração esquemática das configurações *trans*-Pro e *cis*-Pro, diferenciação das subfamílias braceletes e Möbius, respectivamente. B) Estrutura tridimensional da kalata B1, em destaque em azul os resíduos da cadeia lateral Trp¹⁹, em rosa, e Pro²⁰, em amarelo. C) Sobreposição das estruturas de uma braceletes (cicloviolacina O2 em cinza) e de uma Möbius (kalata B1 em azul), em destaque temos o *loop5*, com a visualização da diferença de torção deste *loop* entre as duas subfamílias.



1.4.1 Atividades biológicas dos ciclótídeos

1.4.1.1 Atividade antimicrobiana

Depois da descoberta e caracterização da kalata B1, que possui atividade uterotônica, outros ciclótídeos foram descobertos e caracterizados apresentando diversas atividades. Alguns ciclótídeos como as circulinas A e B apresentam, além da atividade anti-HIV, atividade antimicrobiana. Outros ciclótídeos como kalata B1 e ciclopsicotrídeo A também apresentam essa atividade. Esses peptídeos apresentam em sua estrutura regiões hidrofílicas e hidrofóbicas localizadas em diferentes regiões da sua superfície, se assemelhando à natureza anfipática de muitos peptídeos antimicrobianos. Em testes realizados contra as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram observadas atividades inibitórias dos ciclótídeos circulina B e ciclopsicotrídeo A resultando em uma concentração inibitória mínima (CIM) de 0,4 a 2,5 μM para *E. coli* e 13,5 a 25,5 μM para *P.*

aeruginosa (TAM *et al.*, 1999; GRAN *et al.*, 2008). Os ciclotídeos circulina A e B, ciclopsicotride A e kalata B1 também apresentaram atividade contra *Proteus vulgaris* e *Klebsiella oxytoca* e contra os fungos *Candida albicans*, *Candida kefyr* e *Candida tropicalis* (CRAIK *et al.*, 1999; TAM *et al.*, 1999). Alguns estudos demonstraram que a remoção da carga positiva dos ciclotídeos, em condições salinas, gerou redução ou perda da atividade antimicrobiana, mostrando que as interações eletrostáticas com a membrana do microrganismo são importantes para essa atividade (CRAIK, 2009; HENRIQUES e CRAIK, 2010). Como apresentam em sua superfície regiões hidrofóbicas expostas e uma variedade de atividades, foi proposto um possível mecanismo de ação comum para os ciclotídeos (CRAIK *et al.*, 2010). Possivelmente essa atividade dos ciclotídeos ocorra através de interações hidrofóbicas com as membranas (CRAIK *et al.*, 1999; JENNINGS *et al.*, 2005; SIMONSEN *et al.*, 2005; GRUBER *et al.*, 2007). Em pesquisas realizadas com membranas sintéticas, observou-se que os ciclotídeos kalata B1, B6 e análogos interagiram com membranas lipossômicas contendo dodecilsfosfolina, indicando que esses ciclotídeos interagem seletivamente com membranas bacterianas (SHENKAREV *et al.*, 2006; SHENKAREV *et al.*, 2008). Essa interação pode ocorrer por meio de afinidade de resíduos hidrofóbicos presentes nos *loops* cinco e seis (HUANG *et al.*, 2009). Outros trabalhos mostraram que os peptídeos não apresentam atividade antibacteriana *in vitro*, como foi o caso do trabalho do pesquisador Henriques *et al.* (2012b), que testou os peptídeos KB1, KB2, KB5, KB6, KB7, KB8, KB9, CyO2 e o triciclona A (tcA), contra as bactérias *S. aureus*, onde não verificou atividade de nenhum peptídeo contra ela, e *E. coli*, onde apenas o ciclotídeo CyO2 apresentou um MIC 50 de 6,8 µM.

Um trabalho realizado por Henriques e Craik (2012b) sugere alguns mecanismos de ação para os ciclotídeos, nesse trabalho, eles utilizam o peptídeo KB1 e chegam à conclusão que as diversas atividades deste peptídeo não são dependentes de reconhecimento por uma proteína quiral, e sim dependentes da sua afinidade pela bicamada lipídica e da sua capacidade de perturbar as membranas celulares. O mecanismo de ação proposto por eles pode ser descrito em quatro etapas: o peptídeo KB1 (1) tem como alvo as membranas celulares de forma a realizar interações específicas com fosfolípidios compostos por fosfatidiletanolamina em sua composição; (2) se insere na membrana por meio de interações hidrofóbicas específicas peptídeo-lipídeo; (3) promove uma movimentação exterior dos

fosfolipídios fosfatidiletanolamina, expondo mais fosfatidiletanolamina na superfície exterior da membrana promovendo mais ligações de ciclotídeos; e (4) quando um limiar de concentração dessas moléculas é alcançado na membrana, esses ciclotídeos induzem a formação de poros e eventual ruptura da membrana celular. Os alvos e a intensidade da ação são variáveis nos ciclotídeos, mesmo naqueles encontrados em um mesmo grupo, diferentes ciclotídeos possuem diferentes propriedades hidrofóbicas e eletrostáticas de forma a possuírem diferentes seletividades por lipídeos. O KB1, globalmente neutro, possui uma atividade antimicrobiana fraca, enquanto o CyO2, carga global +2, possui atividade antibacteriana contra patógenos Gram-negativos, dessa forma demonstrando que as interações eletrostáticas podem ser importantes para a atividade do CyO2. A hipótese de que diferentes ciclotídeos possuem preferência a diferentes membranas celulares, poderia explicar porque uma planta individual produz um conjunto amplo de ciclotídeos.

1.4.1.2 Atividade imunomodulatória

Atualmente PAMs com outras atividades biológicas, além da antimicrobiana, têm sido descritos, e entre essas atividades está a imunomodulatória, que é descrita tanto para ação antibacteriana indireta, no estímulo de resposta do organismo ao agente patogênico, como para tratamento de doenças imunológicas. A ação imunomodulatória tem sido descrita para diversas classes de PAMs, incluindo os ciclotídeos. Um grupo de pesquisadores, de Friburgo na Alemanha, publicou dois artigos sobre ciclotídeos com atividade imunomodulatória. No primeiro, publicado em setembro de 2011, eles verificaram a atividade antiproliferativa, do extrato de ciclotídeos extraídos das folhas de *O. affinis* e do peptídeo kalata B1 sobre células polimorfo nucleares de sangue periférico humano (PBMCs), e observaram, tanto para o extrato quanto para o peptídeo isolado, que eles apresentam uma atividade antiproliferativa dose dependente, onde maiores concentrações apresentam uma maior atividade. Vale ressaltar que a kalata B1 também apresentou atividade citotóxica em concentrações maiores que 14 μM (GRUNDEMANN *et al.*, 2012).

Em um segundo estudo publicado em julho de 2013, os pesquisadores caracterizaram a correlação estrutura atividade dos ciclotídeos utilizando ensaios para determinar o efeito antiproliferativo contra linfócitos humanos. Eles utilizaram o

peptídeo kalata B1 como modelo, realizando diversas modificações em sua sequência. Os mutantes [G18K], [N29K] e [T20K] apresentaram uma atividade antiproliferativa dose-dependente, enquanto que os mutantes [T8K], [V10A] e [V10K] não apresentaram essa mesma atividade. Os mutantes [T20K] ativo e [V10K] inativo foram utilizados para detalhamento do mecanismo de ação da atividade imunológica e demonstraram que os ciclotídeos suprimem a polifuncionalidade dos linfócitos T, e impedem a proliferação de outras células do sistema imune através da inibição da ação de IL-2 em diversos sítios. Além disso, eles demonstraram que essa ação pode ser estereoespecífica indicando uma interação direta entre o ciclotídeo e o alvo. Dessa forma, o autor sugere que com esses resultados, novos estudos para utilização de ciclotídeos modificados e otimizados poderão ser realizados com teste *in vivo* em sistemas de modelos animais relacionados com o mau funcionamento de células imunes em geral e de forma específica o aumento da reatividade de células T, podendo posteriormente ser utilizados como droga peptídica com ação imunossupressora (GRUNDEMANN *et al.*, 2013).

1.4.1.3 Outras atividades biológicas

Alguns ciclotídeos como o ciclotídeo violapeptideo I extraído da *Viola arvensis* e a cicloviolacina H4 isolados de *Viola hederaceae*; possuem propriedades hemolíticas contra eritrócitos humanos (IRELAND *et al.*, 2006b). Vários ciclotídeos apresentaram atividade anti-HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), como o Vhl-1 encontrada em *V. hederaceae*, as cicloviolinas A-D isoladas de *Leonia cymosa*, a palicoureina isolada da *Palicourea condensata*, kalata B1 e B8 de *O. affinis* e as circulinas A e B isoladas de *Chassalia parvifolia* (HALLOCK *et al.*, 2000; BOKESCH *et al.*, 2001). Não está definido ainda o mecanismo de ação desses peptídeos, mas é provável que a atividade anti-HIV ocorra através do efeito sobre a ligação ou fusão do vírus com o seu receptor na membrana celular (GUSTAFSON *et al.*, 2000). Porém, o aumento do efeito da citoproteção associada com uma diminuição dos níveis de partículas virais infecciosas, sugere que o efeito protetor dos ciclotídeos possa ocorrer antes da entrada do vírus na célula hospedeira (RUSCONI *et al.*, 2007; HENRIQUES e CRAIK, 2010). Contudo, ainda é muito cedo para obter a certeza sobre como os ciclotídeos interagem com o vírus, com a membrana celular

da célula alvo, ou com ambos, assim como, para a utilização em terapias contra o HIV (IRELAND *et al.*, 2008; HENRIQUES e CRAIK, 2010).

Alguns ciclotídeos, como a kalata B1, B2 e B5, possuem atividade inseticida, apresentando uma inibição de aproximadamente 70 % no crescimento larval, quando incorporadas à dieta dos lepidópteros *Helicoverpa papunctigera* e *H. armigera*, duas importantes pragas do algodão (JENNINGS *et al.*, 2005). Acreditava-se que a atividade inseticida poderia estar relacionada à inibição de algumas enzimas digestivas dos insetos, como tripsina, quimotripsina ou α -amilase (JENNINGS *et al.*, 2001). Porém, estudos realizados com a kalata B1 demonstraram que a atividade inseticida deste ciclotídeo afeta a mudança na morfologia das células do epitélio do trato intestinal do inseto, levando a formação de edema e lise celular. A hipótese mais provável é que a kalata B1 possa romper a membrana plasmática das células epiteliais do intestino dos insetos por ligação a receptores específicos, ainda não descritos, da membrana celular do trato intestinal formando buracos ou poros que levam à lise celular das células caliciformes e colunares (BARBETA *et al.*, 2008). Como não foram relatados receptores específicos para os ciclotídeos com atividade inseticida, sua atividade pode, então, estar relacionada com a interação dos resíduos hidrofóbicos expostos dos ciclotídeos com os lipídeos presentes na membrana do trato intestinal (BARBETA *et al.*, 2008; SHENKAREV *et al.*, 2008). Essa teoria de ligação foi proposta baseada nos estudos da especificidade da kalata B1 com as dodecilmfosfolinas presentes na membrana celular, com isso explicando os efeitos específicos sobre as células intestinais dos insetos (BARBETA *et al.*, 2008; SHENKAREV *et al.*, 2008). Outra atividade constatada consiste na atividade moluscicida encontrada nos ciclotídeos cicloviolacina O2 e das kalatas B1, B2, B7 e B8 contra a ampulária (*Pomacea canaliculata*), que ataca plantações de arroz (*Oryza sativa*). O mecanismo de ação desses peptídeos contra os moluscos ainda não foi elucidado, porém, a secreção excessiva de muco e a forma de retração do caramujo em suas conchas na presença desses peptídeos indicam um processo de toxicidade semelhante ao metaldeído moluscicida (PLAN *et al.*, 2008). O metaldeído causa danos nos mucócitos e na parede cutânea do aparelho digestivo do molusco, o que leva inicialmente a secreção excessiva de muco e depois a alterações no metabolismo energético (TRIEBSKORN *et al.*, 2007).

Verificou-se em alguns estudos que os ciclotídeos kalatas B1, B2, B6, B7 e a cicloviolacina O2, além de possuírem atividade inseticida e moluscicida, apresentam

atividade anti-helmíntica contra os nematóides *Haemonchus contortuse* *Trichostrongylus colubriformis*, que atacam o sistema gastrointestinal de ruminantes. Foi sugerido que a atividade do ciclotídeo também pode ser através da interação externa com a membrana espiculada do nematóide (LINDHOLM *et al.*, 2002; COLGRAVE *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Essa atividade pode ser relacionada à presença de resíduos de carga positiva (COLGRAVE *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). Em estudos realizados através da inserção de resíduos de lisina em vários *loops* da kalata B1, observou-se um aumento da atividade nematicida com a inserção tripla de lisina (G¹/K¹, T²⁰/K²⁰ e N²⁹/K²⁹) localizada nos *loops* 1, 3 e 6. Foi percebida a diminuição da atividade em algumas substituições, como no caso V²⁵/K²⁵. Esses resultados apresentam quais as regiões da estrutura que está relacionada com a atividade nematicida (HUANG *et al.*, 2009). Em outros estudos, alguns ciclotídeos apresentaram efeitos tóxicos sobre ancilostomídeos, que geram a ancilostomose, conhecida popularmente como amarelão em humanos e cães (COLGRAVE *et al.*, 2010).

Além das atividades previamente descritas, os ciclotídeos possuem semelhanças funcionais com algumas defensinas antitumorais (SVANGARD *et al.*, 2007). Elas possuem intervalos de concentração e perfis de curva de dose resposta semelhantes (BATEMAN *et al.*, 1992), possivelmente por possuírem mecanismos de ação semelhantes que podem envolver a disrupção e desestabilização da membrana. Até o presente momento, existem somente alguns ciclotídeos com atividade tumoricida direta descritas, entre elas a vitri A, varv A (kalata S) e F, vibe D, E, G e H e a cicloviolacina O2, sendo a última uma das mais estudadas. O ciclotídeo vitri A foi isolado de *Viola tricolor* e *Viola bicolor*, e juntamente com os ciclotídeos varv A e F, apresentaram atividade contra linhagens de células de linfoma e mieloma, sendo que a vitri A foi de 7 a 10 vezes mais potente que as varv A e F, possivelmente devido a carga 2+ proveniente dos resíduos de lisina de vitri A em relação com a carga 0 de varv A/F, corroborando com a hipótese de que resíduos catiônicos possuem papel crucial na atividade (SVANGARD *et al.*, 2007). Os ciclotídeos vibe D, E, G e H, isolados de *Viola biflora* mostraram atividade contra linhagens de linfoma humano, sendo as vibe G e H mais potentes, pois também apresentam carga 2+, enquanto vibe E possui carga 0. Vibe D, apesar de apresentar um resíduo Arg a mais, tendo carga maior, apresenta menor atividade, possivelmente pelo resíduo positivo excedente se encontrar em uma região

hidrofóbica no *loop2*, diminuindo assim a anfipacidade e prejudicando a interação com a membrana (HERRMANN *et al.*, 2008). A cicloviolacina O2 (CyO2) tem sido o ciclotídeo antitumoral mais estudado. O mesmo foi extraído inicialmente de *Viola odorata* e apresentou atividade *in vitro* contra linhagens de células HeLa, células tumorais de linfoma, leucemia, pulmão e mieloma, além de linhagens resistentes destas últimas quatro. De acordo com o experimento de cinética de ação sobre as linhagens de linfoma, o CyO2 agiu causando a desintegração da membrana. Em outro experimento realizado com a linhagem HeLa, foi evidenciada uma rápida liberação do conteúdo intracelular, indicando assim também a permeabilização da membrana seguida de desbalanço osmótico. Assim como os outros ciclotídeos mais potentes, CyO2 possui uma carga 2+ derivada de resíduos de lisinas (SVANGARD *et al.*, 2007). Em outro estudo realizado com CyO2, foram avaliadas a importância dos resíduos carregados, sendo que o bloqueio do resíduo positivo de arginina não gerou alteração da atividade, enquanto o bloqueio de lisinas por acetilação gerou uma diminuição da atividade em três vezes. Com o bloqueio concomitante das argininas e lisinas, a atividade decresceu em sete vezes. Interessantemente o bloqueio do glutamato³ causou uma diminuição da atividade na ordem de 48 vezes, possivelmente por causar indiretamente alterações conformacionais no *loop* hidrofóbico, que possui importância na atividade (HERRMANN *et al.*, 2006).

O ciclotídeo CyO2 foi testado *in vivo* quanto a sua atividade antitumoral (BURMAN *et al.*, 2010). Apesar de demonstrar potente atividade em ensaios *in vitro* contra linhagens tumorais crescendo em suspensão (GERLACH *et al.*, 2010b) ou crescendo em fibras sintéticas na forma de tumores sólidos, não foi observada atividade significativa quando estas mesmas fibras com tumores foram implantadas em ratos, tratados em seguida com a CyO2 (BURMAN *et al.*, 2011).

