



Universidade de Brasília



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOLÍTICOS DE ANÁLOGOS DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

FABIANO JOSÉ QUEIROZ COSTA

BRASÍLIA-DF

2015

FABIANO JOSÉ QUEIROZ COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOLÍTICOS DE ANÁLOGOS DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Orientadora:
Profa. Dra. Mariana de Souza Castro.

BRASÍLIA
2015

FABIANO JOSÉ QUEIROZ COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOLÍTICOS DE ANÁLOGOS DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro, CFS/UnB
(Presidente)

Profa. Dra. Sônia Nair Bão, CEL/UnB

Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa, CEL/UnB

Dra. Betânia Ferraz Quirino, Embrapa Agroenergia

Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira, FM/UnB

Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes A. Santos, GEM/UnB
(Suplente)

APOIO FINANCEIRO

O projeto de tese de doutorado intitulado “Avaliação dos efeitos citolíticos de análogos de peptídeos antimicrobianos” desenvolvido por Fabiano José Queiroz Costa sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro tem o apoio financeiro do CNPq (processos nº 563972/2010-6, Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010, no. 302925/2012-0, Produtividade em Pesquisa - PQ – 2012 e no. 407801-2013, Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processo no. 193.000.461/2011, da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

DEDICATÓRIA

À minha mão amiga, meu braço forte, àquela
que esteve sempre ao meu lado,
compartilhando todos os momentos, mãe e
esposa dedicada, Sabrina, obrigado pela
força, incentivo e cumplicidade

Aos meus pequenos GRANDES FILHOS,
João Victor e Thiago, essenciais na minha
vida, e que souberam entender minha
ausência em certos momentos

Amo muito vocês

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por iluminar meus passos e permitir que mais um sonho se transformasse em meta, e que mais uma meta se realizasse em minha vida.
- Ao meu pai, minha proteção eterna, meu arrimo nos momentos não tão favoráveis.
- À minha mãe, pelo seu exemplo de vida e pessoa, por seu amor incondicional, pelo incentivo, pelas lições e conselhos que levarei para toda minha vida; aos meus irmãos, amigos do peito, elos de uma corrente que jamais se quebra.
- À minha orientadora, Prof^a. Dra. Mariana, pela liberdade e confiança com que me orientou do mestrado ao doutorado. Sabedora do ofício de ensinar e pesquisar, conduziu com inteligência, paciência e coerência este projeto, para que os resultados fossem alcançados com êxito. Agradeço imensamente a chance que você me deu, e a oportunidade de poder ter compartilhado de seus ensinamentos. Eternamente grato.
- A Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pela estrutura e parte dos subsídios indispensáveis à realização deste projeto.
- Aos meus amigos do LACEN-DF e HUB-UnB, pelo apoio e cooperação com minhas pesquisas.
- A todos os meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, pelo ambiente prazeroso que sempre foi proporcionado.
- Aos amigos do Laboratório de Toxinologia, Adolfo e Prof. Dr. Osmindo, pela constante disponibilidade e solicitude.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto as cheias se curvam para a terra, sua mãe.

Leonardo da Vinci

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	9
Figura 2. Modelo da parede celular das micobactérias..	10
Figura 3. Estrutura da parede celular de <i>Candida albicans</i>	11
Figura 4. Alvo dos PAMs nas membranas dos organismos celulares e base desta especificidade.....	13
Figura 5. Inter-relação entre os determinantes estruturais dos PAMs.....	16
Figura 6. Representação do modelo em <i>barrel-stave</i>	25
Figura 7. Representação do modelo do poro toroidal.....	27
Figura 8. Comparação entre os modelos <i>barrel-stave</i> e poro toroidal.....	27
Figura 9. Representação do modelo <i>carpet-like</i>	29
Figura 10. Modelo Shai–Matsuzaki–Huang	31

CONFIDENCIAL

Figura 14. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da mistura de análogos produzidos quimicamente.	51
Figura 15. Espectro de massas do análogo AH_1.....	52
Figura 16. Espectro de massas do análogo AH_2..	53
Figura 17. Porcentagem de hemólise de eritrócitos humanos (O ⁺) pelos análogos AH_1 e AH_2.	55
Figura 18. Análise por citometria de fluxo mostrando a contagem global dos leucócitos em sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos AH_1 e AH_2.	56
Figura 19. Análise por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de destruição dos leucócitos totais após exposição do sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos AH_1 e AH_2.	57

Figura 20. Análise por citometria de fluxo mostrando a porcentagem de destruição das diferentes linhagens de leucócitos pelo peptídeo AH_2 e AH_1.	58
Figura 21. Análise por citometria de fluxo mostrando a porcentagem de destruição das diferentes linhagens de leucócitos pelo peptídeo AH_2.	58
Figura 22. Análise por citometria de fluxo mostrando a porcentagem de destruição das diferentes linhagens de leucócitos pelo peptídeo AH_1.	59
Figura 23. Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos AH_2 e AH_1 na concentração de 64 µM no tempo T 0'	63
Figura 24. Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos AH_2 e AH_1 na concentração de 64 µM no tempo T 30'	64
Figura 25. Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos AH_2 e AH_1 na concentração de 64 µM no tempo T 120'	65
Figura 26. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> pelos peptídeos AH_2 e AH_1	67
Figura 27. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva <i>Enterococcus faecalis</i> pelos peptídeos AH_2 e AH_1	68
Figura 28. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa <i>Escherichia coli</i> pelos peptídeos AH_2 e AH_1	69
Figura 29. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i> pelos peptídeos AH_2 e AH_1	70
Figura 30. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa <i>Proteus mirabilis</i> pelos peptídeos AH_2 e AH_1	71
Figura 31. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelos peptídeos AH_2 e AH_1	72
Figura 32. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC pelos peptídeos AH_2 e AH_1	74
Figura 33. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente (MRSA) pelos peptídeos AH_2 e AH_1	75
Figura 34. Porcentagem de inibição do crescimento da levedura <i>Candida albicans</i> pelos peptídeos AH_2 e AH_1	77
Figura 35. Porcentagem de inibição do crescimento da levedura <i>Candida parapsilosis</i> pelos peptídeos AH_2 e AH_1	78

- Figura 36.** Porcentagem de inibição do crescimento da levedura *Candida krusei* pelos peptídeos AH_2 e AH_1.....**79**
- Figura 37.** Representação do ensaio de inibição do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv revelado com resazurina a 0,01%**82**
- Figura 38.** Esquema ilustrando as diferentes combinações de concentração entre o peptídeo AH_1 e a polimixina B em placa de microtitulação de 96 poços fundo chato, frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente**84**
- Figura 39.** Esquema ilustrando as diferentes combinações de concentração entre o peptídeo AH_2 e a polimixina B em placa de microtitulação de 96 poços fundo chato, frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente**84**
- Figura 40.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente pelos peptídeos AH_2 e AH_1 em concentrações variando de 128 a 0,0625 μ M.**85**
- Figura 41.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente pelo antimicrobiano polimixina B em concentrações variando de 128 a 0,0625 μ g/mL.**85**

Tabela 1. Valores de hidrofiliçidade dos 20 aminoácidos mais comumente encontrados nas proteínas.....	3
Tabela 2. Exemplos de PAMs e mecanismos pelos quais induzem seus efeitos deletérios.....	34
Tabela 3. Microrganismos e meios de cultura utilizados na determinação das CIMs	46
Tabela 4. Contagem global dos leucócitos em sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos após ação dos peptídeos AH_1 e AH_2	55
Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre bactérias Gram-positivas	68
Tabela 6. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre bactérias Gram-negativas.....	72
Tabela 7. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre microrganismos multirresistentes.....	76
Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre leveduras patogênicas.....	79
Tabela 9. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	82
Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	85
Tabela 11. Efeito sinérgico dos peptídeos AH_1 e AH_2 com polimixina B contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	86
Tabela 12. Perfil de sensibilidade da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR utilizada nos ensaios Checkerboard obtido em Vitek® 2 Compact bioMérieux.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CA-MRSA	<i>Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CL	Cardiolipina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
HA-MRSA	<i>Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
HC₅₀	Concentração capaz de promover 50% de hemólise
HCCA	α -ciano-4-hidroxicinâmico
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	<i>Multi-Drug Resistance</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
OADC	<i>Oleic Acid, Albumin, Dextrose, Catalase</i>
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PBP2a (PBP2')	<i>Penicillin-Binding Protein 2a</i>
PG	Fosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
RP-HPLC	<i>Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
RPM	Rotações por minuto
TFA	Ácido trifluoroacético
WBC	<i>White Blood Cell</i>
WIC	<i>WBC Impedance Count</i>
WOC	<i>WBC Optical Count</i>

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas	xi
Resumo	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	1
1.1.1 O interesse nos peptídeos antimicrobianos como potenciais antibióticos	4
1.2 O surgimento dos antibióticos e a evolução da resistência microbiana	4
1.3 O envoltório celular bacteriano	7
1.3.1 O envoltório celular das bactérias Gram-negativas	8
1.3.2 O envoltório celular das bactérias Gram-positivas.....	8
1.3.3 Parede celular das micobactérias	9
1.3.4 Parede celular das leveduras	10
1.4 Atividade antibacteriana dos peptídeos antimicrobianos	11
1.4.1 Mecanismos de resistência bacteriana frente aos PAMs.....	14
1.5 Parâmetros estruturais capazes de modular a atividade e a seletividade dos PAMs	15
1.5.1 Helicidade e anfipaticidade	16
1.5.2 Ângulo polar.....	18
1.5.3 Carga.....	19
1.5.4 Conformação	20
1.5.5 Hidrofobicidade	21
1.6 Especificidade de ação dos PAMs.....	22
1.7 Mecanismo de ação dos PAMs	23
1.7.1 Atividade membranotrópica dos PAMs	24
1.7.2 Modelo em <i>barrel-stave</i>	25
1.7.3 Modelo do poro toroidal	26
1.7.4 Modelo <i>carpet-like</i>	28
1.7.5 Modelo do agregado.....	29
1.7.6 Modelo Shai-Matsuzaki-Huang.....	30
1.8 Interações dos PAMs com alvos intracelulares	32
CONFIDENCIAL	
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	37

3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Metas experimentais.....	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Reagentes Químicos	38
CONFIDENCIAL		
4.3	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)	38
4.4	Espectrometria de massas	39
4.5	Ensaio hemolítico (Determinação da HC ₅₀)	39
4.6	Citometria de fluxo	40
4.6.1	Preparo do sangue total	40
4.6.2	Preparo das suspensões dos peptídeos AH ₁ e AH ₂ a 64 µM em sangue total.....	40
4.6.3	Preparo dos controles negativo e positivo	41
4.7	Ensaio antimicrobianos	41
4.7.1	Ensaio antibacterianos.....	41
4.7.2	Ensaio com leveduras.....	41
4.7.3	Ensaio com micobactérias	42
4.7.4	Ensaio Checkerboard	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Desenho racional, síntese química e purificação dos análogos de PAMs.....	47
5.2	Confirmação da homogeneidade das amostras por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF	52
5.3	Efeitos hemolíticos dos análogos AH ₁ e AH ₂	53
5.4	Efeitos citolíticos dos análogos AH ₁ e AH ₂ sobre leucócitos totais	55
5.5	Efeitos antimicrobianos dos análogos AH ₁ e AH ₂	66
5.5.1	Ensaio antibacterianos com cepas ATCC Gram-positivas.....	66
5.5.2	Ensaio antibacterianos com cepas ATCC Gram-negativas	68
5.5.3	Ensaio antibacterianos com cepas multirresistentes.....	72
5.5.3.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	73
5.5.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	74
5.5.4	Ensaio antimicrobianos com leveduras.....	76
5.5.5	Ensaio com micobactérias	79
5.6	Ensaio Checkerboard	82
6.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos, compostos encontrados em plantas, insetos e vertebrados, dentre outros, surgem como fortes candidatos na desafiadora busca por novas drogas capazes de combater a diversificada maquinaria bacteriana, principalmente pelo fato da maioria deles apresentarem um mecanismo de ação independente da interação com receptores. Nos últimos anos, o número de novos antimicrobianos licenciados para uso no homem tem sido bem menor que em um passado recente. As indústrias farmacêuticas e o governo não estão dispendendo recursos para a geração de novos antimicrobianos eficazes e seguros, deixando a população suscetível a infecções bacterianas multi-droga-resistentes (MDR), um fenômeno que tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública do século 21. O desenho racional e a síntese química permitem a produção de análogos de peptídeos antimicrobianos com atividade citotóxica diminuída e melhora na potência antimicrobiana, fornecendo drogas eficazes no combate a disseminação da resistência bacteriana. No presente estudo, foram sintetizados dois análogos de peptídeos antimicrobianos de anuros. Os dois análogos, denominados AH_1 e AH_2, foram produzidos por síntese química em fase sólida e purificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC). Seu grau de homogeneidade e pureza foram avaliados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Após confirmação da pureza, estes análogos foram utilizados em ensaios *in vitro* buscando avaliar suas atividades antibacteriana, fungicida, micobactericida e hemolítica. Os dois análogos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA), *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) e *Pseudomonas aeruginosa*. Também apresentaram atividade contra as espécies de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, além de atividade micobactericida contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. O efeito sinérgico entre estes análogos e a polimixina B foi avaliado através do ensaio *Checkerboard*. Uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente com CIM igual a 8 µg/mL para polimixina B, caracterizada como resistente de acordo com *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI 2014 foi utilizada neste ensaio. Os dois peptídeos AH_1 e AH_2 apresentaram ICIF < 0,5 demonstrando assim sinergismo de ação com a polimixina B. Houve uma redução da CIM inicial de 8 µg/mL quando a polimixina foi testada sozinha, para 0,0625 µg/mL e 0,25 µg/mL quando testada em combinação aos dois análogos AH_1 e AH_2, respectivamente. Nestas baixas concentrações ativas exibidas no ensaio *Checkerboard*, as atividades hemolíticas dos dois análogos foram desprezíveis. Tais resultados confirmam o potencial dos análogos AH_1 e AH_2 como agentes antimicrobianos de interesse para a indústria farmacêutica. O análogo AH_1, apesar de seu maior potencial hemolítico em altas concentrações, exibiu excelente atividade principalmente sobre bactérias gram negativas, responsáveis hoje por grande parte dos casos de infecções hospitalares.

PALAVRAS-CHAVE: anuros; peptídeos antimicrobianos; resistência bacteriana; síntese química

ABSTRACT

Antimicrobial peptides, compounds found in plants, insects and vertebrates, emerge as strong candidates in the challenging search for new drugs. They are able to combat the bacterial machinery, mainly because most of them present a mechanism of action independent of the interaction with receptors. In recent years, the number of new antimicrobial drugs licensed for human use has been smaller than in the recent past. The pharmaceutical industries and government are not expending resources for the generation of new effective and safe antimicrobial agents, leaving the population susceptible to multi-drug-resistant (MDR) bacterial infections, a phenomenon that has become one of the greatest public health problems of the 21st century. Rational design and chemical synthesis allow production of antimicrobial peptides analogues with reduced cytotoxic activity and improved antimicrobial potency, providing effective drugs in combating the spread of bacterial resistance. In this study, two analogues of anurans antimicrobial peptides were synthesized. Both analogues, named AH_1 and AH_2 were produced by chemical solid-phase synthesis and purified by high performance liquid chromatography on reversed-phase column (RP-HPLC). Their degree of homogeneity and purity were assessed by mass spectrometry analysis using MALDI-TOF. After confirming their purity, these analogs were tested *in vitro* to evaluate their antibacterial, fungicidal, mycobactericidal and hemolytic properties. The two analogues showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including multidrug resistant strains such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), and *Pseudomonas aeruginosa*. Also showed activity against species of *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*, in addition mycobactericidal activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. The synergistic effect between these analogs and polymyxin B was tested by checkerboard assay. A strain of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with MIC equal to 8 µg/mL for polymyxin B, characterized as resistant in accordance with breakpoints established by the CLSI 2014 was used in this test. Both AH_1 and AH_2 peptides presented ICIF <0.5 thus demonstrating synergistic action with polymyxin B. There was a reduction of the initial MIC of 8 µg/mL when the polymyxin was tested alone to 0.0625 µg/mL and 0.25 µg/mL when tested in combination to the two analogs AH_1 and AH_2, respectively. In this low active concentrations in Checkboard assay, both analogues showed negligible hemolytic activity. These results confirm the potential of the analogues AH_1 AH_2 as antimicrobial agents of interest to the pharmaceutical industry. Analog AH_1, despite its greater potential hemolytic in high concentrations, exhibited excellent activity mainly on gram-negative bacteria, responsible for many cases of nosocomial infections.

KEYWORDS: antimicrobial peptides; anurans; bacterial resistance; chemical synthesis

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são pequenas moléculas que constituem uma importante parte do sistema de imunidade inata de uma ampla gama de espécies de vertebrados e invertebrados, sendo dotadas de atividades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias e antivirais. Embora geralmente chamados de peptídeos antimicrobianos, estas moléculas são multifuncionais, visto que apresentam propriedades imunomoduladoras mediada por citocinas, atividade antitumoral e de liberação de insulina (Conlon & Mechkarska, 2014).

Os PAMs fazem parte de um grande grupo de moléculas amplamente disseminadas na natureza e produzidas em espécies dos reinos Monera (bactérias), Protista (protozoários e algas), Fungi (fungos e leveduras), Plantae (plantas) e Animalia (insetos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos). Em algumas espécies estes peptídeos servem como mecanismo de defesa antimicrobiana primário, já em outras eles participam como adjuvantes para os sistemas de imunidade inata e adaptativa (Maróti *et al.*, 2011).

O tegumento dos anfíbios é um órgão de múltiplas funções, estando envolvido tanto na proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmorregulação e termorregulação quanto na secreção de substâncias protetoras (Barra & Simmaco, 1995; Nascimento *et al.*, 2004). Quanto a essa última função, a pele dos anfíbios se destaca por apresentar uma fonte riquíssima de compostos bioativos, incluindo aminas biogênicas, alcaloides, bufodienolídeos, proteínas e peptídeos, com diversas funções biológicas. Dentre esses compostos, os peptídeos antimicrobianos têm apresentado cada vez mais destaque no cenário científico como uma alternativa no combate aos microrganismos patogênicos (Mangoni *et al.*, 2006; Pukala *et al.*, 2006; Azevedo Calderon *et al.*, 2011).

Os principais peptídeos antimicrobianos isolados da pele de anfíbios têm sido descritos como pertencentes às famílias *Alytidae*, *Bombinatoridae*, *Hylidae*, *Hyperoliidae*, *Leiopelmatidae*, *Leptodactylidae*, *Myobatrachidae*, *Pipidae* e *Ranidae*. Apesar de não serem necessários à sobrevivência das espécies, a produção de peptídeos citotóxicos na pele de alguns anfíbios pode conferir a eles vantagens evolutivas (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Conlon & Mechkarska, 2014).

Estudos já demonstraram que a secreção de peptídeos antimicrobianos aumenta quando os anfíbios sofrem exposição a microrganismos e patógenos. Acredita-se que estes peptídeos citolíticos sejam rapidamente degradados por enzimas presentes em suas secreções logo após terem exercido sua atividade tóxica sobre os microrganismos (Giovannini *et al.*, 1987; Nascimento *et al.*, 2004).

A Bombinina foi o primeiro peptídeo antimicrobiano descrito, descoberto em 1962, na pele de *Bombina variegata*. Porém naquela época esta descoberta não gerou tanta repercussão, assim como também o isolamento da melitina da peçonha de abelhas, as cecropinas da hemolinfa de pupas de *Hyalophora cecropia*, bem como as primeiras defensinas isoladas de macrófagos de pulmões de coelhos (Amiche; Galanth (2011). No entanto, a consolidação e intensificação dos estudos com peptídeos antimicrobianos se deu com as magaininas, peptídeos isolados da pele do anuro sul-africano *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987).

Em virtude da similaridade estrutural limitada, os peptídeos antimicrobianos podem ser agrupados em famílias que partilham uma origem evolutiva comum, porém a variação das sequências de aminoácidos de peptídeos homólogos é considerável, sendo raro que um peptídeo de uma espécie seja encontrado com uma sequência de aminoácidos idêntica em outra espécie. Há também uma ampla variação na potência e especificidade para diferentes microrganismos que pode ser importante na proteção dos organismos frente a uma diversificada gama de patógenos (Conlon *et al.*, 2007).

Mais de 7.400 espécies de anuros foram descritos em todo o mundo, numa ampla variedade de ambientes, com exceção dos pólos (Frost, 2015). A América do Sul, quando comparada aos outros continentes, é o local com o maior número de espécies de anuros do mundo em seus biomas, sendo o Brasil, a Colômbia e o Equador os países mais ricos em espécies de anuros neste continente (Azevedo Calderon *et al.*, 2011).

Centenas de peptídeos antimicrobianos foram isolados e caracterizados quanto aos seus efeitos citolíticos frente a diferentes tipos celulares, incluindo bactérias, fungos, protozoários e células tumorais (Bevins & Zasloff, 1990; Rinaldi, 2002; Nascimento *et al.*, 2004; Coccia *et al.*, 2011; Conlon, 2011). A rápida disseminação de microrganismos multirresistentes tem despertado o interesse crescente nestes peptídeos, como uma alternativa no combate a estes agentes (Jenssen *et al.*, 2006; Yeung *et al.*, 2011).

Os peptídeos antimicrobianos de anuros se caracterizam por apresentarem de

10 a 46 resíduos de aminoácidos e com raras exceções, são em sua maioria catiônicos, em virtude do excesso de resíduos de lisina, arginina e histidina em suas cadeias polipeptídicas (estes aminoácidos são carregados positivamente em pH neutro, conforme mostrado na Tabela 1), o que garante a eles uma carga líquida positiva variando de +2 a +6 em pH=7. Eles apresentam uma face hidrofóbica, que compreende as cadeias laterais de aminoácidos não-polares, e uma face hidrofílica de resíduos polares carregados positivamente, daí o fato de serem tratados como moléculas anfipáticas. Apesar de suas similaridades, estas moléculas apresentam variações consideráveis em seus comprimentos, na sua sequência de aminoácidos e na sua estrutura secundária (Hancock & Chapple, 1997; Conlon, 2011).

Tabela 1 – Valores de hidrofiliidade dos 20 aminoácidos mais comumente encontrados nas proteínas (Hopp & Woods, 1981).

Aminoácido	Valor de hidrofiliidade	Carga em pH 7,0
Arginina	3,0	Positiva
Ácido Aspártico	3,0	Negativa
Ácido Glutâmico	3,0	Negativa
Lisina	3,0	Positiva
Serina	3,0	Positiva
Asparagina	0,2	Neutra
Glutamina	0,2	Neutra
Glicina	0	Neutra
Prolina	0	Neutra
Treonina	- 0,4	Neutra
Alanina	- 0,5	Neutra
Histidina	- 0,5	Positiva
Cisteína	- 1,0	Neutra
Metionina	- 1,3	Neutra
Valina	- 1,5	Neutra
Isoleucina	- 1,8	Neutra
Leucina	- 1,8	Neutra
Tirosina	- 2,3	Neutra
Fenilalanina	- 2,5	Neutra
Triptofano	- 3,4	Neutra

1.1.1 O interesse nos peptídeos antimicrobianos como potenciais antibióticos

Devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, os peptídeos antimicrobianos passaram a ser considerados uma importante opção terapêutica no tratamento de infecções, principalmente aquelas causadas por microrganismos multirresistentes. As pesquisas com estes peptídeos são divididas em algumas grandes áreas, destacando-se três principais. Uma destas áreas se concentra em determinar o espectro de ação de peptídeos antimicrobianos naturais sobre bactérias, fungos e vírus, elucidando seus prováveis mecanismos de ação sobre membranas modelo, e avaliação de seus efeitos citotóxicos sobre células eucarióticas e hemácias. Uma segunda área de pesquisa está focada no papel que estes PAMs apresentam sobre a imunidade inata, a influência deles na indução de citocinas pró-inflamatórias e sua influência sobre os mecanismos da imunidade adaptativa (Feder *et al.*, 2000; Kohlgraf *et al.*, 2010).

Em uma outra área, pesquisas vêm sendo realizadas com peptídeos modificados, tais como PAMs congêneres, miméticos, híbridos, conjugados e imobilizados (Brogden, 2011).

A falta de um alvo celular específico é uma vantagem significativa dos PAMs, já que os peptídeos antimicrobianos com aminoácidos nas formas D e L apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus, tornando estes compostos uma grande promessa no desenvolvimento de novas opções farmacêuticas (Findlay *et al.* (2010).

1.2. O surgimento dos antibióticos e a evolução da resistência microbiana

Os antibióticos vêm sendo usados há várias décadas como importantes ferramentas no combate às doenças infecciosas, reduzindo a incidência destas, porém não a sua persistência. Uma das grandes descobertas nesta área se deu por volta do ano de 1929, no St. Mary's Hospital de Londres. Alexander Fleming notou a inibição no crescimento de culturas de *Staphylococcus aureus* por ação de um fungo do ar, que posteriormente seria identificado como *Penicillium notatum* (hoje *Penicillium chrysogenum*). Apesar da descoberta em 1929, a penicilina G ou benzilpenicilina foi utilizada terapêuticamente a partir de 1940, sendo industrializada a partir daí principalmente em virtude do sucesso de seu uso restrito e reservado às forças armadas durante a Segunda Guerra Mundial (Alanis, 2005).

O uso indiscriminado e até mesmo irracional destas drogas tem estimulado a evolução dos microrganismos no que diz respeito ao desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência adaptativos, em virtude de sua exposição aos antibióticos. Com a exposição quase constante frente aos antimicrobianos e sob os efeitos da pressão seletiva, aliada a transmissão genética dos mecanismos de resistência às novas gerações de microrganismos, assistimos ao surgimento de um cenário extremamente preocupante no que diz respeito às opções de drogas antimicrobianas disponíveis para o combate de agentes microbianos, principalmente aqueles com elevados perfis de resistência (Park *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2013).

O número limitado de classes de antimicrobianos, somado à ocorrência de resistência cruzada entre as diferentes classes tem deixado clara a necessidade e urgência de novas opções terapêuticas, apesar do claro abandono na busca por novos compostos pelas empresas farmacêuticas. No início dos anos 60 a necessidade de novos antibióticos passou a estar mais evidente com o surgimento de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA, pouco tempo após a introdução da metilina para tratar cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina. De líder em pesquisas terapêuticas, a pesquisa por novos antimicrobianos passou a ser uma área tratada como de baixa prioridade pela indústria farmacêutica. Este desinteresse da indústria farmacêutica na pesquisa de novos antimicrobianos está diretamente relacionado ao surgimento dos diversos mecanismos de resistência apresentados pelos microrganismos, que os tornam resistentes a uma grande variedade de classes de antimicrobianos. A indústria tem custos elevados com pesquisas, produção e publicidade e em pouco tempo pode assistir seu produto se tornar ineficaz frente a microrganismos capazes de apresentar resistência.

Mesmo frente a um cenário onde as doenças infecciosas, em especial as infecções bacterianas, se mantêm entre as principais causas de mortalidade no mundo, as pesquisas neste campo vêm diminuindo, pelas razões apresentadas acima, que incluem uma combinação de ciência, medicina, *marketing* e negócios. Esta perda de interesse na busca por novas opções de drogas antibacterianas, associada ao risco crescente de infecções causadas por patógenos multirresistentes, representa uma séria ameaça a saúde pública. Para se ter um dimensionamento deste grave

problema, basta avaliarmos o impacto financeiro deste risco para a Europa, o qual foi avaliado em aproximadamente 1,5 bilhões de euros. A gravidade desta ameaça é amplificada ao levarmos em conta a estagnação no campo da pesquisa de novos agentes antibióticos. Há uma clara possibilidade de que nenhum agente novo e ativo contra bactérias multirresistentes seja colocado no mercado em um futuro próximo. O século 20, tido como "o século dos antibióticos", foi marcado pela descoberta e desenvolvimento contínuo de novas drogas cada vez mais ativas, porém nenhuma nova família tornou-se disponível aos clínicos desde os lipopeptídeos em 1987 (Alanis, 2005; Barret & Overbye 2005; Nordmann, 2013).

Somando-se ao fato dos microrganismos multirresistentes causarem graves infecções hospitalares e de difícil tratamento, comprometendo a cura e recuperação dos pacientes hospitalizados, assistimos casos onde essas bactérias têm se disseminado por populações de comunidades, afetando pessoas aparentemente saudáveis e ocasionando graves problemas de saúde. Um destes exemplos diz respeito ao *Staphylococcus aureus* Ca-MRSA, cepas isoladas de pacientes da comunidade e que aparecem cada vez mais implicadas em infecções nosocomiais, e segundo modelos matemáticos acabarão por substituir as cepas tradicionais HA-MRSA nos serviços de saúde (Mediavilla *et al.*, 2012). Um dos grandes problemas atuais relacionado à falta de opções terapêuticas é o surgimento de cepas bacterianas produtoras de enzimas KPC, capazes de hidrolizar antibióticos carbapenêmicos e conferir resistência a um amplo espectro de antibióticos (Hirsch & Tam, 2010).

