



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Caracterização das propriedades biológicas de uma
dermaseptina isolada da secreção cutânea de
Pithecopus rohdei (Anura: Phyllomedusinae)**

JOYCE SILVA DOS SANTOS

Brasília – DF

2023



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Caracterização das propriedades biológicas de uma
dermaseptina isolada da secreção cutânea de
Pithecopus rohdei (Anura: Phyllomedusinae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Autora: Joyce Silva dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília – DF

2023



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

JOYCE SILVA DOS SANTOS

**Caracterização das propriedades biológicas de uma
dermaseptina isolada da secreção cutânea de
Pithecopus rohdei (Anura: Phyllomedusinae)**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro

Presidente

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Membro Titular

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marlon Henrique Cardoso

Membro Titular

S-inova Biotec - Universidade Católica Dom Bosco

INBIO - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Apoio Financeiro

A dissertação de mestrado intitulada “Caracterização das propriedades biológicas de uma dermaseptina isolada da secreção cutânea de *Pithecopus rohdei* (Anura: Phyllomedusidae)” foi desenvolvida por Joyce Silva dos Santos sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro, teve o apoio financeiro do CNPq, da FAPDF, da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, por guiar meus passos e decisões e por todas as maravilhosas coisas que têm me acontecido.

Agradeço aos meus pais, Valéria e Aguinaldo, por nunca duvidarem do meu potencial e não me deixarem desistir, sempre me dando todo apoio, carinho e amor.

Agradeço, de todo meu coração, a Lucas Jeferson, que me apoiou em tudo e esteve comigo não apenas durante a construção desse trabalho, mas na vida, me ajudando infinitamente a crescer em todos os âmbitos.

Agradeço aos meus amigos por toda compreensão da minha ausência durante a realização desse projeto, e por sempre estarem comigo nos melhores e piores momentos desses últimos anos.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Mariana S. Castro, pela sabedoria, gentileza, compreensão e amizade durante esse processo tão conturbado durante a pandemia, e por sempre fazer tudo dar certo mesmo quando as coisas estão difíceis.

Agradeço aos meus colegas do LBQP e Toxinologia pela ajuda e companheirismo, em especial aos amigos Brunna de Oliveira e Natanael Sales, pessoas em que encontrei conforto, amizade e lealdade.

Agradeço ao Prof. Dr. Wagner Fontes, à Dra. Daiane Ribeiro e às doutorandas Isabelle S. Luz e Raquel Takaya pelo auxílio nos experimentos de migração de neutrófilos.

Agradeço à Profa. Dra. Sônia Nair Bão e à Dra. Karine Barros pela orientação nos experimentos de microscopia eletrônica de varredura.

Agradeço à Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas e à doutoranda Izadora Cristina M. de Oliveira pelo auxílio na realização dos experimentos de difração circular.

Agradeço ao Dr. Fabiano José Queiroz Costa pela orientação nos experimentos de combinação de drogas.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pela disponibilização do equipamento empregado nos experimentos de RTCA.

À secretaria do curso, direção e coordenação, pela cooperação.

À UnB e à CAPES, pelo auxílio financeiro que tornou possível a execução desse projeto.

Enfim, agradeço a todos e todas que tornaram o sonho do mestrado uma realidade, mesmo em tempos tão difíceis, sem cada um de vocês, eu não seria eu. Meu muito obrigada!

Resumo

O uso indiscriminado de antibióticos tem provocado elevados níveis de resistência bacteriana ao redor do mundo. Esse cenário se intensificou significativamente após o período pandêmico de SARS-CoV 2, onde agentes antimicrobianos foram utilizados desenfreada e erroneamente, mesmo que indicados apenas no caso de coinfeição com bactérias ou fungos. Com isso, ocorreu um aumento expressivo de superbactérias resistentes, sendo necessário o uso de antibióticos de amplo espectro causadores de graves efeitos colaterais, como é o caso da Polimixina B, um medicamento associado a intensa nefrotoxicidade e uma das últimas alternativas de tratamento para superbactérias hospitalares. Diante disso, pesquisas envolvendo moléculas com potencial antimicrobiano são de grande importância para a sociedade e têm ganhado espaço no meio científico. Uma interessante opção para esse quadro é o estudo de moléculas antimicrobianas naturais, como é o caso dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) também chamados de peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs). Esses peptídeos são moléculas curtas, catiônicas, anfipáticas e abundantes na natureza, sendo muito encontrados na secreção cutânea de anfíbios. Nesse trabalho, foi isolado um potente peptídeo antimicrobiano presente na secreção cutânea de *Pithecopus rohdei*, uma espécie da subfamília Phylomedusinae (Hylidae). A fração ativa foi isolada por cromatografia líquida de alta eficiência e apresentou uma massa molecular de 3080,66 Da. A molécula foi sequenciada por degradação de Edman e apresentou uma sequência peptídica de 30 resíduos de aminoácidos (GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES-COOH). Por estudos de similaridade de sequência, foi observado que esse peptídeo possui alta similaridade de sequência com peptídeos da classe das dermaseptinas, sendo então denominado Dermaseptina PR-1 (PR em referência à espécie *Pithecopus rohdei*). Através de análises de dicroísmo celular, a estrutura secundária do peptídeo na presença de SDS e TFE foi avaliada, sendo possível inferir que a Dermaseptina PR-1 adota uma estrutura secundária em alfa-hélice quando em contato com tais reagentes, um padrão associado a respostas antimicrobianas em outros peptídeos de defesa. No que diz respeito a suas propriedades biológicas, o peptídeo apresentou resultados inibitórios sobre o crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (CIM = 4 µM), *S. epidermidis* (CIM = 4 µM) e *Enterococcus faecalis* (CIM = 16 µM) e Gram-negativas *Escherichia coli* (CIM = 1 µM), *Klebsiella pneumoniae* (CIM = 2 µM) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 4 µM), sendo observado, também, a atividade antibacteriana em um isolado clínico multirresistente de *K. pneumoniae* carbapenemase (CIM = 16 µM), resultado que foi corroborado por análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em que evidenciou-se a formação de profundas rugosidades na membrana dessa bactéria, o que possivelmente leva a desestruturação da parede e lise do microrganismo. Além disso, como um teste preliminar para avaliar a capacidade inunomodulatória dessa dermaseptina, o peptídeo foi avaliado quanto a sua capacidade de induzir a quimiotaxia de neutrófilos, onde se observou uma moderada atividade quimiotática. Esses resultados sugerem que o peptídeo pode atuar de forma dupla, erradicando bactérias de maneira direta e indireta. Por fim, a atividade hemolítica do peptídeo foi avaliada e resultou em um baixo percentual de hemólise nas concentrações relacionadas aos valores de CIMs de bactérias sensíveis (2% a 9%) observando-se também uma moderada atividade hemolítica na concentração inibitória mínima da superbactéria *K. pneumoniae* carbapenemase (23%).