Recentemente, outros ciclotídeos com atividade antitumoral foram descritos como os vaby A e D (YESHAK *et al.*, 2011) isolados de *Viola abyssinica* e psyle A, D e E (GERLACH *et al.*, 2010a), isolados de *Psychotria leptothyrsa*. Os dois primeiros demonstraram atividade *in vitro* contra células de linfoma da linhagem U-932. Apesar de ambos possuírem resíduos carregados, vaby A possui carga total neutra, e apresenta atividade em concentração maior que vaby D, que possui carga total negativa, mostrando a importância das propriedades superficiais para atividade antitumoral observada em ciclotídeos. Psyle A, C e E também foram avaliados contra células de linfoma, sendo que psyle E apresentou maior atividade,

semelhante a da CyO2. Este trabalho demonstrou ainda que psyle C foi o único ciclotídeo que manteve sua atividade após linearização.

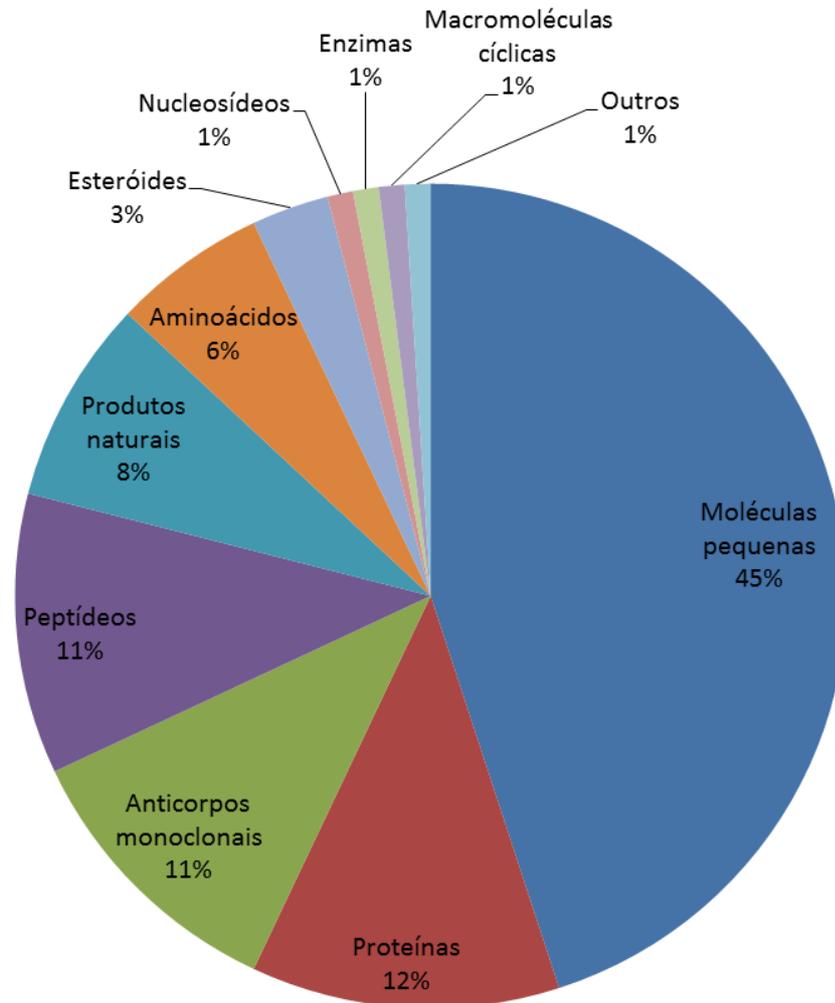
1.5 A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E O USO DE PEPTÍDEOS

A indústria farmacêutica é um dos setores mais intrigantes da indústria, principalmente por ser o setor dedicado à necessidade mais vital da humanidade, a saúde. É um dos poucos setores que ainda estão em crescimento no clima econômico atual. No entanto, este setor lança menos produtos no mercado a cada ano. Nos anos de 2009 a 2011 a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) aprovou a liberação de apenas 76 novas terapias, 58 novas entidades moleculares e 19 novos produtos biológicos. Nesse período, apenas 34 moléculas pequenas foram aceitas pelo FDA, o que representa 45 % do total, enquanto 18 proteínas – incluindo proteínas, anticorpos monoclonais e enzimas – foram introduzidas no mercado. A notícia animadora para a pesquisa com peptídeos é que 8 peptídeos (Tabela 1), 11 % do total, foram aceitos pelo FDS nesse período (Figura 7) (ALBERICIO e KRUGER, 2012). Levando em consideração que existem mais laboratórios, tanto acadêmicos como industriais, trabalhando no desenvolvimento de pequenas moléculas comparando a síntese de peptídeos, pode-se concluir que os peptídeos tem tido sucesso na terapêutica. Além de proteínas e peptídeos, esteróides, nucleosídeos e produtos naturais também foram aceitos pelo órgão, demonstrando que a natureza continua sendo a principal fonte e a melhor inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN e CRAGG, 2012).

Alguns pesquisadores têm sugerido que a tendência de redução do número de novos fármacos que surgiram no mercado desde meados da década de 90 pode estar relacionada com a diminuição do interesse em busca nos produtos naturais do início dos anos 80, que favoreceram métodos computacionais como a tecnologia de condução na descoberta de fármacos (GANESAN, 2008). Nessa época, foi divulgado que a utilização de métodos computacionais reduziria os requisitos de tempo e recursos de síntese química e testes biológicos, diminuindo os custos de ensaio pré-clínicos e clínicos (SUKUMAR e DAS, 2011). Atualmente é reconhecido que há necessidade de uma abordagem experimental e teórica interligadas no desenvolvimento de novas moléculas, de forma que a atuação multidisciplinar é

necessária para acelerar o desenvolvimento de produtos inovadores (CAFLISCH *et al.*, 1998; SUKUMAR e DAS, 2011; ALBERICIO e KRUGER, 2012).

Figura 7. Distribuição de novos fármacos aprovados pelo FDA – 2009 a 2011 – separados por espécie química. Adaptado de Albericio e Kruger (2012)



A análise desses peptídeos aprovados pelo FDA nesse período pela categoria terapêutica é uma indicação da versatilidade de peptídeos capazes de resolver uma grande quantidade de transgressões bioquímicas (Tabela 1). Por exemplo, Broceprevir e Telaprevir são agentes terapêuticos antivirais indicados no tratamento de hepatite C; Ecallantide e Icatibant são agentes com ação cardiovascular; Romidepsin e Brentuximab vedotin são fármacos com ação anticancerígena; Liraglutide é utilizado no tratamento de diabetes tipo 2; e Telavancin é um agente antibacteriano.

Tabela 1. Peptídeos aprovados pelo FDA no período de 2009 a 2011. Os peptídeos foram listados pelos nomes genéricos, nomes comerciais, doença alvo e propriedades. Adaptado de Albericio e Kruger (2012)

Nome genérico (Nome comercial)	Doença alvo	Propriedades
Ecallantide (Kalbitor®)	Angioedema hereditário	Inibidor de caliceína do plasma
Telavancin (Vibativ®)	Infecção de pele	Agente antibacteriano
Romidepsin (Istodax®)	Linfoma de células T cutâneas	Inibidor HDAC
Liraglutide (Victoza®)	Diabetes tipo 2	Agonista de receptor GLP-1
Boceprevir (Victrelis™)	Vírus da hepatite C genótipo 1	Inibidor da protease NS3/4A
Telaprevir (Incivek®)	Vírus da hepatite C genótipo 1	Inibidor da protease NS3/4A
Brentuximab vedotin (Adcetris™)	Linfoma de Hodgkin	CD30 direcionado
Icatibant (Firazyr®)	Angioedema hereditário	Antagonista do receptor B2 da bradicinina

Atualmente, além de cerca de 80 peptídeos no mercado, há cerca de 200 em fases clínicas e 400 em fases pré-clínicas. Atuação no metabolismo é a principal área de atuação terapêutica para essas moléculas (25 %), seguida pelo tratamento do câncer (16 %), porém, fármacos peptídicos também demonstram enorme potencial para outras áreas clínicas como atuação no sistema cardiovascular, sistema nervoso central, sistema gastrointestinal, doenças autoimunes e infecções (AYOUB e SCHEIDEGGER, 2006; ALBERICIO e KRUGER, 2012).

Os peptídeos oferecem algumas vantagens como fármacos incluindo sua alta atividade biológica, alta especificidade e, de forma geral, baixa toxicidade. Um dos principais obstáculos que impede essas moléculas de tornarem-se ingredientes farmacêuticos ativos é sua falta de biodisponibilidade oral (ZOMPRA *et al.*, 2009). Mesmo com esse obstáculo, os peptídeos tem se mostrado alternativas terapêuticas

para a indústria farmacêutica, principalmente devido a uma série de grandes fracassos de alguns medicamentos a base de pequenas moléculas (PEASE e HORUK, 2010). Já os peptídeos apresentam uma imagem otimista nesse cenário, devido ao avanço na química de peptídeos com desenvolvimento de estratégias para facilitar a síntese dessas moléculas. O paradigma da descoberta de fármacos está sendo alterado pela nova tendência da indústria farmacêutica desenvolver pró-fármacos ou sistemas de entrega de fármacos. Exemplos dessa nova tendência é o pró-fármaco brentuximab vedotin, que foi aceito pela FDA em 2011. Essas novas drogas abrem caminho para um grande número de terapias com peptídeos que devem entrar no mercado num futuro próximo. Esta nova abordagem também vai acelerar a pesquisa acadêmica e industrial, mostrando a importância no campo da pesquisa com peptídeos (ALBERICIO e KRUGER, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A busca de novas moléculas, a partir de fontes naturais, que possam ser usadas para combater microrganismos causadores de infecções parece ser de fundamental importância. Dentre essas moléculas, destacam-se os PAMs, que abrem a possibilidade de aplicações terapêuticas numa enorme variedade de distúrbios, tais como neoplasias, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, imunodeficiências bem como doenças infecciosas. Os ciclotídeos apresentam uma vasta gama de atividades biológicas além de serem moléculas extremamente estáveis devido a sua conformação estrutural. Ainda não foram descritos na literatura nenhum representante dessa classe com atividade antibacteriana testada *in vivo*. Nesse trabalho utilizaremos os peptídeos cicloviolacina O2, kalata B1 e B2 com o objetivo de avaliar sua potencial atividade imunomodulatória e antibacteriana *in vivo* e *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e imunomodulatória dos ciclotídeos cicloviolacina O2, kalata B1 e kalata B2 contra *S. aureus* ATCC 25923 utilizando modelo cirúrgico de ferida cutânea com tratamento tópico.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a atividade antibacteriana dos ciclotídeos *in vitro* pelo método da microdiluição em caldo.
- Avaliar a atividade citotóxica contra células de linhagem RAW 264.7.
- Avaliar a atividade antibacteriana dos ciclotídeos *in vivo* em um modelo de infecção de ferida subcutânea.
- Avaliar a produção de TNF- α no sobrenadante das culturas de células RAW 264.7 tratadas e no soro e ferida dos animais submetidos ao modelo de infecção de ferida cirúrgica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos utilizados no presente estudo foram cicloviolacina O2 (CyO2), kalata B1 (KB1) e kalata B2 (KB2). Todos os peptídeos foram purificados e cedidos pelo Dr. David J. Craik da *Queensland University*, Brisbane Austrália. Resumidamente, o procedimento realizados pelo grupo do Dr. David estão descritos a seguir. Os peptídeos foram isolados a partir das partes aéreas das plantas *V. odorata* (CyO2) e *O. affinis* (KB1, KB2 e KB7) com diclorometano/metanol (1:1) durante 12 h. Em seguida o extrato foi submetido a partição com clorofórmio e água, e a fração metanol/água foi concentrada em um rotaevaporador e em seguida liofilizados. O produto seco foi ressuspendido em água e purificado por RT-HPLC preparativo com coluna C18. As massas foram analisadas utilizando um espectrômetro de massa ES-TOF micromass LCT (DALY *et al.*, 2003).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), com modificações. Os peptídeos foram desafiados contra *S. aureus*, já que esse patógeno é um dos micro-organismos mais frequentes em infecções cutâneas, utilizando nesse trabalho a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. As células foram semeadas em ágar Müller-Hinton (MH) por 24 h a 37° C, para isolamento das colônias. As placas com as colônias isoladas foram armazenadas em geladeira por no máximo 7 dias. Uma colônia isolada foi colocada para crescer em 5 mL de caldo MH sob agitação durante 18 h a 37° C. A concentração celular foi determinada pela leitura da densidade óptica (D.O.) e a mesma foi ajustada para 1×10^5 células a cada 50 μ L. Foram realizadas diluições seriadas com os peptídeos CyO2, KB1 e KB2 (200 a 25 μ M) em um volume de 50 μ L, como controle positivo foi utilizado cloranfenicol (50 μ M) e como controle negativo DMSO (2,5 %), e em seguida foram adicionados 50 μ L de suspensão bacteriana contendo 10^5 células na metade da fase logarítmica de crescimento em cada poço. As amostras foram incubadas por 6 h a 37° C, em um leitor de microplaca com agitação (Bio-Tek Power

Wave HT – USA). O crescimento bacteriano foi avaliado por leituras da absorbância a 595 nm a cada 30 min. A menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano da mesma forma que o controle foi definida como a concentração inibitória mínima (CIM).

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para avaliação dos ciclotídeos sobre a viabilidade celular foi utilizada a linhagem celular de monócitos RAW 264.7, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (CR108). Essas células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM Gibcon), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, penicilina (100 U.mL⁻¹) e estreptomicina (100 mM.mL⁻¹) e foram mantidas a 37° C em atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de ar atmosférico (Benet *et al.*, 2004). Após atingirem confluência de 80 %, as células foram removidas com auxílio de um suporte plástico (*cell scraper*) e a concentração celular foi ajustada para 1.10⁵ células.mL⁻¹. As células foram incubadas em placa de 96 poços, juntamente com os ciclotídeos CyO2 (437,8 – 27,4 nM), KB1 (475,4 – 29,7 nM) e KB2 (465,2 – 29,1 nM). Para análise da viabilidade celular, foi utilizado o teste de MTT (1 mg.mL⁻¹), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio, onde leituras foram realizadas a 24 e 48 h de tempo de incubação com os peptídeos. Para este ensaio, 155 µL do meio de cultura foram removidos e adicionados 10 µL de MTT incubados por 3 h a 37° C. Após esse período, foram adicionados 60 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) por poço, para diluição dos cristais de formazan. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 575 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em comparação com os grupos controles (Controle positivo células sem tratamento, controle negativo solução de lise composta por 10 mM Tris-HCl pH 7.4; 1 mM EDTA e 0,1% Triton X-100).

4.4 ENSAIOS *IN VIVO*

4.4.1 Considerações éticas

Todos os experimentos utilizando animais foram realizados no laboratório de Bioensaios da Universidade Católica de Brasília, após aprovação dos procedimentos

experimentais pelo Comitê de ética sob o número 005/2013 CEUA/UCB. Foram adotados os Princípios Éticos em Experimentação Animal, recomendados pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA), instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*, e respeitados os preceitos estabelecidos pela Legislação Brasileira de Animais de Experimentação, Lei nº 11.794, de 09 de outubro de 2008.

4.4.2 Animais

Para realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas com 6 a 8 semanas. Para o experimento de ferida subcutânea foram utilizados animais adquiridos do biotério de camundongos da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto – USP/RP. Os animais utilizados para retirada de células de medula óssea foram adquiridos do biotério da Universidade Católica Brasília. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, alimentação e água disponíveis durante todo o procedimento e os ciclos de claro e escuro de 12 h cada. A troca da maravalha, da água e da comida foram realizadas 2 vezes por semana. Os procedimentos experimentais utilizando animais deste trabalho foram previamente padronizados no laboratório quanto a carga bacteriana, tempo de duração do experimento, tempo para o início do tratamento e tamanho das feridas (SILVA, 2011).

4.4.3 Modelo de infecção de ferida cirúrgica

4.4.3.1 Preparo do microrganismo

Para preparação da cultura de *S. aureus* (ATCC25923), as bactérias obtidas como descrito no item 4.2, foram deixadas sob agitação durante 24 h a 37°C . Após esse período, foi determinada a concentração bacteriana pela leitura da D.O. e todo o conteúdo foi centrifugado a 1600 rpm, por 5 min, o sedimento foi ressuspenso em PBS de forma a obter uma concentração de 2×10^9 células a cada 20 μL e a suspensão deixada no gelo até a hora da utilização.

4.4.3.2 Anestesia dos animais

Os camundongos foram inicialmente anestesiados com cloridrato de cetamina 10 % (80 mg.Kg⁻¹) (Agener União – Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg.Kg⁻¹) (Agener União – Brasil) administrados via intraperitoneal.