Outro grande problema neste campo atualmente é o surgimento de cepas de bactérias Gram-negativas produtoras de metalo- β -lactamases, novas carbapenemases que também garantem resistência aos carbapenêmicos, drogas tidas como últimas opções terapêuticas contra microrganismos multirresistentes. Os carbapenêmicos foram os últimos β -lactâmicos com boa atividade sobre Gram-negativos de maneira quase universal, mas carbapenemases se espalharam e conferiram resistência a estas drogas. As enzimas Nova Deli metalo- β -lactamases (NDM) são as últimas carbapenemases a serem reconhecidas e desde 2008 têm sido relatadas em todo o mundo, principalmente em bactérias de pacientes epidemiologicamente ligados ao subcontinente indiano, onde ocorrem amplamente

em infecções hospitalares e comunitárias, e também em água urbana contaminada. As bactérias com NDM-1 são tipicamente resistentes a quase todos os antibióticos, portanto a detecção e vigilância de confiança são cruciais (Nordmann *et al.*, 2011).

Em 2007, a OMS reconheceu a importância da situação e a elevação nos índices de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidroga resistentes (MDR) e extensivamente resistente aos tuberculostáticos (XDR). Entre os 8,8 milhões de casos incidentes de tuberculose (TB), estima-se que 3,6% são causados MDR-TB por ano no mundo, e entre os 12 milhões de casos de TB prevalentes do mundo, acredita-se que 650 mil sejam devido a cepas MDR-T, e que cerca de 5,4% dos casos de MDR-TB estejam associados a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* XDR-TB, o que impulsiona a necessidade da busca por novas opções terapêuticas (Linde *et al.*, 2001; Sethi *et al.*, 2013).

Apesar de novos tipos de antibióticos eficazes contra bactérias gram-positivas multirresistentes como *Staphylococcus aureus* MRSA estarem sendo introduzidos ou em fase de ensaios clínicos, a situação encontra-se bem mais complicada no que diz respeito aos patógenos Gram-negativos multirresistentes como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Stenotrophomonas maltophilia*. Há necessidade urgente de novos agentes antimicrobianos com atividade contra estes microorganismos, e que também apresentem bons perfis farmacocinéticos e toxicológicos (Conlon & Mechkarska, 2014).

1.3. O envoltório celular bacteriano

A compreensão dos efeitos dos peptídeos antimicrobianos catiônicos sobre as membranas bacterianas exige o conhecimento da estrutura destas membranas. O envoltório celular das bactérias é bastante complexo e tem papel importante na proteção e adaptação destes microrganismos no meio. Um dos grandes desafios nas últimas décadas tem sido estudar esta complexa estrutura e os mecanismos pelos quais ela permite que as bactérias se adaptem até mesmo a condições não propícias como nos casos de exposição aos antibióticos.

As bactérias gram-negativas são envolvidas por uma fina parede celular de peptidoglicano, que por sua vez é cercada por uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos. As bactérias Gram-positivas não possuem uma membrana externa, mas são envolvidas por camadas de peptidoglicano muitas vezes mais espessas do que aquela encontrada nas bactérias Gram-negativas. Em meio a estas

camadas de peptidoglicano há longos polímeros aniônicos chamados ácidos teicóicos e lipoteicóicos. A figura 1 representa as principais diferenças existentes entre as membranas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Silhavy *et al.*, 2010).

1.3.1 Parede celular das bactérias Gram-negativas

Há três constituintes principais presentes no envoltório das bactérias Gram-negativas: a membrana externa, a parede celular de peptidoglicano e a membrana interna ou citoplasmática. Partindo de fora para dentro da bactéria, a primeira camada encontrada é a membrana externa, uma característica distintiva das bactérias Gram-negativas, ausente em bactérias Gram-positivas. Como em outras membranas biológicas, a membrana externa é uma bicamada lipídica, porém não é uma bicamada fosfolipídica. Ela contém fosfolípidos, mas eles estão confinados na camada interna desta membrana. A camada externa da membrana externa é composta de glicolípidos, principalmente lipopolissacarídeos (LPS), que são responsáveis pelo choque séptico causado pelas bactérias Gram-negativas. A parede celular destas bactérias apresenta uma fina camada de peptidoglicano, que é uma macromolécula rica em ligações cruzadas que circunda a membrana celular bacteriana conferindo-a rigidez. É composto por unidades repetidas do ácido dissacarídico N-acetilglicosamina-N-acetil-murâmico, com cadeias laterais de peptídeos contendo aminoácidos D- e L- e, às vezes, ácido diaminopimélico. As cadeias laterais fazem ligações cruzadas por pontes peptídicas. A membrana interna destas bactérias é uma bicamada fosfolipídica, cujos fosfolípidos principais são fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol (Silhavy *et al.*, 2010).

1.3.2 Parede celular das bactérias Gram-positivas

O envoltório celular das bactérias Gram-positivas difere em vários aspectos daquele visto nas bactérias Gram-negativas. Em primeiro lugar, a membrana externa está ausente nas bactérias Gram-positivas. A membrana externa fornece uma proteção à membrana interna nas bactérias gram-negativas, visto que elas têm uma fina camada de peptidoglicano. Diferentemente disto, as bactérias Gram-positivas não apresentam membrana externa, compensando esta ausência com uma parede espessa de peptidoglicano. Em meio a esta camada de peptidoglicano estão presentes os polímeros aniônicos ácido teicóico e lipoteicóico (Silhavy *et al.*, 2010).

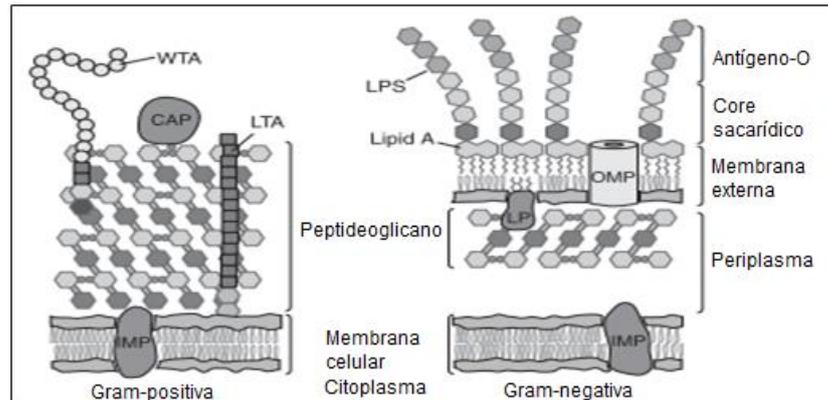


Figura 1 – Representação da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: CAP = proteínas ligadas covalentemente; IMP = proteínas de membrana íntegra; LP = lipoproteínas; LPS = lipopolissacarídeos; LTA = ácidos lipoteicóicos; OMP = proteína de membrana externa; WTA = ácidos teicóicos de parede (Retirado de Silhavy *et al.*, 2010).

1.3.3 Parede celular das micobactérias

A parede celular das micobactérias, como por exemplo aquelas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, são essenciais para o crescimento e sobrevivência destes microrganismos nos hospedeiros infectados. Uma característica chave na parede destas micobactérias, que vem contribuindo para o surgimento de patógenos micobacterianos multirresistentes, é a estrutura não usual e que garante uma baixa permeabilidade à parede celular destes agentes infecciosos. Esta membrana contém características únicas que podem se constituir em importantes alvos para novos antibióticos tais como o pequeno tamanho das micobactérias quando relacionado às outras bactérias, sua hidrofobicidade e álcool-ácido resistência na coloração. A parede celular das micobactérias é composta de três macromoléculas ligadas covalentemente, que são o peptidoglicano, arabinogalactano e os ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são os principais determinantes da invulnerabilidade da parede celular de micobactérias (Chatterjee, 1997).

Conforme visto na figura 2, a parede celular das micobactérias é composta de dois segmentos, um superior e um inferior. Além da membrana está o peptidoglicano, ligado covalentemente ao arabinogalactano, que por sua vez se apresenta ligado aos ácidos micólicos. O segmento superior é composto de lipídeos livres, alguns com longos ácidos graxos complementando as curtas cadeias α , e alguns com curtos ácidos graxos complementando as longas cadeias. Quando as paredes celulares são rompidas, os lipídeos livres, proteínas e o complexo peptidoglicano-arabinogalactano permanecem como resíduos insolúveis, atuando assim como moléculas efetoras no

processo da doença, o passo que o núcleo insolúvel é essencial para a viabilidade da célula e deve ser abordado no contexto do desenvolvimento de novos medicamentos (Chatterjee, 1997).

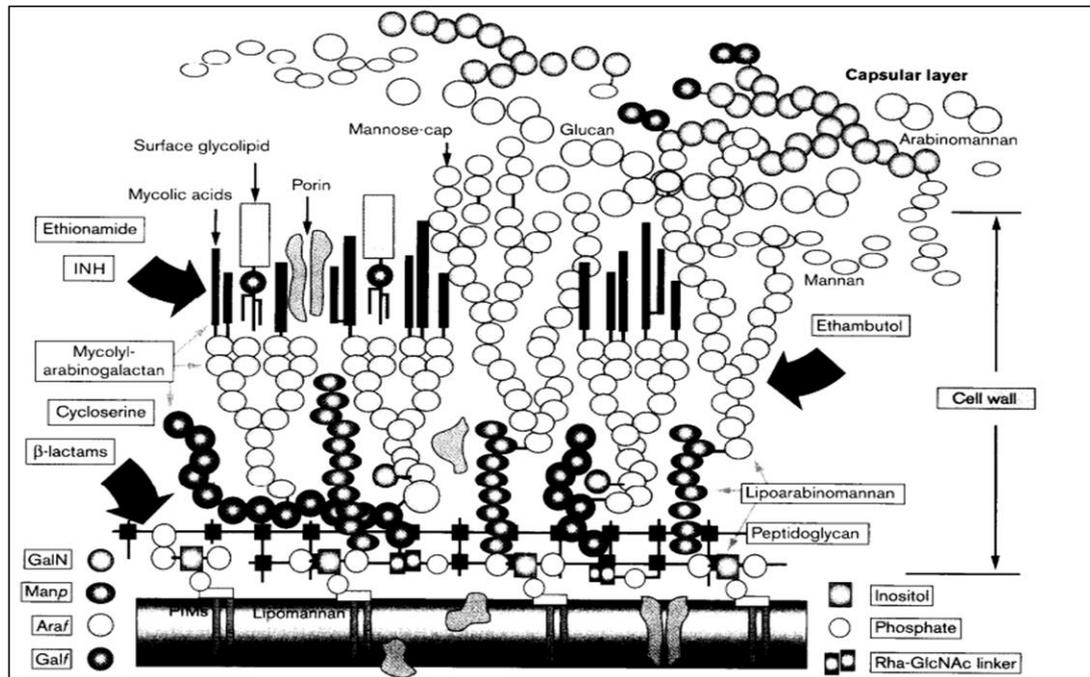


Figura 2– Modelo da parede celular das micobactérias. Os arranjos tridimensionais e espaciais das moléculas-chave são em grande parte desconhecidos. Acredita-se que a maioria das paredes celulares micobacterianas seguem este modelo, em que o peptideoglicano mycolylarabinogalactano (mAGP) e lipoarabinomanano (LAM) são os dois componentes principais. Uma substância rica em polissacarídeos semelhante a uma cápsula circunda o bacilo. Os locais de ação de algumas drogas antimicobacterianas estão representados (seta escura) no modelo (Retirado de Chatterjee, 1997).

1.3.4 Parede celular das leveduras

A parede celular das leveduras apresenta seus componentes divididos em duas camadas: uma externa, rica em glicoproteínas, e uma camada interna, que apresenta uma estrutura esquelética de polissacarídeos. A figura 3 representa a estrutura da parede celular da *Candida albicans*. Para se tornar uma parede forte, com elevada plasticidade, as paredes fúngicas combinam componentes da estrutura esquelética e da matriz, que se assemelha a princípios de engenharia, garantindo a formação de um emaranhado estrutural capaz de gerar grande resistência a parede.

O componente esquelético da parede celular dos principais fungos patogênicos, dentre eles a *Candida albicans*, é um núcleo de β - (1,3) -glucano ligado covalentemente a β - (1,6) – glucano e quitina (um polímero β - (1,4) ligadas de N-acetilglicosamina (GlcNAc) (Netea *et al.*, 2008)

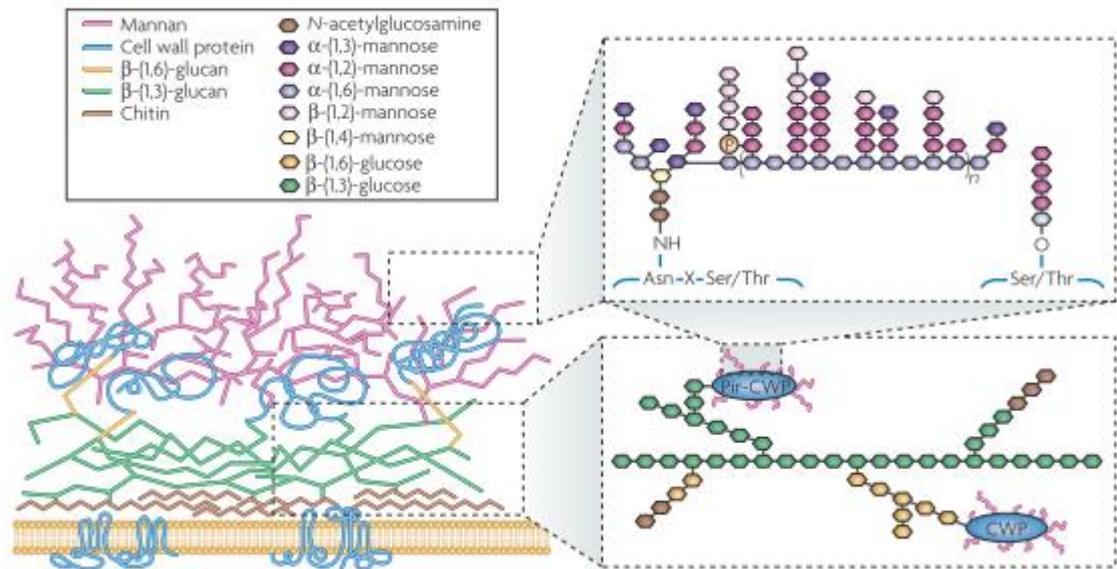


Figura 3. Estrutura da parede celular de *Candida albicans*. A figura mostra os principais componentes da parede celular e suas distribuições. β -(1,3)-glucano e quitina (poli- β -(1,4)-N-acetilglicosamina) são os principais componentes estruturais. A camada externa é rica em proteínas de parede celular presas ao esqueleto principalmente via glicosilfosfatidilinositol para β -(1,6)-glucano, ou para manoproteínas com domínios internos repetidos, via ligações alcali-sensíveis para β -(1,3)-glucano. As inserções mostram a estrutura do glucano e os componentes de manana (Retirado de NETEA. *et al.*(2008).

1.4. Atividade antibacteriana dos PAMs

Inicialmente foi proposto que a permeabilização das membranas bacterianas seria o único modo de ação dos PAMs. No entanto, evidências mostraram que alguns peptídeos antimicrobianos exercem seus efeitos através de modos alternativos de ação, podendo agir sobre múltiplos alvos de células bacterianas. Independentemente do seu modo preciso de ação, as atividades dos peptídeos antibacterianos são quase universalmente dependentes de sua interação com a membrana celular bacteriana (Jenssen *et al.*, 2006).

A capacidade de lisar membranas está diretamente associada ao seu amplo espectro de atividade sobre determinados microrganismos, tais como bactérias, fungos e protozoários (Prates *et al.*, 2004; Mangoni *et al.*, 2006).

Por meio de análises de dicroísmo circular e RMN, foi demonstrado que os PAMs não apresentam elementos de estrutura secundária quando em ambientes aquosos, porém na presença de solventes que mimetizam o ambiente da membrana celular, como trifluoretanol 50%, ou em contato com vesículas de fosfolípidos, tais peptídeos assumem conformação em α -hélice anfipática (Tossi *et al.*, 2000; Castro *et*

al., 2009).

Estudos já mostraram que peptídeos como magainina 2 e cecropina A, por exemplo, inseriram-se prontamente em monocamadas, em grandes vesículas unilamelares e lipossomas contendo fosfolipídeos. No entanto, as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas são bem mais complexas que os modelos de membrana propostos (Brogden, 2005).

O primeiro passo na interação do peptídeo antimicrobiano catiônico com a célula alvo é a atração eletrostática entre o peptídeo e os componentes carregados negativamente presentes na parede celular das bactérias, tais como grupos fosfato presentes no interior dos lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas, e os ácidos teicóicos e lipoteicóicos presentes na superfícies das bactérias Gram-positivas, levando à formação de poros nas membranas das bactérias com posterior extravasamento de material genético e subsequentemente a morte bacteriana (Hancock & Chapple, 1999; Jenssen *et al.*, 2006).

Deve ser salientado que a principal barreira de permeabilidade em uma membrana é a bicamada lipídica. Algumas bactérias constroem uma estrutura adicional, que envolve a célula do lado de fora da membrana citoplasmática, ao que chamamos membrana externa. Isto acontece com as bactérias gram-negativas, tais como *Escherichia coli*, que são protegidas por esta membrana externa que funciona como uma efetiva barreira (Cohen, 2011).

Os fosfolipídeos que compõem a membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas são carregados negativamente. A superfície externa destas bactérias Gram-negativas ainda contém os lipopolissacarídeos, que somados à presença dos fosfolipídeos garantem às bactérias gram-negativas uma superfície com carga líquida negativa. Ainda em relação às bactérias Gram-negativas, os peptídeos antimicrobianos catiônicos deslocam os íons magnésio e cálcio ali presentes, deslocamento este favorecido pelo fato destes peptídeos possuírem uma afinidade três vezes maior pelos lipopolissacarídeos que os íons magnésio. Estes íons auxiliam na manutenção da estrutura das moléculas de lipopolissacarídeos (LPS). Já as bactérias gram-positivas têm uma parede celular espessa de peptideoglicano e rica em ácidos teicóicos e lipoteicóicos, conferindo a estas bactérias uma carga líquida negativa em seu revestimento, facilitando desta maneira a interação com os PAMs (Zhang *et al.*, 2000).

Pelo exposto na figura 4, observa-se que os peptídeos antimicrobianos

catiônicos têm como alvo uma clara diferença existente entre as membranas de microrganismos e de animais multicelulares, melhor visualizado e mais bem compreendido quando observamos os alvos nas membranas bacterianas.

Como visto anteriormente, as membranas bacterianas são organizadas de maneira que sua superfície apresenta uma carga líquida negativa, o que facilita a atração pelos peptídeos antimicrobianos catiônicos. Por outro lado, o revestimento externo das membranas de plantas e animais é composto principalmente de lipídeos sem carga líquida. A maioria dos lipídeos com cabeças de grupo carregadas negativamente estão segregados no folheto interno, voltados para o citoplasma (Zasloff, 2002).

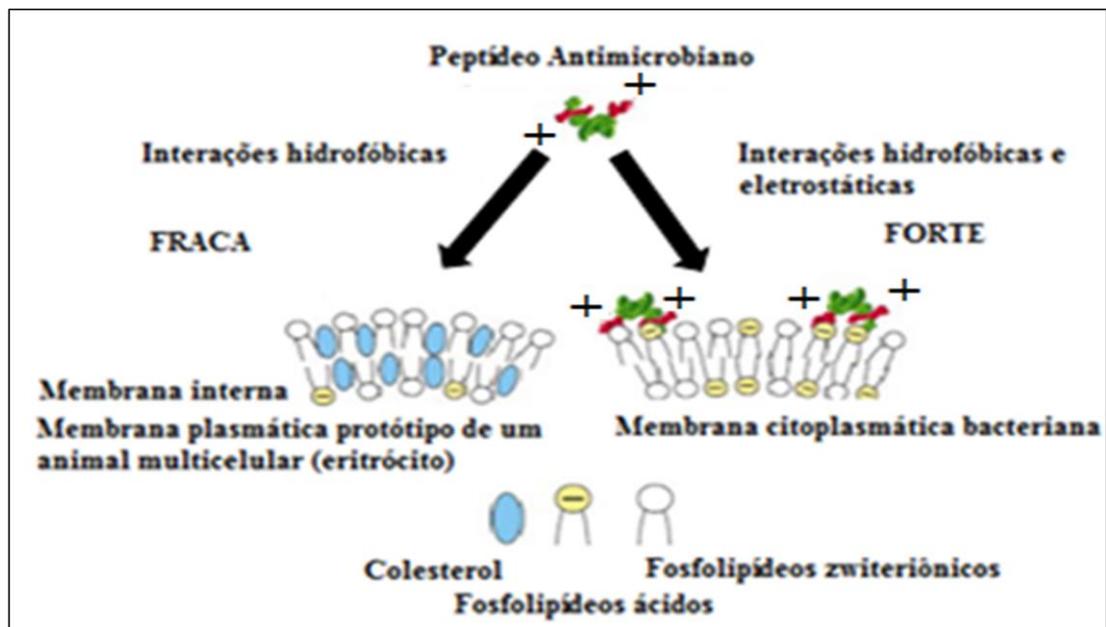


Figura 4 – Alvos dos peptídeos antimicrobianos nas membranas dos organismos multicelulares e base desta especificidade (Retirado de Zasloff (2002)).

A camada externa das células normais de mamíferos é composta predominantemente de fosfolípidos “zwitteriônicos”, tais como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline, o que torna mais fraca a interação dos PAMs com estes tipos de membrana (Bevins & Zasloff, 1990; Zasloff, 2002).

As interações hidrofóbicas entre a face hidrofóbica de um peptídeo anfipático e os fosfolípidos “zwitteriônicos” na superfície celular têm um importante papel na interação dos PAMs com as membranas celulares de células de mamíferos, visto que peptídeos hemolíticos exibem uma forte interação com a fosfatidilcolina, enquanto peptídeos não hemolíticos não apresentam esta forte interação (Dathe *et al.*, 1996; Matsuzaki, 2009).

1.4.1 Mecanismos de resistência bacteriana frente aos PAMs

Alguns microrganismos desenvolvem mecanismos de resistência para impedirem a inserção na membrana e os efeitos dos peptídeos antimicrobianos catiônicos, que poderia levar à formação de poros com o extravasamento de material genético e morte celular. Em um destes mecanismos, os microrganismos passam a apresentar uma membrana aniônica menos carregada negativamente, diminuindo assim a atração eletrostática inicial pelos PAMs. (Brogden, 2005).

Cepas de *Staphylococcus aureus*, também em busca de resistência aos efeitos dos PAMs, reduzem a carga líquida negativa de sua parede celular transportando o aminoácido D-Alanina do citoplasma para a superfície rica em ácido teicóico. Este ácido é altamente carregado em grupos fosfato desprotonizados, e a esterificação com D-Alanina causa uma redução na carga líquida negativa em virtude da adição de grupamentos amino básicos (Brogden, 2005).

Bactérias Gram-negativas também apresentam mecanismos pelos quais se tornam resistentes aos efeitos dos PAMs. A presença de cápsula polissacarídica mostrou reduzir a sensibilidade em cepas de *Klebsiella pneumoniae* frente a lactoferrina, sulfato de protamina e polimixina B. Mutantes desta bactéria desprovidos de cápsula se mostraram mais suscetíveis a ação dos PAMs. A cápsula polissacarídica limita a interação dos PAMs com os componentes carregados negativamente da parede das bactérias Gram-negativas. Algumas bactérias, como por exemplo *Burkholderia cepacia* e *Serratia marcescens* podem se apresentar resistentes aos peptídeos antimicrobianos catiônicos em virtude de uma membrana externa não interativa e também devido à produção de proteases específicas, respectivamente (Hancock & Chapple, 1997; Brogden, 2005).

Há também casos de bactérias Gram-negativas, como *Yersinia enterocolitica*, que promovem alterações em suas proteínas de membrana externa, aumentando desta maneira a resistência aos PAMs. Esta resistência foi atribuída à presença de um plasmídeo de 70-kb, denominado pYVe, que codificou adesinas A e lipoproteínas A em *Y. enterocolitica* (Visser *et al.*, 1996).

A presença de enzimas proteolíticas capazes de degradarem os peptídeos antimicrobianos também podem levar resistência a eles, tal como visto em cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de uma metaloprotease chamada aureolysina (Visser *et al.*, 1996).

A grande maioria das cepas de *Proteus mirabilis* liberam enzimas proteolíticas

capazes de degradarem rapidamente os peptídeos antimicrobianos. Em um estudo onde eram empregadas estratégias para melhorar a atividade do peptídeo temporina-1DRa, nenhuma atividade antimicrobiana sobre *Proteus mirabilis* (MIC>128 μ M) foi encontrada por Conlon e colaboradores (2007).

1.5. Parâmetros estruturais capazes de modular a atividade e a seletividade dos PAMs

A atividade antimicrobiana dos PAMs depende da interação eletrostática destes com as membranas dos microrganismos, como também das interações hidrofóbicas que irão resultar na formação dos poros nas membranas. Desta forma, há diversos parâmetros estruturais que podem ser modulados com o objetivo de melhorar a atividade de um peptídeo sobre determinada membrana. Porém, em muitos casos as alterações realizadas sobre um parâmetro estrutural podem resultar em alterações em outros parâmetros interdependentes, o que implica em uma grande dificuldade em avaliar as modificações isoladamente (Kim & Cha, 2010).

Alguns fatores influenciam a citotoxicidade dos peptídeos, dentre eles o tamanho do peptídeo, a sua anfipaticidade e a distribuição das cargas positivas. A carga positiva dos peptídeos é consistente com a afinidade destes pelas membranas bacterianas carregadas negativamente. A capacidade dos peptídeos de se intercalarem por entre a membrana é garantida por sua anfipaticidade. Um outro fator que pode estar correlacionado à atividade citotóxica dos PAMs, demonstrado em estudos de Feder e colaboradores (2000), é o estado de agregação dos peptídeos em solução. O perfil de agregação do peptídeo correlaciona-se muito bem com sua atividade antibacteriana, onde os peptídeos agregados atuam de maneira bem fraca sobre bactérias Gram-negativas, ao passo que aqueles menos agregados apresentam atividade mais forte (Feder *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2003).

Na figura 5 podemos observar a inter-relação entre os determinantes estruturais dos PAMs, onde fica claro que alterações efetuadas em simples pontos podem culminar com alterações em outros parâmetros, e logo alterar as características biofísicas dos PAMs sobre os diferentes tipos de membranas.



Figura 5 – Inter-relação entre os determinantes estruturais dos PAMs. A eficácia antimicrobiana ideal dos peptídeos ocorre na zona de coordenação entre elas (área circular escura). (Figura modificada de Yeaman & Yount, 2003).

1.5.1. Anfipaticidade e helicidade

Uma das classes de antimicrobianos mais estudadas atualmente é a dos peptídeos antimicrobianos, sendo a principal aquela dos peptídeos alfa-helicoidais catiônicos com hélices anfipáticas. Há também a classe dos peptídeos alfa-helicoidais hidrofóbicos e aqueles aniônicos. Conforme demonstrado em estudos anteriores, os peptídeos que não apresentam cationicidade tendem a ser menos seletivos frente aos microrganismos quando comparados às células de mamíferos (Erand; Vogel (1999).

A maioria dos peptídeos helicoidais anfipáticos citotóxicos são catiônicos, e exibem uma maior toxicidade seletiva sobre microrganismos. Um dos primeiros peptídeos antimicrobianos alfa-helicoidais catiônicos e anfipáticos estudados foi a maiganina, um peptídeo com 23 resíduos de aminoácidos secretado na pele do sapo africano *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987).

A helicidade destes peptídeos é fundamental para sua interação com as membranas “zwitteriônicas” eucarióticas e menos necessária na interação com membranas aniônicas procarióticas. Sendo assim, trocas de aminoácidos podem levar à quebra na estrutura helicoidal, ocasionando pequena diminuição na atividade antimicrobiana, com interessante e relevante diminuição na atividade hemolítica (Dathe & Wieprecht, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Zhao, 2003).

Esta α -hélice anfipática apresenta um intervalo de três a quatro resíduos, e é extremamente importante para a interação com biomembranas. A extensão da helicidade anfipática influencia a atividade do peptídeo contra membranas carregadas negativamente, podendo gerar um efeito ainda mais pronunciado na atividade hemolítica de determinados peptídeos contra membranas “zwitteriônicas” ou neutras. Assim, um alto grau de helicidade e/ou anfipaticidade, que gere um domínio hidrofóbico bem segregado, está diretamente relacionado a um aumento da toxicidade frente às células compostas por fosfolípidios neutros (Dathe & Wieprecht, 1999; Yeaman & Yount, 2003).

Conforme estudos de Conlon e colaboradores, a conformação em hélice somente é atingida quando o peptídeo entra em contato com vesículas fosfolipídicas ou com solventes que mimetizam as condições da membrana. Estas conclusões foram obtidas através de experimentos conduzidos por meio da técnica deicroísmo circular. O fato do peptídeo adotar esta estrutura em hélice apenas quando em contato com ambiente de membrana previne que o mesmo exerça sua atividade citotóxica antes mesmo de atingir o alvo desejado (Conlon *et al.*, 2007).

A anfipaticidade está diretamente relacionada à abundância e polarização dos domínios hidrofóbicos e hidrofílicos em uma proteína. Ela é expressa quantitativamente através do momento hidrofóbico, que corresponde a soma vetorial da hidrofobicidade de cada aminoácido, normalizado para uma hélice ideal. Elevações no momento hidrofóbico levam a um aumento significativo na atividade de permeabilização de membranas alvo, bem como na atividade hemolítica de determinados modelos de peptídeos ((Eisenberg *et al*, 1984).