Palavras chave: Anuros; *Pithecopus rohdei*; peptídeo antimicrobiano; quimiotaxia; Polimixina B; KPC; sinergismo.

Abstract

The indiscriminate use of antibiotics has caused high levels of bacterial resistance around the world. This scenario intensified significantly after the SARS-CoV 2 pandemic period, where antimicrobial agents were wildly and erroneously used, even if indicated only in the case of coinfection with bacteria or fungi. As a result, there has been a significant increase in resistant superbugs, requiring the use of broad-spectrum antibiotics that cause serious side effects, such as Polymyxin B, a drug associated with intense nephrotoxicity and one of the last treatment alternatives for hospital superbugs. In view of this, research involving molecules with antimicrobial potential is of great importance to society and has gained space in the scientific community. An interesting option for this scenario is the study of natural antimicrobial molecules, such as antimicrobial peptides (AMPs) also called host defense peptides (PDHs). These peptides are short molecules, cationic, amphipathic and abundant in nature, being often found in the cutaneous secretion of amphibians. In this work, a potent antimicrobial peptide present in the cutaneous secretion of *Pithecopus rohdei*, a species of the subfamily Phylomedusinae (Hylidae), was isolated. The active fraction was isolated by high performance liquid chromatography and had a molecular mass of 3080.66 Da. The molecule was sequenced by Edman degradation and exhibited a peptide sequence of 30 amino acid residues (GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQQQPES-COOH). By sequence similarity studies, it was observed that this peptide has high sequence similarity with peptides of the dermaseptin class, being then named Dermaseptin PR-1 (PR in reference to the species *Pithecopus rohdei*). Circular dichroism analyses were performed and the secondary structure of the peptide in the presence of SDS and TFE was evaluated, making it possible to infer that Dermaseptin PR-1 adopts a secondary structure in an alpha-helix when in contact with such reagents, a pattern associated with antimicrobial responses in other defense peptides. With regard to its biological properties, the peptide showed inhibitory results on the growth of Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (MIC = 4 μ M), *S. epidermidis* (MIC = 4 μ M) and *Enterococcus faecalis* (MIC = 16 μ M) and Gram-negative *Escherichia coli* (MIC = 1 μ M), *Klebsiella pneumoniae* (MIC = 2 μ M) and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 4 μ M), with antibacterial activity also observed in a multidrug-resistant clinical isolate of *K. pneumoniae* carbapenemase (MIC= 16 μ M), a result that was corroborated by Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis, in which it was possible to observe the formation of deep roughness in the membrane of this bacterium, which leads to disruption of the wall and lysis of the microorganism. Furthermore, as a preliminary test to evaluate the immunomodulatory capacity of this dermaseptin, the peptide was evaluated for its ability to induce neutrophil chemotaxis, where a moderate chemotactic activity was observed. These results suggest that the peptide can act in a dual way, eradicating bacteria directly and indirectly. Finally, the hemolytic activity of the peptide was evaluated and resulted in a low percentage of hemolysis in the concentrations related to the values of MICs of sensitive bacteria (2% to 9%) also observing a moderate hemolytic activity in the minimal inhibitory concentration value of the superbug *K. pneumoniae* carbapenemase (23%).

Keywords: anurans; *Pithecopus rohdei*; skin secretion; antimicrobial peptides; Dermaseptins; neutrophils; quimiotaxis; Polimixin B; KPC; synergism.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática dos mecanismos de resistência a antimicrobianos. Fonte: ANVISA, 2007. 3
- Figura 2.** Representação ilustrativa das principais bombas de efluxo de cada família e seus respectivos modos de ação. Fonte: KUMAR e SCHWEIZER, 2005. 5
- Figura 3.** Formas estruturais encontradas em peptídeos antimicrobianos. Fonte: MORETTA et al., 2021. 6
- Figura 4.** Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Fonte: ATANASSOVA, 2020.. 7
- Figura 5.** Interações moleculares que justificam a seletividade dos peptídeos antimicrobianos. Adaptado de ZASLOFF, 2002). 8
- Figura 6.** Representação esquemática dos principais modelos de interação de PAMs com as membranas de microrganismos. A) Modelo barril ou barrel-stave; B) Modelo carpete-like e C) Modelo poro toroidal. Fonte: HERZOG e FRIDMAN, 2014. 9
- Figura 7.** Representação esquemática do modelo de Shai-Matsuzaki-Huang. Fonte: SHAI, 2002; HUANG, 2006. 10
- Figura 8.** Esquema representativo da imunidade inata e adaptativa demonstrando o tempo de resposta de cada fase. Fonte: ABBAS, 2022. 12
- Figura 9.** Mecanismos biológicos de ação de PAMs mediante uma exposição a patógeno. Além de alterar a permeabilidade da membrana através dos principais modelos descritos (carpet-like, barrel-stave e toroidal pore) os PAMS também podem modular o sistema imune, promovendo um aumento da quimiotaxia, fagocitose, liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) entre outras atividades, auxiliando na eliminação do patógeno invasor. Imagem elaborada pela autora com biorender.com. 13
- Figura 10.** Representação esquemática do tegumento de anfíbios. Fonte: DEMORI, et al 2019. 15
- Figura 11.** Exemplar adulto de *Pithecopus rohdei*. Foto de Gabriel Rodrigues. Fonte: SBH, 2023. 17
- Figuras apresentadas no artigo: Purification and Biological Characterization of Dermaseptin Pr-1, a Novel Antimicrobial Peptide Isolated from the Skin Secretion of the Frog *Pithecopus rohdei* (Mertens, 1926)**