4.4.3.3 Indução da ferida

Depois de anestesiados o dorso dos animais foi tricotomizado com o auxílio de um tosador elétrico e com um *punch* cirúrgico de 4 mm foi delimitado o tamanho da ferida, em seguida com auxílio de uma tesoura foi realizada a incisão cirúrgica. Depois da realização da ferida, os grupos que seriam infectados receberam 20 µL da suspensão bacteriana. Cada camundongo foi colocado em uma gaiola individualmente, para proteção da ferida, comida e água foram deixadas livres. A analgesia foi obtida durante 72 h após a indução da ferida por adição de dipirona na água.

4.4.3.4 Tratamento

Após 24 h da inoculação da bactéria, a infecção foi confirmada de forma visual a partir da presença de características inflamatórias como vermelhidão e presença de exudato. Foram então realizados os tratamentos segundo os grupos experimentais, onde cada animal recebeu 20 µL da solução na concentração encontrada na Tabela 2 diariamente em um horário fixo durante 6 dias. As concentrações utilizadas foram calculadas com base na CIM *in vitro* das amostras.

4.4.3.5 Eutanásia e coleta de amostras

Após o sexto dia de tratamento, os animais foram anestesiados como descrito no item 3.4.2.2, com o devido cuidado para não apertar ou tocar as feridas. Depois de anestesiados eles tiveram o sangue coletado por punção cardíaca, o sangue depois de coletado foi colocado em tubos de coleta de sangue (*vacuette*) com gel separador, e centrifugados para separação do soro, que foi armazenado a – 80° C para posterior dosagem de citocinas. Em seguida os animais foram eutanasiados

por deslocamento da cervical, posteriormente as feridas foram removidas e pesadas para recuperação da carga bacteriana total.

Tabela 2. Apresentação dos grupos experimentais utilizados nos ensaios antibacterianos in vivo, modelo de ferida subcutânea contaminada com *S. aureus*.

Tratamento	Concentração	Nº de camundongos
DMSO	2,5 %	5
Peptídeo (KB2 ou CyO2)	0,75 mg.kg ⁻¹	5
	1,50 mg.kg ⁻¹	5
	3,00 mg.kg ⁻¹	5
Peptídeo (KB1)	1,50 mg.kg ⁻¹	4
	3,00 mg.kg ⁻¹	4
Vetaglos® – Vetnil	Gentamicina 0,5 % Sulfanilamida 5 % Sulfadiazina 5 %	5

4.4.3.6 Recuperação da carga bacteriana

As feridas foram maceradas, em ambiente estéril, com 1 mL de PBS estéril, em seguida foram realizadas diluições seriadas, onde 100 µL da diluição anterior foram diluídos em 900 µL de PBS estéril para a próxima diluição, 10 µL dessas diluições foram semeadas em meio ágar MH e ágar Manitol - meio seletivo para *S.aureus*. As placas foram deixadas em estufa por 24 h a 37° C, e em seguida realizada a contagem do número de colônias. Foi realizada a correlação entre o peso da ferida e o número de colônias por ferida de forma ao resultado ser expresso em UFC.mg⁻¹. Os 900 µL do macerado da ferida que não foram utilizados pra contagem de colônias foram centrifugados para retirada do resto de tecido e armazenados a – 80° C, para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas.

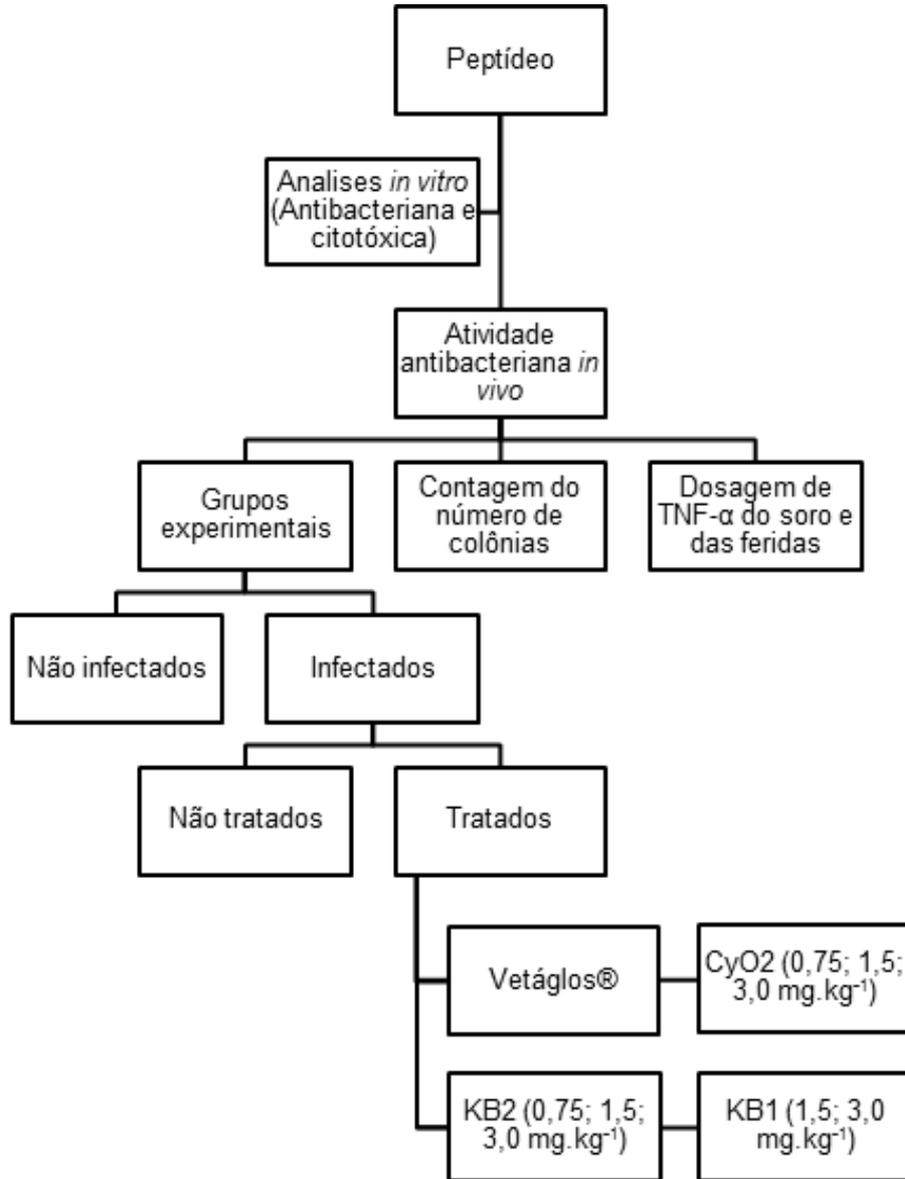
4.5 DOSAGEM DE TNF- α

A secreção da citocina TNF- α foi mensurada no macerado das feridas, no soro dos animais e no sobrenadante da cultura celular da linhagem RAW 264.7 tratadas com os ciclotídeos como descrito no item 3.3. As concentrações foram determinadas pelo método de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante (Peprotech - EUA). As concentrações desses produtos foram expressas em picogramas por mL (pg.mL^{-1}).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado *one-way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para a análise da recuperação bacteriana das feridas e para a análise de citocina do sangue e ferida. As análises foram realizadas utilizando o software Bioestat versão 5.0 e o GraphPad PRISMA[®] versão 5.0. Os resultados foram considerados significativos, quando $\rho < 0,05$.

4.7 FLUXOGRAMA DE TRABALHO



5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

A atividade antiestafilocócica de PAMs tem sido comprovada através de intensivas pesquisas. Geralmente, são estudadas, avaliadas e confirmadas através de ensaios biológicos *in vitro* em testes de susceptibilidade ou sensibilidade por microdiluição em caldo. Neste trabalho foi realizada a verificação da atividade antibacteriana *in vitro* utilizando a metodologia de microdiluição em caldo com o objetivo de confirmar a atividade sobre *S. aureus* dessas amostras.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da determinação da atividade antiestafilocócica dos peptídeos KB1, KB2 e CyO2. O critério utilizado para classificação da atividade dos peptídeos utilizados no presente trabalho consistiu em: forte atividade antibacteriana, quando CIM entre 1-50 μM ; peptídeo com atividade antibacteriana moderada, quando CIM entre 50-100 μM , peptídeo com baixa atividade antibacteriana, quando CIM entre 100-150 μM e peptídeo inativo, quando CIM superior a 151 μM (YOSHIO *et al.*, 2003; DESLOUCHES *et al.*, 2005; YIN *et al.*, 2012; GOPAL *et al.*, 2013). O controle, cloranfenicol, utilizado no ensaio no valor do CIM apresenta uma atividade antibacteriana moderada.

Como pode ser observado na Tabela 2, o peptídeo CyO2 apresentou a melhor atividade frente a *S. aureus*, podendo ser considerado um peptídeo com forte atividade antibacteriana contra esse microrganismo. Enquanto o peptídeo KB2 pode ser considerado peptídeo com atividade antibacteriana moderada e a KB1 peptídeo com baixa atividade antibacteriana.

Tabela 3. Avaliação da atividade antiestafilocócica *in vitro* dos ciclótídeos KB1, KB2 e CyO2 contra *S. aureus* ATCC25923. As células bacterianas foram incubadas com o ciclótídeo nas concentrações de 25-100 μM por 6 h.

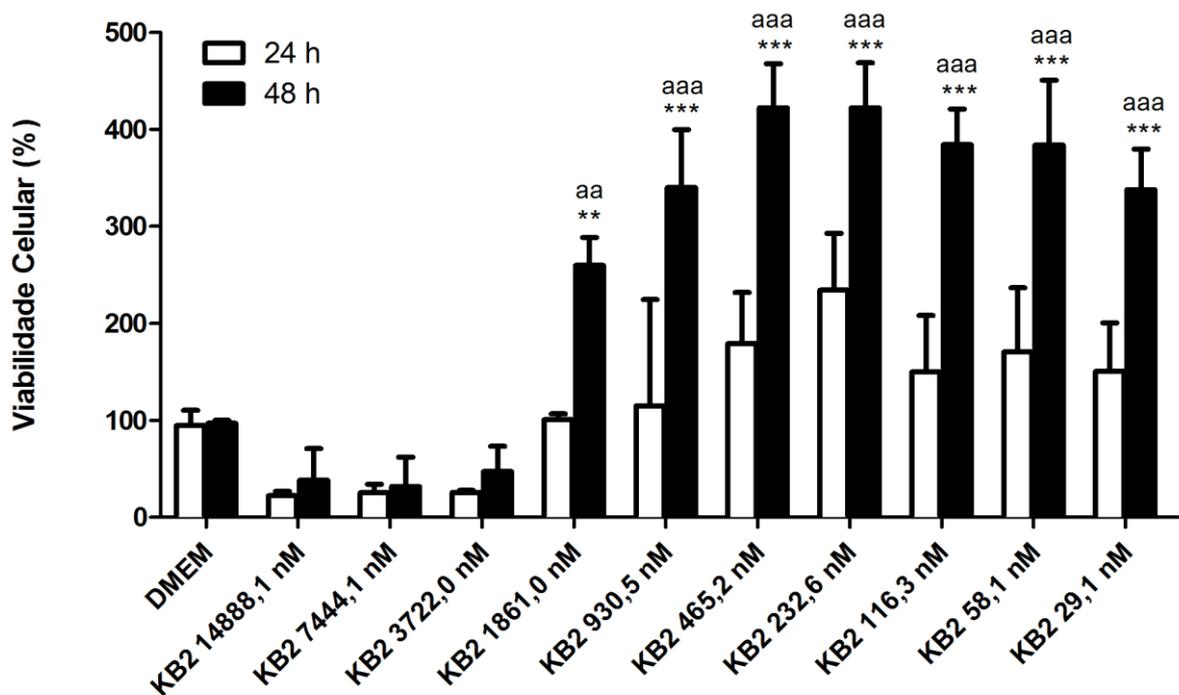
Microrganismo	CIM (μM)		
	KB1	KB2	CyO2
<i>S. aureus</i>	100	50	25

5.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS RAW 264.7

Com o objetivo de determinar quais as concentrações não tóxicas desses peptídeos, os ensaios biológicos para determinar a atividade citotóxica *in vitro* foram realizados segundo o método do MTT. Esse método consiste na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídeos, principalmente na atividade de enzimas desidrogenases (MOSMANN, 1983). Neste trabalho, a atividade celular foi quantificada através da redução do MTT à formazana, ocasionada pela ação das enzimas desidrogenases presentes nas células viáveis.

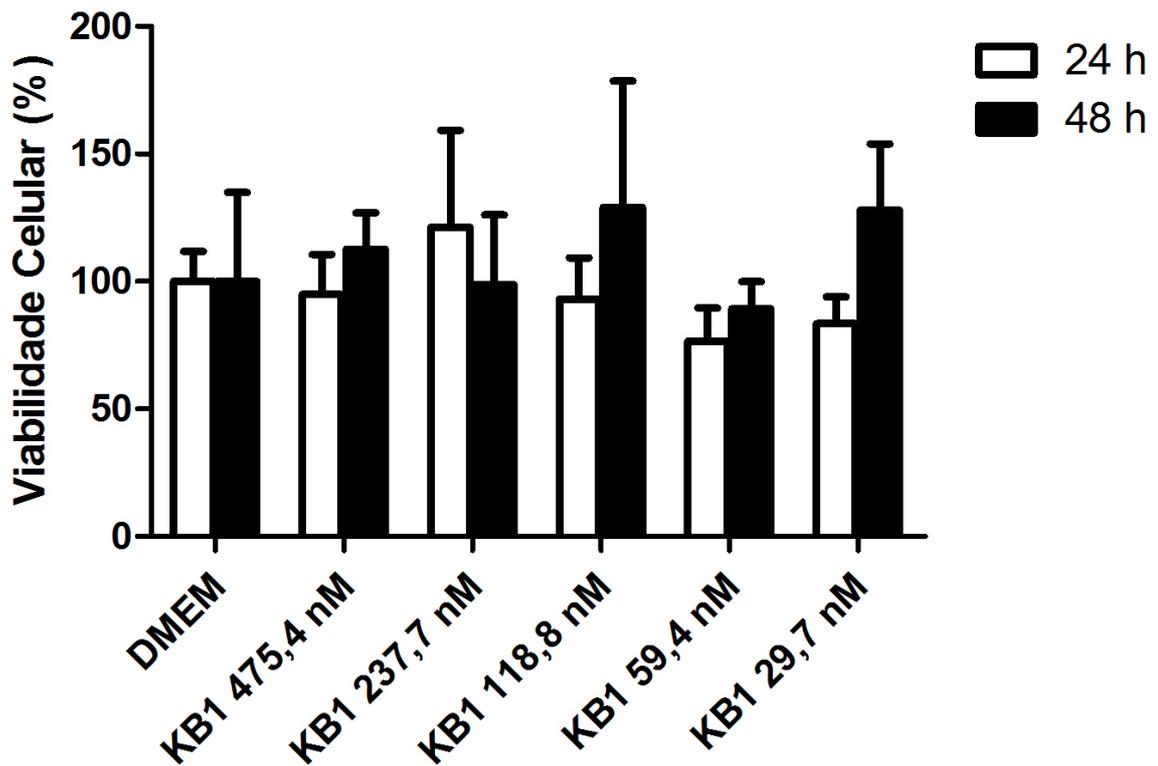
A avaliação do ciclotídeo KB2 (Figura 8) demonstrou que em concentrações superiores a 1,8 μM apresentou uma inibição, dose dependente, da viabilidade celular, chegando a ~80%, enquanto que, com a diminuição da concentração apresentou uma redução da atividade citotóxica.

Figura 8. Avaliação do efeito do ciclotídeo KB2 sobre a viabilidade/proliferação celular de células da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas por 24 e 48 h com o ciclotídeo KB2 nas concentrações de 29,7- 475,4 nM. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando o grupo não tratado. A $p < 0,5$, aa $p < 0,01$, aaa $p < 0,001$ comparando os tratamentos nos tempos diferentes, 24 h e 48 h.