Foi demonstrado que a anfipaticidade possui um papel mais importante que a hidrofobicidade e que o próprio conteúdo helicoidal na atividade de certos peptídeos antimicrobianos. Já para a maioria das membranas neutras, onde as interações eletrostáticas peptídeo-lipídeo são minimizadas, o momento hidrofóbico parece exercer um papel fundamental na atividade tóxica de determinados peptídeos sobre as células do hospedeiro (Yeaman & Yount, 2003).

Com o objetivo de melhorar as atividades antimicrobianas e hemolíticas, são realizados desenhos racionais propondo alterações na estrutura dos peptídeos antimicrobianos. Um dos alvos destes desenhos está na estrutura em hélice destes peptídeos. Song e colaboradores (2004) utilizaram em suas pesquisas o peptídeo sintético α -helicoidal anfipático K₁LW, dotado de citotoxicidade não-seletiva, e

demonstraram que a incorporação de L ou D-Pro naquele peptídeo promoveu uma redução na sua α -helicidade. Foi demonstrado também que a incorporação de D-Pro induziu uma ruptura mais acentuada na estrutura α -helicoidal que a incorporação de L-Pro. Resultados como estes sugerem que por meio da incorporação de D-Pro na face hidrofóbica da hélice de determinados peptídeos α -helicoidais anfipáticos não-seletivos, possam ser gerados novos peptídeos antimicrobianos com alta atividade bacteriana e isentos de atividade hemolítica.

Oren e colaboradores (1999) promoveram a substituição de determinados resíduos em um peptídeo α -helicoidal anfipático, dotado de atividades antimicrobiana e hemolítica por D-aminoácidos. Tal peptídeo passou a assumir uma conformação em folha- β pregueada, e de maneira desejada, perdeu sua atividade hemolítica, porém manteve a atividade antimicrobiana.

1.5.2. Ângulo polar

Ângulo polar é o parâmetro que mede a proporção relativa das faces polar e não polar quando o peptídeo adota uma conformação em hélice anfipática. Como referência, uma α -hélice anfipática ótima na qual uma face é constituída principalmente por resíduos hidrofóbicos e a outra composta principalmente de resíduos polares ou carregados, apresenta ângulo de 180° (Yeaman & Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012; Yeaman & Yount, 2003).

Desta forma, alterações na predominância ou segregação de um tipo de resíduo são capazes de mudar este parâmetro. Vários estudos têm sugerido que um menor ângulo polar (e, por conseguinte, um maior domínio não polar) está relacionado com um aumento na permeabilização da membrana.

Dois peptídeos com ângulos polares de 100° e 180° foram desenhados e sintetizados por Uematsu e colaboradores (2000), e o comportamento resultante da interação destes peptídeos com determinados tipos de membranas foi avaliado, observando aspectos relacionados à permeabilização e formação de poros nestas membranas. Os resultados mostraram que peptídeos com menores ângulos polares induziram uma maior permeabilização da membrana, maior translocação e maiores taxas de formação de poros. No entanto, embora a taxa de formação de poros tenha sido maior naqueles peptídeos com menores ângulos polares, a taxa de colapso destes poros também foi maior. Estes resultados sugerem que os peptídeos com menores ângulos polares levam a formação de poros menos estáveis em comparação

com peptídeos de maiores ângulos polares. A maior estabilidade dos poros formados pelos peptídeos de maior ângulo polar pode ser devido a maiores superfícies carregadas, e/ou mais moléculas de peptídeo por canal.

Em resumo, estes dados mostram que vários parâmetros têm papel central no perfil de atividade dos peptídeos antimicrobianos, onde a simples modificação de um único parâmetro leva a ajustes em outros parâmetros, mostrando que estas inter-relações são fatores chave no mecanismo de ação dos PAMs (Teixeira *et al.*, 2012).

1.5.3. Carga

A carga positiva dos peptídeos antimicrobianos é necessária para a atração inicial pelas membranas bacterianas carregadas negativamente, onde variações em parâmetros físicos como a substituição de resíduos, permitem otimizar a sequência peptídica, e conseqüentemente aprimorar os efeitos sobre estas membranas bacterianas (Findlay *et al.*, 2010).

O aumento da carga positiva de um peptídeo antimicrobiano, por exemplo através da adição de resíduos de arginina, lisina ou histidina na sequência peptídica, pode resultar em um aumento na atividade antibacteriana. Esta carga aumentada melhora a atração eletrostática entre o peptídeo e a membrana bacteriana negativamente carregada, sem afetar a interação com lipídeos zwitteriônicos encontrados em células de mamíferos. Obviamente, uma carga positiva facilita a ligação dos peptídeos a membranas antimicrobianas carregadas negativamente. Apesar dos acréscimos na carga positiva dos peptídeos muitas vezes gerarem produtos com maior afinidade por membranas bacterianas, um excesso de cationicidade pode levar a um aumento na atividade hemolítica e até mesmo perda ou redução da atividade antimicrobiana, como resultado de uma repulsão intermolecular dos poros da membrana (Dathe & Wieprecht, 1999; Conlon *et al.*, 2007; Matsuzaki, 2009).

Apesar de não existir nenhuma correlação simples entre a carga do peptídeo e a sua atividade sobre as membranas, a grande maioria dos peptídeos antimicrobianos estudados têm um domínio catiônico bem definido, com carga líquida positiva variando de +2 a +9. Esta cationicidade pode explicar a relativa seletividade destes peptídeos sobre membranas bacterianas carregadas negativamente em detrimento às células dos hospedeiros (Yeaman & Yount, 2003; Jiang, Vasil, *et al.*, 2008).

Em resumo, peptídeos com uma carga positiva moderadamente alta, um

grande momento hidrofóbico e um pequeno ângulo hidrofílico tendem a ter alta atividade contra membranas microbianas, baixa atividade hemolítica, e uma preferência por um mecanismo de ação do tipo carpete. Em contraste, os peptídeos com uma carga positiva baixa, uma pequena anfipaticidade, e uma alta hidrofobicidade intrínseca, mostram alta atividade sobre membranas microbianas e do hospedeiro, agindo principalmente pelo mecanismo de formação de poros do tipo "barrel-stave"(Shai, 1999).

Dathe e colaboradores realizaram estudos com análogos da magainina 2, mantendo constantes os parâmetros de hidrofobicidade e helicidade. Eles observaram que aumentos na carga positiva de +3 para +5 levaram a aumentos na atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém também notaram que um aumento de carga positiva já não confere maior atividade. Elevações na carga positiva de +6 a +7 culminou em aumento na capacidade hemolítica e uma perda de atividade antimicrobiana (Dathe *et al.*, 2002).

A diminuição da atividade antimicrobiana pode ocorrer como fruto das fortes interações do peptídeo com as cabeças polares dos fosfolípidos, evitando a translocação deste peptídeo para o interior da célula. Há exemplos de bactérias com resistência intrínseca a determinados PAMs, como *Burkholderia cepacia* e *Serratia marcescens*, que podem ser resistentes a peptídeos catiônicos em virtude de uma membrana externa não interativa e devido à produção de proteases específicas, respectivamente (Hancock & Chapple, 1997).

1.5.4. Conformação

Um padrão conformacional bem conhecido nos peptídeos antimicrobianos é seu arranjo anfipático sua conformação anfipática, resultante da polaridade e concentração dos resíduos hidrofóbicos de um lado da hélice e resíduos polares do outro lado desta hélice.

Este domínio catiônico polar dos PAMs é muito importante na interação inicial com a superfície da membrana, enquanto a porção hidrofóbica direciona o peptídeo a se inserir no núcleo da membrana, inserção esta mediada principalmente por interações hidrofóbicas e de Van der Waals. Evidências sugerem que a helicidade é um pré-requisito para a atividade hemolítica, mas não antimicrobiana.

Oren e colaboradores (1999) demonstraram que os diastereoisômeros da melitina que perderam sua estrutura alfa-helicoidal revogaram sua atividade

hemolítica junto a eritrócitos humanos, porém foi mantida a atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Chen e colaboradores (2005), em seus estudos com os análogos do peptídeo V681, observaram que, em ambas as faces polares e não polares, as hidrofobicidades relativas dos D-peptídeos foram sempre menores do que as hidrofobicidades dos seus L-diastereoisômeros, o que indica que a característica de perturbação da hélice dos D-aminoácidos também conduz ao rompimento do domínio de ligação preferido destas hélices.

Shai e colaboradores (1999) realizaram estudos com análogos do peptídeo citolítico pardaxina, que possui ação sobre bactérias e células de mamíferos. Os produtos sintetizados tiveram a incorporação de D-aminoácidos, e foi demonstrado que os diastereoisômeros não retiveram a estrutura alfa-helicoidal, que por sua vez aboliu os efeitos tóxicos dos análogos sobre células de mamíferos. Os diastereoisômeros altamente hidrofóbicos exibiram atividade lítica tanto contra vesículas carregadas negativamente quanto sobre vesículas fosfolipídicas zwitteriônicas, demonstrando tanta atividade antibacteriana quanto hemolítica. De maneira oposta, diastereoisômeros altamente carregados positivamente levaram a quebra apenas de vesículas de ácido fosfolipídico e exibiram atividade apenas contra bactérias (Oren, 1996).

1.5.5. Hidrofobicidade

Definida como a porcentagem de resíduos hidrofóbicos presentes no peptídeo, a hidrofobicidade do peptídeo é de aproximadamente 50% para a maioria dos PAMs. É um importante parâmetro da atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos e determina a extensão da partição do peptídeo no interior da membrana, sendo assim uma característica essencial para as interações dos PAMs com as membranas biológicas (Teixeira *et al.*, 2012).

Embora esta hidrofobicidade seja necessária para a permeabilização efetiva da membrana, níveis elevados de hidrofobicidade estão fortemente correlacionados com uma maior toxicidade frente às células de mamíferos e com uma menor especificidade antimicrobiana (Tossi *et al.*, 2000; Yeaman & Yount, 2003).

De fato, peptídeos altamente hidrofóbicos estão relacionados com uma forte atividade hemolítica e baixa atividade antimicrobiana (Song *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008).

Corroborando com os achados acima, Chen e colaboradores (2007) em estudos com o peptídeo antimicrobiano alfa-helicoidal anfipático de 26 resíduos (V13KL) demonstraram que aumentos na hidrofobicidade levaram a aumentos na atividade hemolítica. A hidrofobicidade foi sistematicamente reduzida ou aumentada pela substituição de resíduos de leucina por resíduos de alanina menos hidrofóbicos ou substituição de resíduos de alanina por resíduos de leucina mais hidrofóbicos na face não polar da hélice, respectivamente.

Giangeroso e colaboradores (2001), em estudos com o peptídeo P19, demonstraram que a ausência de grandes resíduos alifáticos, responsável pela diminuição da hidrofobicidade deste peptídeo, aboliu completamente a atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

1.6 Especificidade de ação dos PAMs

O componente básico de praticamente todas as biomembranas é a bicamada fosfolipídica. Por definição, tais bicamadas são anfipáticas, tendo ambos os domínios, hidrofóbico e hidrofílico. No entanto, com base em sua composição, as biomembranas de células procariontes e eucariontes diferem significativamente (Yeaman & Yount, 2003).

Os diferentes componentes das biomembranas dos eucariontes e procariontes estão intimamente relacionados ao comportamento destas biomembranas frente aos peptídeos antimicrobianos. Componentes como fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) presentes nas células eucarióticas normalmente não apresentam carga líquida. Além disso, a esfingomiélin, um análogo da fosfatidilcolina (PC) contendo um resíduo de palmitol, também se apresenta com carga neutra, e os esteróis como colesterol e ergosterol, encontrados em células eucarióticas, porém raramente em membranas procariontes também são geralmente neutros. De modo inverso, fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS) sustentam uma carga líquida negativa (Yeaman & Yount, 2003)

Os componentes das biomembranas relacionados acima explicam de certa forma a relativa insensibilidade das células eucarióticas quando em contato com os PAMs, e a capacidade destes peptídeos em lisar uma ampla gama de microrganismos incluindo bactérias, leveduras, fungos e micobactérias (Dathe *et al.*, 1996; Wu, *et al.*, 1999).

Tem sido proposto que a carga líquida positiva dos peptídeos antimicrobianos

contribui para sua ligação às superfícies bacterianas carregadas negativamente, as quais diferem da superfície zwitteriônica presente nas células normais de mamíferos (Wu *et al.*, 1999).

As células tumorais perdem parte de sua assimetria lipídica e, portanto, apresentam um folheto externo da membrana plasmática com caráter mais aniônico, que assim se liga preferencialmente aos peptídeos antimicrobianos catiônicos. Estas células tumorais expressam mais fosfatidilserina (PS) em seu folheto externo que as células normais, o que garante às membranas de muitos tipos de células cancerosas uma carga líquida negativa, explicando a selectividade de alguns peptídeos antimicrobianos contra células tumorais (Utsugi *et al.* (1991). Outras moléculas aniônicas podem tornar mais negativo o potencial de membrana das células cancerosas, como por exemplo as mucinas O-glicosiladas e o ácido siálico. As membranas destas células tumorais apresentam uma maior fluidez, e conseqüentemente maior propensão à desestabilização. Além disso, as células tumorais possuem uma maior área superficial devido à presença de inúmeras microvilosidades, o que garante a ligação de uma quantidade maior de peptídeos (Dennison *et al.*, 2006).

1.7 Mecanismos de ação dos PAMs

Os peptídeos antimicrobianos, conforme visto anteriormente, apresentam uma ampla gama de atividades (antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticâncer), seja por permeabilização da membrana dos microrganismos, levando-os à morte celular por meio de fenômeno osmótico, ou mesmo através da ação sobre elementos intracelulares como DNA, RNA e proteínas do hospedeiro, e às vezes sem induzir lise de células eucarióticas (Amiche & Galanth, 2011).

Um importante fator na fase inicial de ligação do peptídeo à membrana é a atração eletrostática, mais fortemente observada em relação às membranas procarióticas carregadas negativamente, sendo menos notória em relação às membranas eucarióticas neutras.

Vimos anteriormente que a composição da parede celular dos microrganismos é um tanto quanto complexa, e difere bastante principalmente entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

As bactérias Gram-negativas, ao contrário das Gram-positivas, têm em sua parede celular uma fina camada de peptídeoglicano, mas em compensação têm uma

membrana externa que reveste a membrana citoplasmática, e que associada a outros fatores como por exemplo bomba de efluxo, fazem das bactérias Gram-negativas microrganismos altamente resistentes aos antibióticos tradicionais. Devido ao modo de entrada nas células ser diferente quando comparado aos antibióticos tradicionais, os peptídeos antimicrobianos atuam rapidamente com concentrações equivalentes a quatro vezes sua MIC (concentração inibitória mínima), podendo eliminar 99,99% da bactéria em menos de 15 minutos (Steinberg *et al.*, 1997; Amiche & Galanth, 2011).

1.7.1 Atividade membranotrópica dos PAMs

Na grande maioria dos mecanismos descritos, a ligação dos peptídeos antimicrobianos às membranas celulares precede a permeabilização destas membranas, com posterior lise e morte celular. Há, no entanto, outros mecanismos que mostram que esta ligação é apenas um dos passos de um processo bem mais complexo. Com o objetivo de explicar a interação dos peptídeos catiônicos α -helicoidais com membranas, alguns modelos têm sido propostos. Eles têm resultado de diversos experimentos que avaliam os peptídeos individualmente ou os resultados de seus análogos sobre sistemas de membranas artificiais. Apesar de ainda não haver consenso entre os investigadores a este respeito, muitos detalhes sobre o modo de ação destes peptídeos foram descobertos e pelo menos quatro modelos são propostos para tentar elucidar os mecanismos de ação destes peptídeos. Em todos os casos, no entanto, o passo inicial de ação dos peptídeos sobre as membranas dos microrganismos é a atração eletrostática entre a carga positiva do peptídeo e as cabeças de grupo carregadas negativamente dos fosfolipídeos das membranas bacterianas (Amiche & Galanth, 2011).

1.7.2 Modelo em *barrel-stave*

Este modelo é baseado na formação de poros transmembrana a partir da deposição dos peptídeos sobre a membrana (figura 6). Vários monômeros do peptídeo se agregam sobre a superfície da membrana e então se inserem mais profundamente no núcleo hidrofóbico desta, de modo que sua superfície hidrofóbica interaja com o núcleo lipídico da membrana e a sua face hidrofílica venha revestindo o centro, formando um poro aquoso. À medida que há um aumento na proporção peptídeo/lipídeo, os peptídeos passam a adotar uma orientação perpendicular na membrana. Portanto, esta orientação perpendicular dos peptídeos só ocorre após um determinado aumento na proporção peptídeos/lipídios. O recrutamento de vários monômeros do peptídeo é crucial para a formação do poro e sua abertura. À medida que mais monômeros são recrutados, mais viável se torna a inserção dos peptídeos nas membranas, mais aumenta o diâmetro do poro transmembrana, e conseqüentemente a morte celular irá resultar do extravasamento de material intracelular (Scott *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2003).

A formação de poros depende da anfipaticidade e hidrofobicidade das estruturas secundárias de peptídeos. Um peptídeo apresentando uma importante superfície hidrofílica não é capaz de formar poros transmembrana, a menos que a sua carga positiva seja neutralizada. Assim, não é muito provável que peptídeos antimicrobianos ricos em resíduos de lisina e / ou arginina possam permeabilizar as membranas por um mecanismo em barril. Este modelo é mais aplicável para peptídeos citolíticos de células bacterianas e de mamíferos. Para que estes peptídeos se encaixem no núcleo hidrofóbico da membrana, duas condições são necessárias: (1) a ligação deles com as membranas alvo seja obtida primeiramente por interações eletrostáticas; (2) que eles adotem uma estrutura α -helicoidal anfipática cuja carga líquida positiva esteja próxima da neutralidade. Estudos funcionais têm revelado que pardaxina e alameticina lisam tanto as bactérias como também os eritrócitos via mecanismo “barrel-stave” (Rapaport & Shais, 1991; Yang *et al.*, 2001; Conlon *et al.*, 2007; (Amiche & Galanth, 2011).

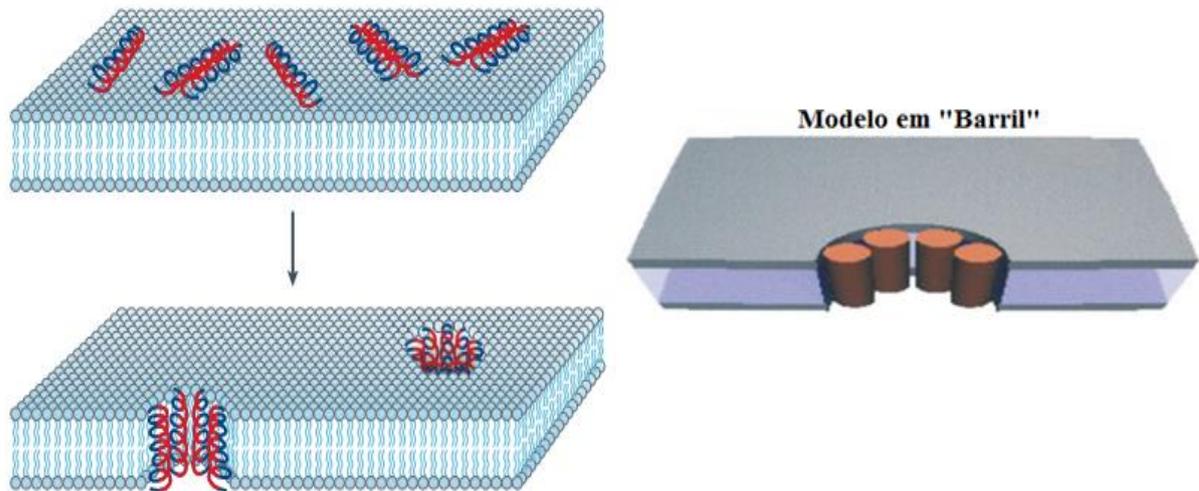


Figura 6 – Modelo em *barrel-stave*. Os PAMs, após se aderirem à membrana plasmática, adotam uma conformação α -helicoidal. Este agregado de peptídeos aderidos se insere na bicamada da membrana de modo que as regiões hidrofóbicas do peptídeo se alinhem com o núcleo lipídico da membrana e as regiões hidrofílicas dos peptídeos formem o interior do poro aquoso. A porção em azul das hélices dos peptídeos representa a face hidrofílica, enquanto que a porção em vermelho representa a região hidrofóbica (Figura retirada de Brogden (2005)). À direita um esquema onde as camadas escuras representam as regiões das cabeças de grupo da bicamada lipídica, e os monômeros dos peptídeos são representados pelos cilindros (Figura retirada de Yang *et al.* (2001)).

1.7.3 Modelo do poro toroidal

O modelo de poro toroidal difere do modelo em barril no qual os peptídeos estão sempre associados com as cabeças de grupo lipídicas mesmo quando eles são inseridos perpendicularmente na bicamada lipídica. No modelo do poro toroidal a monocamada lipídica se inclina continuamente da porção superior para a porção inferior na forma de um orifício circular, toroidal, onde o poro é lineado tanto pelos peptídeos quanto pelas cabeças de grupo lipídicas (Yang *et al.*, 2001b). Conforme observado nas figuras 6, 7 e 8 os peptídeos em α -hélice se orientam paralelamente a membrana até atingirem um limiar de concentração; a partir daí eles se inserem perpendicularmente na camada lipídica. Cabe salientar que a ligação entre o monômero e o lipídio não é quebrada durante a reorganização da camada lipídica, e este processo culmina com a formação de um poro aquoso de meia vida curta, íon seletivo e com a parede formada por monômeros do peptídeo intercalados com lipídios da membrana biológica (Brogden, 2005).

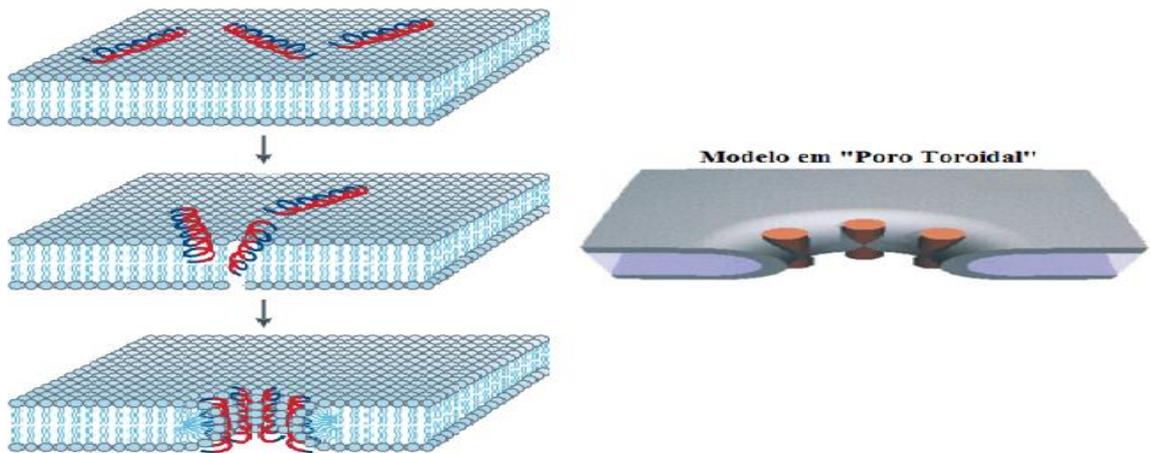


Figura 7 – Modelo do poro toroidal. Neste modelo os peptídeos se agregam até um limiar de concentração e posteriormente eles induzem as monocamadas lipídicas a se dobrarem continuamente através do poro, onde o núcleo aquoso do poro é revestido tanto pelos peptídeos inseridos quanto pelas cabeças de grupo lipídicas. As regiões hidrofílicas do peptídeo são representadas em cor vermelha, e as regiões hidrofóbicas pela cor azul (Figura retirada de Brodgen, 2005). À direita, pode-se observar um esquema onde as camadas escuras representam as regiões das cabeças de grupo da bicamada lipídica, e os monômeros dos peptídeos são representados pelos cilindros (Yang *et al.*, 2001).

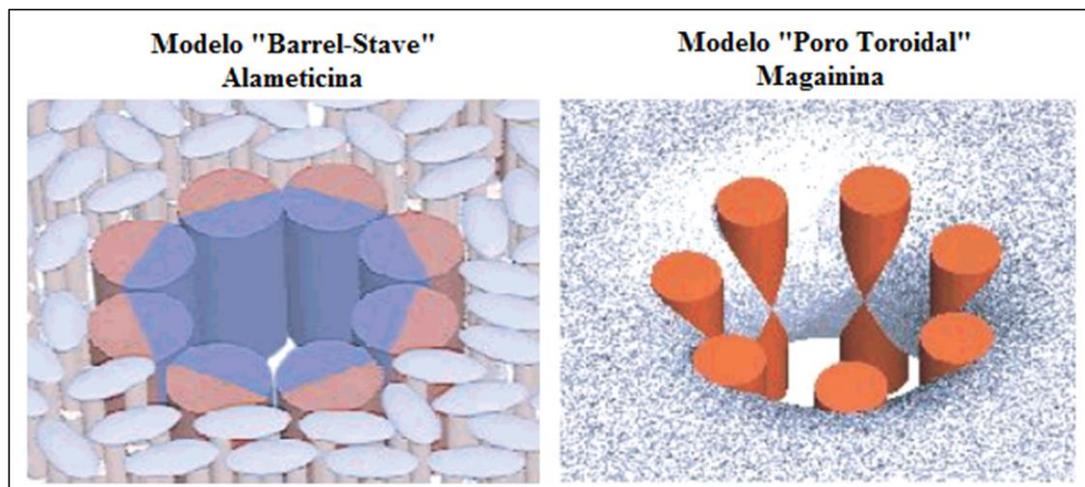


Figura 8—Comparação entre os modelos "barrel-stave" e poro-toroidal.

Modelo em *barrel-stave* à esquerda, sendo a alameticina representada pelo cilindro; em azul temos a porção hidrofílica e em vermelho a porção hidrofóbica deste peptídeo anfipático. O diâmetro do poro formado é de 18 Å. A molécula lipídica é representada por um grupo de cabeça oval com duas pernas. À direita observamos o modelo do poro toroidal, com a formação de poros pela magainina, que está representada pelos cilindros avermelhados embebidos na bicamada lipídica (Huang, 2000).

1.7.4 Modelo *carpet-like*

O modelo *carpet-like* foi proposto pela primeira vez para descrever o modo de ação da dermaseptina S, sendo usado mais tarde para descrever o modo de ação de outros peptídeos antimicrobianos, como os análogos naturais das dermaseptinas, cecropinas, dentre outros. Este modelo descreve uma situação na qual os peptídeos líticos são atraídos eletrostaticamente pelas membranas, de modo que sua porção hidrofílica sofre atração pelas cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos em inúmeros locais que recobrem a superfície da membrana, formando uma espécie de tapete. Os peptídeos se acumulam na superfície de bicamada, orientando-se paralelamente à superfície da membrana, cobrindo-a na forma de um tapete. A permeação das membranas ocorre apenas se há uma alta concentração de peptídeos ligados à membrana. A alta concentração de peptídeos na superfície da membrana pode ocorrer se toda a sua superfície for coberta pelos monômeros do peptídeo, ou alternativamente, após a associação entre peptídeos ligados à membrana, formando um carpete localizado. No modelo em carpete (figura 9), ao contrário do modelo *barrel-stave*, os peptídeos não estão inseridos no núcleo hidrofóbico da membrana. Além disso, um peptídeo que permeabiliza membranas através deste mecanismo não precisa necessariamente adotar uma estrutura específica de ligação à membrana (Shai, 1999).

Os quatro passos propostos envolvidos neste modelo são: (1) ligação preferencial dos monômeros dos peptídeos às cabeças de grupo fosfolipídicas; (2) alinhamento dos monômeros sobre a superfície das membranas, de forma que sua porção hidrofílica se direcione ao centro hidrofóbico da membrana, mantendo ainda aquele contato com as cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos.; (3) rotação da molécula, levando à reorientação dos resíduos hidrofóbicos junto ao núcleo hidrofóbico da membrana; e (4) semelhante a uma ação detergente e, eventualmente, levando à formação de micelas, os peptídeos irão causar uma perturbação na bicamada, quebrando a integridade de sua curvatura, culminando assim com a desagregação da membrana (Shai, 1999; Nascimento *et al.*, 2003; Yeaman & Yount, 2003; Brogden, 2005).

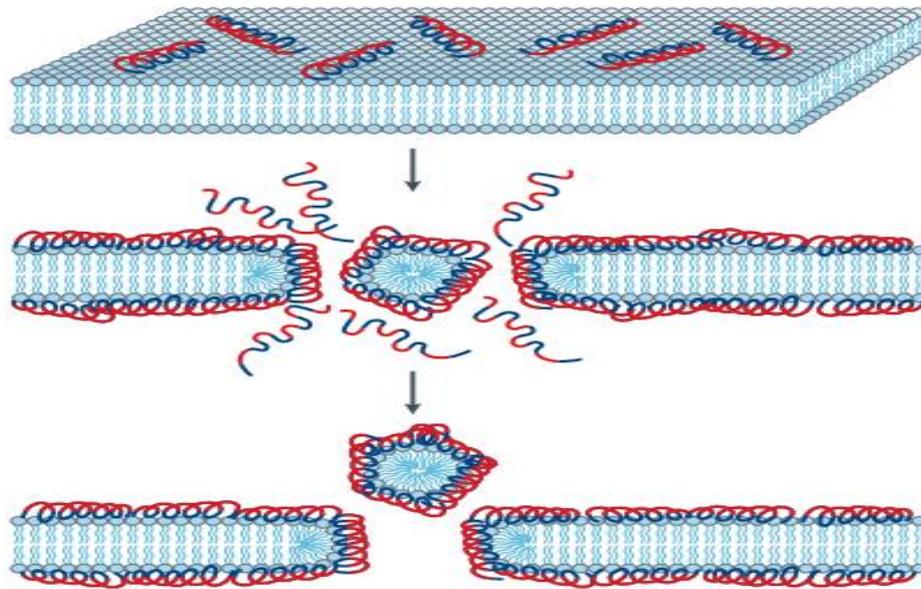


Figura 9 – Representação do modelo *carpet-like*. Neste modelo, os peptídeos rompem a membrana através da orientação paralela à superfície da bicamada lipídica, formando uma extensa camada ou tapete. As regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, enquanto as regiões hidrofóbicas são mostradas em azul. (Figura retirada de Brogden, 2005).