Figura 1. Esquema de plaqueamento de Polimixina B e DRS PR-1 para avaliação do possível sinergismo entre as duas drogas. 23

Figura 2. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. rohdei*

em coluna C₁₈ (Shimadzu Shim-pack CLC ODS 6,0 ID x 150 mm, 5 μ) em sistema HPLC com fluxo de 1 mL/min e monitoramento ao UV em 216 nm. 25

Figura 3. Espectro de massas da fração 27 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) 26

Figura 4. Alinhamento entre o peptídeo dermaseptin PR-1 isolado de *P. rohdei* e as dermaseptinas 11PS de *Phyllomedusa sauvagii* e 3.1TR e 3.2TR de *P. trinitatis*. O símbolo “*” indica resíduos idênticos e “:” indica substituições conservativas. 26

Figura 5. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 a 260 nm) de Dermaseptina PR-1 em água e em diferentes concentrações de (A) SDS e (B) TFE a 25 °C 27

Figura 6. (A) Projeção em roda helicoidal de Schiffer-Edmunson de Dermaseptina PR-1 mostrando a face hidrofílica polar e a face apolar e hidrofóbica. (B) Modelo de estrutura secundária 3D usando o servidor I-Tasser. 28

Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura da bactéria KPC após 30 min de incubação com Dermaseptina PR-1. (A) Controle sem tratamento; (B) Incubação da bactéria com a Dermaseptina PR-1 8 mM (metade da CIM); (C) Incubação da bactéria com a Dermaseptina PR-1 16 mM (CIM). 29

Figura 8. Influência sobre o percentual de crescimento bacteriano promovido pela associação de Dermaseptina PR-1 e Polimixina B. 30

Figura 9. Atividade hemolítica promovida pela incubação da Dermaseptina PR-1 com eritrócitos humanos. Controle positivo (hemólise completa): solução de Triton 1% (v/v) e controle negativo (ausência de hemólise): tampão Tris-salina. 32

Figura 10. Avaliação do potencial quimioatraente da Dermaseptina PR-1. As amostras foram avaliadas por um período de 3 horas, com intervalos de 5 minutos entre as leituras. 32

Lista de Tabelas

Tabela 1. Peptídeos da subfamília Phyllomesinae.	16
Tabelas apresentadas no artigo: Purification and Biological Characterization of Dermaseptin Pr-1, a Novel Antimicrobial Peptide Isolated from the Skin Secretion of the Frog <i>Pithecopus rohdei</i> (Mertens, 1926)	
Tabela 1. Valores de ICIF e relação com atividade sinérgica, antagônica ou indiferente	24
Tabela 2. Propriedades físico-químicas de Dermaseptina PR-1	26
Tabela 3. Atividade antimicrobiana da Dermaseptina PR-1 (CIM, μM)	28
Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas para a Polimixina B e DRS PR-1	30
Tabela 5. Cálculo para avaliação do efeito sinérgico, antagônico ou indiferente da combinação de drogas.	30
Tabela 6. Influência na concentração promovida pela associação de Polimixina B e Dermaseptina PR-1	31

Lista de Siglas e Abreviações

ATCC	Coleção Americana de Culturas Típicas, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CD	Dicroísmo circular do inglês <i>Circular dichroism</i>
Da	Dalton
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRS	Dermaseptinas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
fMLP	Formil-metionina-leucil-fenilalanina do inglês <i>Formyl-methionine-leucyl-phenylalanine</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GRAVY	Índice de hidropaticidade, do inglês <i>Grand Average of Hydropathicity</i>
HBSS	Solução de sais balanceados de Hank – Solução Tampão
HCCA	Ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HUB	Hospital universitário de Brasília
IRF3	Fator regulador de interferon 3
ITUs	Infecções do trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolissacáideo
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz, do inglês <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
CIM	Concentração inibitória mínima, do inglês <i>Minimal inhibitory concentration</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NETs	Rede extracelular liberada por neutrófilos, do inglês <i>Neutrophil extracellular traps</i>
NFκB	Fator nuclear κB

NK cells	Células assassinas naturais, do inglês <i>Natural killers</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered Saline</i>
PDH	Peptídeo de defesa do hospedeiro
PNMs	Polimorfonucleares
RAM	Resistência antimicrobiana
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPM	Rotações por minuto
SARS-COV 2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave, do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SBH	Sociedade Brasileira de herpetologia
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	Trifluoretanol
TLR	Receptores do tipo <i>Toll-like</i>
TOF	Tempo de voo, do inglês <i>time-of-flight</i>
UnB	Universidade de Brasília
Mg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