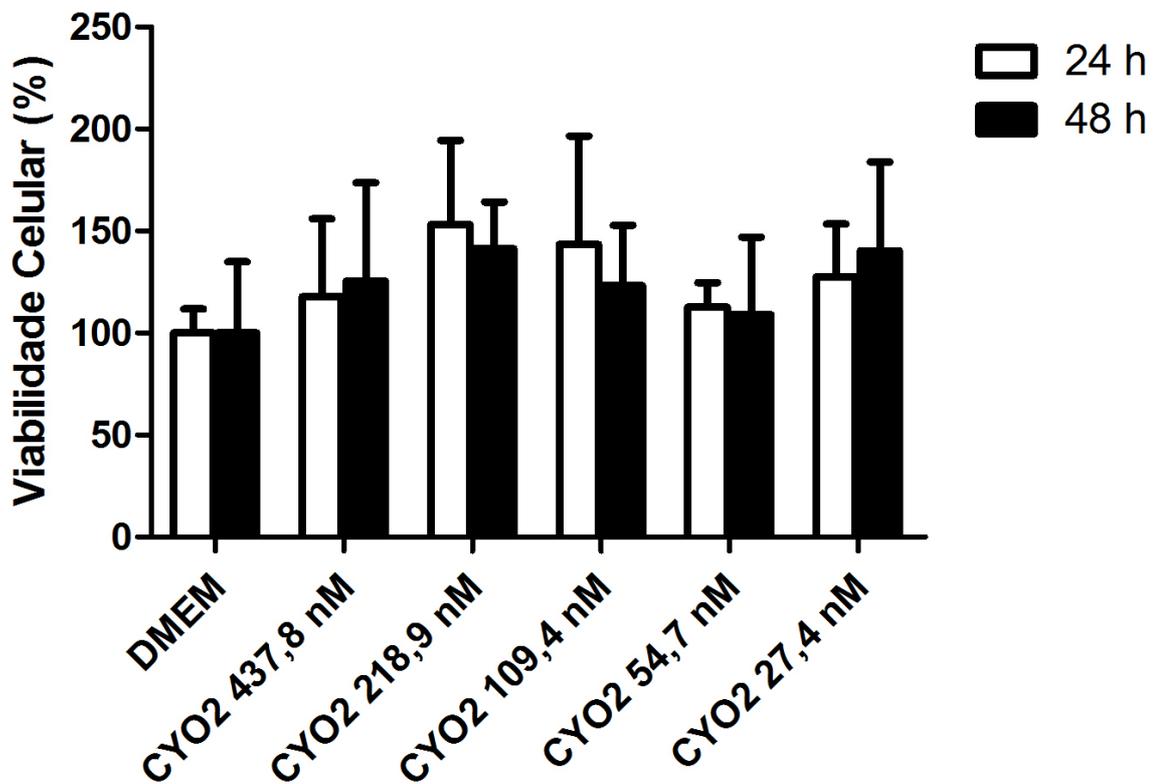
Outro peptídeo que foi avaliado para a citotoxicidade contra células RAW 264.7, foi o KB1. Este peptídeo não apresentou atividade citotóxica contra essa linhagem celular, quando comparado com o controle (Figura 9).

Figura 9. Avaliação do efeito do ciclotídeo KB1 sobre a viabilidade/proliferação celular de células da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas por 24 e 48 h com o ciclotídeo KB1 nas concentrações de 29,7- 475,4 nM. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * $p < 0,5$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando o grupo não tratado e a amostra tratada por 48 h.



A avaliação do peptídeo CyO2 mostrou que esse não apresentou atividade significativa nas concentrações testadas quando comparadas com o controle, demonstrando que esse peptídeo não apresenta atividade citotóxica para as células RAW 264.7, nas concentrações testadas (Figura 10).

Figura 10. Avaliação do efeito do ciclotídeo CyO2 sobre a viabilidade/proliferação celular de células da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas por 24 e 48 h com o ciclotídeo CyO2 nas concentrações de 29,4- 437,8 nM. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * $p < 0,5$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando o grupo não tratado e a amostra tratada por 48 h.



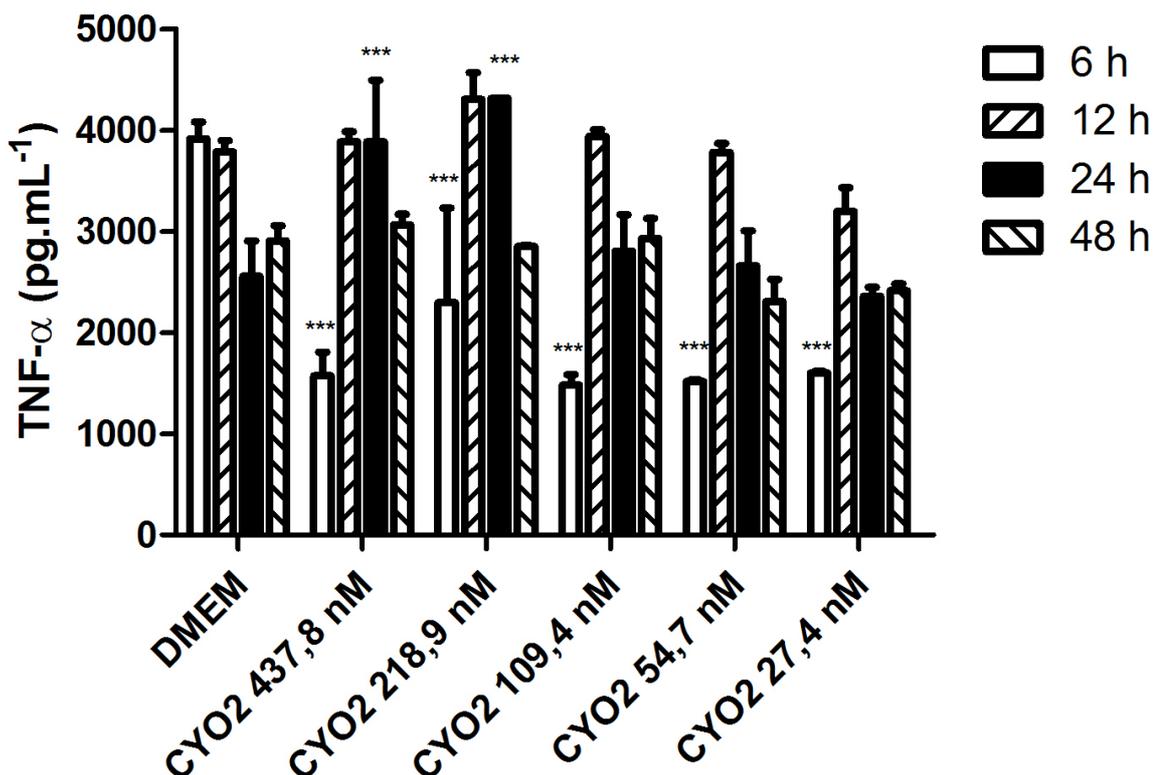
5.3 AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE TNF- α POR MONÓCITOS APÓS ESTÍMULAÇÃO COM OS CICLOTÍDEOS

Nas infecções da pele por *S. aureus*, o patógeno é reconhecido pelas células de defesa que induzem uma resposta inflamatória, conduzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), uma citocina

chave no combate a infecção (AUFIERO *et al.*, 2007; ROCHA-DE-SOUZA *et al.*, 2008; KAPETANOVIC *et al.*, 2011).

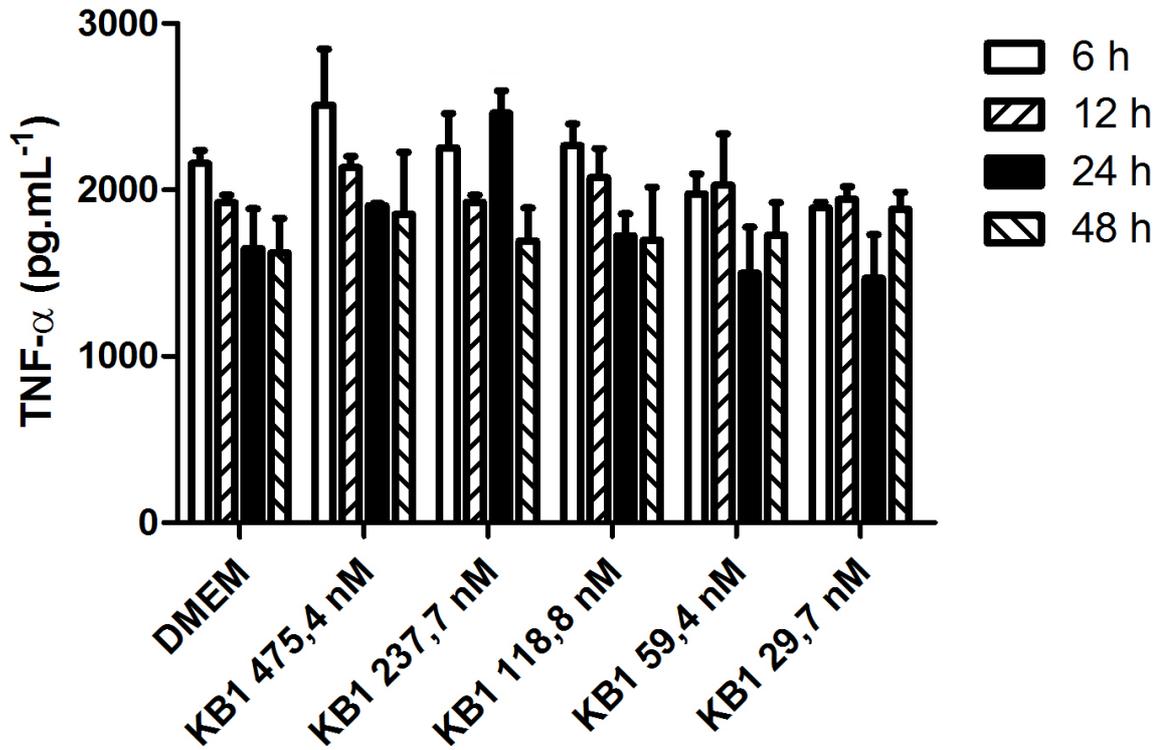
No presente trabalho dosamos os níveis de TNF- α produzido e liberado nas culturas por monócitos RAW 264.7 cultivadas na presença de CyO2, KB1 e KB2. As amostras coletados do sobrenadante de cultura de células tratadas com CyO2 apresentaram diferença significativa apenas para o tempo de 6 h de incubação em todas as concentrações (437,8-27,4 nM), e para 24 h de incubação nas concentrações de 437,8 e 218,9 nM (Figura 10), quando comparadas com o controle negativo (células cultivadas somente na presença de meio DMEM).

Figura 11. Avaliação da secreção de TNF- α no sobrenadante da cultura de monócitos RAW 264.7 tratada com CyO2. As células foram estimuladas por 6, 12, 24 e 48 h com o ciclotídeos. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando o grupo não tratado e a amostra tratada nos respectivos tempos.



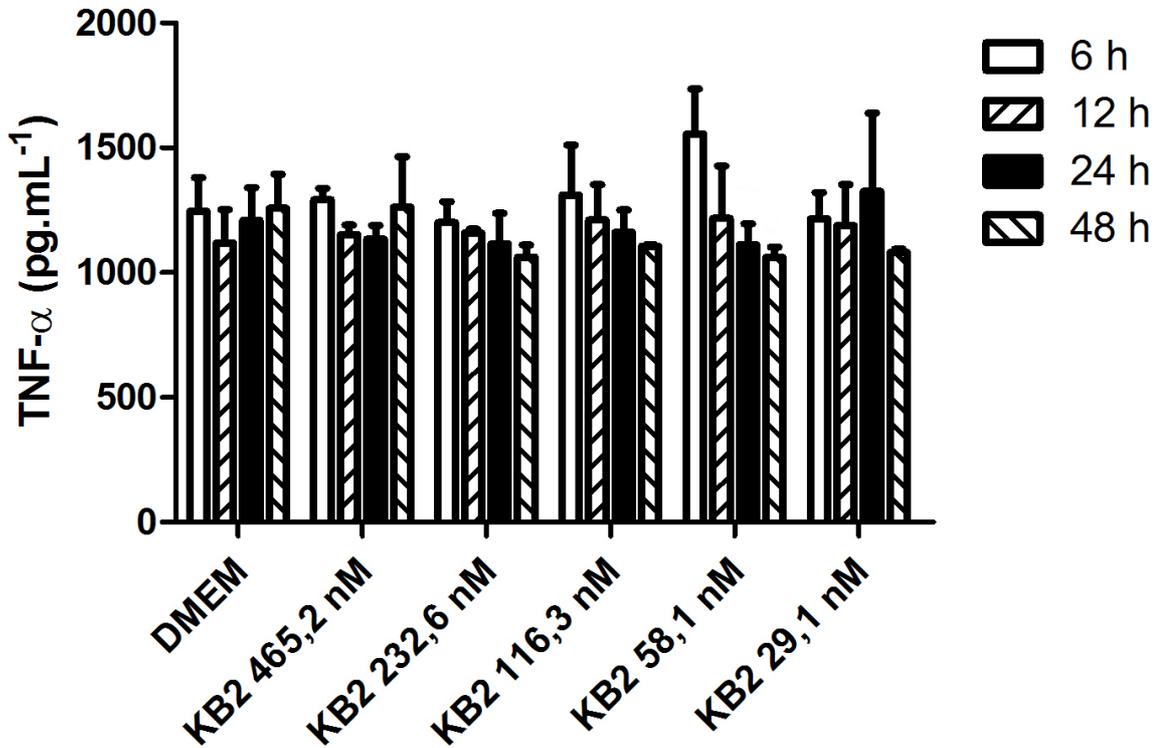
Já a cultura tratada com o ciclotídeos KB1, demonstrou que esse peptídeo não apresenta diferença estatisticamente significativa ao grupo controle negativo em nenhum dos tempos experimentais e concentrações utilizadas (Figura 11).

Figura 12. Avaliação da secreção de TNF- α no sobrenadante da cultura de monócitos RAW 264.7 tratadas com KB1. As células foram estimuladas por 6, 12, 24 e 48 h com o ciclotídeo KB1 (29,7 – 475,4 nM). Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando o grupo não tratado e a amostra tratada nos respectivos tempos.



Por último, as culturas tratadas com o ciclotídeo KB2 também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao grupo controle negativo em nenhum dos tempos experimentais e concentrações utilizadas (Figura 12).

Figura 13. Avaliação da secreção de TNF- α no sobrenadante da cultura de monócitos RAW 264.7 tratadas com KB2. As células foram estimuladas por 6, 12, 24 e 48 h com o ciclótídeos KB2 (29,1 – 465,2 nM). Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Bonferroni, * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando o grupo não tratado e a amostra tratada nos respectivos tempos.



5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA *IN VIVO*

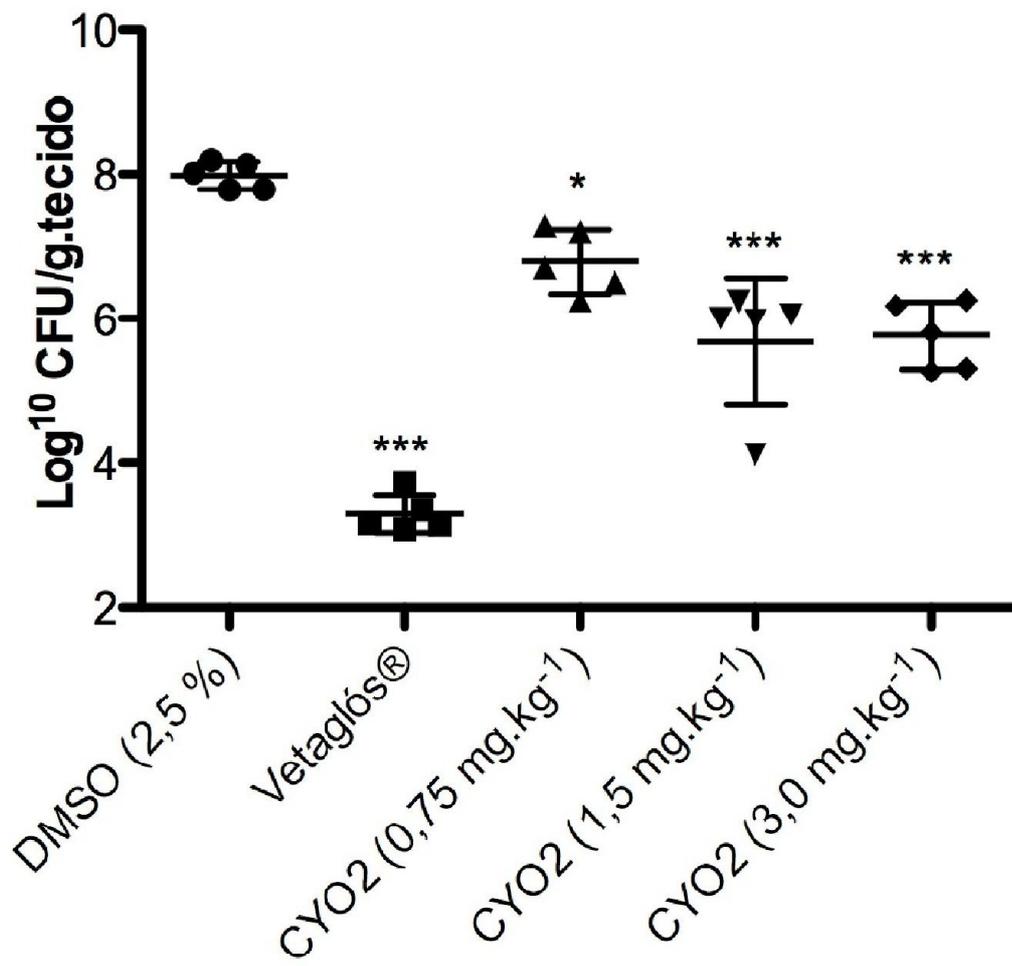
Tendo em vista a atividade antiestafilocócica *in vitro* dos peptídeos KB1, KB2 e CyO2, os mesmos foram desafiados frente a *S. aureus* ATCC25923 em um modelo de infecção de ferida cirúrgica. Os animais foram inoculados com 2.10^9 CFU de *S. aureus* por ferida. Após 24 horas iniciou-se o tratamento por via tópica diariamente com CyO2 (0,75, 1,5 e 3,0 mg.kg⁻¹), KB1 (1,5 e 3,0 mg.kg⁻¹) e KB2 (0,75, 1,5 e 3,0 mg.kg⁻¹), por 6 dias. Após o período de tratamento os animais foram eutanasiados e as feridas removidas e pesadas e em seguida maceradas e plaqueadas para recuperação da carga bacteriana

CyO2 apresentou o menor CIM, com base neste achado calculamos a dose de peptídeo a ser utilizado nos ensaios *in vivo*. O CIM da CyO2 foi 25 μ M (78,45

$\mu\text{g/mL}$). A menor concentração utilizada nos tratamentos foi 15 μg de peptídeo ($0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$), o que representa 10 vezes o valor do CIM *in vitro*.