1.7.5 Modelo do agregado

Após se ligarem às cabeças dos grupos polares dos fosfolipídeos, os peptídeos se reorientam, formando um agregado de peptídeos e lipídeos. Ao contrário do que se vê nos outros modelos, aqui os peptídeos não adotam uma forma de orientação particular. Este mecanismo explica, por um lado, a permeabilização das membranas pelos peptídeos, e por outro lado, a passagem dos peptídeos através das membranas via um mecanismo de ação intracelular. Porém o real mecanismo de ação dos peptídeos ainda vem sendo estudado (Amiche & Galanth, 2011).

Acredita-se que a agregação dos peptídeos em solução afeta tanto a citotoxicidade quanto a seletividade dos peptídeos antimicrobianos. Através de seus estudos com a Dermaseptina S4, Feder e colaboradores (2000) compararam os dados de atividade antimicrobiana, atividade hemolítica e estado de agregação de seu peptídeo, observando que a organização em solução se constituía em um outro determinante da atividade dos PAMs. Os perfis de agregação dos peptídeos se correlacionaram muito bem com as suas atividades antibacterianas, onde os peptídeos agregados eram fracamente ativos contra bactérias Gram-negativas, sendo que aqueles peptídeos menos agregados se mostravam mais ativos.

1.7.6. Modelo unificado de Shai-Matsuzaki-Huang

Este modelo propõe a interação do peptídeo com a membrana, seguido pela substituição dos lipídeos, alteração da estrutura da membrana, e em alguns casos a entrada do peptídeo no interior da célula alvo. A presença de colesterol na membrana alvo reduz a atividade dos peptídeos antimicrobianos, seja pelo fato de ocorrer uma estabilização da bicamada lipídica ou devido às interações entre o colesterol e os peptídeos. De maneira similar, acredita-se que com um aumento da força iônica geralmente se observa uma redução na atividade da maioria dos peptídeos antimicrobianos, em parte devido ao enfraquecimento das cargas eletrostáticas necessárias para a interação inicial. Em geral, peptídeos que atuam através do modelo de Shai-Matsuzaki-Huang lisam os microrganismos em concentrações micromolares (Zaslhoff, 2002).

Neste modelo de Shai–Matsuzaki–Huang (figura 10) observamos que há formação tanto de carpete quanto de poros. As moléculas dos peptídeos sofrem atração eletrostática e começam a se aderir à camada externa das membranas dos microrganismos, de tal forma que levam ao afinamento desta membrana. A bicamada conseqüentemente é forçada, ocorrendo a formação de poros transientes que permitem que o peptídeo atinja a membrana interna. A partir daqui há difusão do peptídeo para o meio intracelular, com acometimento de alguns alvos e ruptura da membrana com o extravasamento do material intracelular (Nascimento *et al.*, 2003).

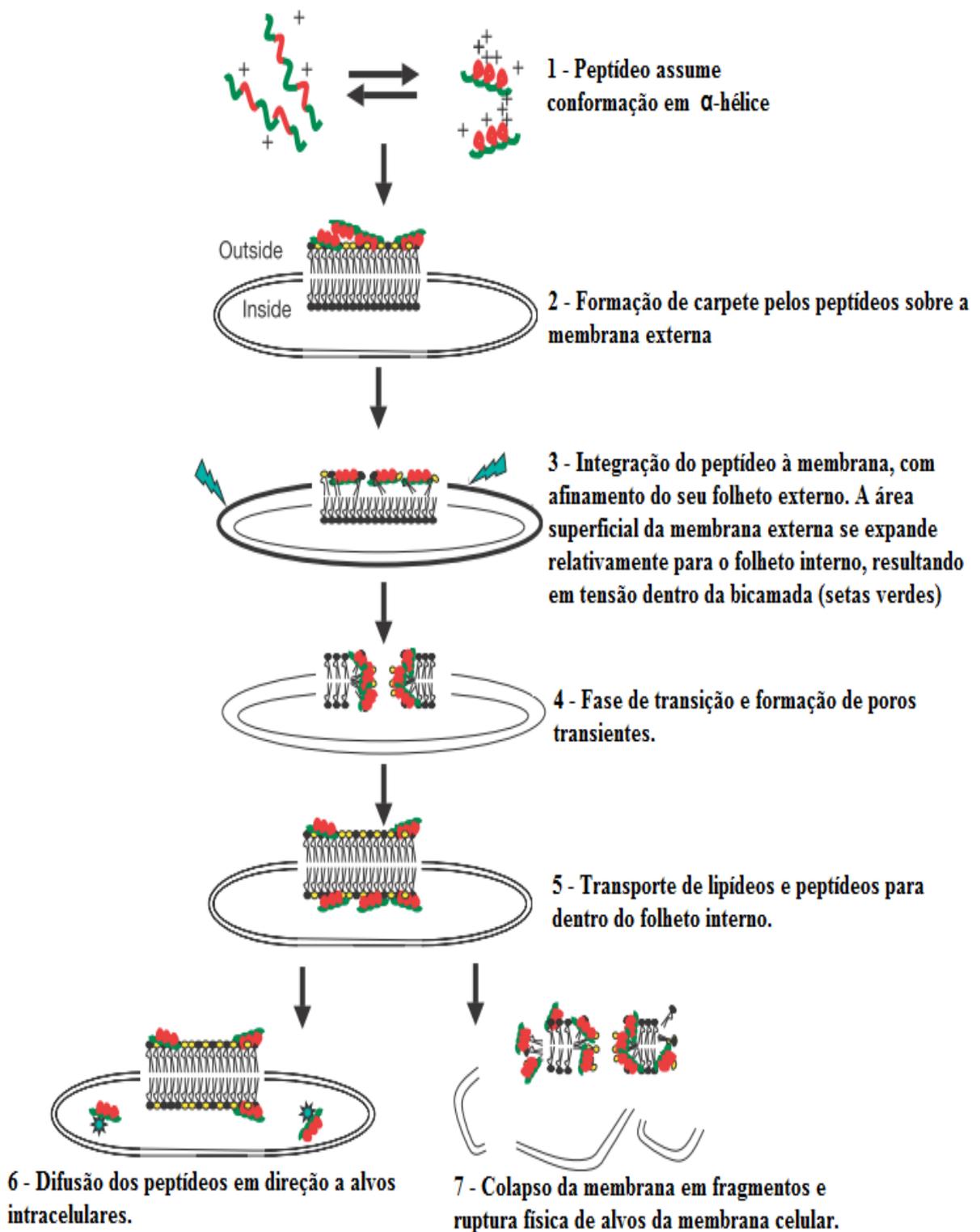


Figura 10 – Representação esquemática do modo de ação dos peptídeos antimicrobianos através do modelo de Shai–Matsuzaki–Huang. Lipídeos com cabeças de grupo amarelas são ácidos, ou negativamente carregados. Lipídeos com cabeças de grupo negras não apresentam carga líquida (Figura retirada de Zasloff, 2002).

1.8 Interação dos PAMs com alvos intracelulares

Embora perturbações na membrana quase sempre contribuam com os mecanismos de ação dos PAMs, há estudos que sugerem que a formação de canais iônicos e poros transmembrana não sejam os únicos mecanismos pelos quais os PAMs conduzam à morte bacteriana. Existem evidências crescentes indicando que os PAMs atuem também sobre alvos intracelulares. Alteração na formação do septo da membrana citoplasmática, inibição da síntese da parede celular, dos ácidos nucléicos, da síntese proteica e inibição da atividade enzimática são alguns dos efeitos que podem ocorrer quando os peptídeos translocados atingem o citoplasma (Yeaman & Yount, 2003; Brogden, 2005).

Com o objetivo de investigar a relação entre a permeabilização das membranas bacterianas e a morte celular subsequente, vários estudos têm mostrado que mesmo nos casos em que há poucos danos na membrana ocorre morte da célula, sugerindo que os PAMs possam interagir com alvos intracelulares chave. Esforços têm sido direcionados com o objetivo de identificar estes alvos intracelulares, bem como o mecanismo pelo qual os peptídeos conseguem entrar na célula microbiana sem antes causar ruptura na membrana bacteriana (Brogden, 2005; Otvos, 2005).

Muitas funções essenciais, como a manutenção dos gradientes eletroquímicos e iônicos, a síntese de peptideoglicano, quitina e outros biopolímeros são realizadas pela membrana citoplasmática, explicando o porquê dos danos causados pelos PAMs sobre a membrana levarem à lise celular. A síntese do peptideoglicano, por exemplo, está diretamente relacionada a integridade da membrana, e como as bactérias Gram-positivas têm parede mais rica em peptideoglicano, elas se tornam mais vulneráveis à ação dos PAMs. Há estudos mostrando que a ruptura da membrana é apenas um passo que permite aos peptídeos penetrarem e inibirem funções intracelulares como síntese de DNA ou RNA (Park *et al.*, 1998; Amiche & Galanth, 2011).

Vários estudos têm mostrado que os PAMs secretados por insetos lisam as bactérias após entrarem e inibirem a síntese de proteínas bacterianas, e que esta inibição está associada à morte celular (Kragol *et al.*, 2001). Estas observações sugerem que as mortes celulares ocasionadas em função dos peptídeos podem ser resultado de vários mecanismos de ação funcionando de forma independente e em cooperação. Além disso, os PAMs podem eliminar os mesmos microrganismos de diferentes maneiras, dependendo de fatores como fase de crescimento, localização tecidual e presença ou ausência de outros antimicrobianos ou outros agentes que

atuem de maneira sinérgica (Mor *et al.*, 1994; Amiche & Galanth, 2011).

Um destes exemplos onde não há lise bacteriana e uma forte atividade do peptídeo sobre DNA e RNA é o caso das Buforinas II, o que sugere que o alvo das Buforinas II são ácidos nucleicos intracelulares, e não membranas celulares (Park *et al.*, 1998).

A eficiência de penetração da Buforina II e seus análogos nas células depende de seu conteúdo helicoidal. Acredita-se que este conteúdo helicoidal exerça um importante papel na eficiência de translocação da Buforina II e seus análogos, sendo a prolina presente na região em dobradiça a responsável por esta habilidade de penetração celular, e o conteúdo helicoidal determinante da eficiência desta penetração, um fator chave determinante da atividade antimicrobiana. Isto mostra que a prolina na região em dobradiça é um fator chave nesta propriedade de penetração celular (Park *et al.*, 1998).

Os estudos de Park e colaboradores (2000) demonstraram que as buforinas constituem uma nova classe de antimicrobianos que atinge alvos intracelulares, mais provavelmente ácidos nucleicos, sem, no entanto, permeabilizar a membrana celular. Uma análise sistemática da relação estrutura-atividade das buforinas revelou a eficiência de penetração na célula, que depende do conteúdo helicoidal, é um fator crítico para determinar a potência antimicrobiana da Buforina II.

A tabela 2 abaixo apresenta alguns dos principais peptídeos antimicrobianos com seus respectivos mecanismos de atividade que levam à morte celular.

Tabela 2 – Exemplos de PAMs e mecanismos pelos quais induzem seus efeitos deletérios.

Mecanismo de atividade antimicrobiana	Peptídeos
Formação de Poros transmembrânicos	
Poros-Toroidal	Magainina 2, Protegrina 1, Melitina, LL-37, MSI-78
Carpete	Dermaseptina S, Cecropina, Melitina, Caerina 1.1
Poros em Barril	Alameticina
Modelos de morte intracelular	
Floculação e conteúdo intracelular	Peptídeos aniônicos
Alterações na membrana citoplasmática	PR-39, PR-26, Indolicidina-1, Microcina 25
Inibição da síntese da parede celular	Mersacidina
Ligação a ácidos nucleicos	Buforina II, Tachiplesina
Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Pleurocidina, Dermaseptina, PR-39, HNP-1, HNP-2, Indolicidina
Inibição da síntese de proteínas	Pleurocidina, Dermaseptina, PR-39, HNP-1, HNP-2, Indolicidina
Inibição da atividade enzimática	Histatinas, Pirrhocoricina, Drosocina, Apidacina

Tabela modificada de Brogden, 2005.

CONFIDENCIAL

2. JUSTIFICATIVA

O aparecimento de resistência aos antibióticos tem se revelado nos últimos anos como um dos grandes desafios da medicina e a emergência de microrganismos multirresistentes cada vez mais envolvidos em infecções hospitalares tem se revelado um grave problema de saúde pública. O uso indiscriminado e inadequado de drogas antimicrobianas tem promovido o surgimento de cepas de microrganismos cada vez mais resistentes. Dificuldades associadas à emergência destes microrganismos multirresistentes estão relacionadas com a falta de opções terapêuticas para combatê-los, visto que, nos últimos anos, a maioria das grandes empresas farmacêuticas se dedicou ao desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças crônicas que oferecem um fluxo de receita melhor do que os agentes antimicrobianos.

Dentre os microrganismos com resistência aos antibióticos clássicos, potentes e convencionais como β -lactâmicos, carbapenêmicos e glicopeptídeos, podemos citar as cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA, *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* VRE. Além destas bactérias, assistimos também ao surgimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas e, como demonstrado por Linde e colaboradores (2001), com resposta reduzida frente aos antimicrobianos usados no combate à tuberculose, impulsionando a busca por novas drogas no combate a esta patologia.

Os peptídeos antimicrobianos são candidatos promissores no desenvolvimento de uma nova classe de antimicrobianos, tanto pelo fato de apresentarem características como a habilidade de eliminar as células-alvo rapidamente e apresentarem um amplo espectro de atividade, quanto pelo fato de apresentarem atividade contra patógenos resistentes a potentes drogas empregadas no meio clínico, além da sua relativa dificuldade em promover a seleção de microrganismos resistentes *in vitro*.

O desenho racional de peptídeos pode levar ao desenvolvimento de drogas com alta atividade antimicrobiana, porém sem o efeito citotóxico característico de alguns peptídeos selvagens.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente projeto teve como objetivo geral a síntese de um peptídeo análogo a peptídeos antimicrobianos de anuros, com vistas a aumentar seu potencial terapêutico, seja pelo aumento na atividade biológica ou na sua especificidade, reduzindo sua toxicidade sobre células eucarióticas.

3.2. Metas experimentais

- Avaliação das estruturas primárias de peptídeos antimicrobianos de anuros, com proposição de mudanças nas suas faces polar e apolar, visando obtenção de um análogo com atividade antimicrobiana aumentada ou mantida e atividade hemolítica reduzida;
- Produção do análogo proposto utilizando síntese química em fase sólida;
- Purificação e obtenção deste análogo em alto grau de pureza por meio de RP-HPLC;
- Caracterização biológica do análogo produzido, utilizando ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antibacteriana (contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas), antifúngica (contra espécies de leveduras), antimicobacteriana (contra espécies de micobactérias) hemolítica (contra eritrócitos humanos), e ensaios de sinergismo com drogas antimicrobianas clássicas e convencionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes Químicos

Em todos os experimentos, foram utilizados somente reagentes de grau analítico, provenientes de diferentes fontes comerciais. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q (Millipore Reagent Water System EUA).

CONFIDENCIAL

4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

A purificação dos peptídeos sintetizados foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se colunas de fase reversa C₁₈ Vydac 218TP54 (250 x 4,6 mm, 5 μ, Separations Group, EUA).

Alíquotas (3,0 mg) dos peptídeos brutos liofilizadas contendo uma mistura dos dois análogos foram ressuspendidas em 820 μL de 0,1% (v/v) TFA em água (solvente A) e centrifugadas por 10 min a 15.887 g. O sobrenadante obtido foi filtrado em filtro Millex GV 0,22 μm, em seguida um volume de 200 μL foi aplicado em uma coluna C₁₈ (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm), com eluição realizada com fluxo de 1 mL/min.

Inicialmente equilibrou-se a coluna com solvente A, sendo posteriormente aplicado um gradiente linear de 0–40% por 10 min e de 40–60% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA (solvente B) por 20 min, seguido de um gradiente de 60-100% de solvente B por 5 min, finalizando a corrida com uma lavagem de 5 min com 100% de solvente B. A absorvância foi monitorada a 216 nm e as frações foram coletadas manualmente, secadas a vácuo e armazenadas a -20°C.

4.4. Espectrometria de massas

Os dois análogos purificados foram analisados por espectrometria de massas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), a fim de se avaliar a pureza dos componentes obtidos.

Alíquotas dos dois análogos purificados por meio de RP-HPLC foram dissolvidas em 0,1% (v/v) de TFA em água e 1 μ L de cada peptídeo foi aplicado em placa de aço inoxidável junto a 1 μ L da matriz reconstituída de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 μ g/ μ L) ressuspendidas em 50% (v/v) acetonitrila/0,1% (v/v) TFA.

As análises foram realizadas com cada um dos análogos após purificação por RP-HPLC no modo refletor de íons positivos, tendo sido utilizada a solução Peptide Mix (Bruker Daltonics) para a calibração e matriz HCCA, sendo a faixa analisada de 500 a 4000 Da.

4.5. Ensaio hemolítico (Determinação da HC₅₀)

Eritrócitos de sangue humano O positivo, coletado de doador saudável, foram separados do plasma por sedimentação e, em seguida, três lavagens sucessivas foram realizadas com tampão 1x (Tris-HCL 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M). Tanto a solubilização das amostras quanto o preparo da solução a 1% (v/v) de hemácias foram efetuadas com este tampão. Alíquotas de 150 μ L de uma solução a 256 μ M em água de cada um dos análogos produzidos foram secas em Speed-Vac e reconstituídas em 150 μ L de tampão 1x. A partir dessa solução-estoque foram realizadas diluições sucessivas até a concentração final de 0,5 μ M. Em seguida, foram adicionados 75 μ L da suspensão de hemácias a 1% (v/v). As amostras foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 3000 rpm por 2 min.

Alíquotas de 100 μ L do sobrenadante de cada peptídeo foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo chato (TPP) e a leitura da absorvância realizada a 405 nm (leitora Multiskan[®]FC, Thermo Scientific, USA). Para as amostras de referência utilizaram-se 100 μ L da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 μ L de Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de lise e 100 μ L da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) com tampão salino como referência de 0% de hemólise. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.6. Citometria de fluxo

As análises das alterações provocadas pelos análogos produzidos sobre as células brancas do sangue (leucócitos) foram realizadas em contador hematológico CellDyn 3700 (Abbot). Esta tecnologia analisa os leucócitos em dois canais separados, WOC (óptico) e WIC (impedância).

4.6.1. Preparação do sangue total

Um volume de 8 mL de sangue tipo O⁺ foi colhido em tubo com EDTA. Este sangue passou por três lavagens sucessivas com solução salina fisiológica (marca Fresenius), sendo que após cada lavagem era realizada uma centrifugação a 15.887 g por 5 min. Após cada etapa de lavagem e centrifugação a fase plasmática era removida, e o volume final completado com solução salina fisiológica, de modo que ao final das três lavagens fosse mantido o volume inicial de 8 mL. A fase plasmática foi removida com o propósito de serem retirados possíveis fatores que interferissem com a atividade do peptídeo, e conseqüentemente seus efeitos sobre as linhagens celulares.

4.6.2. Preparo das suspensões dos peptídeos AH_1 e AH_2 a 64 µM em sangue total

Alíquotas dos peptídeos AH_1 e AH_2 foram dissolvidas separadamente em 200 µL de solução de NaCl 0,9% (p/v), Na⁺ 154 mEq/L; Cl⁻ 154 mEq/L, osmolaridade 308 mOsm/L, pH 4,5 a 7,0 (solução fisiológica - Fresenius). Um volume de 1,9 mL de sangue total O⁺ lavado com a solução fisiológica foi adicionado aos 200 µL de solução contendo cada um dos peptídeos, perfazendo assim um volume final de 2,1 mL de solução destes (AH_2 e AH_1) na concentração final de 64 µM.

Triplicatas de 200 µL destas suspensões foram coletadas imediatamente após o preparo da suspensão (T 0), após 30 min (T 30') e após 120 min (T 120') de incubação e analisadas no CellDyn 3700 (Analisador Hematológico Automatizado por Citometria de Fluxo, Abbott), obtendo-se assim a contagem total e diferencial das células brancas (leucócitos).

4.6.3. Preparo dos controles negativo e positivo

O controle negativo foi preparado juntando-se 1,9 mL de sangue total lavado com solução fisiológica a 200 µL de solução fisiológica. O controle positivo foi preparado juntando-se 1,9 mL de sangue total lavado com solução fisiológica, adicionado de 200 µL de solução de Triton X-100 (20 µL de Triton X-100 10% (v/v) mais 180 µL de solução salina fisiológica).

4.7. Ensaio antimicrobianos

4.7.1. Ensaio antibacterianos

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, e cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* (KPC) obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Brasília (tabela 3), foram cultivadas em 5 mL de meio Mueller-Hinton fresco sob agitação a 37°C até a densidade óptica igual a 1 em 595 nm. As bactérias, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas. Alíquotas de 50 µL de diluições seriadas de cada peptídeo puro, ressuspendidas em água Milli-Q estéril, feitas a partir de uma solução-estoque de 256 µM esterilizada por filtração em filtro Millex GV 0,22 µm, foram incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo aproximadamente de 2 a 7×10^5 CFUs e incubadas por 22 h a 37°C em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato). Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm com uma leitora de placas (Multiskan[®]FC, Thermo Scientific, EUA).

4.7.2. Ensaio com leveduras

Cepas ATCC de *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) (tabela 3), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do LACEN – DF, foram cultivadas em Ágar Sabouraud dextrose (MicroMed), sendo executadas passagens (repiques) para assegurar sua pureza e viabilidade.

O inóculo foi preparado a partir de colônias frescas de *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* crescidas em ágar Sabouraud após 24 horas em 35°C, as quais foram suspensas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, HIMEDIA). Estas cepas foram cultivadas em 5 mL de meio BHI fresco sob agitação a 35°C até a densidade óptica igual a 1 em 595 nm. As leveduras, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção 1:100. Uma alíquota de 50 µL desta suspensão de levedura a 1:100 (contendo aproximadamente 2×10^3 CFUs) foi incubada a 35°C com 50 µL de cada análogo ressuspendido em água Milli-Q estéril, em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato). A partir de uma solução de peptídeo a 256 µM foi realizada a diluição seriada. As concentrações dos peptídeos de interesse variaram de 128 µM a 0,0625 µM. Foi adicionado em cada poço da microplaca 50 µL do inóculo contendo aproximadamente 2×10^3 CFUs, ficando cada poço com volume final de 100 µL. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões das leveduras. A concentração final do inóculo nos poços contendo 100 µL da suspensão de células foi de aproximadamente 2×10^4 por mL. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 35°C, com leitura de absorbância em 595 nm após 24 horas de incubação em leitora de placas (Multiskan[®]FC, Thermo Scientific, USA). A concentração inibitória mínima (CIM) para cada análogo foi assumida como sendo a menor concentração onde não houve crescimento detectável espectrofotometricamente.

4.7.3. Ensaios com micobactérias

Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra cedidas pelo Laboratório de Micobactérias do LACEN – DF (tabela 3), recém-cultivadas em meio Lowestein Jensen inclinado, foram transferidas para um tubo contendo 3 a 4 ml de água destilada estéril, com 6 a 9 pérolas de vidro esterilizadas. Os tubos foram vigorosamente agitados em um vórtex e deixados sedimentar por 5 min. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos estéreis. Estes sobrenadantes foram ajustados com água destilada estéril para igualar a densidade da escala padrão 1 de McFarland. Essa suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* na escala 1 de McFarland foi diluída a 1:25 em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10 % de ácido oléico, albumina, dextrose e catalase (OADC) e 5% de glicerol, e foi utilizada como inóculo padrão no

método de microdiluição em caldo.

Este método de microdiluição em caldo foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços, conforme descrito por (Ribeiro *et al.*, 2004). Uma alíquota de 100 μL desta suspensão de micobactérias a 1:25 (contendo aproximadamente $1,2 \times 10^6$ CFUs) foi inoculada em cada poço da placa de microtitulação estéril (96 poços, fundo chato). Cada poço da microplaca já continha 100 μL de meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% de ácido oléico, albumina, dextrose e catalase (OADC) e 5% de glicerol, mais determinada concentração do peptídeo testado. O volume final nos poços, após a adição do inóculo, foi de 200 μL .

Um volume de 200 μL da solução do peptídeo a 256 μM foi adicionado à primeira coluna de poços da microplaca, a partir do qual foram retirados 100 μL e realizada diluição seriada. A concentração do peptídeo variou de 64 μM a 0,0625 μM . Cada poço apresentou um volume final de 200 μL . Os poços de controle positivo de crescimento continham 100 μL de meio Middlebrook 7H9 estéril, suplementado com 10% de OADC e 5% de glicerol, isento de peptídeo, e mais 100 μL da suspensão a 1:25. A concentração final do inóculo nos poços de 200 μL foi de aproximadamente 6×10^6 CFU/mL. Os poços de controle negativo, para ausência de crescimento, continham 200 μL deste mesmo meio, porém sem a adição de suspensão de micobactérias.

Após a inoculação, as placas foram seladas, colocadas em sacos plásticos e incubadas a 37°C em estufas com hidratação, onde permaneceram por 7 dias.

Após 5 dias de incubação, 20 μL da solução de resazurina Sigma-Aldrich® 0,01% (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionados apenas em cada poço de controle da placa, as quais foram incubadas durante 24 horas a 37°C para o desenvolvimento de cor. Se a cor foi desenvolvida conforme o esperado (rosa para controle de crescimento do microrganismo e azul para o controle de esterilidade), 20 μL da solução de resazurina eram adicionados a cada poço contendo os peptídeos em diferentes concentrações. Após 24 h, a mudança de cor de azul para cor-de-rosa indicava a redução da resazurina e, por conseguinte, o crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração de peptídeo que impediu a redução da resazurina e, por conseguinte, uma mudança de cor de azul para rosa.

4.7.4 Ensaio *Checkerboard*

Os peptídeos antimicrobianos possuem uma capacidade fortalecedora, ou seja, atuam sinergicamente com outros antibióticos clássicos. Se um isolado bacteriano é resistente a um determinado antibiótico, maior será a atividade fortalecedora por um peptídeo catiônico apropriado. Os PAMs têm a habilidade de servir como compostos anti-resistência (Hancock & Chapple, 1997).

Os efeitos sinérgicos da combinação dos peptídeos AH_1 e AH_2 com polimixina B sobre um isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente foram analisados através do Método *Checkerboard*, um ensaio microdilucional que permite avaliar o comportamento de dois antimicrobianos combinados em diferentes concentrações frente a diversos microrganismos. Esse método permite avaliar se a combinação de determinadas concentrações de dois antimicrobianos apresenta-se como sinérgica, indiferente ou antagonista, após uma comparação com a atividade antimicrobiana de cada droga isoladamente. A interpretação do efeito resultante da combinação entre as drogas foi feita por meio de um cálculo que leva em conta o somatório dos índices de concentração inibitória fracional (\sum CIF) (Orhan *et al.*, 2005; Karaoglan *et al.*, 2013).

$$\text{CIF A} = \text{CIF A combinado} / \text{CIF de A sozinho}$$

$$\text{CIF B} = \text{CIF B combinado} / \text{CIF de B sozinho}$$

$$\sum \text{CIF} = \text{CIF A} + \text{CIF B}$$

\sum CIF $\leq 0,5$ está relacionado com efeito sinérgico entre os dois antimicrobianos.

\sum CIF $\leq 0,75$ temos um efeito parcialmente sinérgico.

\sum CIF $> 4,0$ está relacionado a antagonismo.

\sum CIF entre 0,75 e 4 há indiferença entre os efeitos.

Alguns autores adotam índices ligeiramente diferentes, considerando a interação como sinérgica se CIF $\leq 0,5$; aditiva se CIF $> 0,5$ e $\leq 1,0$; indiferente se CIF $> 1,0$ e $\leq 2,0$; e antagonista se CIF $> 2,0$ (Kumar *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012).

A suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* foi cultivada em 5 mL de meio Mueller-Hinton fresco sob agitação a 37°C até a densidade óptica igual a 1 em 595 nm. Essa suspensão bacteriana, em fase logarítmica, foi diluída no mesmo meio de cultura na proporção 1:50. Foram inoculados 100 μ L de solução de polimixina B a 256 μ g/mL em cada poço da coluna 12, da linha A até F. Foi realizada uma diluição

dobrada decrescente da coluna 12 até a coluna 2. Deve ser observado que a coluna 1 contém apenas os peptídeos AH_1 ou AH_2, partindo de uma concentração de 128 μM em A1 e chegando a 2 μM em F1. Aos demais poços da coluna A são inoculados 50 μL do peptídeo testado na concentração de 128 μM . Uma diluição dobrada da linha A até a linha F foi realizada, permitindo obter assim várias combinações entre os peptídeos sintéticos e a Polimixina B. Após as diluições sucessivas, alíquotas de 50 μL da suspensão bacteriana (contendo aproximadamente de 2 a 7×10^5 CFUs) foram posteriormente inoculadas em cada poço das microplacas estéreis (96 poços, fundo chato) as quais foram incubadas por 22 h a 37°C. Os peptídeos puros, ressuspendidos em água Milli-Q estéril, foram armazenados em solução-estoque de 128 μM esterilizada por filtração em filtro Millex GV 0,22 μm . Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm com uma leitora de placas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, EUA).

As figuras 37 e 38 apresentam as diferentes combinações de concentração entre os peptídeos AH_1 e AH_2 junto com a polimixina B em placas de microtitulação de 96 poços. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 3 – Microrganismos e meios de cultura utilizados na determinação das CIMs.

	Bactéria	Fonte	Meio de cultura
Gram-positivos	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	LT – UnB	Mueller Hinton
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	LT – UnB	Mueller Hinton
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	LM/HUB – UnB	Mueller Hinton
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LT – UnB	Mueller Hinton
	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 27736	LT – UnB	Mueller Hinton
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	LM/HUB – UnB	Mueller Hinton
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	LT – UnB	Mueller Hinton
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	LT – UnB	Mueller Hinton
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	LM/HUB–UnB	Mueller Hinton
Leveduras	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	Lacen – DF	Brain Heart Infusion
	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Lacen – DF	Brain Heart Infusion
	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Lacen – DF	Brain Heart Infusion
Micobactérias	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Lacen – DF	Middlebrook 7H9 suplementado com OADC

LT – UnB: Laboratório de Toxinologia – Universidade de Brasília; LM/HUB – UnB: Laboratório de Microbiologia/Hospital Universitário de Brasília – Universidade de Brasília; Lacen – DF: Laboratório Central de Saúde Pública – Distrito Federal; MDR: multidroga resistente; MRSA: *Staphylococcus aureus* metilicina resistente; OADC: ácido oleico, albumina, dextrose e catalase.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenho racional, síntese química e purificação dos análogos de PAMs

CONFIDENCIAL

O desenho racional de um peptídeo antimicrobiano busca superar algumas deficiências contidas no peptídeo protótipo. Considerações em relação à atividade antimicrobiana, custos de produção e resposta do hospedeiro frente ao peptídeo devem ser levados em conta. O ideal é que os peptídeos antimicrobianos sintéticos tenham o menor número de resíduos de aminoácidos capaz de demonstrar atividade antimicrobiana, bem como a capacidade de manter esta atividade em determinadas condições fisiológicas, como as encontradas em fluidos biológicos complexos sob altas concentrações fisiológicas de sal. Este menor número de resíduos representa não apenas uma vantagem econômica em relação aos custos de produção, mas também uma vantagem do que diz respeito às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de uma droga. Além disso, os peptídeos antimicrobianos devem resistir à degradação por enzimas do hospedeiro e apresentarem um espectro mais restrito de atividade, garantindo a eles uma melhor abordagem em termos de especificidade antimicrobiana.

CONFIDENCIAL

CONFIDENCIAL

CONFIDENCIAL

Alíquotas de 3,0 mg dos peptídeos brutos produzidos por síntese química automatizada foram purificadas empregando-se coluna de fase reversa C₁₈, cujos perfis cromatográficos são mostrados na figura 13.

Os perfis cromatográficos obtidos apresentaram reprodutibilidade ao longo de todas as corridas cromatográficas realizadas. Os análogos AH_1 e AH_2, objetos deste estudo, estão destacados na figura 11 (AH_2, em vermelho, com tempo de retenção em torno de 20 minutos e AH_1, em verde, com tempo de retenção em torno de 26 minutos).

CONFIDENCIAL

Figura 14 – Perfil cromatográfico do fracionamento da mistura de análogos produzidos quimicamente. Alíquotas (3 mg) liofilizadas da amostra sintética bruta foram ressuspendidas em 820 μL de 0,1% (v/v) de TFA em água e centrifugadas por 10 min a 15.887 g. O sobrenadante obtido foi filtrado em filtro de 0,22 μM e um volume de 200 μL foi injetado em uma coluna analítica C_{18} de fase reversa (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm), com eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. A linha azul representa o gradiente de acetonitrila empregado. A absorvância foi monitorada em 216 nm.

CONFIDENCIAL

5.2. Confirmação da homogeneidade das amostras por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

Os análogos purificados por RP-HPLC foram individualmente coletados, secos em Speed-Vac e ressuspensos em 0,1% (v/v) TFA em água. Uma alíquota de cada um dos análogos (1 μ L) foi aplicada em poços de uma placa de aço inoxidável junto a 1 μ L da matriz reconstituída de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 20 μ g/ μ L) e analisado em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Alemanha) cobrindo uma faixa de m/z de 500 a 4000 Da no modo refletor de íons positivos calibrado com Pepmix.

Os peptídeos AH_1 (Figura 15) e AH_2 (Figura 16) tiveram suas massas moleculares determinadas, além disso foi possível observar que tais frações se encontravam com alto grau de pureza, compatível com a realização dos testes biológicos previstos.

CONFIDENCIAL

Figura 15 – Espectro de massas do análogo AH_1 purificado por RP-HPLC em coluna de fase reversa C₁₈. Espectros obtidos após plaqueamento das amostras em placa de aço inoxidável junto a matriz de HCCA 20 μ g/ μ L. Análises realizadas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF, tendo sido utilizada a solução Peptide Mix para a calibração, sendo a faixa analisada de 500 a 4000 Da.

CONFIDENCIAL

Figura 16 – Espectro de massas do análogo AH_2 purificado por RP-HPLC em coluna de fase reversa C₁₈. Espectros obtidos após plaqueamento das amostras em placa de aço inoxidável junto a matriz de HCCA 20 µg/µL. Análises realizadas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF, tendo sido utilizada a solução Peptide Mix para a calibração, sendo a faixa analisada de 500 a 4000.

5.3. Efeitos hemolíticos dos análogos AH_1 e AH_2

Os efeitos hemolíticos dos dois análogos, AH_1 e AH_2, sobre uma suspensão de eritrócitos humanos, estão demonstrados na figura 17, que correlaciona o percentual de hemólise com a concentração do análogo em µM.

Os dois análogos sintéticos produzidos neste projeto (figura 12) apresentaram atividade hemolítica bastante diferenciada. O análogo AH_2 apresentou pouco mais de 10% de hemólise na maior concentração testada (128 µM), ao passo que o análogo AH_1 demonstrou maior poder hemolítico, com um percentual de aproximadamente 73% nesta mesma concentração. Em relação ao análogo AH_1, observamos uma acentuada queda na sua atividade hemolítica já na concentração de 8 µM (aproximadamente 6%). Esta atividade hemolítica diminui consideravelmente, até não ser detectada na concentração de 0,125 µM. O análogo AH_2 mantém uma atividade hemolítica de aproximadamente 5% nas faixas de concentração de 16 a 0,5 µM, com pouco menos de 3% de hemólise causada na concentração de 0,25 µM.

CONFIDENCIAL

O peptídeo AH_1, o mais hemolítico dos dois análogos aqui apresentados, promoveu 38% de hemólise na concentração de 64 µM.

A atividade hemolítica é uma propriedade que limita o uso clínico de um peptídeo antimicrobiano. Logo, com o intuito de que estes peptídeos possam se constituir em uma possível opção terapêutica aos antibióticos clássicos e convencionais, mudanças estruturais em peptídeos protótipos, como aqui proposto, devem ser realizadas, gerando produtos mais seguros e eficientes.

Alguns estudos demonstram melhora na atividade dos análogos quando mudanças estruturais pontuais são realizadas. Chen e colaboradores (2005) observaram uma grande redução na atividade hemolítica dos análogos sintetizados quando L-aminoácidos da porção hidrofóbica foram substituídos por D-aminoácidos, atribuindo-se esta redução ao fato de que os análogos D-diastereoisômeros exibiram menor capacidade de auto-agregação que os análogos L-diastereoisômeros. Nesse mesmo estudo, foi detectada grande redução nas atividades hemolíticas dos análogos quando resíduos hidrofóbicos da face apolar foram substituídos por resíduos menos hidrofóbicos.

Mudanças na estrutura dos peptídeos, principalmente visando reduzir a hidrofobicidade, podem acarretar compostos com atividade antimicrobiana melhorada ou mantida, com perda ou redução da atividade hemolítica. Isto foi comprovado quando comparamos os resultados aqui obtidos com os análogos AH_1 e AH_2, com os resultados de nossos trabalhos anteriores com outros dois análogos, os peptídeos sintéticos Ha1_1883 e Ha1_1996, que apresentaram quase 100% de hemólise na concentração de apenas 8 μ M (dados não apresentados).

Em seus estudos buscando estratégias para tornar os peptídeos antimicrobianos naturais em boas opções terapêuticas, Conlon e colaboradores (2007) demonstraram que aumentos na hidrofobicidade, helicidade e anfipaticidade promovem uma atividade hemolítica com perda de seletividade sobre os microrganismos.

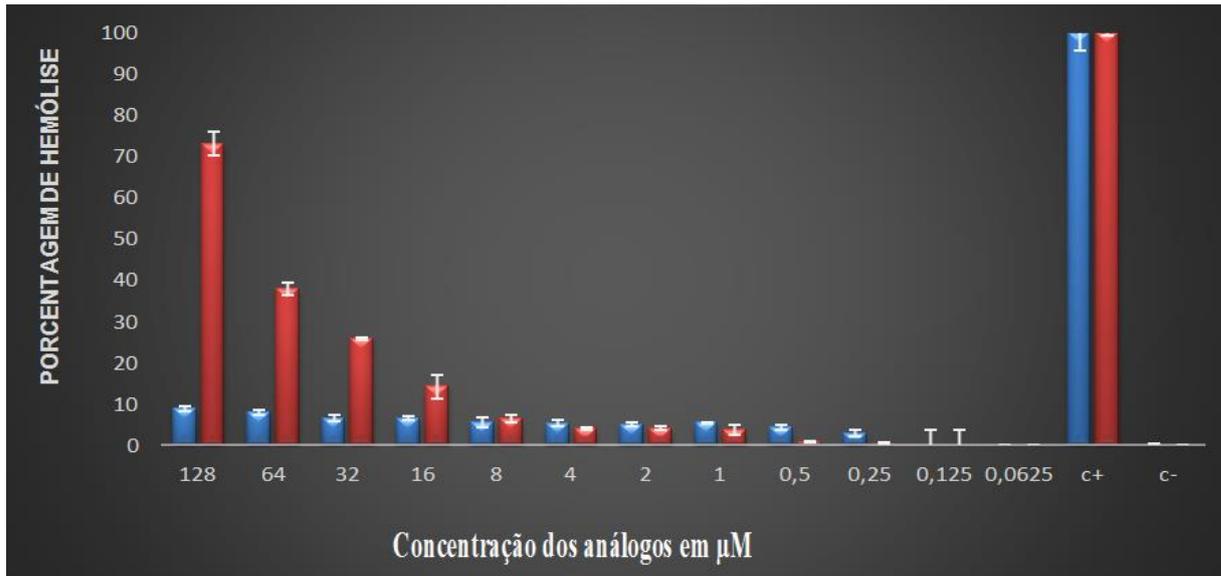


Figura 17 – Porcentagem de hemólise de eritrócitos humanos (O+) pelos análogos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em função da concentração de peptídeos empregada. Como controle da ausência de hemólise (C-), a suspensão de eritrócitos foi incubada com tampão Tris-salina (Tris-HCl 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e CaCl₂ 0,01 M) e como controle hemolítico (C+) os eritrócitos foram lisados com a adição de uma solução de TritonX-100 na concentração final de 0,1% (v/v). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

5.4 Efeitos citolíticos dos análogos AH_2 e AH_1 sobre leucócitos totais

Os valores da contagem global dos leucócitos em sangue total nos tempos 0 (instantâneo), 30 e 120 minutos após ação dos peptídeos AH_2 e AH_1 na concentração de 64 μM são mostrados na tabela 4. Os dados gráficos destas contagens são mostrados na figura 15.

Tabela 4. Contagem global dos leucócitos em sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos após ação dos peptídeos AH_1 e AH_2.

Leucometria (leucócitos/mm ³)			
Tempo	AH_1	AH_2	Salina
Tempo 0	4.758	6.420	7.185
Tempo 30'	4.581	6.291	7.116
Tempo 120'	4.295	6.114	6.951

Observamos que a contagem de leucócitos no tempo T 0, ou seja, imediatamente após a adição de solução salina fisiológica (controle negativo), foi de aproximadamente 7.185 leucócitos/mm³. A contagem destes leucócitos totais

apresentou uma redução neste mesmo tempo quando o sangue foi submetido a ação do peptídeo AH_2, com valor aproximado de 6.420 leucócitos/mm³. Uma redução mais acentuada foi observada quando o sangue foi exposto a ação do peptídeo AH_1, onde a contagem neste mesmo tempo T0 ficou em torno de 4.758 leucócitos/mm³, demonstrando um maior poder de destruição sobre os leucócitos que o seu análogo, o peptídeo AH_2. Com o objetivo de que fossem eliminados possíveis interferentes presentes no plasma que pudessem impedir a atividade dos peptídeos testados, promovemos a retirada do plasma do sangue empregado nestas análises, substituindo o mesmo volume retirado por solução salina fisiológica.

A leucometria global encontrada no tempo T30' em relação ao controle negativo foi de aproximadamente 7.116 leucócitos/mm³. Os peptídeos AH_2 e AH_1 apresentaram contagens aproximadas de, respectivamente, 6.291 e 4.581 leucócitos/mm³. Notamos que a atividade citolítica do análogo AH_1 permaneceu mais acentuada que aquela encontrada em relação ao peptídeo AH_2. Na contagem realizada no último tempo de incubação analisado (T 120 minutos), a leucometria global da amostra de controle negativo ficou em torno de 6.951 leucócitos/mm³. Neste mesmo tempo, as contagens dos leucócitos totais nas amostras submetidas aos efeitos dos análogos AH_2 e AH_1 foram respectivamente de 6.114 e 4.295 leucócitos/mm³.

As leucometrias encontradas com o controle positivo (Triton X-100) nos tempos T0', T30' e T120' foram, respectivamente, 251, 125 e 79 leucócitos/mm³.

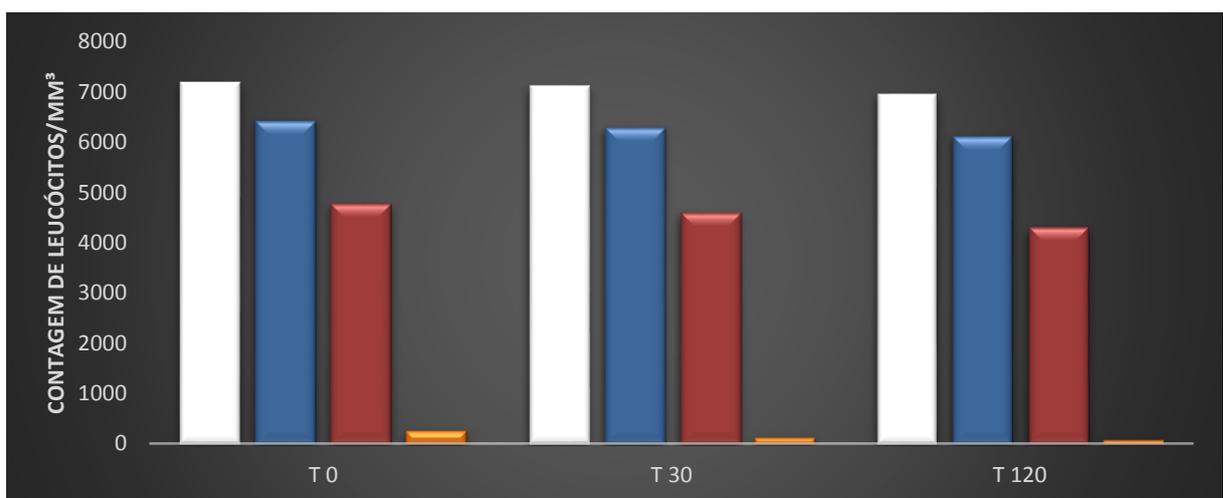


Figura 18 – Análise por citometria de fluxo mostrando a contagem global dos leucócitos em sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) na concentração de 64 μM, comparada aos controles negativo (solução fisiológica, representado em branco) e positivo (Triton X-100 10% (v/v), representado em laranja).

Foram notadas diferenças quanto a atividade citolítica dos análogos AH_2 e AH_1 sobre os leucócitos, conforme visto na figura 18. O efeito citolítico mais evidenciado pelo análogo AH_1 sobre os leucócitos foi mantido nos três tempos de incubação (tempos 0, 30 min e 120 min).

Da mesma forma que os ensaios hemolíticos demonstraram anteriormente maior poder de hemólise para o análogo AH_1, as análises de atividade citolítica também deixaram claro o maior poder de destruição dos leucócitos por este análogo quando comparado ao peptídeo AH_2. Prates e colaboradores (2004) realizaram estudos com o peptídeo HSP1 buscando avaliar a atividade citolítica deste e não encontraram reduções significativas na contagem dos leucócitos totais.



Figura 19 – Porcentagem de destruição dos leucócitos totais após exposição do sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) na concentração de 64 μ M, comparada com o controle positivo (Triton X-100 10% (v/v), barras de cor branca).

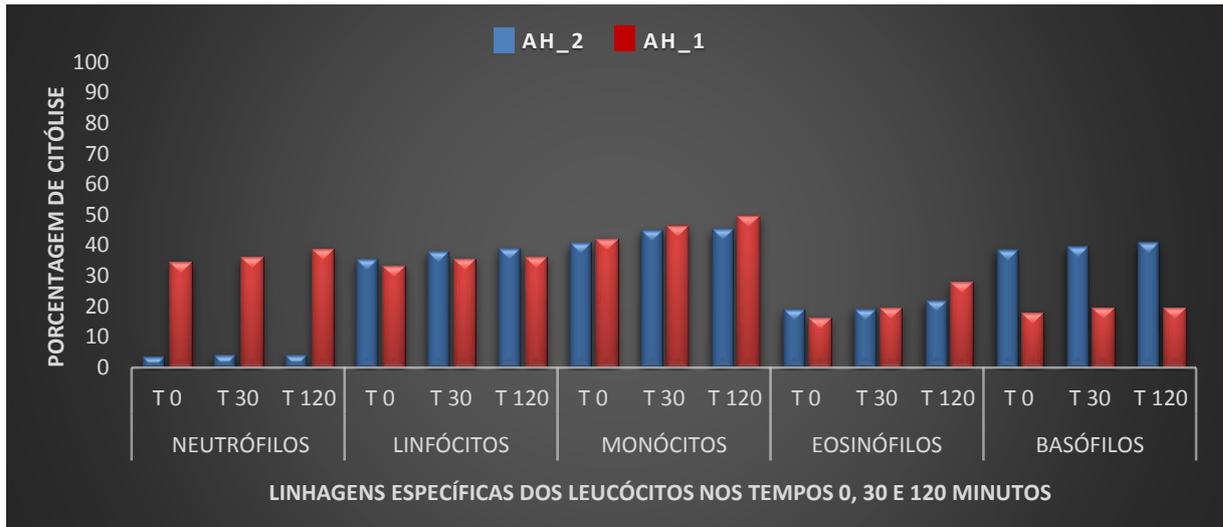


Figura 20 – Análise por citometria de fluxo mostrando a porcentagem de destruição das diferentes linhagens dos leucócitos em sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) na concentração de 64 μ M.



Figura 21 – Análise por citometria de fluxo evidenciando os efeitos do peptídeo AH_2 na concentração de 64 μ M sobre linhagens específicas de leucócitos nos tempos 0, 30 e 120 minutos de incubação.

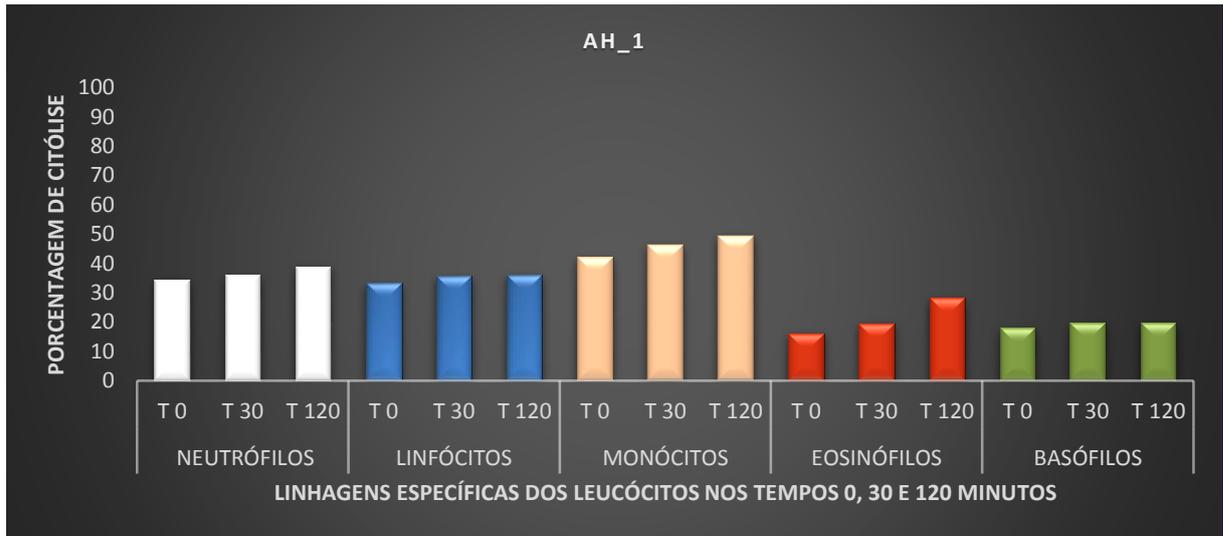


Figura 22 – Análise por citometria de fluxo evidenciando os efeitos do peptídeo AH_1 na concentração de 64 μ M sobre linhagens específicas de leucócitos nos tempos 0, 30 e 120 minutos de incubação.

A figura 20 apresenta uma análise comparativa da atividade dos análogos AH_2 e AH_1 sobre as linhagens diferenciais dos leucócitos, correlacionando a porcentagem de destruição de cada linhagem dos leucócitos após a exposição do sangue aos dois análogos na concentração de 64 μ M nos tempos 0, 30 e 120 minutos. Os percentuais de atividade citolítica expressos são calculados sempre em relação a contagem de leucócitos obtida quando a amostra sanguínea é submetida a ação de salina fisiológica (controle negativo).

A maior atividade citolítica do análogo AH_1 está bem evidenciada na figura 17, onde este análogo tem seus percentuais de atividade citolítica nos três tempos de exposição representados pelas barras vermelhas do gráfico.

Em relação aos neutrófilos, o análogo AH_2 apresentou atividade citolítica na faixa de 4% nos 3 tempos avaliados. A atividade lítica deste análogo sobre os neutrófilos ficou bem abaixo daquela encontrada com o análogo AH_1, onde os percentuais de destruição foram de aproximadamente 35% em T0, 36% em T30 e 38,8% em T120. A elevada atividade citolítica do análogo AH_1 sobre a linhagem dos neutrófilos explica o fato deste análogo apresentar um maior dano sobre a leucometria global em comparação ao análogo AH_2, já que os neutrófilos correspondem a aproximadamente 75% dos leucócitos neste sangue analisado.

As diferenças nas atividades citolíticas destes dois análogos sobre as linhagens dos linfócitos foram pouco expressivas. O análogo AH_2 apresentou atividade citolítica sobre os linfócitos pouco superior ao análogo AH_1. Os percentuais de

citólise do análogo AH_2 nos tempos T0, T30 e T120 variaram de 35,4% a 38,9%, frente a uma variação na faixa de 33% a 36% encontrada em relação ao análogo AH_1.

As atividades citolíticas dos análogos AH_2 e AH_1 sobre as linhagens dos monócitos foram muito semelhantes, variando de um percentual de aproximadamente 42% em T0, e chegando a um percentual de citólise entre 45% e 49% em T120, respectivamente. Como a linhagem dos monócitos representa uma pequena porcentagem da população de leucócitos nesta amostra avaliada, os efeitos dos análogos AH_2 e AH_1 sobre esta linhagem não apresentam grande influência sobre o percentual de atividade citolítica destes análogos no que diz respeito a redução da leucometria global.

A análise dos efeitos citolíticos sobre a linhagem dos eosinófilos demonstrou uma atividade citolítica semelhante entre os dois análogos AH_2 e AH_1, com percentuais de destruição em média na faixa de 19%.

Na avaliação do comportamento destes dois análogos frente a linhagem dos basófilos, observamos uma atividade citolítica do análogo AH_2 variando de 38 a 40% entre os tempos T0, T30 e T120. O análogo AH_1 apresentou uma atividade citolítica mais moderada, com percentuais de citólise variando entre 17% e 19% nos 3 tempos avaliados.

Os resultados das análises por citometria de fluxo evidenciando os efeitos dos peptídeos AH_2 e AH_1 sobre linhagens específicas de leucócitos após 0, 30 e 120 minutos de incubação são mostrados nas figuras 21 e 22, respectivamente.

Os maiores valores de percentuais de destruição do análogo AH_1 sobre os leucócitos totais (leucometria global) em comparação ao análogo AH_2, são explicados pelo fato da população mais numerosa de leucócitos desta amostra, os neutrófilos, ser a mais intensamente afetada por este peptídeo.

As figuras 23, 24 e 25 apresentam os scatterplots gerados pelo contador hematológico Cell-Dyn 3700, mostrando as atividades citolíticas dos análogos AH_2 e AH_1 sobre as diferentes linhagens dos leucócitos nos tempos T0, T30 E T120. Foram estabelecidas contagens diferenciais dos leucócitos a partir de uma comparação entre o tamanho (dispersão 90°) e a complexidade (dispersão 10°) das células analisadas. A análise dos leucócitos foi realizada em dois canais, um óptico (WOC) e um por impedância (WIC). Através do canal óptico, um feixe de laser atua sobre o fluxo celular e o núcleo das células promove uma dispersão da luz em quatro

ângulos diferentes (0°, para avaliar o tamanho da célula; 10°, que avalia a complexidade celular; 90° polarizada, que mede a superfície celular e a estrutura interna ou lobularidade; e 90° despolarizada, que mede certos tipos de granularidades celulares). Por meio da impedância elétrica, os núcleos dos leucócitos são quantificados e medidos à medida que os leucócitos fluem por um orifício de abertura conhecida e promovem mudanças transitórias na resistência entre dois eletrodos. A amplitude de cada pulso é proporcional ao volume da partícula que o produziu.

Analisando a figura 23, que ilustra os efeitos citolíticos causados pelos análogos AH_2 e AH_1, solução salina e Triton no tempo T0, podemos observar a forte atividade lítica exercida pelo Triton, o controle positivo usado neste ensaio. Há uma redução drástica nos pontos coloridos (*dot plots*) da figura, o que corresponde à destruição de todas as diferentes linhagens de leucócitos. Na figura que corresponde ao análogo AH_2 observamos uma região amarela mais densa, quando comparada com aquela encontrada na figura do análogo AH_1. Esta região amarela corresponde à população de neutrófilos, que como visto anteriormente é mais afetada pela ação citolítica do análogo AH_1. Cada ponto (*dot plot*) nos gráficos das figuras corresponde a um único tipo celular, plotado à medida que passa pelo detector celular.

Apesar do análogo AH_2 apresentar um percentual citolítico sobre linfócitos pouco superior aquele do análogo AH_1 no tempo T0 (35,4% frente a 33,2%), a região azul mais densa encontrada nesta figura 20 com o análogo AH_1 demonstra a menor atividade citolítica deste em comparação ao análogo AH_2, visto que os linfócitos estão plotados nos gráficos na cor azul. A região em verde, correspondente a linhagem dos eosinófilos, aparece distribuída de forma proporcional entre os dois análogos, demonstrando que ambos têm atividade citolítica semelhante sobre estas células. Nesta figura 20 observamos também uma região branca mais densa no gráfico do análogo AH_1, o que demonstra que ele apresenta menor atividade citolítica sobre esta linhagem de leucócitos que seu análogo AH_2.

Na figura 24 são apresentados os gráficos que mostram a atividade dos análogos AH_2 e AH_1, solução salina e Triton sobre as diferentes linhagens de leucócitos no tempo T30 (30 minutos). A região amarela mais densa vista no gráfico do análogo AH_2 ilustra de forma bem clara o baixo percentual destrutivo (4,22%) deste análogo sobre a linhagem de neutrófilos. De maneira oposta, no gráfico relacionado ao análogo AH_1, a população de neutrófilos, representada pelos pontos amarelos plotados no gráfico, sofre forte efeito destrutivo (36%). Como as populações

de eosinófilos e basófilos são pouco numerosas, os efeitos causados pelos análogos sobre estas linhagens não são facilmente observados pela análise visual dos gráficos.