Índice

1. Introdução	1
1.1 Microrganismos como causadores de doenças	1
1.2. Resistência antimicrobiana	2
1.3. Mecanismos de resistência a antibióticos	3
1.3.1. Alteração da permeabilidade da membrana plasmática	4
1.3.2. Inativação enzimática	4
1.3.3. Bomba de efluxo	4
1.3.4. Alteração do sítio de ação	5
1.4. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	6
1.5. Mecanismos de interação entre membranas e peptídeos antimicrobianos	7
1.6. Células imunes como alvo de peptídeos antimicrobianos	11
1.7. Neutrófilos e quimiotaxia	13
1.8. Peptídeos antimicrobianos em anuros	14
1.9. Peptídeos antimicrobianos da subfamília Phyllomedusinae	15
2. Justificativa	17
3. Objetivo Geral	18
4. Resultados e Discussão	18
5. Perspectivas Futuras	36
6. Referências Bibliográficas	36
7. Anexo I	45
8. Anexo II	46

1. Introdução

1.1. Microrganismos como causadores de doenças

Segundo o *Jornal of American Medical Association*, o termo sepse é definido como uma situação de disfunção de órgãos, em que ocorre uma incapacidade do sistema circulatório em promover oxigênio e nutrientes de forma eficiente devido a uma exacerbada resposta inflamatória. (REINER; VIETTA; VIGNARDI; GAMA; KLINGELFUS, 2020). Em unidades de terapia intensiva, a sepse é a segunda maior causa de mortalidade e, no Brasil, a incidência é de aproximadamente 200.000 casos por ano (LEITE, 2023). O aumento da idade média do brasileiro devido à sobrevida aumentada de pessoas com doenças crônicas, é uma das causas da observância de um maior tempo de internação de pessoas portadoras dessas doenças, o que eleva a incidência da sepse (BARROS, 2016). Os chamados estafilococos coagulase negativa (ECN) são potenciais causadores de infecções nosocomiais, principalmente associadas a formação de biofilmes em cateteres, próteses e outros dispositivos médicos (TEIXEIRA, 2009). São exemplos de patógenos causadores de tais infecções as bactérias *Staphylococcus epidermidis*, comumente encontradas na superfície da pele, as quais apresentaram um aumento significativo nas últimas décadas (BALABAN, 2004).

Outro exemplo importante de bactéria bastante recorrente em infecções hospitalares é a *Escherichia coli*, uma bactéria aeróbica presente no intestino de vertebrados, que pode causar diversas infecções intra-abdominais, sendo a principal causadora de infecções do trato urinário (ITUs) em humanos. (RUSSO, 2003). Além disso, outras infecções extra-abdominais têm sido descritas, tais como infecções cutâneas, pulmonares e de tecidos moles. (VIHTA, 2018). As infecções associadas à *E. coli* são bastante comuns e sua resistência aos antibióticos convencionais tem aumentado cada vez mais, ocupando o terceiro lugar na lista de patógenos resistentes prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS) (DENAMUR, 2021).

Ademais, tratando-se de microrganismos resistentes, uma das bactérias que mais se destaca no âmbito de infecções hospitalares é a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) (CHAPELLE, 2021). No gênero *Klebsiella*, a espécie *K pneumoniae* é geralmente isolada de infecções de trato urinário, infecções de feridas cirúrgicas, pneumonias, infecções de corrente sanguínea e infecções intra-abdominais (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). Inicialmente, espécies do gênero *Klebsiella* apresentavam sensibilidade à maioria dos antibióticos, contudo, devido ao surgimento de enterobactérias produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ESBL) foi necessário introduzir antimicrobianos carbapenêmicos ao tratamento de infecções por tais bactérias; com o passar do tempo, algumas cepas passaram a apresentar resistência também a essa classe de antimicrobiano, produzindo, dessa vez, as carbapenemases, enzimas que degradam os anéis β -lactâmicos dos agentes microbianos

carbapenêmicos (CAMPOS, 2017).

As carbapenemases podem ser classificadas em dois grupos: as metalo- β -lactamases, que apresentam o metal zinco no sítio de atividade, e as serina- β -lactamases, que contém serina em seu núcleo, sendo essa última a classificação em que se encaixa a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. (ABRANTES, 2017). Além disso, por estarem localizados nos plasmídeos, os genes codificadores de carbapenemases podem ser transferidos de bactéria para bactéria, elevando consideravelmente os riscos de disseminação da resistência para outras espécies. (GOOTZ et al., 2009). Com a resistência aos antibióticos carbapenêmicos, as polimixinas, como a polimixina B, por exemplo, foram reintroduzidas no tratamento de bactérias multirresistentes, porém, trata-se de um antibiótico de última escolha, haja visto que traz intensa nefrotoxicidade, causa pela qual havia sido suspensa no passado (LIMA, 2021).

Uma alternativa para a redução do risco de resistência em ambientes clínicos é utilização de peptídeos antimicrobianos (PAMs) em conjunto com outros antibióticos, essas moléculas são substâncias bastante estudadas e têm como função primordial a primeira linha de defesa do organismo, dessa forma, pode-se estudar combinações que levem a sinergias antimicrobianas eficazes. As combinações sinérgicas que têm vários alvos em vias independentes podem exigir dois conjuntos independentes e simultâneos de mutações para enfrentar os dois desafios. A sinergia também pode ser mais letal, diminuindo a probabilidade de as bactérias escaparem e desenvolverem resistência (ZHU et al., 2022).

1.2. Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana (RAM) se tornou uma das maiores ameaças no ramo de saúde, sendo um problema não apenas restrito a países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, mas também presente em toda escala global (PRESTINACI et al., 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2050, as mortes atribuídas à resistência a antimicrobianos chegarão a 10 milhões, ultrapassando, até mesmo, os óbitos por câncer (OMS, 2014). Esse cenário, além de todo sofrimento aos familiares dos pacientes, causa também desfalques na economia devido ao prolongamento de internações, maiores gastos médicos e um aumento significativo da mortalidade por falhas no tratamento. Estima-se que na Europa, por exemplo, os gastos anuais relacionados à resistência microbiana a antibióticos ultrapassam nove bilhões de euros (PRESTINACI et al., 2015).