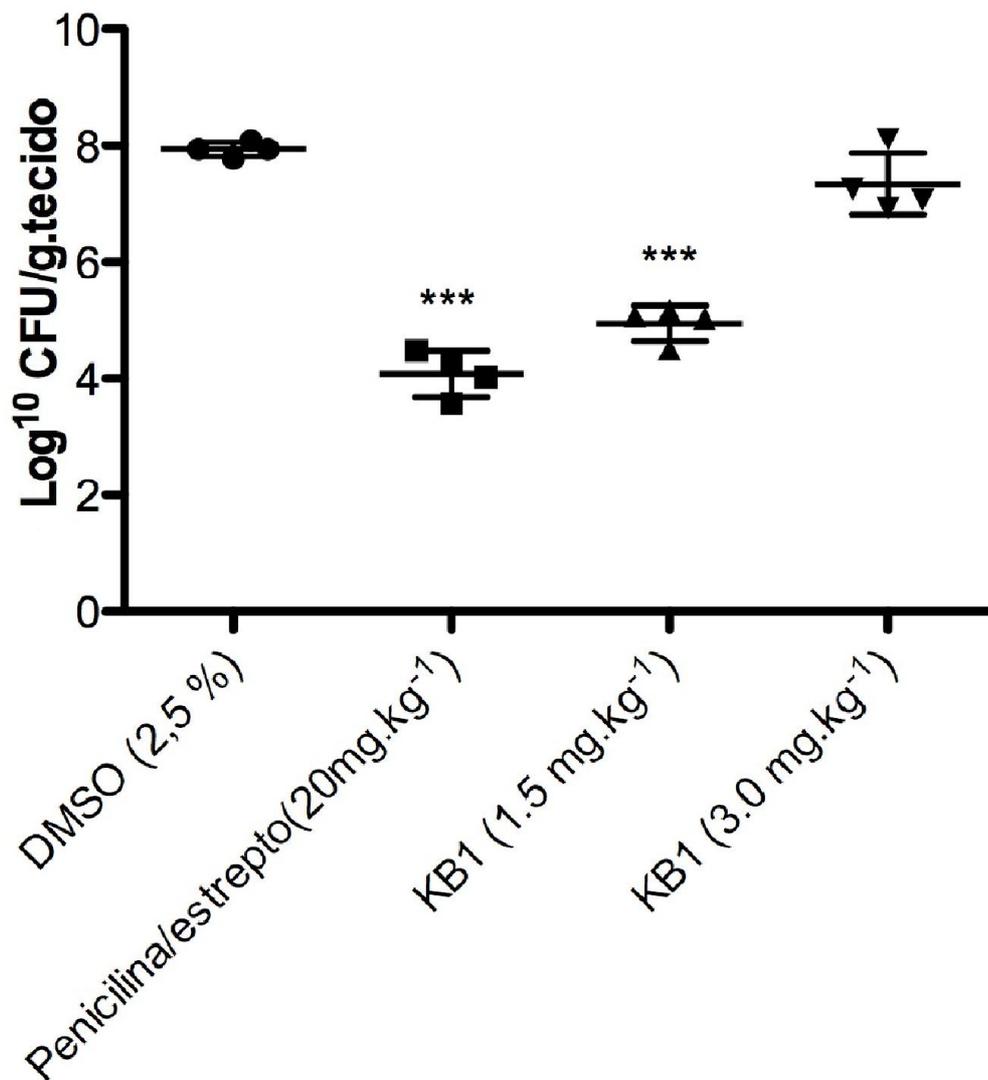
Os camundongos tratados apenas com o controle negativo obtiveram uma carga bacteriana final de $\sim 10^8$. Já quando tratados com $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ de CyO2 apresentaram uma diminuição da carga bacteriana para $\sim 10^7$, quando tratados com 1,5 e $3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, a carga bacteriana foi reduzida para $\sim 10^6$. Nos animais tratados com $6,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ de CyO2 observou-se uma diminuição na carga bacteriana para 10^5 , demonstrando uma possível correlação dose resposta (Figura 13).

Figura 14. Recuperação da carga bacteriana da ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923 após 7 dias de tratamento. As feridas foram inoculadas com 2.10^9 células/mL da bactéria e tratadas com: (A) Vetaglós® (Gentamicina 5 mg.kg^{-1} , sulfanilamida 50 mg.kg^{-1} , Sulfadiazina 50 mg.kg^{-1}), CyO2 ($0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$, $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, $3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, $6,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) e DMSO 2,5 % por 7 dias. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle negativo.



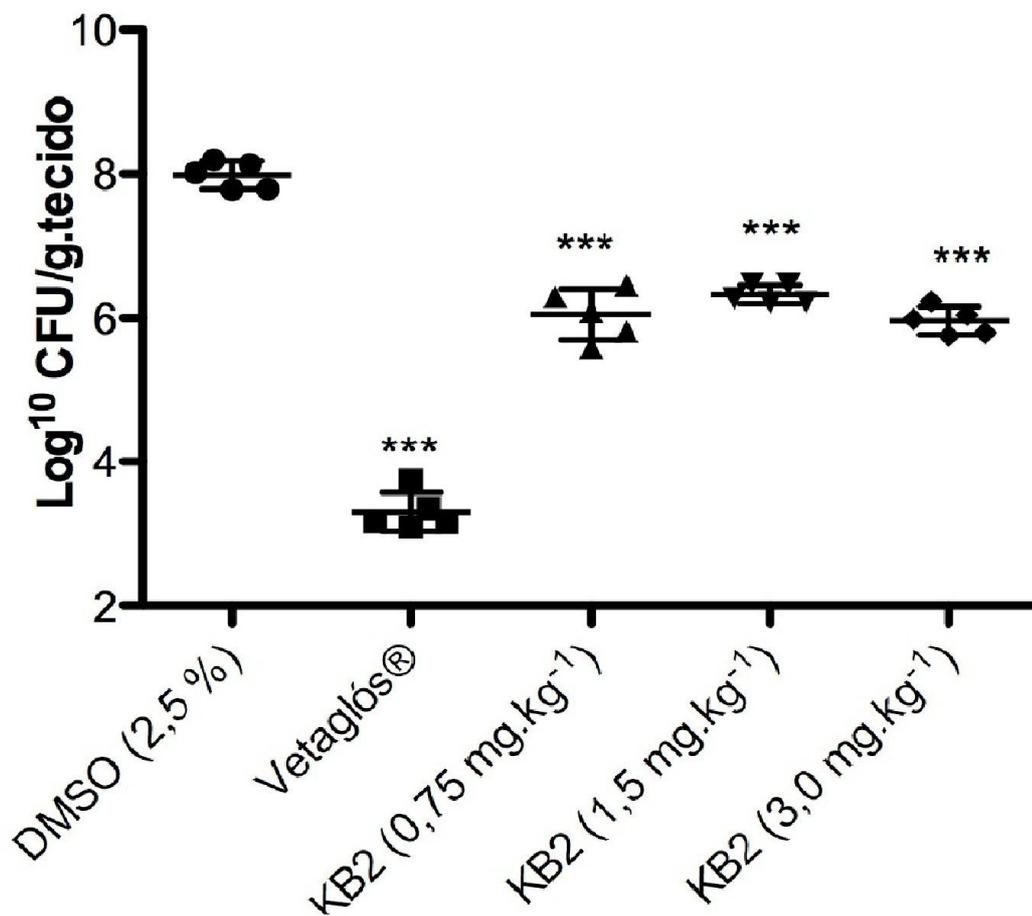
Já os camundongos infectados e tratados com $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de KB1 também apresentaram uma redução na contagem de colônias, onde os animais foram infectados com 2.10^9 e a carga bacteriana foi reduzida pra $\sim 10^5$, porém, nos animais tratados com a dose de $3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ não houve redução significativa da carga bacteriana quando comparado com o controle negativo (Figura 14).

Figura 15. Recuperação da carga bacteriana da ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923 após 7 dias de tratamento. As feridas foram inoculadas com 2.10^9 células/mL da bactéria e tratadas com: (A) Vetaglós® (Gentamicina 5 mg.kg^{-1} , sulfanilamida 50 mg.kg^{-1} , Sulfadiazina 50 mg.kg^{-1}), KB1 ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, $3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) e DMSO 2,5 % por 7 dias. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle.



Os camundongos tratados com o ciclotídeo KB2 apresentaram uma diminuição da carga bacteriana de 2.10^9 para $\sim 10^6$ em todas as concentrações testadas (0,75, 1,5, 3,0 mg.kg^{-1}) (Figura 15), demonstrando que esse peptídeo não apresenta uma correlação dose resposta no tratamento dessa infecção.

Figura 16. Recuperação da carga bacteriana da ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923 após 7 dias de tratamento. As feridas foram inoculadas com 2.10^9 células/mL da bactéria e tratadas com: (A) Vetaglós® (Gentamicina 5 mg.kg^{-1} , sulfanilamida 50 mg.kg^{-1} , Sulfadiazina 50 mg.kg^{-1}), KB2 (0,75 mg.kg^{-1} , 1,5 mg.kg^{-1} , 3,0 mg.kg^{-1}) e DMSO 2,5 %. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle.



5.5 AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE TNF- α EM CAMUNDONGOS COM FERIDAS INFECTADAS POR *S. aureus*

O TNF- α , como dito anteriormente é uma importante citocina pró-inflamatória, produzida em diversas infecções incluindo nas infecções por *S. aureus*. No ensaio *in vivo*, em todos os grupos experimentais foi detectada a secreção de TNF- α no soro e no lavado das feridas.

Nos grupos tratados com CyO₂ (Figura 16) não houve alteração significativa na secreção de TNF- α , nem para sangue, nem para o lavado das feridas quando comparadas com o controle negativo (tratamento com DMSO 2,8 %).

As amostras tratadas com KB1 (Figura 17) também não apresentaram alteração significativa na secreção de TNF- α , nem para sangue, nem para o lavado das feridas quando comparadas com o controle negativo (tratamento com DMSO 2,8 %).

Já o grupo tratado com KB1 (Figura 18) não apresentou diferença significativa para as amostras de soro, porém, na concentração de 3,0 mg.kg⁻¹ apresentou um aumento da secreção dessa citocina.

Figura 17. Efeitos do ciclotídeo CyO2 sobre a secreção de TNF- α no soro e ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923. Animais tratados com CyO2, (A) soro e (B) ferida. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle não infectado.

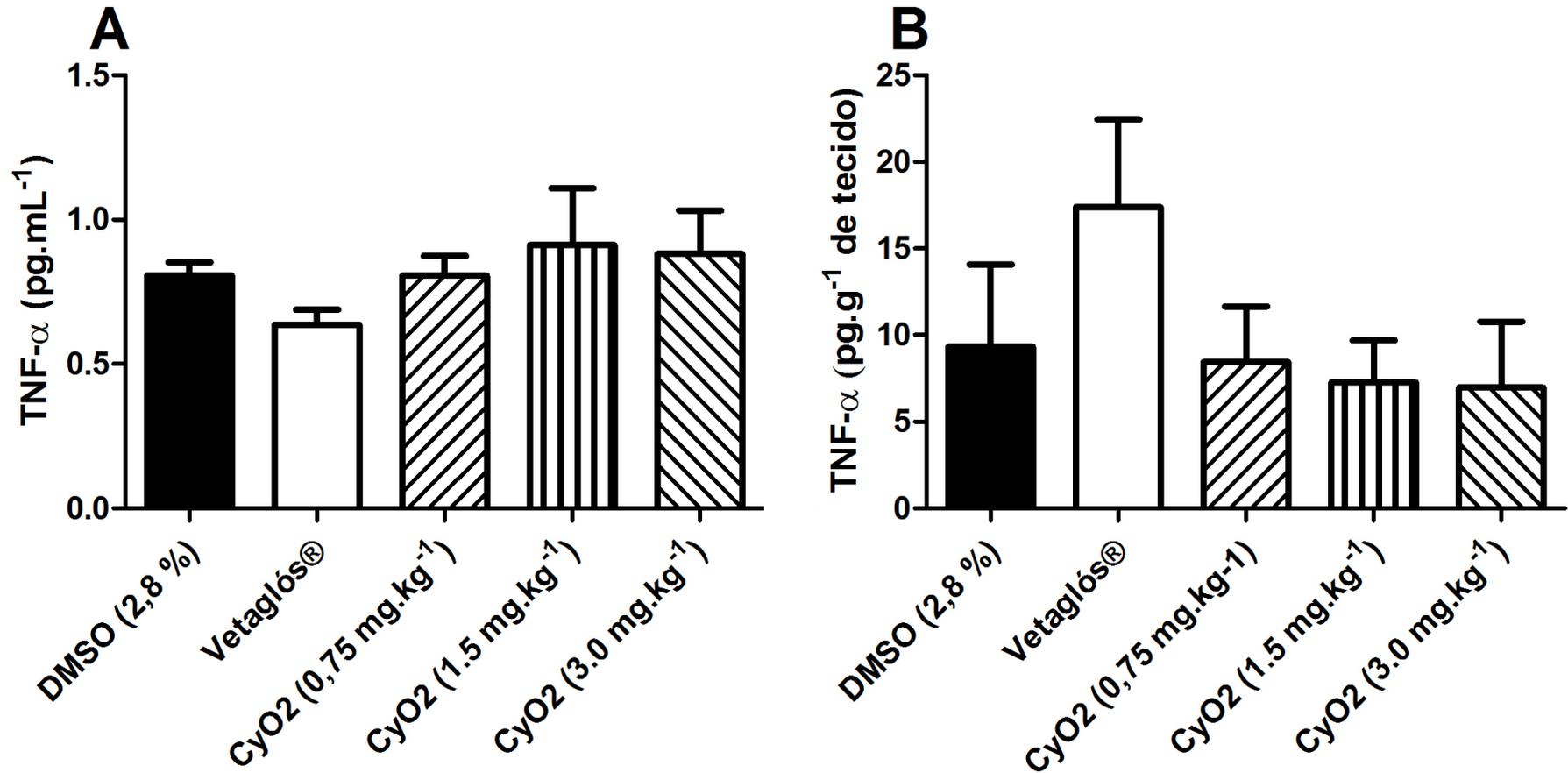


Figura 18. Efeitos do ciclotídeo KB1 sobre a secreção de TNF- α no soro e ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923. Animais tratados com KB1, (A) soro e (B) ferida. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle não infectado.