Os efeitos dos análogos AH_2 e AH_1, solução salina (controle negativo) e Triton (controle positivo) sobre o sangue total no tempo T120 são ilustrados nos gráficos da figura 25. Como demonstrado nos gráficos anteriores, a atividade citolítica do análogo AH_2 sobre a população de neutrófilos é mais branda que a atividade apresentada pelo análogo AH_1, conforme região amarela mais densamente apresentada no gráfico deste análogo AH_2. Uma maior população de linfócitos pode ser observada nesta figura 22 em relação ao análogo AH_1, onde a região azul mais densa é justificada pelo menor poder de lise deste análogo sobre linfócitos quando comparado ao análogo AH_2. Em relação aos efeitos causados por estes dois análogos sobre a linhagem dos basófilos, foi demonstrado que o análogo AH_2 apresentou uma atividade citolítica de aproximadamente 40%, frente a um percentual de 19% encontrado com o análogo AH_1.

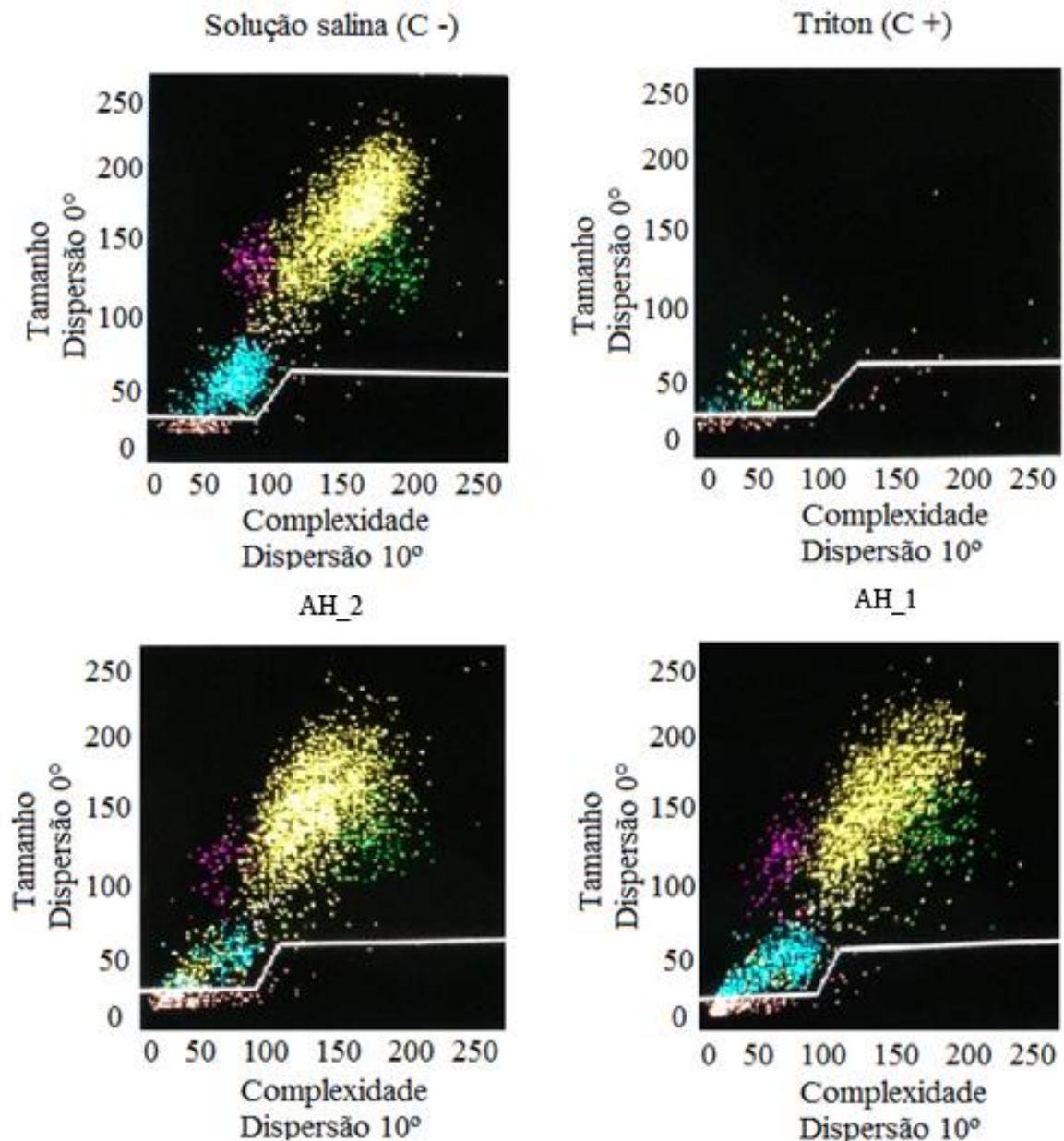


Figura 23 – Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos AH_2 na concentração de 64 μ M, AH_1 na concentração de 64 μ M, salina (controle negativo) e Triton X-100 10% (controle positivo) no tempo T0'. Em amarelo, os neutrófilos; em azul, os linfócitos; os monócitos são representados em roxo e os eosinófilos estão em verde. As raras células representadas na cor branca são os basófilos. Cada ponto nos gráficos corresponde a um único tipo celular, plotado à medida que passa pelo detector celular. As análises foram realizadas em contador hematológico automatizado Cell-Dyn 3700, Marca Abbott.

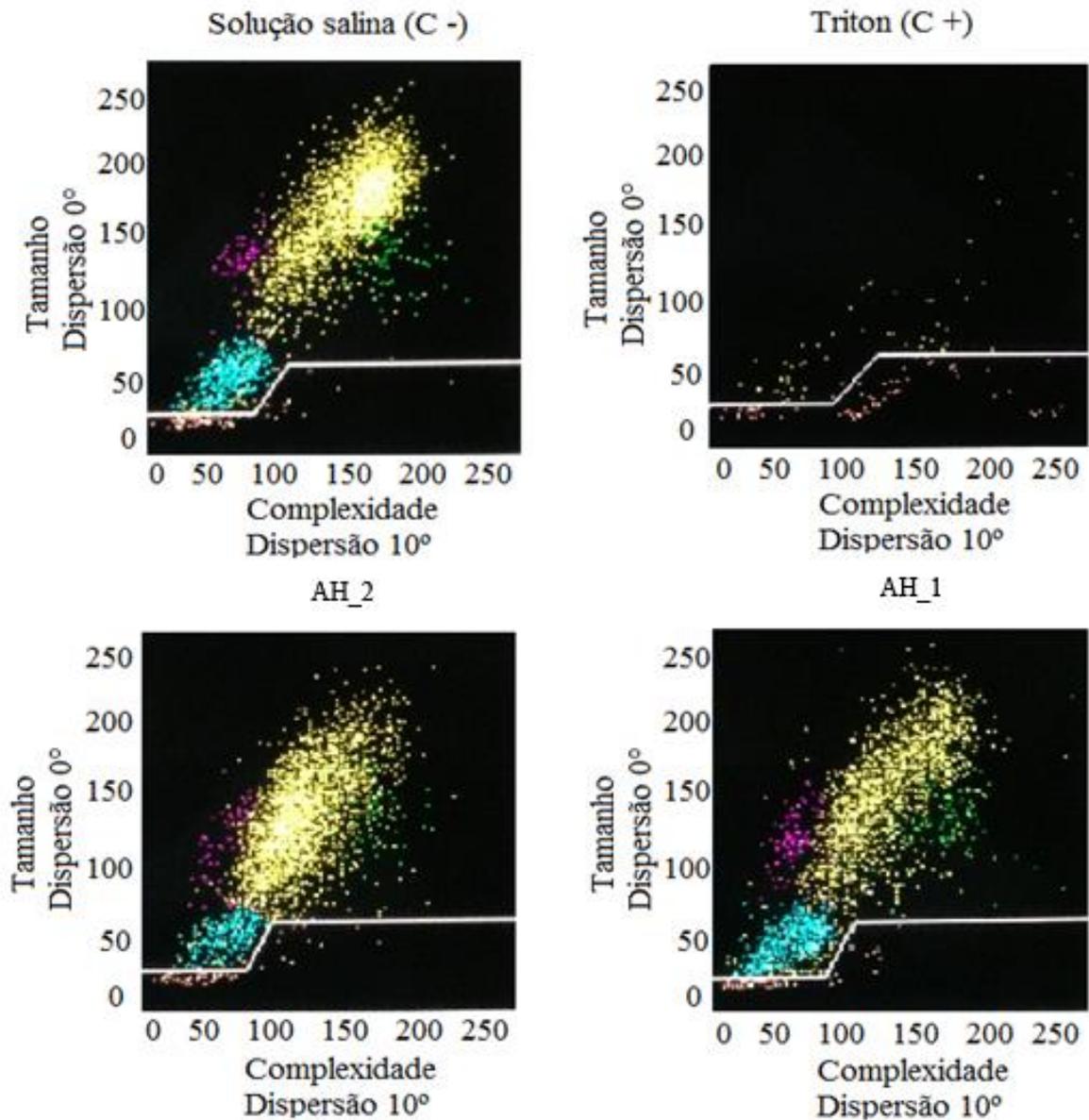


Figura 24 – Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos AH_2 na concentração de 64 μM (1), AH_1 na concentração de 64 μM (2), salina (controle negativo) e Triton X-100 10% (controle positivo) no tempo T 30'. Em amarelo, os neutrófilos; em azul, os linfócitos; os monócitos são representados em roxo e os eosinófilos estão em verde. As raras células representadas na cor branca são os basófilos. Cada ponto nos gráficos corresponde a um único tipo celular, plotado à medida que passa pelo detector celular. As análises foram realizadas em contador hematológico automatizado Cell-Dyn 3700, Marca Abbott.

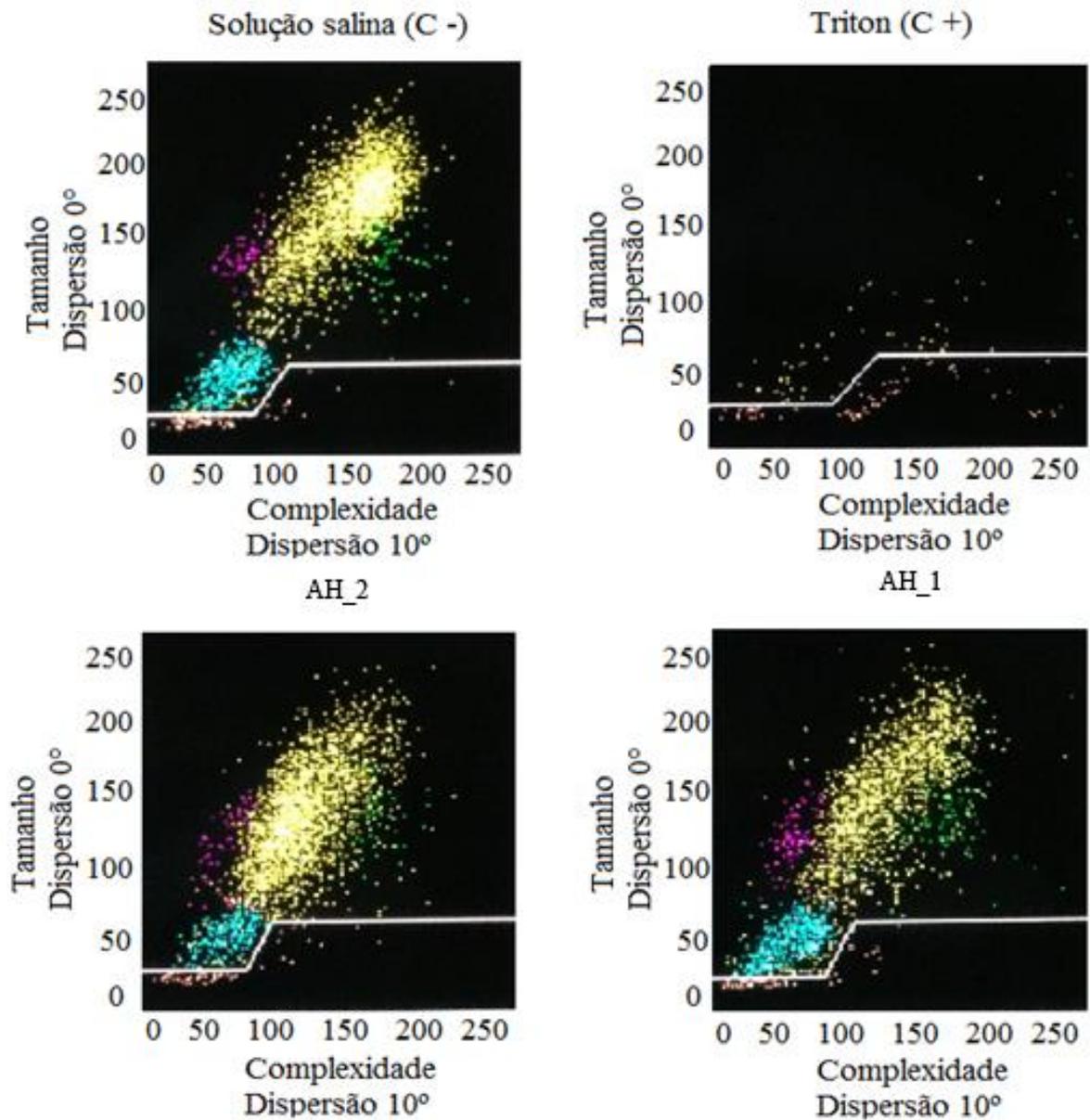


Figura 25 – Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos AH_2 na concentração de 64 μ M (1), AH_1 na concentração de 64 μ M (2), salina (controle negativo) e Triton X-100 10% (controle positivo) no tempo T 120'. Em amarelo, os neutrófilos; em azul, os linfócitos; os monócitos são representados em roxo e os eosinófilos estão em verde. As raras células representadas na cor branca são os basófilos. Cada ponto nos gráficos corresponde a um único tipo celular, plotado à medida que passa pelo detector celular. As análises foram realizadas em contador hematológico automatizado Cell-Dyn 3700, Marca Abbott.

5.5 Efeitos antimicrobianos dos análogos AH_1 e AH_2

Os peptídeos análogos sintéticos AH_1 e AH_2 tiveram suas atividades antimicrobianas avaliadas frente às principais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas envolvidas em infecções. Estes análogos tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada também em relação às principais espécies de *Candida*, bem como frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis*. Os microrganismos empregados nestes ensaios foram: bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis*), bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*), leveduras (*Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*), micobactérias (cepa H37Ra) e contra as bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). Foi empregada a técnica de microdiluição, uma metodologia quantitativa que permite obter a concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo capaz de inibir o crescimento do microrganismo testado. Em virtude de diferentes variáveis envolvidas nos ensaios, como propriedades químicas diferentes entre os dois análogos e composição química diversificada das membranas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e micobactérias, foram observados comportamentos bastante diversificados dos peptídeos frente aos microrganismos em questão. O comportamento também diferenciado da atividade destes análogos entre as membranas bacterianas e de células de mamíferos é justificado em razão das diferentes propriedades físicas e químicas dos lipídeos presentes nestas membranas.

5.5.1 Ensaios antibacterianos com cepas ATCC Gram-positivas

A atividade antimicrobiana dos análogos AH_1 e AH_2 frente as bactérias Gram-positivas foi determinada em ensaios com cepas ATCC dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

A figura 26 ilustra o percentual de inibição sobre o crescimento do *Staphylococcus aureus* causada por estes dois análogos, com concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Conforme observado na tabela 5, o peptídeo AH_1 apresentou uma melhor atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* que seu análogo AH_2. A concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo AH_1 foi de 8 μM , melhor que a do seu análogo AH_2, cuja CIM foi de 32 μM . A partir da concentração de 8 μM , o análogo AH_1 passou a apresentar baixo efeito inibitório

sobre o crescimento do *Staphylococcus aureus*, conforme visto na concentração de 0,25 μM , onde apresentou inibição de aproximadamente 12% sobre o crescimento deste microrganismo. Já o análogo AH_2 teve atividade notadamente evidente apenas até a concentração de 32 μM (CIM). Portanto, o análogo AH_1 apresentou um efeito antibacteriano frente ao *Staphylococcus aureus* superior ao seu análogo AH_2.

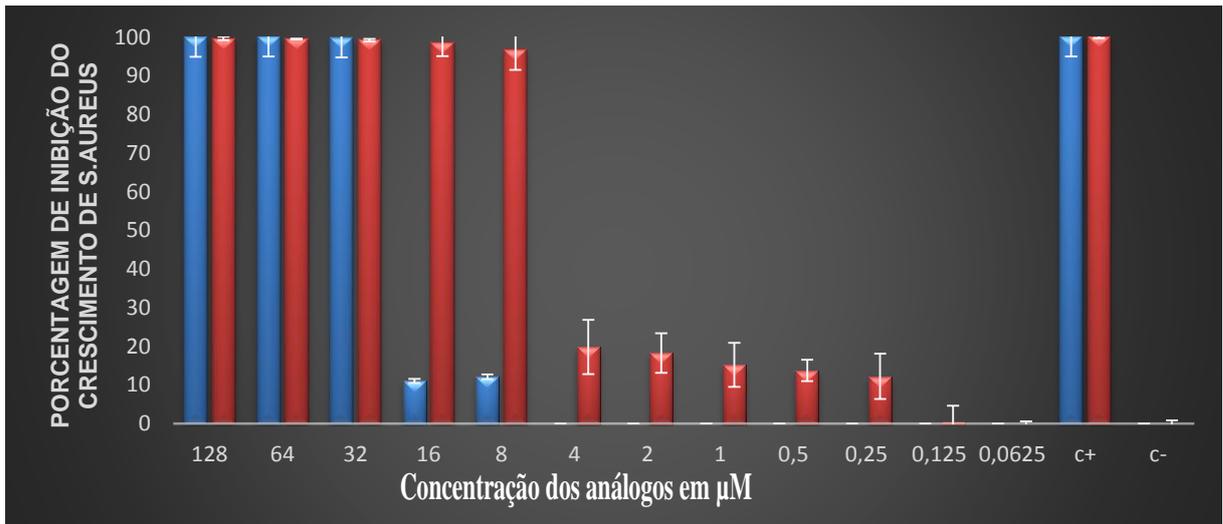


Figura 26 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A porcentagem de inibição dos análogos AH_1 e AH_2 sobre o crescimento da bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis* está demonstrada na figura 27. Observamos um comportamento bastante semelhante entre os dois análogos, uma vez que ambos apresentaram CIM de 64 μM .

CONFIDENCIAL

Conlon e colaboradores (2007) também obtiveram uma melhor CIM em seus ensaios antibacterianos do peptídeo sintético Temporina-1 Dra frente a *E. faecalis*.

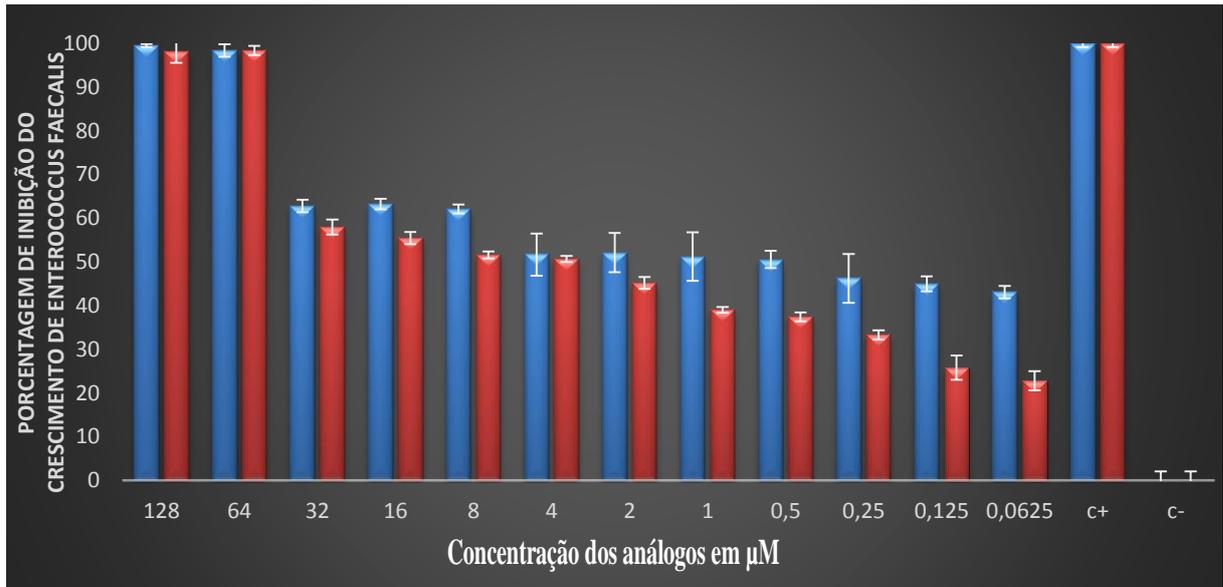


Figura 27 – Percentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *E. faecalis* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre bactérias Gram-positivas.

Bactéria	Peptídeos (CIM em μM)		CONFIDENCIAL
	AH_1	AH_2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	32	CONFIDENCIAL
<i>Enterococcus faecalis</i>	64	64	

NT: não testado.

*

CONFIDENCIAL

5.5.2. Ensaios antibacterianos com cepas ATCC Gram-negativas

Os análogos AH_1 e AH_2 foram testados frente às bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, e os resultados da determinação da CIM de cada sobre cada microrganismo estão representados abaixo.

A atividade inibitória sobre o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 25922) está demonstrada na figura 28. Em relação ao análogo AH_2 foi determinada uma CIM de 4 μM . O análogo AH_1 apresentou uma atividade antibacteriana sobre

Escherichia coli pouco inferior ao análogo AH_2, uma vez que sua CIM foi de 8 μM . Na concentração de 2 μM o análogo AH_2 ainda apresentou um efeito inibitório na faixa de 46%. Estes resultados encontrados com estes dois análogos foram

CONFIDENCIAL

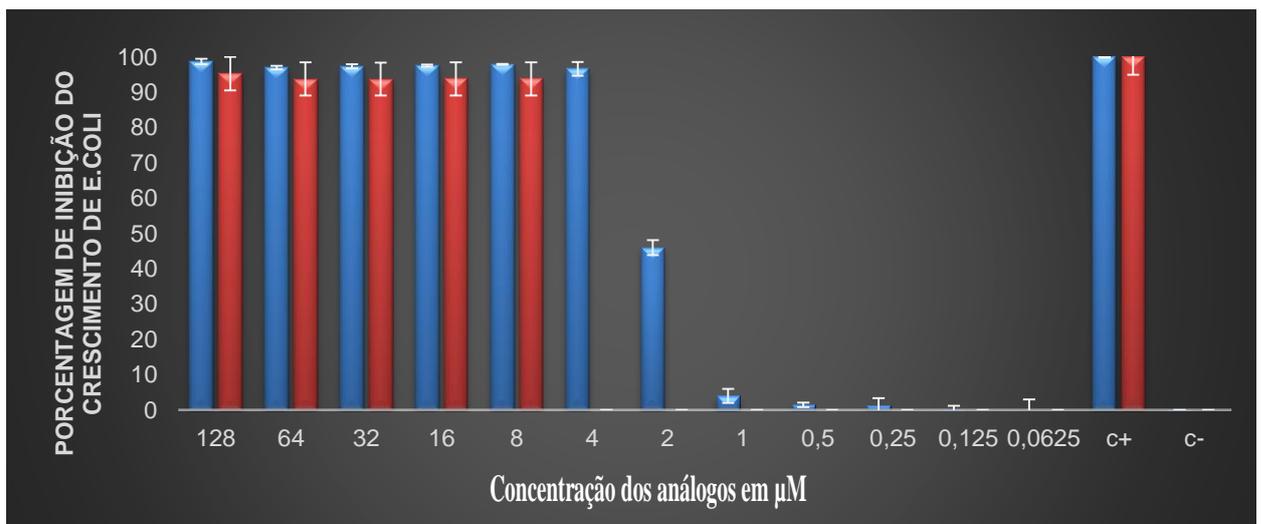


Figura 28 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *E. coli* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo(C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo(C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão

O efeito inibitório destes dois análogos sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* está representado na figura 29. O análogo AH_1 apresentou uma CIM de 4 μM , melhor que aquela apresentada pelo análogo AH_2, de 16 μM . Em todas as concentrações testadas foi notado um melhor efeito antibacteriano do análogo AH_1.

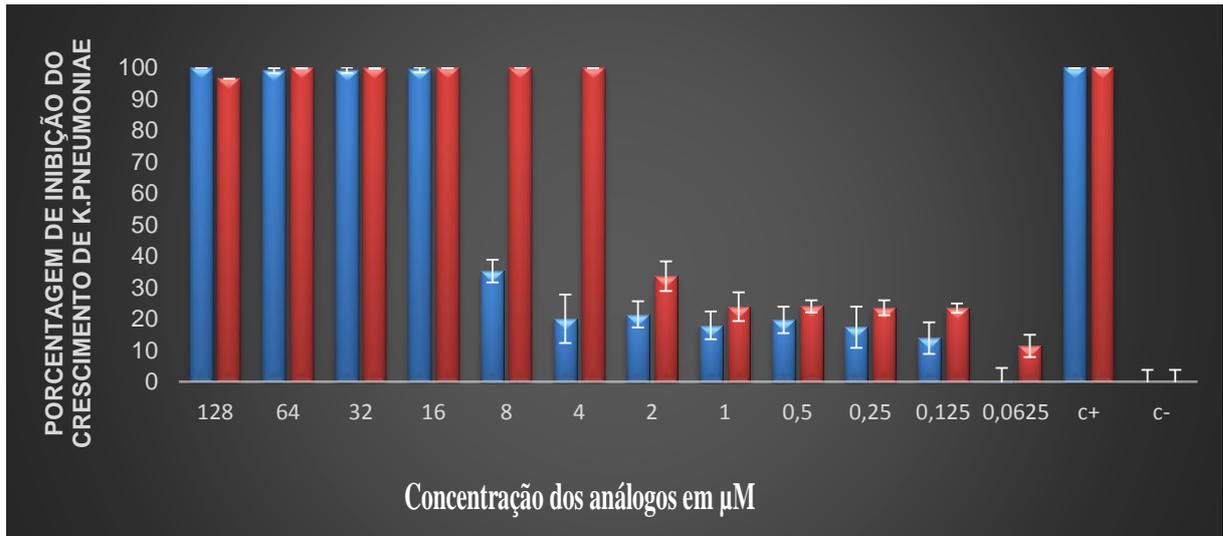


Figura 29 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Na figura 30 observamos a porcentagem de inibição dos peptídeos AH_2 e AH_1 sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *Proteus mirabilis*. O fraco efeito antibacteriano destes dois análogos sobre cepas de *Proteus mirabilis* pode ser explicado pelo fato deste microrganismo produzir enzimas proteolíticas que possam atuar inibindo os efeitos antibacterianos daqueles dois peptídeos, assim como já foi demonstrado por Sênior em 1999, onde 90 a 94% das cepas de *Proteus mirabilis* eram capazes de produzir enzimas proteolíticas. Os dados encontrados em nosso estudo frente a cepas de *Proteus mirabilis* são corroborados por aqueles encontrados por Conlon e colaboradores (2007), onde nem o peptídeo Temporina-1 Dra e nem seus análogos apresentaram atividade antimicrobiana sobre aquele microrganismo, com uma CIM acima de 128 μM .

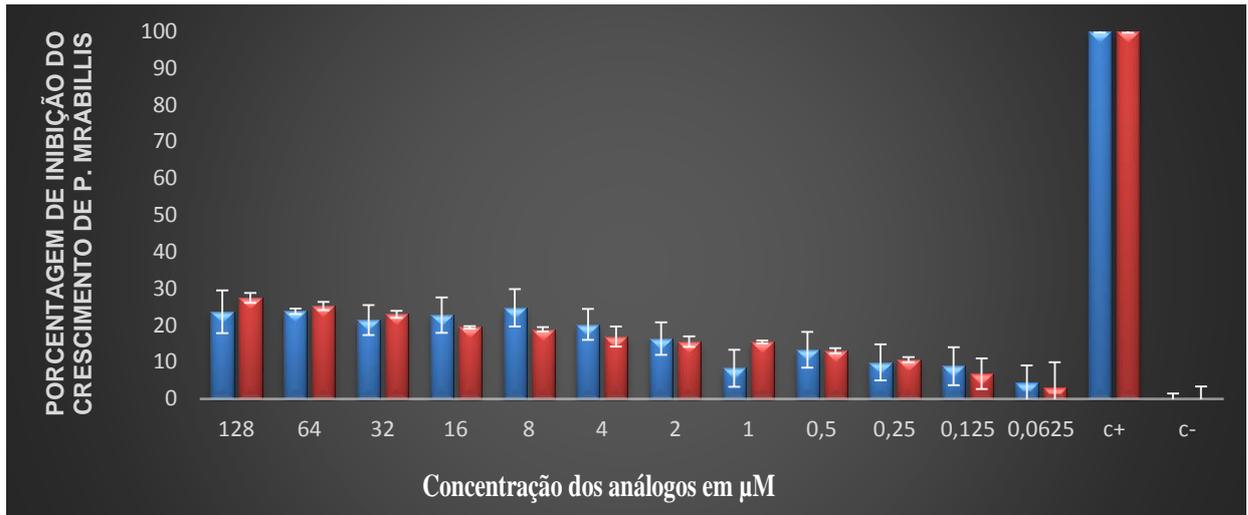


Figura 30 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *P. mirabilis* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Na figura 31 abaixo, temos o percentual de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa não fermentadora *Pseudomonas aeruginosa* pelos peptídeos AH_2 e AH_1. O análogo AH_1 apresentou CIM de 4 μM , atividade melhor que a apresentada pelo análogo AH_2, cuja CIM foi de 32 μM .