Dados levantados em uma revisão bibliográfica na revista Lancet, em 2019, demonstraram que seis patógenos foram os maiores responsáveis por mortes associadas e atribuídas à RAM neste mesmo ano: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Juntas, essas

bactérias foram responsáveis por 929.000 de 1,27 milhões de mortes atribuídas à resistência antimicrobiana (MURRAY et al., 2022).

Além disso, a pandemia de SARS-COV 2 impulsionou ainda mais o aumento das taxas de resistência, já que antibióticos de espectros muito escalonados foram utilizados inadvertidamente nesse período, apesar das recomendações de uso restritas a casos de coinfeção com bactérias ou fungos. Quando comparado ao período pré-pandêmico, foi observado um aumento expressivo da resistência de diversos microrganismos, destacando-se a *K. pneumoniae* resistente à Polimixina B, em que se teve um aumento de 15% em relação ao ano de 2019, e também à *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em que se observou um aumento de 24,1% na taxa de resistência ao antibiótico supracitado, uma das últimas opções de tratamento disponíveis para bactérias multirresistentes (GASPAR et al., 2021). Esse resultado, proveniente do uso excessivo de agentes antimicrobianos, pode ser considerado uma consequência indireta grave da pandemia de coronavírus (GUISADO-GIL et al., 2020).

Com isso, apesar da grande demanda, o rápido desenvolvimento de resistência a antibióticos desestimula a criação de novos fármacos por parte da indústria farmacêutica, considerando os altos custos para a produção de um novo fármaco associado ao baixo retorno financeiro após o medicamento ser lançado no mercado, uma vez que, com o mau uso e o desenvolvimento de resistência, os medicamentos tendem a perder utilidade em poucos anos, diminuindo consideravelmente os lucros (MCKENNA, 2013). Logo, a corrida para o desenvolvimento de novos fármacos é contrabalanceada pela rápida evolução de resistência microbiana.

1.3. Mecanismos de resistência a antibióticos

As bactérias possuem mecanismos que as permitem escapar dos efeitos nocivos dos antimicrobianos. Sendo assim, os principais mecanismos de resistência conhecidos são: alterações na permeabilidade da membrana plasmática, inativação enzimática, bombas de efluxo e alterações no sistema de transporte do fármaco (Figura 1).

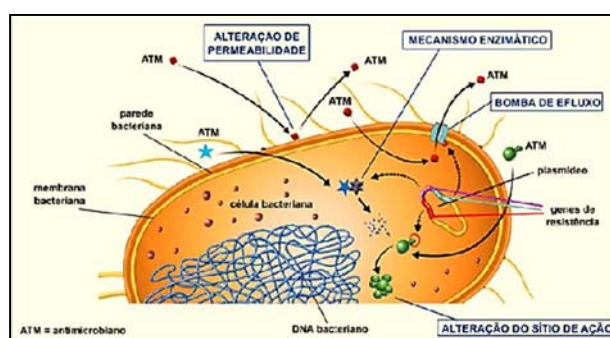


Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos de resistência a antimicrobianos. Fonte: ANVISA, 2007.

1.3.1. Alteração da permeabilidade da membrana plasmática

Os fármacos podem adentrar na membrana celular bacteriana por três maneiras: difusão simples na bicamada fosfolipídica, difusão facilitada por meio de proteínas transmembranares como as porinas, ou ainda pelo chamado “*self promoted uptake*” (DA COSTA; JÚNIOR, 2017) que está relacionado com interações iônicas entre o fármaco e moléculas de lipopolissacarídeos presentes em bactérias Gram-negativas. Essas interações causam mudanças conformacionais e resultam na abertura de poros na membrana, facilitando a entrada do fármaco. Assim, diferenças na permeabilidade da membrana podem estar relacionadas a alterações na função, quantidade ou tamanho das porinas, fazendo com que uma quantidade menor do fármaco atravesse a membrana, e conseqüentemente tenha um efeito reduzido (TOLEMAN, 2011; DA COSTA & JÚNIOR, 2017).

1.3.2. Inativação enzimática

O processo de resistência por degradação / inativação enzimática ocorre em decorrência da produção bacteriana de enzimas que se ligam em determinadas partes do fármaco e o inativam através de reações químicas como hidrólise, transferência de grupos ou oxirredução (COSTA, 2016). Um bom exemplo desse tipo de resistência é a produção da enzima β -lactamase, que realiza a reação de hidrólise no anel de β -lactâmico nos fármacos que possuem essa estrutura, como as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (KUMAR et al., 2013).

1.3.3. Bomba de efluxo

Outro mecanismo de resistência bastante comum são as bombas de efluxo, que geralmente são proteínas membranares que transferem o antibiótico para o meio externo da célula, diminuindo a concentração intracelular do fármaco. Esse mecanismo afeta principalmente as classes de macrolídeos, tetraciclínas e fluoroquinolonas, porém, todas as classes de antibióticos já apresentam esse tipo de resistência em algum nível (DZIDIC et al., 2008).

Existem cinco famílias de bombas de efluxo bem elucidadas na literatura, são elas a superfamília ABC (*Adenosine triphosphate – Binding Cassete*), superfamília MFS (*Major Facilitator Superfamily*), família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), superfamília RND (*Resistance-Nodulation-Cell-Division*) e família SMR (*Small Multidrug Resistance*) (DELMAR et al., 2014) (Figura 2).