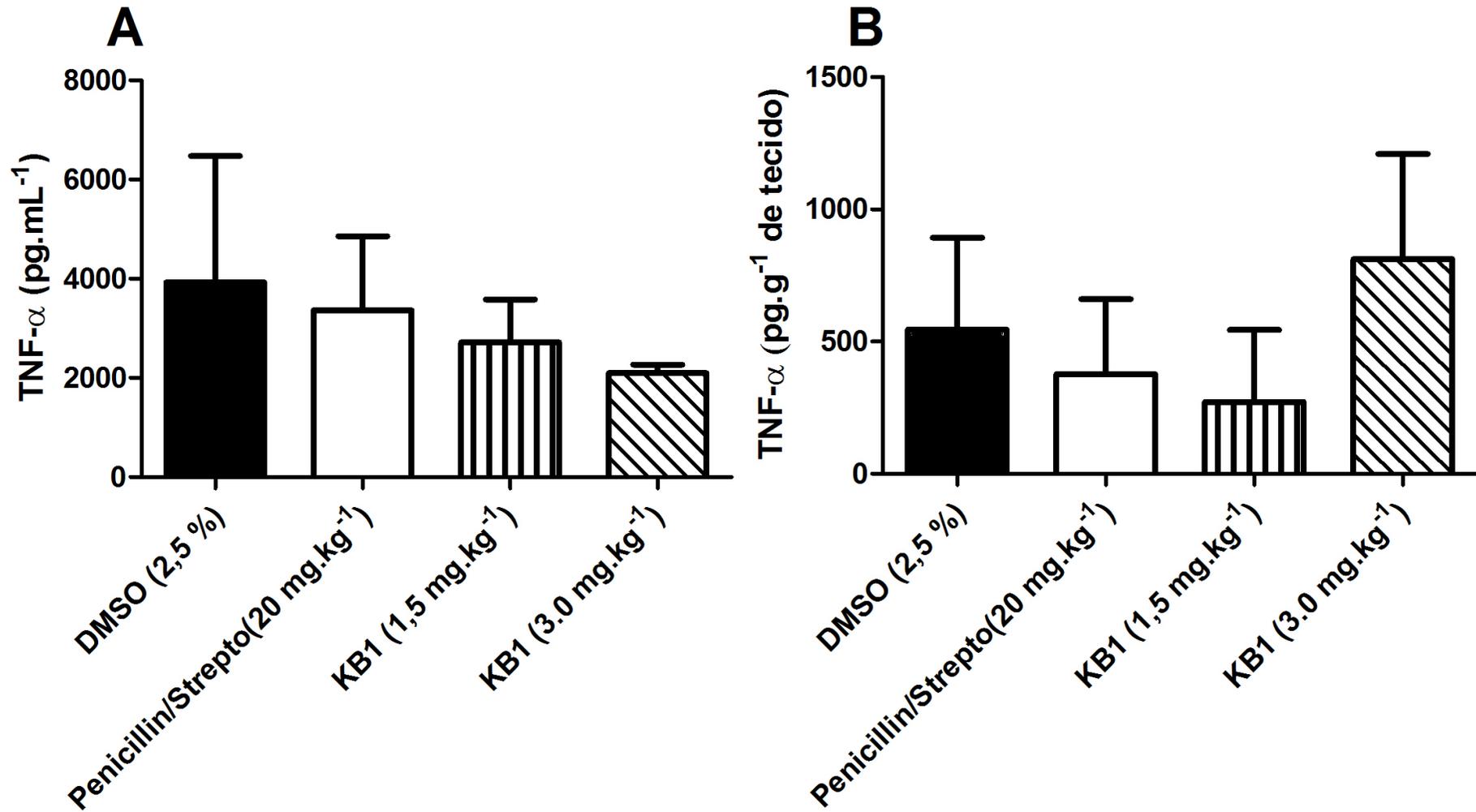
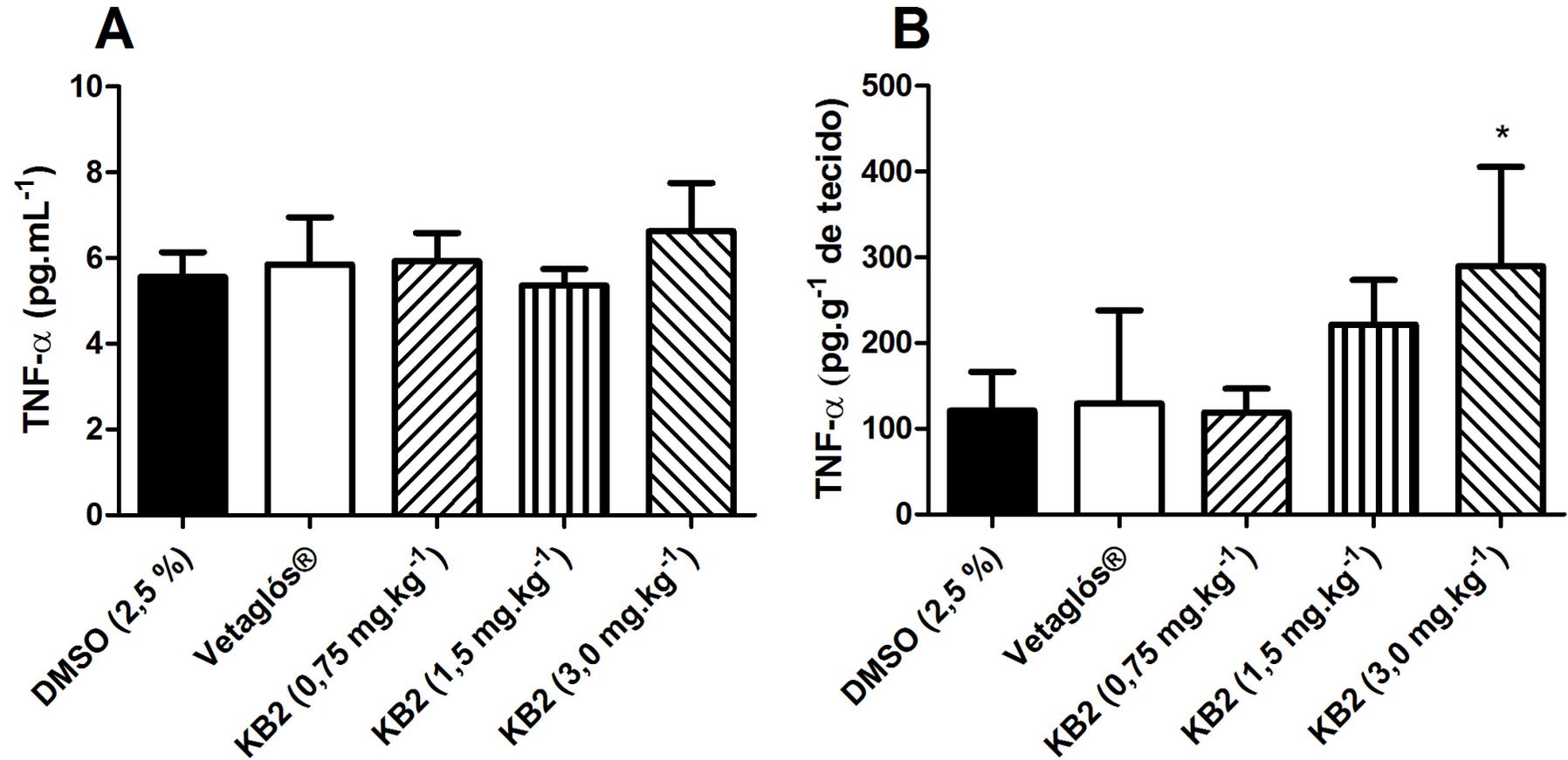


Figura 19. Efeitos do ciclotídeo KB2 sobre a secreção de TNF- α no soro e ferida de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus* ATCC25923. Animais tratados com KB2, (A) soro e (B) ferida. Os valores representam a média \pm DP e foram analisados pelo two-way ANOVA e teste de Tukey's, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle não infectado.



6 DISCUSSÃO

Com o rápido aumento na incidência de bactérias resistentes a múltiplas drogas e a descontinuidade na pesquisa de novas drogas pela indústria farmacêutica, a utilização de PAMs pode ser uma alternativa a essa terapêutica, já que os PAMs têm sido cada vez mais estudados, apresentando uma ampla atividade contra diversas bactérias, fungos e vírus. Os PAMs são mediadores multifuncionais da resposta imune inata, com atividade antimicrobiana direta e imunomoduladora. Dentre os PAMs, os ciclotídeos se destacam por serem pequenos peptídeos cíclicos que possuem seis resíduos de cisteína altamente conservado, que formam três ligações dissulfídicas interligadas, dando assim uma maior estabilidade à estrutura, quando comparado com PAMs lineares e apresentado uma grande variedade de atividades biológicas (IRELAND *et al.*, 2006a; HENRIQUES e CRAIK, 2010; PINTO *et al.*, 2012). Logo, a utilização de ciclotídeos no *design* de drogas poderia potencialmente contornar muitas das limitações hoje encontradas para a utilização de peptídeos como drogas, tais como a sensibilidade à degradação proteolítica (GUNASEKERA *et al.*, 2008; HENRIQUES e CRAIK, 2010; PINTO *et al.*, 2012).

No presente trabalho, com o objetivo de confirmar as atividades antibacterianas dos peptídeos, KB1, KB2 e CYO2, avaliamos a atividade desses ciclotídeos contra *S. aureus* ATCC25923. Dos peptídeos avaliados, CyO2 apresentou a melhor atividade antiestafilocócica *in vitro*. Embora KB2 e KB1 também tenham apresentado atividade antiestafilocócica, mas com o dobro ou o quádruplo, respectivamente, da concentração de CyO2.

Na literatura são encontrados outros trabalhos onde atividade de ciclotídeos *in vitro* contra *S. aureus* foram realizados. No trabalho de Tam *et al.* (1999), os pesquisadores observaram que os peptídeos kalata B1, circulina A, circulina B e ciclopsicotrídeo em um ensaio de difusão em disco, com meio de baixa densidade de sal, apresentaram CIMs de 0,26 μM , 0,19 μM , 13,5 μM e 39 μM respectivamente (TAM *et al.*, 1999), esses dados foram bastante diferentes dos encontrados em outros trabalhos. Ninguém até o presente momento foi capaz de repetir esses CIMs, de forma que não há explicação de como esses pesquisadores obtiveram esses dados.

Em outro estudo, realizado pela equipe de Pranting *et al.* (2010), os ciclotídeos CyO2, KB1, KB2, vaby A e D foram avaliados também quanto a sua

atividade frente a *S. aureus*, porém não apresentaram atividade contra essa bactéria quando a metodologia de difusão em disco foi realizada, mas quando utilizada a metodologia de microdiluição em caldo, esses mesmos ciclotídeos inibiram o crescimento de *S. aureus* apresentando os seguintes CIMs: CyO2 > 50 µM, KB1 > 100 µM, KB2 35 µM, vaby A e D > 90 µM (PRANTING *et al.*, 2010). Nesse caso os peptídeos apresentaram uma atividade antibacteriana similar a que se verificou neste trabalho, onde para KB1 os CIMs foram idênticos, para KB2 o CIM apresentado pelo trabalho de Pranting foi mais interessante e para CyO2, o CIM verificado neste trabalho foi melhor. Essa atividade contra microrganismos específicos, que no caso dos ciclotídeos pôde ser observada frente a *S. aureus*, já foi reportada na literatura para outros peptídeos antimicrobianos, como é o caso dos peptídeos ricos em cisteína e peptídeos com estrutura em folhas-β, tais como as defensinas (LEHRER *et al.*, 1991; PELEGRINI *et al.*, 2011).

Tendo em vista a confirmação da baixa atividade antiestafilocócica pelos ciclotídeos, o experimento subsequente visou identificar a ausência de interferências dos ciclotídeos sobre a viabilidade celular frente aos monócitos murinos RAW 264.7, além de verificar uma possível atividade antibacteriana indireta por estimulação do sistema imunológico. Dessa forma foi empregado o ensaio de viabilidade celular utilizando MTT com tempo de incubação máximo de 24 e 48 horas. Com relação à atividade citotóxica, verificou-se que apenas o ciclotídeo KB2 apresentou uma leve citotoxicidade com o aumento das doses (superior a 1,8 µM). Um relato similar a esse foi realizado no trabalho de Grundemann *et al.* (2012), onde o extrato das folhas de *O. affinis* e o ciclotídeo KB1 (1,8-14,0 µM) reduziram a proliferação de PBMCs e demonstraram que a partir da concentração de 1,8 até a concentração de 14 µM houve uma correlação dose dependente para diminuição da proliferação celular.

A capacidade dos ciclotídeos interagirem com membranas biológicas tem sido bem descrita na literatura, onde é observado que os ciclotídeos apresentam afinidade seletiva para membranas lipídicas. Todos os ciclotídeos testados até o presente têm a membrana celular como alvo, realizando interações com fosfolipídios que contêm grupos de fostatidiletanolamina. Além disso, a potência biológica dos ciclotídeos está amplamente correlacionada com a sua capacidade de atacar e romper as membranas celulares, sugerindo que eles sejam uma família de

peptídeos de ligação a lipídeos (HENRIQUES e CRAIK, 2012a; HENRIQUES *et al.*, 2012a).

Além de verificar que esses peptídeos não interferiram na viabilidade celular em baixas dose, o sobrenadante da cultura de células RAW 264.7 tratadas com essas amostras foi dosada para diversas citocinas (IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-12 e TNF- α) e para uma quimiocina (MCP-1), porém, devido a problemas durante a realização dos ELISAs, apenas as dosagens para TNF- α foram realizadas com sucesso. E o peptídeo CyO2 apresentou uma redução na secreção de TNF- α nas primeiras 6 horas de incubação e uma elevação desses níveis com 24 horas de incubação nas duas maiores concentrações.

Diante dessa possível atividade antibacteriana indireta apresentada pelo peptídeo CyO2 e nos outros dados expostos anteriormente, no presente estudo avaliamos a atividade antiestafilocócica *in vivo* utilizando um modelo de ferida cirúrgica infectada com *S. aureus* ATCC25923.

No contexto atual a problemática apresentada representa um número cada vez mais frequente de pacientes infectados em ambientes hospitalares, especialmente após procedimento cirúrgico juntamente com uma resistência microbiana crescente à utilização de antibióticos convencionais. Sendo assim, alternativas a esses antibióticos são extremamente necessárias. Vários agentes antimicrobianos estão disponíveis para a prevenção ou tratamento de feridas infectadas, tais como antimicrobianos de uso tópico que têm sido comumente utilizados no tratamento de feridas, para prevenção ou tratamento de infecção (MALMSTEN *et al.*, 2011).

Na literatura, os poucos ciclotídeos que tiveram seus testes estendidos para ensaios *in vivo*, foram utilizados para testes com atividade antitumoral, sendo este trabalho o primeiro a avaliar *in vivo* essas moléculas quanto à atividade antibacteriana. Burman *et al.* (2011) descreveu que o peptídeo CyO2 apresentou uma atividade dose dependente *in vitro* frente as linhagens tumorais humanas: (1) U-937 GTB de linfoma, com uma IC50 de 0,9 μM ; (2) CCRF-CEM de leucemia, com IC50 de 0,3 μM ; (3) NCI-H69 de câncer de pulmão, com IC50 de 1,2 μM ; (4) HT29 de carcinoma de colón, com IC50 5,3 μM . Porém, em testes *in vivo*, não foi observada a mesma capacidade de eliminação das células tumorais. Os animais tratados diariamente com uma dose de 0,5 mg.kg^{-1} não apresentaram nem atividade antitumoral, nem atividade tóxica, porém, aumentada a dose para 1,0 mg.kg^{-1} os animais apresentaram inflamação local. Esse experimento demonstrou que a ação

tóxica decorreu da alteração na concentração, já que ratos injetados com 2 mg.kg^{-1} apresentaram rápida letalidade, enquanto que ratos injetados com $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ não apresentaram nenhum sintoma (BURMAN *et al.*, 2011). Em razão desta toxicidade descrita por Burman e colaboradores (2011), decidimos trabalhar com um modelo local de infecção subcutânea.

Não há relatos de ciclotídeos testados com o modelo *in vivo* de infecção subcutânea. No presente trabalho, mostramos que o ciclotídeo CyO2 reduziu a carga bacteriana para 10^6 nas concentrações de 1,5 e 3,0 mg.kg^{-1} , enquanto o grupo tratado com PBS apresentou uma carga bacteriana de 10^8 . O ciclotídeo KB1 apresentou uma redução para 10^5 na concentração de 1,5 mg.kg^{-1} e para 10^7 na concentração de 3,0 mg.kg^{-1} , associa-se esse aumento na carga bacteriana com o aumento da concentração a uma possível toxicidade dessa amostra. O ciclotídeo KB2, apresentou uma redução da carga bacteriana para 10^6 em todas as concentrações testadas, enquanto o controle negativo apresentou uma carga bacteriana de 10^8 . É muito difícil atualmente comparar trabalhos que utilizam essa metodologia, já que cada grupo de pesquisa que utiliza essa metodologia apresenta variações muitas vezes significativas.

Um trabalho realizado com o peptídeo IDR 1018 demonstrou que esse peptídeo não apresentou atividade antibacteriana *in vivo* contra *S. aureus*, já que não houve alteração da carga bacteriana nos grupos tratados com a amostra, nem nos tratados com PBS. Inicialmente todas as feridas apresentaram aparência de inflamação, e a partir do dia 4 houve melhora na aparência das feridas tratadas com IDR 1018, porém, os pesquisadores demonstraram que esse peptídeo apresentou uma atividade de aceleração da cicatrização das feridas (STEINSTRAESSER *et al.*, 2012). Outro trabalho que mostra a atividade antibacteriana *in vivo* utilizando o modelo de ferida cirúrgica foi realizado utilizando o PAM coprisina (5 mg.kg^{-1}), que além de reduzir a carga bacteriana acelerou o processo de cicatrização da ferida. Nesse trabalho os pesquisadores associaram a atividade antibacteriana dessa molécula com a aceleração da cicatrização das feridas (LEE *et al.*, 2013). No nosso trabalho não foi possível verificar variação na cicatrização das feridas, por falta de tempo e amostra, já que as feridas que iriam ser utilizadas para verificar a atividade de cicatrização foram utilizadas para a recuperação da carga bacteriana.