CONFIDENCIAL

Resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo com o análogo AH_2 foi obtido por Conlon em 2007 nos testes antibacterianos do peptídeo Temporina-1 Dra também frente à *Pseudomonas aeruginosa*, com uma CIM de 32 μM . A atividade antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* foi determinada também por Prates e colaboradores em 2004, com resultados menos expressivos que os aqui apresentados. Naquela ocasião foi encontrada uma CIM de 48,8 μM para o peptídeo antimicrobiano catiônico HSP1, isolado do anuro *Hyla punctata*.

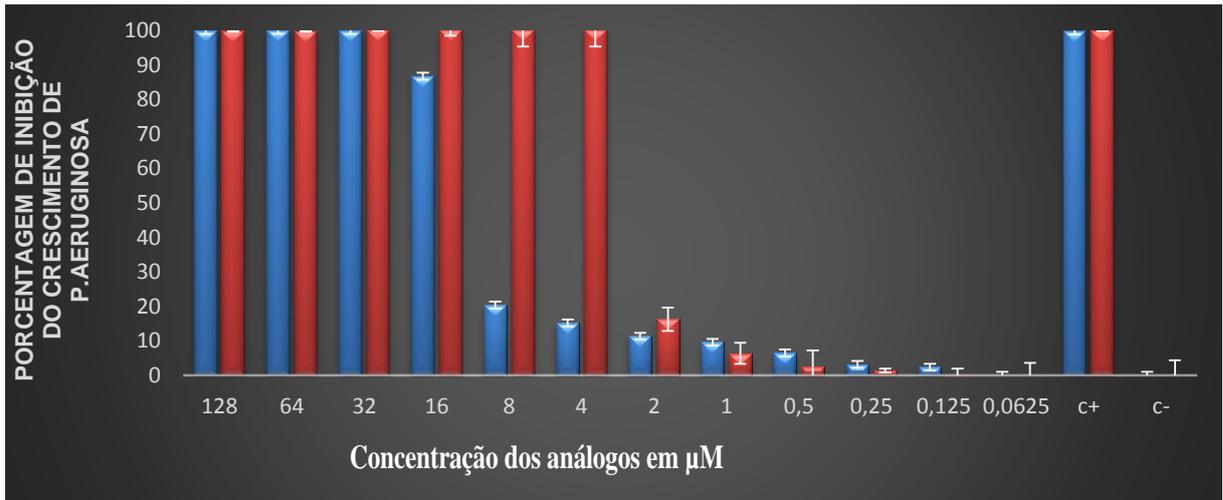


Figura 31 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos peptídeos análogos AH_1 e AH_2 frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, estão apresentadas na tabela 6. Os valores das CIMs estão expressos em μM .

Tabela 6 – Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre bactérias Gram-negativas.

Bactéria	Peptídeos (CIM em μM)		CONFIDENCIAL
	AH_1	AH_2	
<i>Escherichia coli</i>	8	4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	16	CONFIDENCIAL
<i>Proteus mirabilis</i>	>128	>128	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	32	

NT: não-testado.

CONFIDENCIAL

5.5.3 Ensaios antibacterianos com cepas multirresistentes

Os resultados da determinação da CIM dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre as bactérias multirresistentes *Klebsiella pneumoniae* KPC e *Staphylococcus aureus* metilina resistente MRSA estão representados abaixo.

5.5.3.1. *Klebsiella pneumoniae* KPC

A resistência aos carbapenêmicos, principalmente entre as enterobactérias, já é um grave problema de saúde pública que vem causando impacto de âmbito mundial, devido a elevada mortalidade e ao reduzido arsenal de opções terapêuticas (Nordmann & Cornaglia, 2012).

Bactérias produtoras de enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), com resistência a múltiplos antimicrobianos, vêm se disseminando rapidamente e causando infecções difíceis de serem tratadas. O mecanismo de resistência frente aos carbapenêmicos (doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem) mais impactante sobre a saúde do homem é a produção de carbapenemases, devido ao seu alto poder hidrolítico e também devido à sua codificação por genes localizados em elementos genéticos móveis, os plasmídios e transposons, que garantem uma rápida disseminação. Estas carbapenemases são capazes de hidrolisar não só os carbapenêmicos, mas também os demais beta-lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos (Hirsch & Tam, 2010).

As opções terapêuticas para combater estas bactérias produtoras de carbapenemases são escassas, logo a busca por novas drogas eficazes é extremamente necessária. Neste nosso trabalho, os peptídeos AH_1 e AH_2 foram testados contra um isolado clínico de *K. pneumoniae* KPC.

A porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* KPC pelos peptídeos AH_2 e AH_1 é mostrada na figura 32, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μ M.

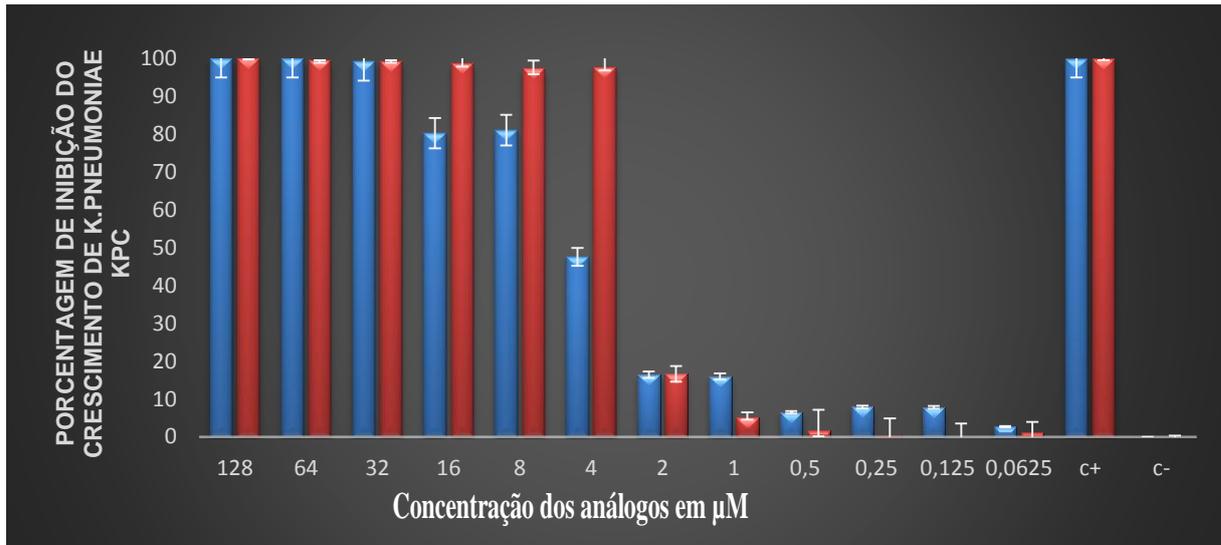


Figura 32 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* KPC pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

5.5.3.2. *Staphylococcus aureus* MRSA

Atualmente observamos a disseminação de doenças infecciosas causadas por bactérias patogênicas resistentes a grande maioria dos antibióticos comercialmente disponíveis. Uma das bactérias multirresistentes mais comuns, o *Staphylococcus aureus* (MRSA) é um dos principais causadores de infecções nosocomiais. Aparece como sendo a causa mais frequente de infecções de sítio cirúrgico, infecções do trato respiratório inferior e infecções cardiovasculares, além de estar bastante envolvido em infecções de corrente sanguínea (Nübel *et al.*, 2008). De acordo com estimativas recentes, ocorrem 400.000 hospitalizações relacionadas ao *Staphylococcus aureus* por ano nos Estados Unidos, causando 11 mil mortes neste período (Klein *et al.*, 2007). Infecções causadas por microrganismos multirresistentes levam a um tratamento mais oneroso, com consideráveis efeitos econômicos sobre a terapêutica. No caso particular do MRSA as infecções são geralmente tratadas com glicopeptídeos, tendo a vancomicina como protótipo. O primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina foi identificado no Japão em 1996. Embora grande parte das amostras de MRSA sejam sensíveis à vancomicina e aos outros glicopeptídeos, uma diminuição na suscetibilidade a vancomicina tem emergido em todas as pandemias de MRSA (Lohner, 2009).

As cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA possuem uma proteína de ligação a penicilina modificada, PBP2a ou PBP2', com baixa afinidade pelos antibióticos β -

lactâmicos, que são codificadas pelo gene *mecA*, o qual está localizado em um grande fragmento de DNA móvel chamado "cassete cromossômico estafilocócico" (SCCmec). As proteínas de ligação a penicilina são responsáveis por catalizar a ligação cruzada do peptidoglicano na parede celular bacteriana (Nübel *et al.*, 2008).

O *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA) apresenta comumente resistência a todas as classes de agentes antimicrobianos, reduzindo assim o arsenal de opções terapêuticas disponíveis ao seu combate, justificando desta forma a importância da busca por novas opções terapêuticas eficazes contra tal agente. Vários casos de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes adquiridos na comunidade (CA-MRSA) têm sido reportados recentemente. Estes relatos descreveram casos de infecções letais por tais microrganismos principalmente em pacientes imunocomprometidos (Ryu *et al.*, 2014). Pelo exposto na figura 33 observamos uma atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* MRSA mais fortemente exercida pelo análogo AH_1. Este análogo apresentou uma CIM de 4 μM , com redução acentuada da atividade já em 2 μM , onde a porcentagem de inibição do crescimento ficou em torno de 17,67%. Em relação ao análogo AH_2, este apresentou uma CIM maior que aquela encontrada com o análogo AH_1, em torno de 32 μM . O gráfico ilustra claramente o maior poder antimicrobiano exibido pelo análogo AH_1.

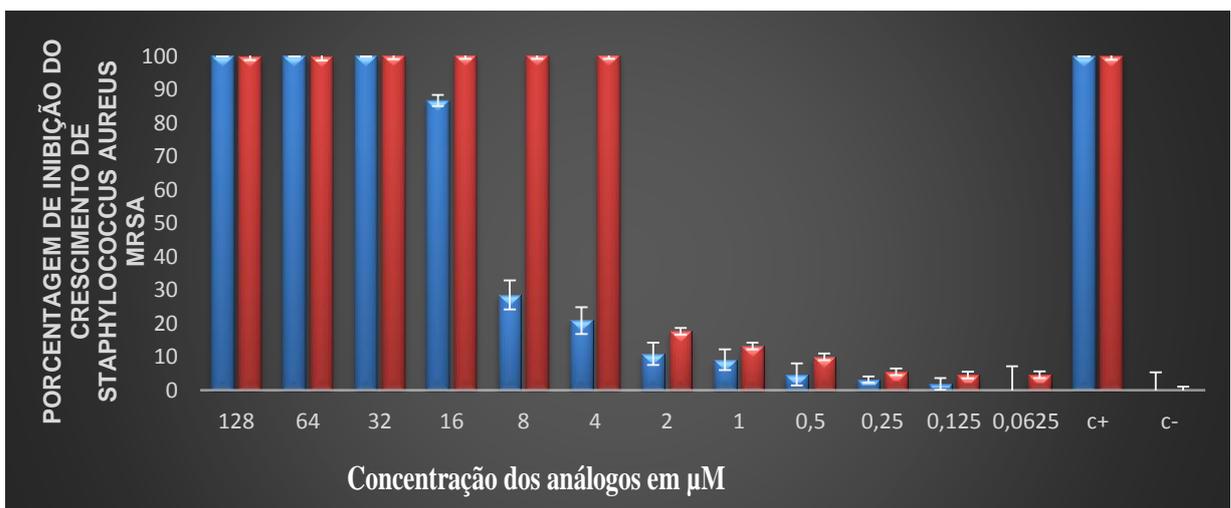


Figura 33 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* metilina resistente (MRSA) pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A tabela 7 sintetiza os resultados obtidos nos ensaios antibacterianos dos

peptídeos AH_1 e AH_2 frente aos microrganismos multirresistentes *S. aureus* MRSA e *K. pneumoniae* KPC. Os valores das CIMs estão expressos em μM .

Tabela 7. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_2 e AH_1 sobre microrganismos multirresistentes.

Bactéria	Peptídeos (CIM em μM)	
	AH_1	AH_2
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	4	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	4	32

5.5.4. Ensaio com leveduras

A candidíase é uma das infecções fúngicas mais frequentes vistas em pacientes imunodeprimidos. O número de pacientes imunodeprimidos vem aumentando significativamente nos últimos anos, e paralelamente a isto observamos um aumento no risco de infecções oportunistas, em especial as infecções fúngicas (Yapar, 2014).

São conhecidas mais de 150 espécies de *Candida*, entretanto apenas 15 destas espécies são isoladas de pacientes como sendo agentes infecciosos. São as *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, e *Candida norvegensis*. Embora a frequência de isolamento possa variar, nos últimos 20-30 anos observamos que em 95% dos casos de infecções os patógenos envolvidos eram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pappas, 2006; Yapar, 2014).

Neste trabalho, os peptídeos AH_1 e AH_2 foram testados frente às espécies de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, muito envolvidas em infecções em humanos.

Os efeitos destes dois peptídeos sobre as diferentes espécies de *Candida* são mostrados nas figuras 34,35 e 36. A figura 34 representa os efeitos inibitórios dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre o crescimento da levedura *Candida albicans*, uma das espécies mais envolvidas em infecções principalmente em pacientes imunocomprometidos. A atividade inibitória do peptídeo AH_1, de 8 μM , foi

ligeiramente melhor que a do análogo AH_2, cuja CIM foi de 16 μM .

Já o análogo AH_1 apresentou uma CIM bem melhor que a encontrada nos testes com seu protótipo. Os dados encontrados em nossos estudos com as espécies de *Candida* forneceram resultados melhores também que aqueles encontrados por Prates e colaboradores (2004), que determinaram uma CIM de 195,2 μM nos testes de microdiluição entre seu peptídeo e duas cepas distintas de *C. albicans*, uma cepa ATCC e um isolado clínico com resistência a anfotericina B. Kavanagh & Dowd (2004) demonstraram a importância do peptídeo antimicrobiano Histatina-5 no combate a infecções por *C. albicans*, e foi proposto o uso deste peptídeo em dentaduras e próteses orais. O peptídeo Temporina-1 DRa apresentou CIM de 32 μM frente a *C. albicans*, conforme os trabalhos de Conlon e colaboradores (2007). Os baixos níveis de sensibilidade da *C. albicans* frente a determinados peptídeos antimicrobianos, como aqueles encontrados quando o peptídeo Histatina 5 foi testado contra *C. albicans*, podem ser explicados pela possível produção de enzimas proteolíticas por estes microrganismos. Estas enzimas, além dos efeitos inibitórios sobre os peptídeos, são capazes de degradarem o tecido hospedeiro, bem como propiciar a invasão dos tecidos por tais microrganismos (Meiller *et al.*, 2009).

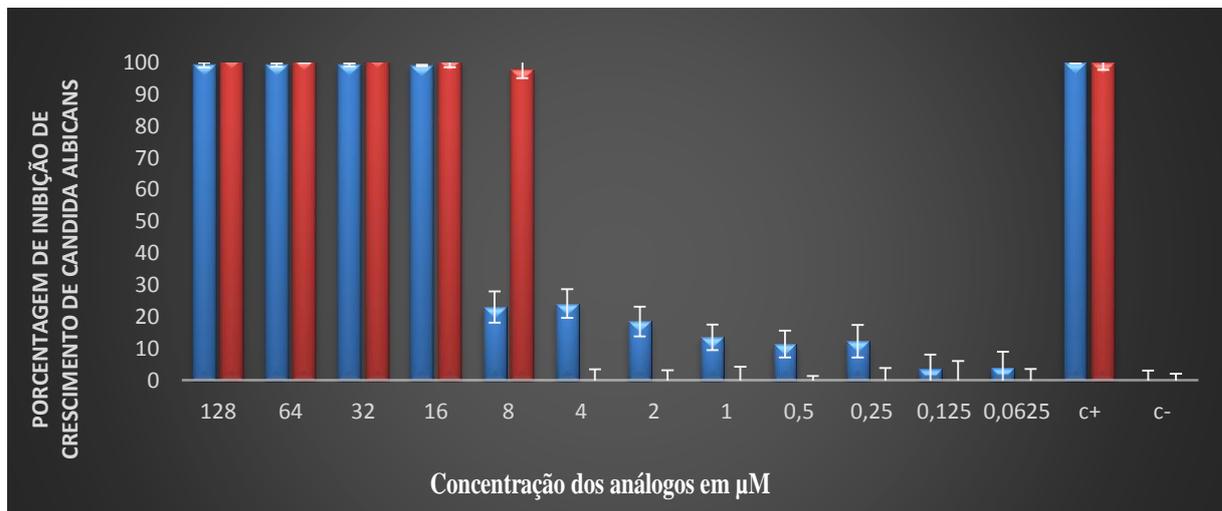


Figura 34 – Porcentagem de inibição do crescimento da levedura *C. albicans* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregado água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-) formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Conforme podemos observar na figura 35 os dois análogos tiveram suas propriedades antimicóticas mais acentuadas sobre o crescimento de *Candida*

parapsilosis quando comparados aos resultados fornecidos por estes dois peptídeos frente a *C. albicans*. O peptídeo AH_1 apresentou uma CIM de 2 μM , frente a uma CIM de 8 μM apresentada pelo peptídeo AH_2. Novamente o peptídeo AH_1 apresentou atividade inibitória mais satisfatória que o peptídeo AH_2.

CONFIDENCIAL

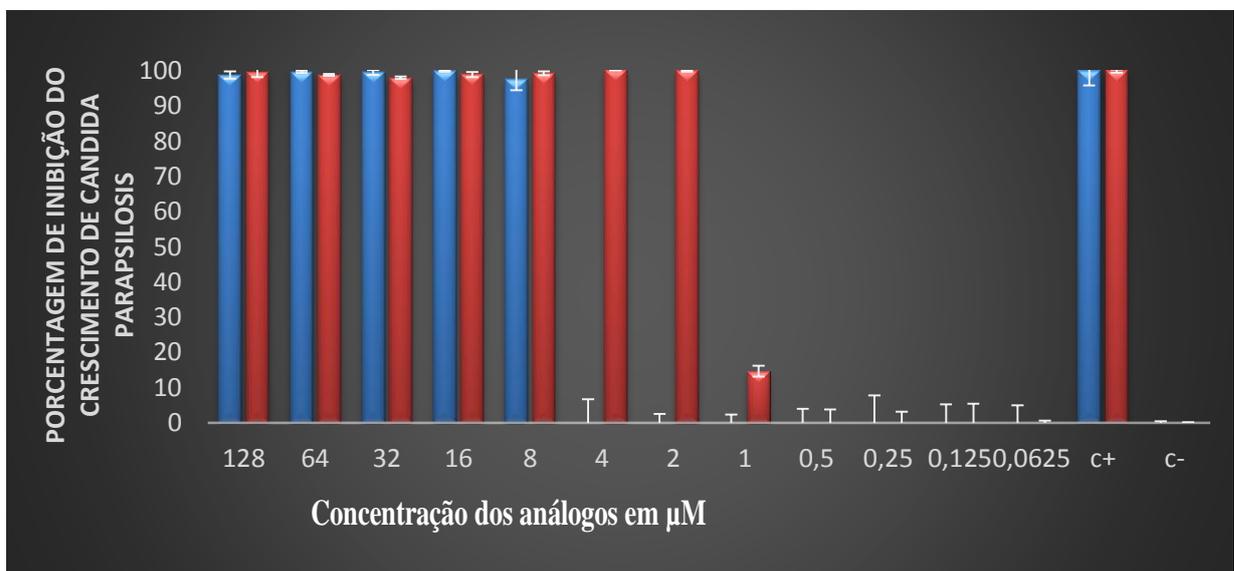


Figura 35 – Porcentagem de inibição do crescimento da levedura *C. parapsilosis* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Os percentuais de inibição sobre o crescimento da levedura *Candida krusei* frente a diferentes concentrações dos peptídeos AH_1 e AH_2 estão representados na figura 36. Podemos observar um comportamento semelhante àquele visto contra a espécie *Candida albicans*, onde a CIM dos peptídeos AH_1 e AH_2 foi de 8 μM e 16 μM , respectivamente.

CONFIDENCIAL

(Castro *et al.*, 2009).

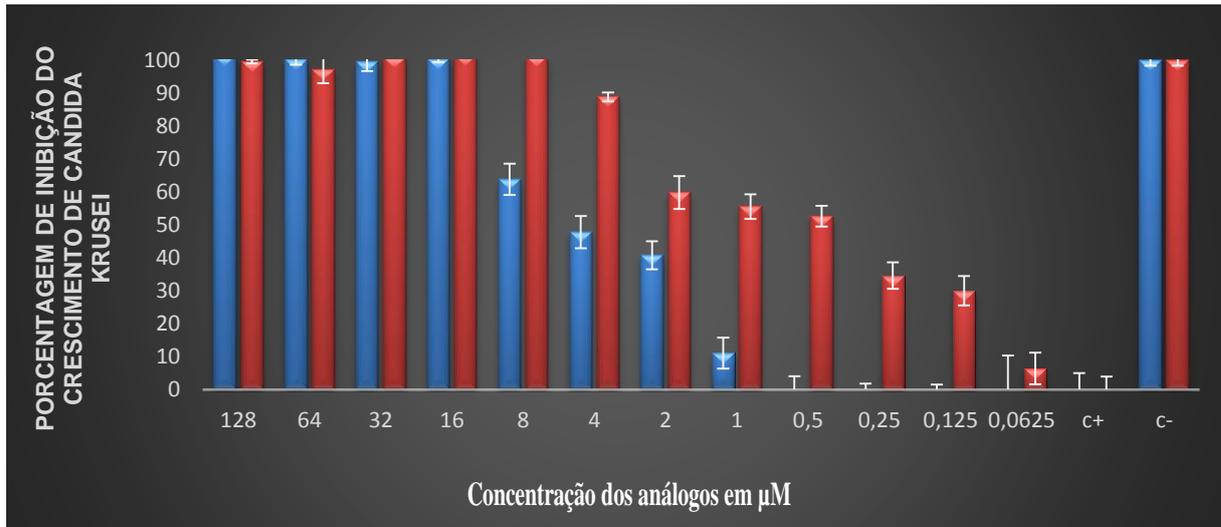


Figura 36 – Percentagem de inibição do crescimento da levedura *C. krusei* pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A concentração inibitória mínima (CIM) em μM , obtida nos ensaios dos peptídeos AH_1 e AH_2 frente às cepas ATCC das leveduras *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* estão expressas na tabela 8.

CONFIDENCIAL

Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre leveduras patogênicas.

Levedura	Peptídeos (CIM em μM)		CONFIDENCIAL
	AH_1	AH_2	
<i>Candida albicans</i>	8	16	CONFIDENCIAL
<i>Candida krusei</i>	8	16	
<i>Candida parapsilosis</i>	2	8	

NT: não-testado.

CONFIDENCIAL

5.5.5. Ensaios com micobactérias

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 havia cerca de 8,6 milhões de novos casos de tuberculose no mundo,

representando um total de 1,3 milhões de mortes (incluindo 320 mil mortes entre pacientes HIV-positivos). A tuberculose é uma questão de saúde pública de grande relevância no Brasil, sendo a terceira causa de morte por doenças infecciosas. O Brasil é um dos 22 países que respondem por 82% de todos os casos de TB no mundo (Freitas *et al.*, 2014).

O surgimento de cepas *Mycobacterium tuberculosis* MDR (*Multidrug resistance*) tem dificultado o tratamento da tuberculose ao promover uma redução no arsenal terapêutico disponível para combater este microrganismo, levando desta forma a uma busca por novas opções terapêuticas capazes de combater esta grave doença infecciosa (Linde *et al.*, 2001).

A parede das micobactérias se apresenta de uma forma um tanto complexa, com centenas de resíduos de ácido micólicos covalentemente ligados a um grupo, o qual por sua vez está ligado de forma covalente à estrutura subjacente do peptidoglicano. Levando-se em consideração o fato do LPS das bactérias Gram-negativas apresentar de seis a sete ácidos graxos unidos a um único grupo, podemos concluir que a penetração dos antibióticos nestas micobactérias é bastante prejudicada, dada a baixa combinação da permeabilidade dos canais de porina e da matriz lipídica, conferindo resistência às micobactérias (Cohen, 2011).

Estudos vêm demonstrando a atividade inibitória dos peptídeos antimicrobianos sobre determinadas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Em um destes estudos, o peptídeo Pandinin 2 (Pin2), um peptídeo antimicrobiano isolado de peçonha de escorpião e altamente hemolítico, serviu de protótipo para a síntese de análogos estruturais que apresentaram atividade inibitória sobre cepas de H37Rv, uma estirpe já amplamente estudada e com genoma completamente sequenciado, e sobre cepas MDR, uma estirpe clínica com resistência antimicrobiana contra rifampicina e isoniazida. Todas as variantes dos peptídeos sintéticos mostraram atividades antimicrobianas sobre ambas as estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*. Os valores de MIC observados foram de 11 a 30 μM para o *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e de 6-33 μM de *Mycobacterium tuberculosis* MDR (Rodríguez *et al.*, 2014).

Podemos citar também o exemplo do peptídeo PR-39, rico em arginina e prolina, isolado do intestino de porco, e peptídeos derivados da granulicina, presentes em grânulos dos linfócitos T citotóxicos humanos (Zerbini *et al.*, 2006).

Os peptídeos AH_1 e AH_2 foram testados contra cepa de *Mycobacterium*

tuberculosis H37Rv por meio de microdiluição em caldo 7H9 de Middlebrook. A revelação do ensaio com rezasurina mostrou que até a concentração de 64 μ M a coloração se mostrou sempre azul, indicando ausência de crescimento no referido poço, com CIM definida como 64 μ M (Figura 37). Esta concentração inibitória mínima foi encontrada para os dois peptídeos. Estes resultados não foram tão expressivos quanto aqueles encontrados por Rodríguez e colaboradores em 2014, porém foram melhores que aqueles encontrados por Zerbini e colaboradores (2006), já que nenhum de seus dois peptídeos testados exerceu inibição sobre isolados de *M. tuberculosis*, somente demonstrando inibição sobre cepas de *M. smegmatis*. Outro fato que merece atenção, de acordo com os ensaios realizados por Zerbini, diz respeito à composição do fluido de enriquecimento OADC empregado nos dois estudos, uma vez que tal fluido contém albumina bovina que poderia vir a demonstrar atividade inibitória contra determinados peptídeos antimicrobianos.

Empregando técnica diferente da usada neste estudo, já que lançou mão do método radiométrico BACTECT, Linde e colaboradores (2001) realizaram estudos sobre a capacidade do peptídeo PR-39 em inibir o crescimento de isolados clínicos de *M. tuberculosis* suscetíveis a drogas antituberculosas, encontrando uma inibição na faixa de 80 a 90% na concentração de 50 mg/L do peptídeo. Este mesmo peptídeo foi testado frente a dois isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR, e a capacidade de inibição do crescimento destes isolados ficou na faixa de 39 a 49%, na mesma concentração de 50 mg/L do peptídeo. A concentração inibitória mínima encontrada com os peptídeos AH_1 e AH_2 frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foi de 64 μ M (100,48 e 108,8 mg/L, respectivamente), acima daquela vista com o peptídeo PR-39, devendo ser ressaltado, no entanto, que nesta concentração estes peptídeos apresentaram inibição de 100% sobre o crescimento do referido microrganismo. Estes resultados devem ser considerados, dada a grande dificuldade de permeabilização da parede das micobactérias, destacando aqui o potencial destes peptídeos em promover a formação de poros e permeabilização das membranas das micobactérias, permitindo a ação de outras drogas.

A tabela 9 apresenta a concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre o crescimento de cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Os valores das CIMs estão expressos em μ M.

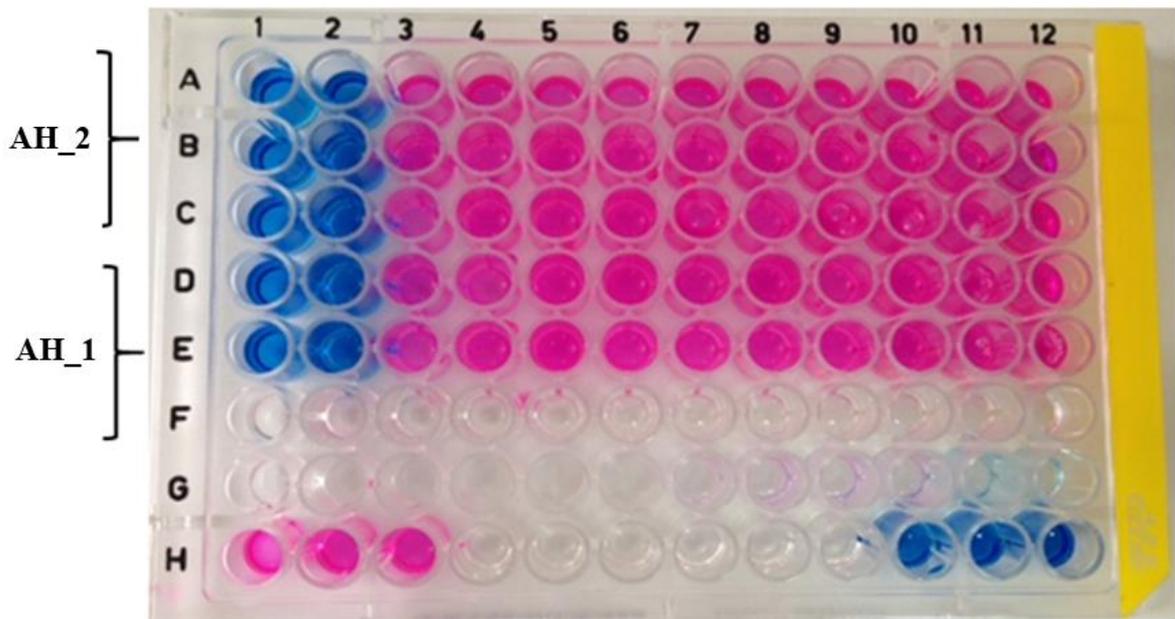


Figura 37 – Representação do ensaio de inibição do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pelos peptídeos AH_1 e AH_2, revelado com resazurina a 0,01%.