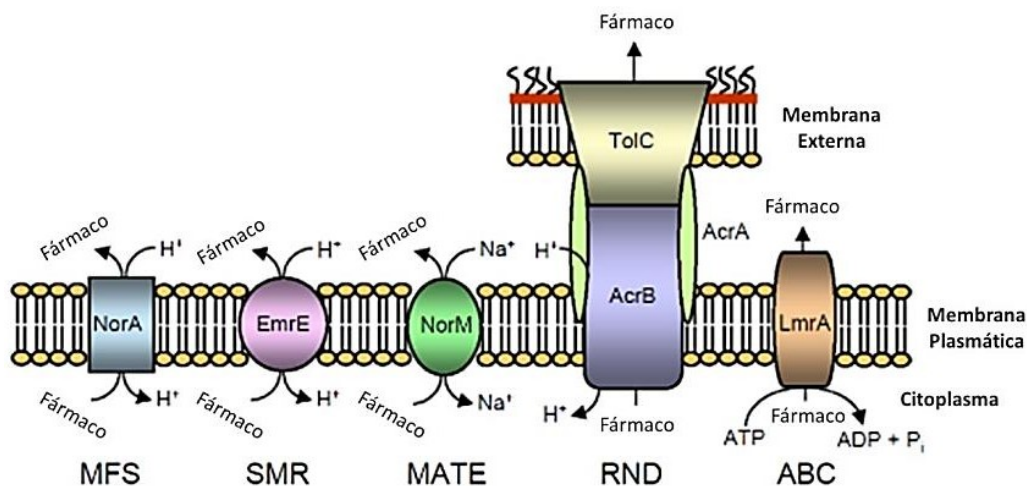


Figura 2. Representação ilustrativa das principais bombas de efluxo de cada família e seus respectivos modos de ação. Fonte: KUMAR E SCHWEIZER, 2005.

Os principais representantes das famílias de bombas de efluxo bacterianas são **NorA** de *S. aureus*, que pertence à superfamília MFS; **EmrE** de *E. coli*, da superfamília SMR; **NorM** de *Vibrio parahaemolyticus*, pertencente à família MATE; **AcrABTolC** de *E. coli*, da família RND; e **LmrA** de *Lactococcus lactis*, pertencente à superfamília ABC (KUMAR e SCHWEIZER, 2005). A maioria das bombas de efluxo realiza o processo de extrusão através de sistema antiporte (força próton motiva), como é o caso das bombas tipo MATE, MFS e SMR ou um mecanismo de gradiente de prótons, como é o caso da superfamília RND. Contudo, contrariamente às demais, os transportadores da família ABC utilizam a hidrólise de ATP como fonte de energia para realizar a exteriorização do antimicrobiano, como mostrado na figura 1 (KUMAR, 2005; BLANCO, 2016).

1.3.4. Alteração do sítio de ação

Outro mecanismo responsável por conferir resistência ao antimicrobiano é a mudança de sítio ativo do antibiótico, fazendo com que seus grupos farmacofóricos não atinjam os alvos para os quais foram desenhados. Em alguns casos, pode ocorrer a transferência de genes de resistência entre as bactérias por conjugação, transformação ou transdução. Esses mecanismos ocorrem, por exemplo, quando *S. aureus* adquire os genes *MecA*, responsáveis por codificar a proteína PBP2a, proteína que confere resistência à Meticilina, gerando os famosos MRSA (em português, *Staphylococcus aureus resistente a metilina*) (LAMBERT, 2005).

Levando em consideração a quantidade de vias de resistência que bactérias podem adquirir, é de suma importância pesquisas envolvendo novos agentes antimicrobianos, visto que os antibióticos disponíveis já demonstram grande dificuldade no tratamento de infecções por bactérias multirresistentes.

1.4. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são muito estudados e estão presentes em vários seres vivos, do menor ao maior nível de complexidade. Essas moléculas são compostos naturais que têm como função compor a primeira linha de defesa do organismo. Por isso, são também denominados por alguns autores como peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) (ZHANG e GALLO, 2016). Elas são formadas por sequências curtas de até 100 resíduos de aminoácidos e possuem uma estrutura geralmente anfipática e catiônica (carga líquida que varia a +2 a +13). Tais características são resultado da presença de aminoácidos básicos, como a lisina, arginina e histidina, que possuem carga positiva em PH ácido (BALTZER e BROWN, 2011; KUMAR et al., 2018).

Em relação à estrutura secundária, os PAMs são divididos em quatro famílias: α -hélice, folha- β pregueada, estrutura estendida e loop, sendo que a maior parte dos peptídeos se encaixa na primeira e segunda família (BAHAR e REN, 2013; ANDERSSON et al., 2016) (Figura 3). Dentre as famílias, os PAMs que se enovelam em α -hélice são os mais estudados e correspondem a quase 50 % de todos os peptídeos identificados. Essa estrutura helicoidal parece ter uma relação direta com a atividade antimicrobiana, já que PAMs catiônicos que se enovelam em estruturas α -hélices anfipáticas demonstram uma maior atividade formadora de poros transmembranares (BAHAR e REN, 2013; ANDERSSON et al., 2016; LI et al., 2021).