Em outro estudo, o peptídeo PEP35 demonstrou que este peptídeo apresenta uma fraca atividade antimicrobiana *in vitro*, onde o MIC50 para diversas cepas de

isolados clínicos de *S. aureus* foi de 512 μM . Porém, este peptídeo apresenta atividade imunomodulatória e quando testado *in vivo* no modelo de ferida cirúrgica, utilizando 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi capaz de reduzir a carga bacteriana em aproximadamente $10^2 \text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido, acreditando-se ser o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção o responsável pela redução no número de microrganismos (LEE *et al.*, 2010). Nesse trabalho, o peptídeo utilizado apresenta atividade imunomodulatória e apresentou uma redução da carga bacteriana similar a nossa de $10^2 \text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido.

Outros dois trabalhos descrevem o uso de peptídeos em modelo de infecção de ferida similar ao utilizado em nosso trabalho. No primeiro trabalho os pesquisadores testaram o peptídeo epinecidina-1 (EPI-1) contra MRSA (10^6 CFU) e os tratamentos foram colocados sobre a ferida 5 min após a infecção e coberto após 30 min para evitar a retirada do material pelos animais. Nesse experimento, os animais tratados com metilicina, ou com o veículo morreram em menos de 7 dias, enquanto que os grupos tratados com EPI-1 ou EPI-1 mais colágeno, apresentaram uma sobrevivência até o final do experimento com uma redução da carga bacteriana de 10^6 para $\sim 20 \text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido. Além disso, os pesquisadores dosaram também IL-6, MCP-1 e TNF- α , e os tratamentos com EPI-1 e EPI-1 mais colágeno apresentaram uma redução dos níveis séricos dessas citocinas, quando comparadas com o controle (animais não infectados) (HUANG *et al.*, 2013b). No segundo trabalho, utilizando a mesma metodologia do estudo anteriormente citado, os pesquisadores utilizaram o peptídeo pardaxina (GE33) em um modelo de ferida cirúrgica infectada com *S. aureus* 10^6 CFU . Neste estudo verificou-se a redução da carga bacteriana para níveis próximos a zero. Além disso, o peptídeo GE33 foi capaz de gerar uma ação anti-inflamatória reduzindo os níveis séricos de TNF- α , IL-6 e MCP-1 (HUANG *et al.*, 2013a), de forma semelhante ao observado para o peptídeo EPI-1. Nesse caso, a carga bacteriana utilizada pelos pesquisadores e o tempo de início do tratamento foram menores do que a utilizada em nosso trabalho, de forma que isso pode facilitar a redução da carga bacteriana.

Outra forma interessante de realizar o tratamento de feridas subcutâneas é a utilização do peptídeo como pré-tratamento à ferida. O grupo do pesquisador Cirioni *et al.* (2013), demonstrou que a utilização do peptídeo IB-367 como pré-tratamento à infecção melhorou a atividade dos antibióticos convencionas. No tratamento apenas com os antibióticos, daptomicina ou teicoplanina, a carga bacteriana foi reduzida

apenas em 10^2 CFU.g⁻¹ de tecido, já com o pré-tratamento com IB-367, os antibióticos foram capazes de reduzir a carga bacteriana em 10^4 CFU.g⁻¹ de tecido.

Outro trabalho realizado por Vingsbo Lundberg e Frimodt-Moller (2013) demonstrou que a utilização de tratamento local de antibióticos apresentou um melhor resultado na redução da carga bacteriana do que o tratamento sistêmico.

As dosagens da secreção da citocina TNF- α nas amostras de soro e lavado da ferida realizados neste trabalho apresentaram diferenças significativas apenas para o grupo tratado com KB2 na maior concentração (3,0 mg.kg⁻¹). Os dois trabalhos realizados pelo grupo do pesquisador Huang (2013) fizeram a mensuração de citocinas, IL-6, TNF- α e MCP-1, e demonstraram que os dois peptídeos em estudo, EPI-1 e GE33, foram capazes de reduzir os níveis de secreção dessas citocinas comparados com um grupo não tratado (HUANG *et al.*, 2013a; HUANG *et al.*, 2013b). Lee *et al.* (2010) dosaram outras citocinas (CXCL1, CXCL2, CCL2 e IL-1 β) no experimento com o peptídeo PEP35, e descreveram que houve aumento da produção dessas citocinas, o que resultou em maior recrutamento de neutrófilos para o local da infecção. Vale ressaltar que são raros os trabalhos que utilizam o modelo de ferida cirúrgica para avaliar a atividade imunomoduladora, acreditamos que tal fato se deve aos baixos níveis de citocinas que são secretados neste local, o que torna difícil a mensuração por ELISA convencional.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram utilizados os ciclotídeos CyO2, KB1 e KB2, com o objetivo de caracterizar suas atividades citotóxica, imunomodulatória e antiestafilocócica *in vitro* e *in vivo* em um modelo cirúrgico de ferida cutânea com tratamento tópico. Os dados apresentados no decorrer do trabalho sugerem que:

- Os peptídeos não apresentaram atividade citotóxica para os monócitos RAW 264.7 nas concentrações testadas;
- Os ciclotídeos testados apresentaram atividade antiestafilocócica *in vitro*, variando de forte a moderada;
- Os ciclotídeos testados apresentaram atividade antiestafilocócica *in vivo*;
- As dosagens de TNF- α foram realizadas em todos os grupos, apresentando variação significativa apenas para as amostra de CyO2 no ensaio *in vitro* reduzindo os níveis de secreção dessa citocina, e KB2 no ensaio *in vivo*, onde este peptídeo induziu a um aumento na secreção de TNF local.

Em conclusão, os ciclotídeos CyO2, KB1 e KB2 podem constituir uma nova alternativa terapêutica para o tratamento local de infecções, sendo necessários mais estudos para avaliar a aplicabilidade destes PAMs.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592.
- AKOVA, M. Emerging problem pathogens: A review of resistance patterns over time. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. S3 - S8, 2006.
- ALBERICIO, F.; KRUGER, H. G. Therapeutic peptides. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 12, p. 1527-31, 2012.
- ALY, R. Microbial Infections of Skin and Nails. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th. Galveston (TX), 1996. ISBN 0963117211.
- AUFIERO, B.; GUO, M.; YOUNG, C.; DUANMU, Z.; TALWAR, H.; LEE, H. K.; MURAKAWA, G. J. Staphylococcus aureus induces the expression of tumor necrosis factor-alpha in primary human keratinocytes. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 7, p. 687-94, 2007.
- AYOUB, M.; SCHEIDEGGER, D. Peptide drugs, overcoming the challenges, a growing business. **Chemistry Today**, v. 24, n. 4, 2006.
- BARBETA, B. L.; MARSHALL, A. T.; GILLON, A. D.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 4, p. 1221-5, 2008.
- BATEMAN, A.; SINGH, A.; JOTHY, S.; FRASER, R.; ESCH, F.; SOLOMON, S. The levels and biologic action of the human neutrophil granule peptide HP-1 in lung tumors. **Peptides**, v. 13, n. 1, p. 133-9, 1992.
- BATISTA, T. F.; RODRIGUES, M. C. S. Vigilância de infecção de sítio cirúrgico pós-alta hospitalar em hospital de ensino do Distrito Federal, Brasil: estudo descritivo retrospectivo no período 2005-2010*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 2, p. 253-264, 2012.
- BENET, L. Z.; CUMMINS, C. L.; WU, C. Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, n. 1-2, p. 3-9, 2004.
- BOIX, E.; NOGUES, M. V. Mammalian antimicrobial proteins and peptides: overview on the RNase A superfamily members involved in innate host defence. **Molecular bioSystems**, v. 3, n. 5, p. 317-35, 2007.
- BOKESCH, H. R.; PANNELL, L. K.; COCHRAN, P. K.; SOWDER, R. C., 2ND; MCKEE, T. C.; BOYD, M. R. A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 2, p. 249-50, 2001.

BOUMA, G.; ANCLIFF, P. J.; THRASHER, A. J.; BURNS, S. O. Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. **British Journal of Haematology**, v. 151, n. 4, p. 312-26, 2010.

BRAFF, M. H.; ZAIYOU, M.; FIERER, J.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6771-81, 2005.

BURMAN, R.; HERRMANN, A.; TRAN, R.; KIVELA, J. E.; LOMIZE, A.; GULLBO, J.; GORANSSON, U. Cytotoxic potency of small macrocyclic knot proteins: structure-activity and mechanistic studies of native and chemically modified cyclotides. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 4306-14, 2011.

BURMAN, R.; SVEDLUND, E.; FELTH, J.; HASSAN, S.; HERRMANN, A.; CLARK, R. J.; CRAIK, D. J.; BOHLIN, L.; CLAESON, P.; GORANSSON, U.; GULLBO, J. Evaluation of toxicity and antitumor activity of cycloviolacin O2 in mice. **Biopolymers**, v. 94, n. 5, p. 626-34, 2010.

CAFLISCH, A.; WALCHLI, R.; EHRHARDT, C. Computer-Aided Design of Thrombin Inhibitors. **News Physiol Sci**, v. 13, p. 182-189, 1998.

CATÃO, R. M. R.; SILVA, P. M. D. F. E.; FEITOSA, R. J. P.; PIMENTEL, M. C.; PEREIRA, H. D. S. Prevalence of Hospital-Acquired infections caused by *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profile. **Jornal of Nursing**, v. 7, n. 8, 2013.

CAVALCANTI, S. M. D. M.; FRANÇA, E. R. D.; VILELA, M. A.; MONTENEGRO, F.; CABRAL, C.; MEDEIROS, Â. C. R. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 4, 2006.

CHEN, B.; COLGRAVE, M. L.; DALY, N. L.; ROSENGREN, K. J.; GUSTAFSON, K. R.; CRAIK, D. J. Isolation and characterization of novel cyclotides from *Viola hederaceae*: solution structure and anti-HIV activity of vhl-1, a leaf-specific expressed cyclotide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 23, p. 22395-405, 2005.

CIRIONI, O.; SILVESTRI, C.; PIERPAOLI, E.; BARUCCA, A.; KAMYSZ, W.; GHISELLI, R.; SCALISE, A.; BRESCINI, L.; CASTELLI, P.; ORLANDO, F.; KAMYSZ, E.; GUERRIERI, M.; GIACOMETTI, A.; PROVINCIALI, M. IB-367 pre-treatment improves the in vivo efficacy of teicoplanin and daptomycin in an animal model of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 10, p. 1552-8, 2013.

COLASITO, D. J.; KOFFLER, H.; TETRAULT, P. A.; REITZ, H. C. Antibiotic effects of circulin against certain gram-negative plant pathogens. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 77, n. 1, p. 107-8, 1951.

COLGRAVE, M. L.; HUANG, Y. H.; CRAIK, D. J.; KOTZE, A. C. Cyclotide interactions with the nematode external surface. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 2160-6, 2010.

COLGRAVE, M. L.; KOTZE, A. C.; HUANG, Y. H.; O'GRADY, J.; SIMONSEN, S. M.; CRAIK, D. J. Cyclotides: natural, circular plant peptides that possess significant activity against gastrointestinal nematode parasites of sheep. **Biochemistry**, v. 47, n. 20, p. 5581-9, 2008.

CRAIK, D. J. Circling the enemy: cyclic proteins in plant defence. **Trends in plant science**, v. 14, n. 6, p. 328-35, 2009.

CRAIK, D. J. Cybase: the database of cyclic proteins. 2013. Disponível em: < <http://www.cybase.org.au/> >. Acesso em: 23/12/2013.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; BOND, T.; WAINE, C. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of molecular biology**, v. 294, n. 5, p. 1327-36, 1999.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; MULVENNA, J.; PLAN, M. R.; TRABI, M. Discovery, structure and biological activities of the cyclotides. **Current protein & peptide science**, v. 5, n. 5, p. 297-315, 2004.

CRAIK, D. J.; MYLNE, J. S.; DALY, N. L. Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agriculture. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 67, n. 1, p. 9-16, 2010.

DALY, N. L.; CLARK, R. J.; CRAIK, D. J. Disulfide folding pathways of cystine knot proteins. Tying the knot within the circular backbone of the cyclotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 8, p. 6314-22, 2003.

DALY, N. L.; CLARK, R. J.; PLAN, M. R.; CRAIK, D. J. Kalata B8, a novel antiviral circular protein, exhibits conformational flexibility in the cystine knot motif. **The Biochemical journal**, v. 393, n. Pt 3, p. 619-26, 2006.

DESLOUCHES, B.; PHADKE, S. M.; LAZAREVIC, V.; CASCIO, M.; ISLAM, K.; MONTELARO, R. C.; MIETZNER, T. A. De novo generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 316-22, 2005.

DU, Y. New Approaches to Target Gram-Negative Bacteria. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1846-1847, 2010.

ECKMANN, C.; DRYDEN, M. Treatment of complicated skin and soft-tissue infections caused by resistant bacteria: value of linezolid, tigecycline, daptomycin and vancomycin. **European Journal of Medical Research**, v. 15, n. 12, p. 554-63, 2010.

ELSTON, D. M. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 1-16; quiz 17-20, 2007.

FOSTER, T. Staphylococcus. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th. Galveston (TX), 1996. ISBN 0963117211.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 12, p. 948-58, 2005.

FOURNIER, B.; PHILPOTT, D. J. Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 3, p. 521-40, 2005.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Curr Opin Chem Biol**, v. 12, n. 3, p. 306-17, 2008.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 479-91, 1998.

GERLACH, S. L.; BURMAN, R.; BOHLIN, L.; MONDAL, D.; GORANSSON, U. Isolation, characterization, and bioactivity of cyclotides from the Micronesian plant *Psychotria leptothyrsa*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 7, p. 1207-13, 2010a.

GERLACH, S. L.; RATHINAKUMAR, R.; CHAKRAVARTY, G.; GORANSSON, U.; WIMLEY, W. C.; DARWIN, S. P.; MONDAL, D. Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin 02 from *Viola odorata* and psyle cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*. **Biopolymers**, v. 94, n. 5, p. 617-25, 2010b.

GIRARDI, M. Cutaneous perspectives on adaptive immunity. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 33, n. 1-2, p. 4-14, 2007.

GOPAL, R.; SEO, C. H.; SONG, P. I.; PARK, Y. Effect of repetitive lysine-tryptophan motifs on the bactericidal activity of antimicrobial peptides. **Amino Acids**, v. 44, n. 2, p. 645-60, 2013.

GRAN, L.; SLETTEN, K.; SKJELDAL, L. Cyclic peptides from *Oldenlandia affinis* DC. Molecular and biological properties. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, n. 10, p. 2014-22, 2008.

GRUBER, C. W. Global cyclotide adventure: a journey dedicated to the discovery of circular peptides from flowering plants. **Biopolymers**, v. 94, n. 5, p. 565-72, 2010.

GRUBER, C. W.; CEMAZAR, M.; ANDERSON, M. A.; CRAIK, D. J. Insecticidal plant cyclotides and related cystine knot toxins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 4, p. 561-75, 2007.

GRUNDEMANN, C.; KOEHBACH, J.; HUBER, R.; GRUBER, C. W. Do plant cyclotides have potential as immunosuppressant peptides? **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 2, p. 167-74, 2012.

GRUNDEMANN, C.; THELL, K.; LENGEN, K.; GARCIA-KAUFER, M.; HUANG, Y. H.; HUBER, R.; CRAIK, D. J.; SCHABBAUER, G.; GRUBER, C. W. Cyclotides

Suppress Human T-Lymphocyte Proliferation by an Interleukin 2-Dependent Mechanism. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e68016, 2013.

GUNASEKERA, S.; FOLEY, F. M.; CLARK, R. J.; SANDO, L.; FABRI, L. J.; CRAIK, D. J.; DALY, N. L. Engineering stabilized vascular endothelial growth factor-A antagonists: synthesis, structural characterization, and bioactivity of grafted analogues of cyclotides. **J Med Chem**, v. 51, n. 24, p. 7697-704, 2008.

GUSTAFSON, K. R.; WALTON, L. K.; SOWDER, R. C., JR.; JOHNSON, D. G.; PANNELL, L. K.; CARDELLINA, J. H., JR.; BOYD, M. R. New circulin macrocyclic polypeptides from *Chassalia parvifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 2, p. 176-8, 2000.

HADLEY, E. B.; HANCOCK, R. E. Strategies for the discovery and advancement of novel cationic antimicrobial peptides. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 18, p. 1872-81, 2010.