Tabela 9. Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre *M. tuberculosis* H37Rv.

Bactéria	CIM (μM)	
	AH_1	AH_2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	64	64

5.6 Ensaio *Checkerboard*

A avaliação de sinergismo entre os análogos em estudo e a polimixina B foi realizada frente a uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente por meio do ensaio *Checkerboard*. Este método microdilucional permite avaliar a existência ou não de sinergismo entre duas drogas, ou melhor, permite avaliar o tipo de efeito resultante da combinação destas duas drogas em diversas concentrações.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um dos patógenos mais envolvidos em infecções nosocomiais e tem se tornado uma das bactérias mais desafiadoras clinicamente, dada a sua extraordinária capacidade de desenvolver resistência frente a um grande arsenal de drogas antimicrobianas. Este alto padrão de resistência resulta de vários mecanismos, como as mutações em genes que levam a produção de enzimas metalo-beta-lactamases (MBLs) ou beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (D'Souza *et al.*, 2014).

O uso combinado de antimicrobianos pode se tornar uma alternativa terapêutica frente ao surgimento de microrganismos cada vez mais resistentes, capazes de sobreviverem em ambientes com altas concentrações de antimicrobianos. Estas combinações podem ser úteis também naqueles casos onde as altas dosagens de drogas antimicrobianas podem se constituir em riscos ao sistema fisiológico do paciente.

As infecções hospitalares se tornaram importantes problemas de saúde pública em todo o mundo, devido ao alto grau de morbidade e mortalidade, associados ao prolongamento do tempo de hospitalização e aos aumentos dos custos dos tratamentos. Conhecida pelo seu alto padrão de resistência aos antimicrobianos, a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta forte tendência a desenvolver resistência durante a terapia antimicrobiana (Dundar & Otkun, 2010).

O tratamento das infecções com combinação de antimicrobianos pode fornecer um maior espectro de ação e prevenir a rápida emergência de resistência em infecções nosocomiais, principalmente causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. A avaliação dos efeitos sinérgicos das combinações AH_1 e AH_2 revelou uma redução da CIM da polimixina B frente ao isolado de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Trata-se de uma observação muito importante, já que permite uma redução nas dosagens de polimixina e conseqüente redução de sua toxicidade.

Frente a escassez de drogas antimicrobianas eficazes no combate principalmente às bactérias gram-negativas, drogas usadas no passado ganham força, como as polimixinas. A polimixina B é um lipopeptídeo policatiônico que exerce seu efeito bactericida ao interagir com o LPS da membrana das bactérias gram-negativas. A nefrotoxicidade desta droga é um inconveniente ao seu uso (Neiva *et al.*, 2014).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100,48	100,48/0,0625	100,48/0,125	100,48/0,25	100,48/0,5	100,48/1	100,48/2	100,48/4	100,48/8	100,48/16	100,48/32	100,48/64
B	50,24	50,24/0,09375	50,24/0,1875	50,24/0,375	50,24/0,75	50,24/1,5	50,24/3	50,24/6	50,24/12	50,24/24	50,24/48	50,24/96
C	25,12	25,12/0,109375	25,12/0,21875	25,12/0,4375	25,12/0,875	25,12/1,75	25,12/3,5	25,12/7,0	25,12/14	25,12/28,0	25,12/56	25,12/112
D	12,56	12,56/0,1171875	12,56/0,234375	12,56/0,46875	12,56/0,9375	12,56/1,875	12,56/3,75	12,56/7,5	12,56/15,0	12,56/30,0	12,56/60,0	12,56/120
E	6,28	6,28/0,12109375	6,28/0,2421875	6,28/0,484375	6,28/0,96875	6,28/1,9375	6,28/3,875	6,28/7,75	6,28/15,5	6,28/31,0	6,28/62,0	6,28/124
F	3,14	3,14/0,123046875	3,14/0,24609375	3,14/0,4921875	3,14/0,984375	3,14/1,96875	3,14/3,9375	3,14/7,875	3,14/15,75	3,14/31,5	3,14/63,0	3,14/126
G												
H	C+	C+	C+							C-	C-	C-

Figura 38 – Esquema ilustrando as diferentes combinações de concentração entre o peptídeo AH_1 (em vermelho) e a polimixina B (em negro) em placa de microtitulação de 96 poços fundo chato, frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Todas as concentrações estão expressas em µg/mL. A região destacada na cor amarela é aquela na qual as combinações entre as drogas não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. C +: controle positivo de crescimento; C -: controle negativo de crescimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	108,8	108,8/0,0625	108,8/0,125	108,8/0,25	108,8/0,5	108,8/1	108,8/2	108,8/4	108,8/8	108,8/16	108,8/32	108,8/64
B	54,4	54,4/0,09375	54,4/0,1875	54,4/0,375	54,4/0,75	54,4/1,5	54,4/3	54,4/6	54,4/12	54,4/24	54,4/48	54,4/96
C	27,2	27,2/0,109375	27,2/0,21875	27,2/0,4375	27,2/0,875	27,2/1,75	27,2/3,5	27,2/7,0	27,2/14	27,2/28,0	27,2/56	27,2/112
D	13,6	13,6/0,1171875	13,6/0,234375	13,6/0,46875	13,6/0,9375	13,6/1,875	13,6/3,75	13,6/7,5	13,6/15,0	13,6/30,0	13,6/60,0	13,6/120
E	6,8	6,8/0,12109375	6,8/0,2421875	6,8/0,484375	6,8/0,96875	6,8/1,9375	6,8/3,875	6,8/7,75	6,8/15,5	6,8/31,0	6,8/62,0	6,8/124
F	3,4	3,4/0,123046875	3,4/0,24609375	3,4/0,4921875	3,4/0,984375	3,4/1,96875	3,4/3,9375	3,4/7,875	3,4/15,75	3,4/31,5	3,4/63,0	3,4/126
G												
H	C+	C+	C+							C-	C-	C-

Figura 39 – Esquema ilustrando as diferentes combinações de concentração entre o peptídeo AH_2 (em vermelho) e a polimixina B (em negro) em placa de microtitulação de 96 poços fundo chato, frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Todas as concentrações estão expressas em µg/mL. A região destacada na cor amarela é aquela na qual as combinações entre as drogas não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. C +: controle positivo de crescimento; C -: controle negativo de crescimento.

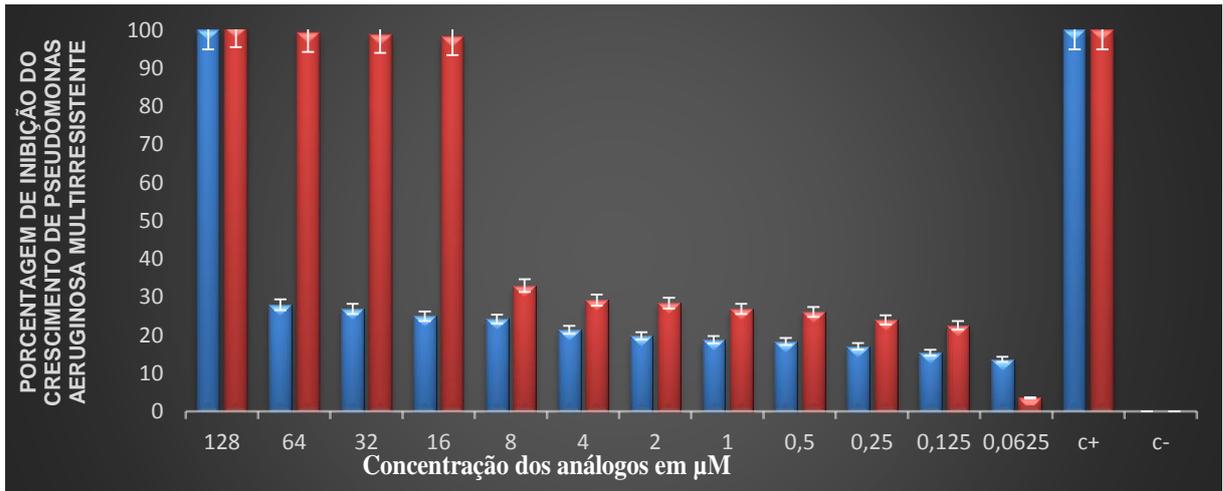


Figura 40 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente pelos peptídeos AH_2 (azul) e AH_1 (vermelho) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana dos peptídeos AH_1 e AH_2 sobre *Pseudomonas aeruginosa* MR.

Bactéria	CIM (μM)	
	AH_1	AH_2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	16 (25,12 $\mu\text{g/mL}$)	128 (217,6 $\mu\text{g/mL}$)

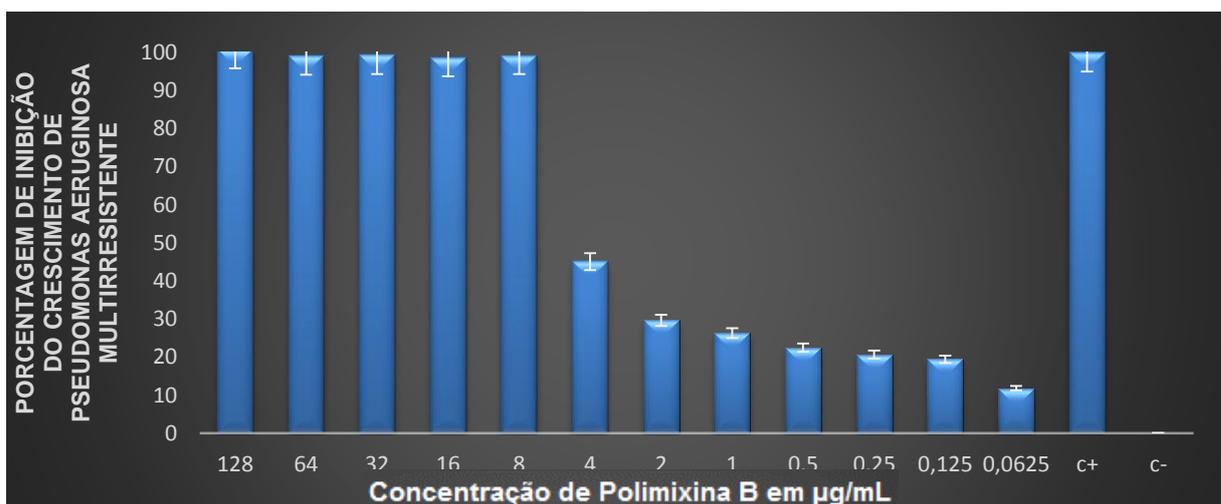


Figura 41 – Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente pelo antimicrobiano polimixina B em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle negativo (C-), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Os valores encontrados na tabela 11 foram obtidos a partir dos cálculos com valores expressos nas figuras 38 e 39, usando as fórmulas abaixo.

$$\text{CIF A} = \text{CIF A combinado} / \text{CIF de A sozinho}$$

$$\text{CIF B} = \text{CIF B combinado} / \text{CIF de B sozinho}$$

$$\Sigma \text{CIF} = \text{CIF A} + \text{CIF B}$$

$\Sigma \text{CIF} \leq 0,5$ está relacionado com efeito sinérgico entre os dois antimicrobianos.

$\Sigma \text{CIF} \leq 0,75$ temos um efeito parcialmente sinérgico.

$\Sigma \text{CIF} > 4,0$ está relacionado a antagonismo.

ΣCIF entre 0,75 e 4 há indiferença entre os efeitos

Tabela 11 – Avaliação dos efeitos dos peptídeos AH_1 e AH_2 combinados com polimixina B contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Microrganismo	Droga	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CIF	ICIF	Efeito observado
		Sozinho	Combinado			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AH_1	25,12	3,14	0,125	0,133	Sinérgico
	Polimixina B	8	0,0625	0,0078		
	AH_2	217,6	3,40	0,0156	0,047	Sinérgico
	Polimixina B	8	0,25	0,0312		

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

CIF: Concentração Inibitória Fracionada.

ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente utilizada neste ensaio apresentou uma CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$ para Polimixina B (figura 41), que a caracteriza como resistente a esta droga de acordo com *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI 2014. A tabela 12 demonstra o alto padrão de resistência desta bactéria quando submetida a avaliação no sistema Vitek® 2 Compact. O análogo AH_1 apresentou CIM igual a 25,12 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando atividade antimicrobiana sobre este isolado de *Pseudomonas aeruginosa* bem melhor que a encontrada com o análogo AH_2, cuja CIM foi de 217,6 $\mu\text{g/mL}$, conforme visto figura 40 e na tabela 10.

A tabela 11 apresenta as CIMs dos dois análogos AH_1 e AH_2, sozinhos e combinados a polimixina B, frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Observamos que os dois peptídeos apresentaram ICIF < 0,5 demonstrando assim sinergismo de ação com a polimixina B. Deve ser destacada a grande melhora na atividade antimicrobiana do análogo AH_2 sobre a *Pseudomonas aeruginosa* quando este foi testado combinado com a polimixina B, uma vez que este análogo sozinho apresentou uma CIM de 217,6 µg/mL, que foi reduzida para 3,40 µg/mL após associação com a polimixina B. O análogo AH_1 também apresentou melhora na sua atividade antimicrobiana após associação com a polimixina B, tendo sua CIM reduzida de 25,12 µg/mL quando sozinho, para 3,14 µg/mL quando combinado à polimixina B. Outro dado que merece destaque são as baixas concentrações de polimixina B capazes de inibir o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*, quando esta droga foi testada combinada aos dois análogos AH_1 e AH_2, com redução da CIM de 8 µg/mL para 0,0625 µg/mL e 0,25 µg/mL respectivamente.

O efeito sinérgico resultante da combinação entre peptídeos e polimixina B pode ocorrer devido ao fato desta apresentar uma estrutura química muito semelhante à dos peptídeos antimicrobianos catiônicos, com grupos lipofílicos e hidrofílicos que a tornam anfipática, que levam a mecanismo de ação que se inicia com a atração inicial pelas cargas negativas das membranas das bactérias Gram-negativas e posterior interação hidrofóbica com formação de poros na membrana. Algumas cepas de *P. aeruginosa* apresentam resistência a antimicrobianos catiônicos, como a polimixina B e os peptídeos antimicrobianos, via mecanismos de diminuição da carga líquida negativa na membrana externa e conseqüente diminuição da atração eletrostática entre peptídeo e membrana bacteriana. Este pode ser um mecanismo pelo qual as bactérias possam vir a desenvolver resistência aos PAMs (Velkov *et al.*, 2013).

Tabela 12 – Perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa* MR utilizada nos ensaios *Checkerboard* obtido em Vitek® 2 Compact bioMérieux.

Bactéria	Droga	CIM (µg/mL)	Interpretação
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	Ampicilina	≥ 32	R
	Ceftazidima	≥ 64	R
	Cefepime	≥ 64	R
	Imipenem	8	R
	Meropenem	8	R
	Polimixina B	8	R

CIM: concentração inibitória mínima; R: resistente

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Organização Mundial de Saúde tem identificado na resistência bacteriana uma das três maiores ameaças globais a saúde pública (Policy (2010). Desde 1990 estamos assistindo a uma marcante redução na descoberta de novos antibióticos e um crescente aumento nos casos de resistência bacteriana. Apesar do aumento na frequência e severidade dos casos de resistência antimicrobiana, o futuro acerca do desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos está ameaçada pela falta de interesse das grandes empresas farmacêuticas por tais drogas (Talbot *et al.*, 2006).

Dois estudos recentes, um da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA), e outro do Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças, demonstraram que há poucas drogas candidatas a oferecer benefícios superiores aos das drogas já existentes e poucas drogas irão futuramente ser capazes de tratar infecções pelos patógenos chamados “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e Espécies de *Enterobacter*) (Boucher *et al.*, 2009).

Nosso trabalho apresentou dois peptídeos antimicrobianos, os análogos AH_1 e AH_2, com marcantes propriedades antibacterianas e com atividade sobre, pelo menos, 4 daqueles patógenos incluídos no grupo ESKAPE. As modificações estruturais implementadas levaram ao surgimento de drogas bem menos hemolíticas e com notórias atividades principalmente antibacterianas e antifúngicas. Nos ensaios antibacterianos realizados, estes análogos demonstraram atividade antimicrobiana contra ampla gama de microrganismos, com destaque para os ensaios onde inibiram o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* KPC e *Staphylococcus aureus* MRSA, dois patógenos muito envolvidos em casos de mortalidades em pacientes internados. As atividades contra *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* são também muito expressivas, uma vez que são patógenos frequentemente vistos causando infecção em pacientes imunocomprometidos, cujo número vem aumentando, principalmente entre os portadores de HIV, devido à disponibilização de anti-retrovirais mais eficazes.

Nos ensaios com as bactérias multirresistentes *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e *Staphylococcus aureus* MRSA o análogo

AH_1 apresentou melhor atividade antimicrobiana que o análogo AH_2. A maior atividade antimicrobiana deste análogo também foi demonstrada nos ensaios sobre *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Apesar do análogo AH_1 ter apresentado maior percentual de hemólise que o análogo AH_2 nas maiores concentrações do ensaio hemolítico, merece atenção que, em grande parte dos ensaios antimicrobianos, o análogo AH_1 exibiu atividade antimicrobiana em faixa de concentração na qual sua atividade hemolítica era semelhante a do análogo AH_2.

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) vem apoiando o desenvolvimento do programa “10 x 20”, incentivando o desenvolvimento de 10 novos antibacterianos sistêmicos, seja através da descoberta de novas classes de drogas ou através da exploração de classes de antibióticos já existentes, candidatos a possíveis novas drogas até 2020.

Os peptídeos antimicrobianos são fortes candidatos neste cenário de busca por novas opções antimicrobianas, demonstrando forte ação sobre patógenos tanto de forma isolada quanto de maneira associada, conforme demonstramos em nossos ensaios *Checkerboard*, onde os dois análogos aqui propostos exibiram excelente atividade combinada com a polimixina B sobre um isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que os dois análogos, AH_1 e AH_2, mesmo em baixas concentrações, foram capazes de apresentar um sinergismo de ação com a polimixina B. Deve ser destacado o fato de que estes peptídeos apresentaram um baixo percentual de hemólise nestas concentrações de atividade sinérgica com a polimixina B. Esta abordagem se mostrou satisfatória, visto que permitiu inibir o crescimento deste patógeno utilizando concentrações muito baixas de polimixina B, detentora de um certo poder nefrotóxico.

Os resultados obtidos em nosso estudo com os análogos AH_1 e AH_2, além de demonstrarem a forte capacidade destes análogos em se tornarem candidatos a novos antimicrobianos, colocam estes análogos em situação de destaque graças principalmente às suas atividades apresentadas sobre bactérias Gram-negativas, em especial *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, dois dos principais agentes infecciosos responsáveis por infecções hospitalares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697–705, 2005.

AMICHE, M.; GALANTH, C. Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 1184–93, 2011.

AZEVEDO CALDERON, L. DE; SILVA, A. D. A. E.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R. G. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 29–49, 2011.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1543–1575, 2013.

BARRA, D.; SIMMACO, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 205–9, 1995.

BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 395–414, 1990.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2009.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–50, mar. 2005.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 3, p. 217–25, 2011.

CONFIDENCIAL

Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the

CONFIDENCIAL

CHATTERJEE, D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, n. 4, p. 579–88, 1997.

COCCIA, C.; RINALDI, A. C.; LUCA, V.; *et al.* Membrane interaction and antibacterial properties of two mildly cationic peptide diastereomers, bombinins H2 and H4, isolated from *Bombina* skin. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 4, p. 577–88, 2011.

COHEN, G. N. **Microbial Biochemistry**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011.

CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 13, p. 2303–15, 2011.

CONLON, J. M.; AL-GHAFFERI, N.; ABRAHAM, B.; LEPRINCE, J. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 349–57, 2007.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M. Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 1, p. 58–77, 2014.

D'SOUZA, B. B.; PADMARAJ, S. R.; REKHA, P. D.; *et al.* In vitro synergistic activity of colistin and ceftazidime or ciprofloxacin against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 6, 2014.

DATHE, M.; MEYER, J.; BEYERMANN, M.; *et al.* General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1558, n. 2, p. 171–86, 2002.

DATHE, M.; SCHÜMANN, M.; WIEPRECHT, T.; *et al.* Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. **Biochemistry**, v. 35, n. 38, p. 12612–22, 1996.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 71–87, 1999.

DENNISON, S. R.; WHITTAKER, M.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. Anticancer alpha-helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. **Current Protein & Peptide Science**, v. 7, n. 6, p. 487–99, 2006.

DUNDAR, D.; OTKUN, M. In-vitro efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Yonsei Medical Journal**, v. 51, n. 1, p. 111–6, 2010.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 1, p. 140–4, 1984.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 11–28, 1999.

FEDER, R.; DAGAN, A.; MOR, A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 6, p. 4230–8, 2000.

FINDLAY, B.; ZHANEL, G. G.; SCHWEIZER, F. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4049–58, 2010.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World 6.0, an Online Reference. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html>., American Museum of Natural History, New York, USA., 2015.

DE FREITAS, F. A D.; BERNARDO, V.; GOMGNIMBOU, M. K.; *et al.* Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective katG and rpoB mutation profile analysis in isolates from a reference center in Brazil. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e104100, 2014.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 21, p. 5589–600, 2001.

GIOVANNINI, M. G.; POULTER, L.; GIBSON, B. W.; WILLIAMS, D. H. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. **The Biochemical Journal**, v. 243, n. 1, p. 113–20, 1987.

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; *et al.* Antibiotic development

challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, article 353, p. 1-12, 2013.

HANCOCK, R. E.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 349, n. 6, p. 418–422, 1997.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317–1323, 1999.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1119–25, 2010.

HOPP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 6, p. 3824–8, 1981.

HUANG, H. W. Current topics action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 25–30, 2000.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JIANG, Z.; KULLBERG, B. J.; VAN DER LEE, H.; *et al.* Effects of hydrophobicity on the antifungal activity of alpha-helical antimicrobial peptides. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 72, n. 6, p. 483–95, 2008.

JIANG, Z.; VASIL, A. I.; HALE, J. D.; *et al.* Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 90, n. 3, p. 369–83, 2008.

KARAOGLAN, I.; ZER, Y.; BOSNAK, V. K.; METE, A. O.; NAMIDURU, M. In vitro synergistic activity of colistin with tigecycline or β -lactam antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 6, p. 1830–7, 2013.

KIM, Y. S.; CHA, H. J. Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 216–23, 2010.

KOHLGRAF, K. G.; ACKERMANN, A.; LU, X.; *et al.* Defensins attenuate cytokine

responses yet enhance antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* adhesins in mice. **Future Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 115–125, 2010.

KRAGOL, G.; LOVAS, S.; VARADI, G.; *et al.* The antibacterial peptide pyrrolic acid inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. **Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3016–3026, 2001.

KUMAR, S. N.; SIJI, J. V; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3143–50, 2012.

LEE, Y.-S.; JANG, K.-A.; CHA, J.-D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 618081, 2012.

LINDE, C. M. A.; HOFFNER, S. E.; REFAI, E.; ANDERSSON, M. susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 575–580, 2001.

LOHNER, K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. **General Physiology and Biophysics**, v. 28, n. 2, p. 105–116, 2009.

MANGONI, M. L.; PAPO, N.; SAUGAR, J. M.; *et al.* Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. **Biochemistry**, v. 45, n. 13, p. 4266–76, 2006.

MARÓTI, G.; KERESZT, A.; KONDOROSI, E.; MERGAERT, P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 363–74, 2011.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1687–92, 2009.

MEDIAVILLA, J. R.; CHEN, L.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B. N. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 588–95, 2012.

MEILLER, T. F.; HUBE, B.; SCHILD, L.; *et al.* A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. **Plos One**, v. 4, n. 4, p. e5039, 2009.

MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 50, p. 31635–41, 1994.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein and peptide letters**, v. 10, n. 3, p. 227–38, 2003.

NASCIMENTO, A. C. C.; ZANOTTA, L. C.; KYAW, C. M.; *et al.* Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **The Protein Journal**, v. 23, n. 8, p. 501–8, 2004.

NEIVA, L. B. DE M.; BORGES, F. T.; WATANABE, M.; *et al.* Nephrotoxicity of polymyxin B: experimental study in cells and implications for nursing practice. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, v. 48, n. 2, p. 272–7, 2014.

NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW, N. A R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67–78, 2008.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 2, p. 51-56, 2013.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 411–2, 2012.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; WALSH, T. R.; LIVERMORE, D. M. The emerging NDM carbapenemases. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 588–95, 2011.

OREN, Z. Diastereomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 13, p. 7305–7308, 1996.

ORHAN, G.; BAYRAM, A.; ZER, Y.; BALCI, I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 140–143, 2005.

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

OVERBYE, K. M.; BARRETT, J. F. Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 1, p. 45-52, 2005.

PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 485–506, 2006.

PARK, C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 244, n. 1, p. 253–7, 1998.

PARK, S.-C.; PARK, Y.; HAHM, K.-S. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5971–92, 2011.

POLICY, I. P. The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 8, p. 1081–3, 2010.

PRATES, M. V.; SFORÇA, M. L.; REGIS, W. C. B.; *et al.* The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13018–26, 2004.

PUKALA, T. L.; BOWIE, J. H.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F.; TYLER, M. J. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 3, p. 368–93, 2006.

RAPAPORT, D.; SHAIS, Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. **Journal of Biological Chemistry**. v. 266, p. 23769–775, 1991.

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. DA S.; SENNA, S. G.; ROSSETTI, M. L. R.; FONSECA, L. DE S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 5–10, 2004.

RINALDI, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 6, p. 799–804, 2002.

RODRÍGUEZ, A.; VILLEGAS, E.; MONTOYA-ROSALES, A.; RIVAS-SANTIAGO, B.; CORZO, G. Characterization of Antibacterial and Hemolytic Activity of Synthetic Pandinin 2 Variants and Their Inhibition against *Mycobacterium tuberculosis*. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. e101742, 2014.

RYU, S.; SONG, P. I.; SEO, C. H.; CHEONG, H.; PARK, Y. Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8753–72, 2014.

SCOTT, M. G.; YAN, H.; HANCOCK, R. E. Biological properties of structurally related alpha-helical cationic antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 2005-9, 1999.

SETHI, S.; MEWARA, A.; DHATWALIA, S. K.; *et al.* Prevalence of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV seropositive and seronegative patients with pulmonary tuberculosis in north India. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 137, p. 1-8, 2013.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 55–70, 1999.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 29–54, 1999.

SONG, Y. M.; PARK, Y.; LIM, S. S.; *et al.* Cell selectivity and mechanism of action of antimicrobial model peptides containing peptoid residues. **Biochemistry**, v. 44, n. 36, p. 12094–106, 2005.

STEINBERG, D. A.; HURST, M. A.; FUJII, C. A.; *et al.* Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with *in vivo* activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 8, p. 1738–42, 1997.

TALBOT, G. H.; BRADLEY, J.; EDWARDS, J. E.; *et al.* Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of

the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 5, p. 657–68, 2006.

TAVARES, L. S.; SILVA, C. S. F.; DE SOUZA, V. C.; *et al.* Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, article 412, p. 1-10, 2013.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 149–77.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, p. 4–30, 2000.

UTSUGI, T.; SCHROIT, A. J.; CONNOR, J.; BUCANA, C. D.; FIDLER, I. J. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. **Cancer Research**, v. 51, n. 11, p. 3062–6, 1991.

VELKOV, T.; ROBERTS, K. D.; NATION, R. L.; THOMPSON, P. E.; LI, J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 711–24, 2013.

VISSER, L. G.; HIEMSTRA, P. S.; VAN DEN BARSELAAR, M. T.; BALLIEUX, P. A.; VAN FURTH, R. Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 5, p. 1653–8, 1996.

WU, M.; MAIER, E.; BENZ, R.; HANCOCK, R. E. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 38, n. 22, p. 7235–42, 1999.

YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1475–85, 2001.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95–105, 2014.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Cardiovascular Research**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

YEAMAN, M.; YOUNT, N. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

YEUNG, A. T. Y.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 13, p. 2161–76, 2011.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 15, p. 5449–53, 1987.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–95, 2002.

ZERBINI, E.; ANDREU, D.; TONARELLI, G.; SEQUEIRA, M. D. Sensibilidad in vitro de micobacterias a dos péptidos sintéticos híbridos con actividad antimicrobiana. **Current Drug Targets**, p. 221–223, 2006.

ZHANG, L.; DHILLON, P.; YAN, H.; FARMER, S.; HANCOCK, R. E. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3317–21, 2000.

ZHAO, H. Mode of action of antimicrobial peptides. **Academic Dissertation Helsinki Biophysics & Biomembrane Group** - Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland, 2003.