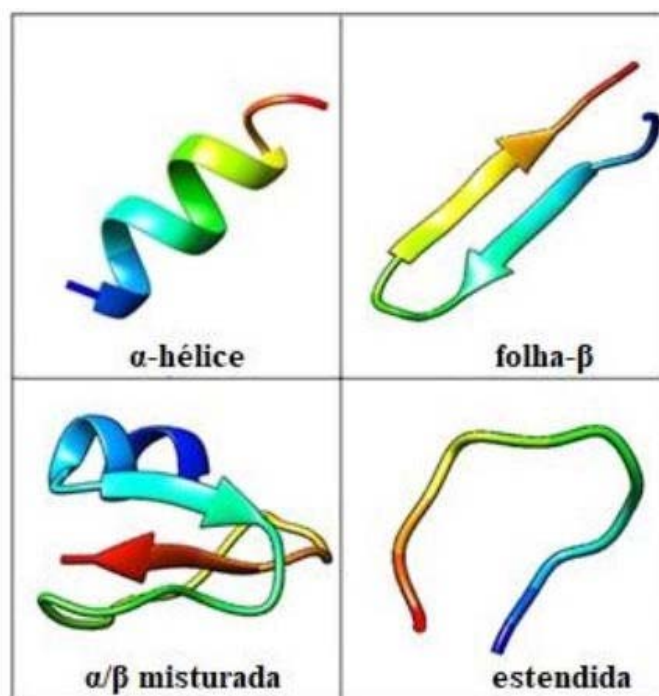


Figura 3. Formas estruturais encontradas em peptídeos antimicrobianos. Fonte: MORETTA et al., 2021.

Os peptídeos de defesa podem ser produzidos e liberados de forma constitutiva, ou seja, naturalmente, ou de forma induzida, através de estímulos externos. Na literatura, existem mais de dois mil peptídeos antimicrobianos descritos, porém, a atividade antimicrobiana não é a única documentada, visto que formam um grupo versátil de defesa, desempenhando, além da função microbiana propriamente dita, atividades imunomodulatórias, fungicidas, pró-apoptóticas e antiparasitárias (MAHLAPUU et al., 2016; MORAVEJ, 2018).

1.5. Mecanismos de interação entre membranas e peptídeos antimicrobianos

As membranas plasmáticas de microrganismos procarióticos, como as bactérias, diferem em alguns aspectos das membranas animais, de modo que, apesar dos dois modelos apresentarem uma estrutura formada por bicamadas fosfolipídicas associadas à uma vasta gama de proteínas, as membranas celulares de bactérias possuem diferentes componentes estruturais, como por exemplo a presença de fosfolipídios ácidos como fosfatidilglicerol e cardiolipina, além de lipopolissacarídeos na parede externa de bactérias Gram-negativas e também ácido teicoico e lipoteicoico nas paredes de Gram-positivas (Figura 4). Tais características na composição das paredes resulta em uma alta densidade de cargas eletronegativas na superfície desses microrganismos, o que atrai as cargas positivas de peptídeos catiônicos (KUMAR, 2018; ATANASSOVA, 2020).

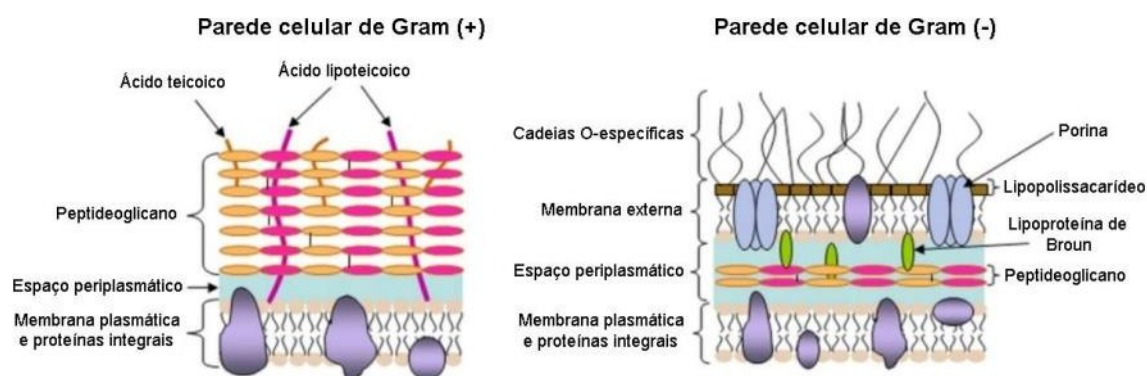


Figura 4. Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Fonte: ATANASSOVA, 2020.

Já as membranas de organismos eucarióticos possuem significativas quantidades de fosfolipídeos zwitteriônicos, como a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomiélna além da presença abundante de colesterol e outros esteróis (Figura 5). Todos esses fatores juntos conferem uma carga mais neutra à membrana (EBENHAN, 2014). Tais características são essenciais para a

atividade e seletividade dos PAMs, já que, geralmente, os PAMs apresentam uma carga líquida positiva e uma polaridade predominantemente hidrofóbica, devido a existência de aminoácidos apolares em sua composição (CONLON et al., 2009; ZHANG e GALLO, 2016). Essas características fazem com que haja uma atração eletrostática entre as cadeias laterais catiônicas do peptídeo com as cabeças dos fosfolípidos da membrana, ocasionando a formação de poros que a desestabilizam e causam a lise celular, podendo, também, inibir alvos intracelulares, perturbando a atividade fisiológica do microrganismo (BECHINGER e LOHNER, 2006; AZEVEDO et al., 2011) (Figura 6).

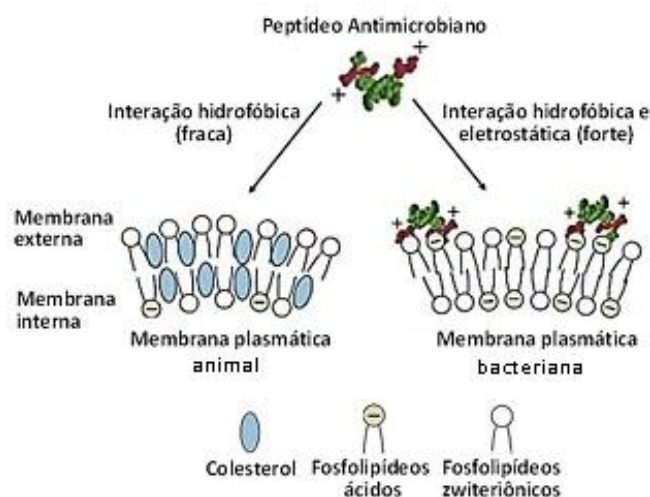


Figura 5. Interações moleculares que justificam a seletividade dos peptídeos antimicrobianos. Adaptado de ZASLOFF, 2002.