HALLOCK, Y. F.; SOWDER, R. C., 2ND; PANNELL, L. K.; HUGHES, C. B.; JOHNSON, D. G.; GULAKOWSKI, R.; CARDELLINA, J. H., 2ND; BOYD, M. R. Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*. **The Journal of organic chemistry**, v. 65, n. 1, p. 124-8, 2000.

HAMMAMI, R.; BEN HAMIDA, J.; VERGOTEN, G.; FLISS, I. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D963-8, 2009.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 12, p. 1551-7, 2006.

HENRIQUES, S. T.; CRAIK, D. J. Cyclotides as templates in drug design. **Drug discovery today**, v. 15, n. 1-2, p. 57-64, 2010.

_____. Importance of the cell membrane on the mechanism of action of cyclotides. **ACS Chem Biol**, v. 7, n. 4, p. 626-36, 2012a.

_____. Importance of the cell membrane on the mechanism of action of cyclotides. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 626-36, 2012b.

HENRIQUES, S. T.; HUANG, Y. H.; CASTANHO, M. A.; BAGATOLLI, L. A.; SONZA, S.; TACHEDJIAN, G.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Phosphatidylethanolamine binding is a conserved feature of cyclotide-membrane interactions. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 40, p. 33629-43, 2012a.

_____. Phosphatidylethanolamine binding is a conserved feature of cyclotide-membrane interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 40, p. 33629-43, 2012b.

HERRMANN, A.; BURMAN, R.; MYLNE, J. S.; KARLSSON, G.; GULLBO, J.; CRAIK, D. J.; CLARK, R. J.; GORANSSON, U. The alpine violet, *Viola biflora*, is a rich

source of cyclotides with potent cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 939-52, 2008.

HERRMANN, A.; SVANGARD, E.; CLAESON, P.; GULLBO, J.; BOHLIN, L.; GORANSSON, U. Key role of glutamic acid for the cytotoxic activity of the cyclotide cycloviolacin O2. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 2, p. 235-45, 2006.

HIRSCHFELD, M.; KIRSCHNING, C. J.; SCHWANDNER, R.; WESCHE, H.; WEIS, J. H.; WOOTEN, R. M.; WEIS, J. J. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 5, p. 2382-6, 1999.

HOLTFRETER, S.; KOLATA, J.; BROKER, B. M. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* - The anti-*S. aureus* antibody response. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 2-3, p. 176-92, 2010.

HUANG, H. N.; PAN, C. Y.; CHAN, Y. L.; CHEN, J. Y.; WU, C. J. Use of the antimicrobial peptide pardaxin (GE33) to protect against MRSA infection in mice with skin injuries. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2013a.

HUANG, H. N.; RAJANBABU, V.; PAN, C. Y.; CHAN, Y. L.; WU, C. J.; CHEN, J. Y. Use of the antimicrobial peptide Epinecidin-1 to protect against MRSA infection in mice with skin injuries. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 10319-27, 2013b.

HUANG, Y. H.; COLGRAVE, M. L.; DALY, N. L.; KELESHIAN, A.; MARTINAC, B.; CRAIK, D. J. The biological activity of the prototypic cyclotide kalata b1 is modulated by the formation of multimeric pores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20699-707, 2009.

HWANG, J. H.; LEE, J. H.; MOON, M. K.; KIM, J. S.; WON, K. S.; LEE, C. S. The efficacy and safety of arbekacin and vancomycin for the treatment in skin and soft tissue MRSA infection: preliminary study. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 62-8, 2013.

IRELAND, D. C.; COLGRAVE, M. L.; CRAIK, D. J. A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability. **The Biochemical journal**, v. 400, n. 1, p. 1-12, 2006a.

IRELAND, D. C.; COLGRAVE, M. L.; NGUYENCONG, P.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Discovery and characterization of a linear cyclotide from *Viola odorata*: implications for the processing of circular proteins. **Journal of molecular biology**, v. 357, n. 5, p. 1522-35, 2006b.

IRELAND, D. C.; WANG, C. K.; WILSON, J. A.; GUSTAFSON, K. R.; CRAIK, D. J. Cyclotides as natural anti-HIV agents. **Biopolymers**, v. 90, n. 1, p. 51-60, 2008.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology** v. 20, p. 197-216, 2002.

JENNINGS, C.; WEST, J.; WAINE, C.; CRAIK, D.; ANDERSON, M. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10614-9, 2001.

JENNINGS, C. V.; ROSENGREN, K. J.; DALY, N. L.; PLAN, M.; STEVENS, J.; SCANLON, M. J.; WAINE, C.; NORMAN, D. G.; ANDERSON, M. A.; CRAIK, D. J. Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalata B2, a circular protein with a twist: do Mobius strips exist in nature? **Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 851-60, 2005.

KAMDAR, K.; NGUYEN, V.; DEPAOLO, R. W. Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 207-12, 2013.

KAMYSZ, W.; OKROJ, M.; LUKASIAK, J. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta biochimica Polonica**, v. 50, n. 2, p. 461-9, 2003.

KAPETANOVIC, R.; PARLATO, M.; FITTING, C.; QUESNIAUX, V.; CAVAILLON, J. M.; ADIB-CONQUY, M. Mechanisms of TNF induction by heat-killed *Staphylococcus aureus* differ upon the origin of mononuclear phagocytes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology** v. 300, n. 4, p. C850-9, 2011.

KELEMU, S.; CARDONA, C.; SEGURA, G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale**, v. 42, n. 11, p. 867-73, 2004.

KIM, M. H.; GRANICK, J. L.; KWOK, C.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L.; CURRY, F. R.; MILLER, L. S.; SIMON, S. I. Neutrophil survival and c-kit(+)-progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds promote resolution. **Blood**, v. 117, n. 12, p. 3343-52, 2011.

KRISHNA, S.; MILLER, L. S. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 261-80, 2012a.

_____. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 2, p. 261-80, 2012b.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 211-22, 2004.

LEE, J.; HAN, S. Y.; JI, A. R.; PARK, J. K.; HONG, I. H.; KI, M. R.; LEE, E. M.; KIM, A. Y.; LEE, E. J.; HWANG, J. S.; LEE, D. G.; JEONG, K. S. Antimicrobial effects of coprisin on wounds infected with *Staphylococcus aureus* in rats. **Wound Repair and Regeneration**, 2013.

LEE, J. C.; GREENWICH, J. L.; ZHANEL, G. G.; HAN, X.; CUMMING, A.; SAWARD, L.; MCLOUGHLIN, R. M. Modulation of the local neutrophil response by a novel

hyaluronic acid-binding peptide reduces bacterial burden during staphylococcal wound infection. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 10, p. 4176-86, 2010.

LEHRER, R. I.; ROSENMAN, M.; HARWIG, S. S.; JACKSON, R.; EISENHAUER, P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. **J Immunol Methods**, v. 137, n. 2, p. 167-73, 1991.

LICHTENFELS, E.; FRANKINI, A. D.; PALUDO, J.; D'AZEVEDO, P. A. Prevalência de resistência bacteriana nas infecções de ferida operatória causadas por estafilococos em cirurgia vascular periférica. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 54, n. 2, p. 141-146, 2010.

LINARES, J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7 Suppl 4, p. 8-15, 2001.

LINDHOLM, P.; GORANSSON, U.; JOHANSSON, S.; CLAESON, P.; GULLBO, J.; LARSSON, R.; BOHLIN, L.; BACKLUND, A. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 6, p. 365-9, 2002.

LIU, G. Y.; ESSEX, A.; BUCHANAN, J. T.; DATTA, V.; HOFFMAN, H. M.; BASTIAN, J. F.; FIERER, J.; NIZET, V. Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **J Exp Med**, v. 202, n. 2, p. 209-15, 2005.

LOFGREN, S. E.; MILETTI, L. C.; STEINDEL, M.; BACHERE, E.; BARRACCO, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental parasitology**, v. 118, n. 2, p. 197-202, 2008.

MALMSTEN, M.; KASETTY, G.; PASUPULETI, M.; ALENFALL, J.; SCHMIDTCHEN, A. Highly selective end-tagged antimicrobial peptides derived from PRELP. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16400, 2011.

MARTIN, M. A. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the persistent resistant nosocomial pathogen. **Current clinical topics in infectious diseases**, v. 14, p. 170-91, 1994.

MCCAIG, L. F.; MCDONALD, L. C.; MANDAL, S.; JERNIGAN, D. B. Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1715-23, 2006.

MILLER, L. S. Toll-like receptors in skin. **Advances in Dermatology**, v. 24, p. 71-87, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NESTLE, F. O.; DI MEGLIO, P.; QIN, J. Z.; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 679-91, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.

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. 464-72, 2011.

NICHOLS, R. L.; FLORMAN, S. Clinical presentations of soft-tissue infections and surgical site infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33 Suppl 2, p. S84-93, 2001.

O'DELL, M. L. Skin and wound infections: an overview. **American Family Physician**, v. 57, n. 10, p. 2424-32, 1998.

PARK, Y.; JANG, S. H.; LEE, D. G.; HAHM, K. S. Antinematodal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Caenorhabditis elegans*. **Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society**, v. 10, n. 5, p. 304-11, 2004.

PEASE, J. E.; HORUK, R. Small molecule antagonists of chemokine receptors--is promiscuity a virtue? **Curr Top Med Chem**, v. 10, n. 13, p. 1351-8, 2010.

PELEGRINI, P. B.; DEL SARTO, R. P.; SILVA, O. N.; FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SA, M. F. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. **Biochemistry Research International**, v. 2011, p. 250349, 2011.

PELEGRINI, P. B.; QUIRINO, B. F.; FRANCO, O. L. Plant cyclotides: an unusual class of defense compounds. **Peptides**, v. 28, n. 7, p. 1475-81, 2007.

PESCHEL, A.; SAHL, H. G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 529-36, 2006.

PINTO, M. F. S.; ALMEIDA, R. G.; PORTO, W. F.; FENSTERSEIFER, I. C. M.; LIMA, L. A.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Cyclotides: from Gene Structure to Promiscuous Multifunctionality. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 40-53, 2012.

PLAN, M. R.; SASKA, I.; CAGAUAN, A. G.; CRAIK, D. J. Backbone cyclised peptides from plants show molluscicidal activity against the rice pest *Pomacea canaliculata* (golden apple snail). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5237-41, 2008.

PRANTING, M.; LOOV, C.; BURMAN, R.; GORANSSON, U.; ANDERSSON, D. I. The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1964-71, 2010.

PRATES, M. V. B. J., C. Peptídeos Antimicrobianos: uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 30-36, 2000.

REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536-47, 2004.

REMONATTO, G.; CARDOSO, C. M.; MARQUES, C. G. D.; SILVA, A. E. B. D.; GELATTI, L. C.; LEITE, C. F. M. CA-MRSA: um patógeno emergente. **NewsLab**, v. 80, 2007.

ROCHA-DE-SOUZA, C. M.; BERENT-MAOZ, B.; MANKUTA, D.; MOSES, A. E.; LEVI-SCHAFFER, F. Human mast cell activation by *Staphylococcus aureus*: interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha release and the role of Toll-like receptor 2 and CD48 molecules. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 10, p. 4489-97, 2008.

ROOIJAKKERS, S. H.; VAN KESSEL, K. P.; VAN STRIJP, J. A. Staphylococcal innate immune evasion. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 12, p. 596-601, 2005.

ROSENFELD, Y.; SAHL, H. G.; SHAI, Y. Parameters involved in antimicrobial and endotoxin detoxification activities of antimicrobial peptides. **Biochemistry**, v. 47, n. 24, p. 6468-78, 2008.

ROSENGREN, K. J.; DALY, N. L.; PLAN, M. R.; WAINE, C.; CRAIK, D. J. Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotide framework. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8606-16, 2003.

RUSCONI, S.; SCOZZAFAVA, A.; MASTROLORENZO, A.; SUPURAN, C. T. An update in the development of HIV entry inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 13, p. 1273-89, 2007.

SAETHER, O.; CRAIK, D. J.; CAMPBELL, I. D.; SLETTEN, K.; JUUL, J.; NORMAN, D. G. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. **Biochemistry**, v. 34, n. 13, p. 4147-58, 1995.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 197-223, 2005a.

_____. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 197-223, 2005b.

SHENKAREV, Z. O.; NADEZHDIR, K. D.; LYUKMANOVA, E. N.; SOBOL, V. A.; SKJELDAL, L.; ARSENIIEV, A. S. Divalent cation coordination and mode of membrane interaction in cyclotides: NMR spatial structure of ternary complex Kalata B7/Mn²⁺/DPC micelle. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 5-6, p. 1246-56, 2008.

SHENKAREV, Z. O.; NADEZHIDIN, K. D.; SOBOL, V. A.; SOBOL, A. G.; SKJELDAL, L.; ARSENIIEV, A. S. Conformation and mode of membrane interaction in cyclotides. Spatial structure of kalata B1 bound to a dodecylphosphocholine micelle. **The FEBS journal**, v. 273, n. 12, p. 2658-72, 2006.

SILVA, O. N. **Avaliação do potencial terapêutico e estudo da atividade imunomodulatória e antimicrobiana in vitro e in vivo de diferentes formas de clavaninas**. 2011. (Mestrado). Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora

SIMONSEN, S. M.; SANDO, L.; IRELAND, D. C.; COLGRAVE, M. L.; BHARATHI, R.; GORANSSON, U.; CRAIK, D. J. A continent of plant defense peptide diversity: cyclotides in Australian Hybanthus (Violaceae). **The Plant cell**, v. 17, n. 11, p. 3176-89, 2005.

STEINSTRÄESSER, L.; HIRSCH, T.; SCHULTE, M.; KUECKELHAUS, M.; JACOBSEN, F.; MERSCH, E. A.; STRICKER, I.; AFACAN, N.; JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E.; KINDRACHUK, J. Innate defense regulator peptide 1018 in wound healing and wound infection. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e39373, 2012.

SUKUMAR, N.; DAS, S. Current trends in virtual high throughput screening using ligand-based and structure-based methods. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 14, n. 10, p. 872-88, 2011.

SVANGARD, E.; BURMAN, R.; GUNASEKERA, S.; LOVBORG, H.; GULLBO, J.; GORANSSON, U. Mechanism of action of cytotoxic cyclotides: cycloviolacin O2 disrupts lipid membranes. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 643-7, 2007.

TAM, J. P.; LU, Y. A.; YANG, J. L.; CHIU, K. W. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 16, p. 8913-8, 1999.

TEIXEIRA, F. R., LIMA, M.C.O., ALMEIDA, H.O., ROMEIRO, R.S., SILVA, D.J., PEREIRA, P.R.G., FONTES E.P.B., BARACAT-PEREIRA, M.C. Bioprospection of Cationic and Anionic Antimicrobial Peptides from Bell Pepper Leaves for Inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* Growth. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 418-421, 2006.

TEVYASHOVA, A. N.; OLSUFYEVA, E. N.; BALZARINI, J.; SHTIL, A. A.; DEZHENKOVA, L. G.; BUKHMAN, V. M.; ZBARSKY, V. B.; PREOBRAZHENSKAYA, M. N. Modification of the antibiotic olivomycin I at the 2'-keto group of the side chain. Novel derivatives, antitumor and topoisomerase I-poisoning activity. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 62, n. 1, p. 37-41, 2009.

TODD, J. K. Staphylococcal infections. **Pediatrics in Review**, v. 26, n. 12, p. 444-50, 2005.

TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; SCHEIL, V.; SCHWAIGER, J. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1405-16, 2007.

VINGSBO LUNDBERG, C.; FRIMODT-MOLLER, N. Efficacy of topical and systemic antibiotic treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine superficial skin wound infection model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 3, p. 272-5, 2013.

WU, W. J.; RALEIGH, D. P. Local control of peptide conformation: stabilization of cis proline peptide bonds by aromatic proline interactions. **Biopolymers**, v. 45, n. 5, p. 381-94, 1998.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. **Life sciences**, v. 70, n. 10, p. 1129-38, 2002.

YESHAK, M. Y.; BURMAN, R.; ASRES, K.; GORANSSON, U. Cyclotides from an extreme habitat: characterization of cyclic peptides from *Viola abyssinica* of the Ethiopian highlands. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 4, p. 727-31, 2011.

YIN, L. M.; EDWARDS, M. A.; LI, J.; YIP, C. M.; DEBER, C. M. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7738-45, 2012.

YOSHIO, H.; TOLLIN, M.; GUDMUNDSSON, G. H.; LAGERCRANTZ, H.; JORNVALL, H.; MARCHINI, G.; AGERBERTH, B. Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense. **Pediatric Research**, v. 53, n. 2, p. 211-6, 2003.

ZOMPRA, A. A.; GALANIS, A. S.; WERBITZKY, O.; ALBERICIO, F. Manufacturing peptides as active pharmaceutical ingredients. **Future Med Chem**, v. 1, n. 2, p. 361-77, 2009.