Diante do exposto, foram propostos diversos modelos para explicar como ocorrem as interações peptídeo-membrana que resultam na lise célula (JENSSEN et al., 2006). Os principais modelos descritos para essas interações são: *barrel-stave* (barril), *carpet-like* (carpete) e *toroidal pore* (poro toroidal) (Figura 7).

No modelo barril, as faces hidrofóbicas do PAM interagem com as cadeias carbônicas dos lipídios presentes na membrana bacteriana e se inserem de forma perpendicular à bicamada, resultando em poros transmembranares transitórios que se assemelham a barris (BROGDEN, 2005; KUMAR e TOLIA, 2019). Já no modelo carpete, os peptídeos são atraídos eletrostaticamente e se depositam paralelamente à membrana, como um tapete, e, após atingirem uma concentração crítica, se inserem na bicamada lipídica, desestabilizando-a (KUMAR e TOLIA, 2019; PARENTE et al., 2018). Outro modelo proposto é o poro toroidal, nesse processo, o peptídeo interage com as cabeças hidrofílicas dos fosfolípidos, fazendo com que a monocamada superior da membrana se dobre,

formando um poro composto por peptídeos intercalados com cabeças fosfolípídios carregados (BROGDEN, 2005; PARENTE et al., 2018).

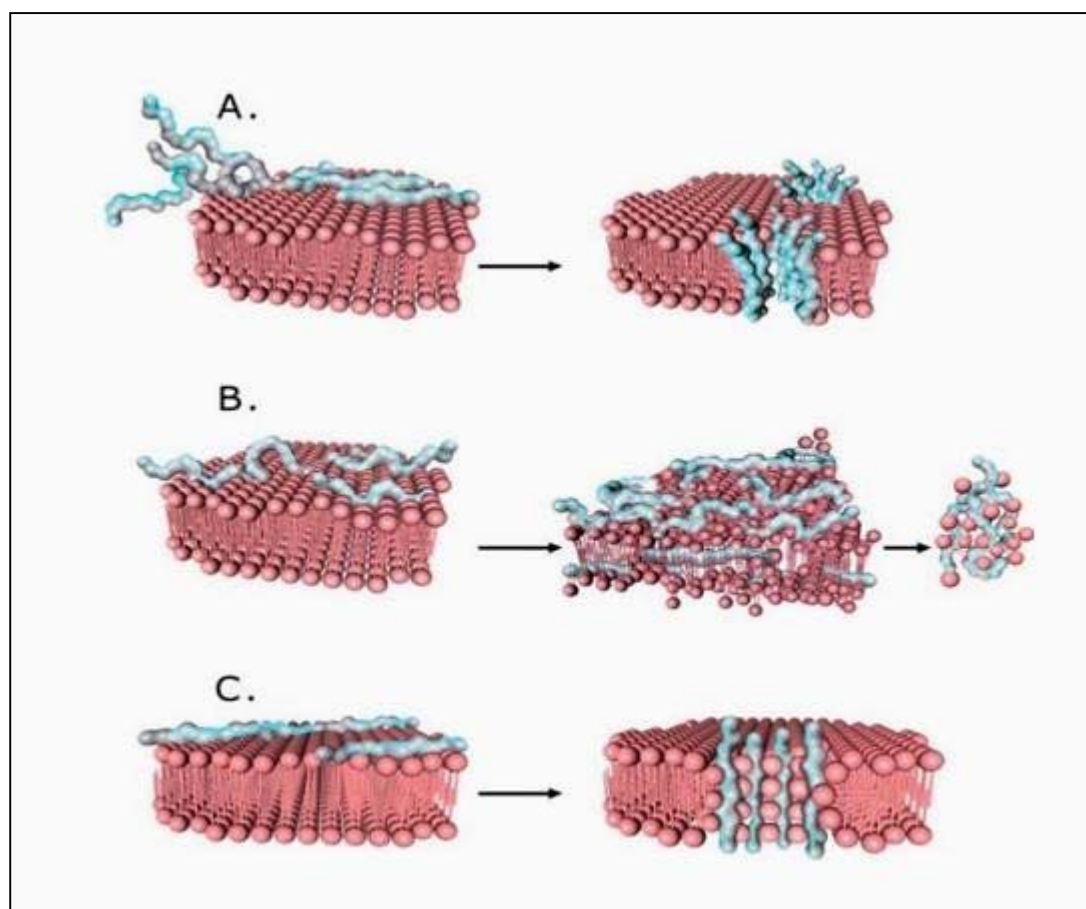


Figura 6. Representação esquemática dos principais modelos de interação de PAMs com as membranas de microrganismos. A) Modelo barril ou *barrel-stave*; B) Modelo *carpet-like* e C) Modelo poro toroidal. Fonte: HERZOG e FRIDMAN, 2014.

Outro modelo proposto é o modelo de Shai-Matsuzaki-Huang, nesse modelo há uma mistura dos mecanismos propostos, primeiramente, o peptídeo interage com a membrana formando uma espécie de *carpete*, com a interação, ocorre um afinamento da camada externa e o deslocamento das cabeças de fosfolípídios, provocando a formação transitória de poros. Além dos danos externos à membrana, há o transporte de lipídios e peptídeos para a camada interna, e, com isso, há a difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos). Todo esse processo finda no colapso da membrana plasmática, provocando a morte do patógeno (SHAI, 2002; HUANG, 2006) (Figura 7).

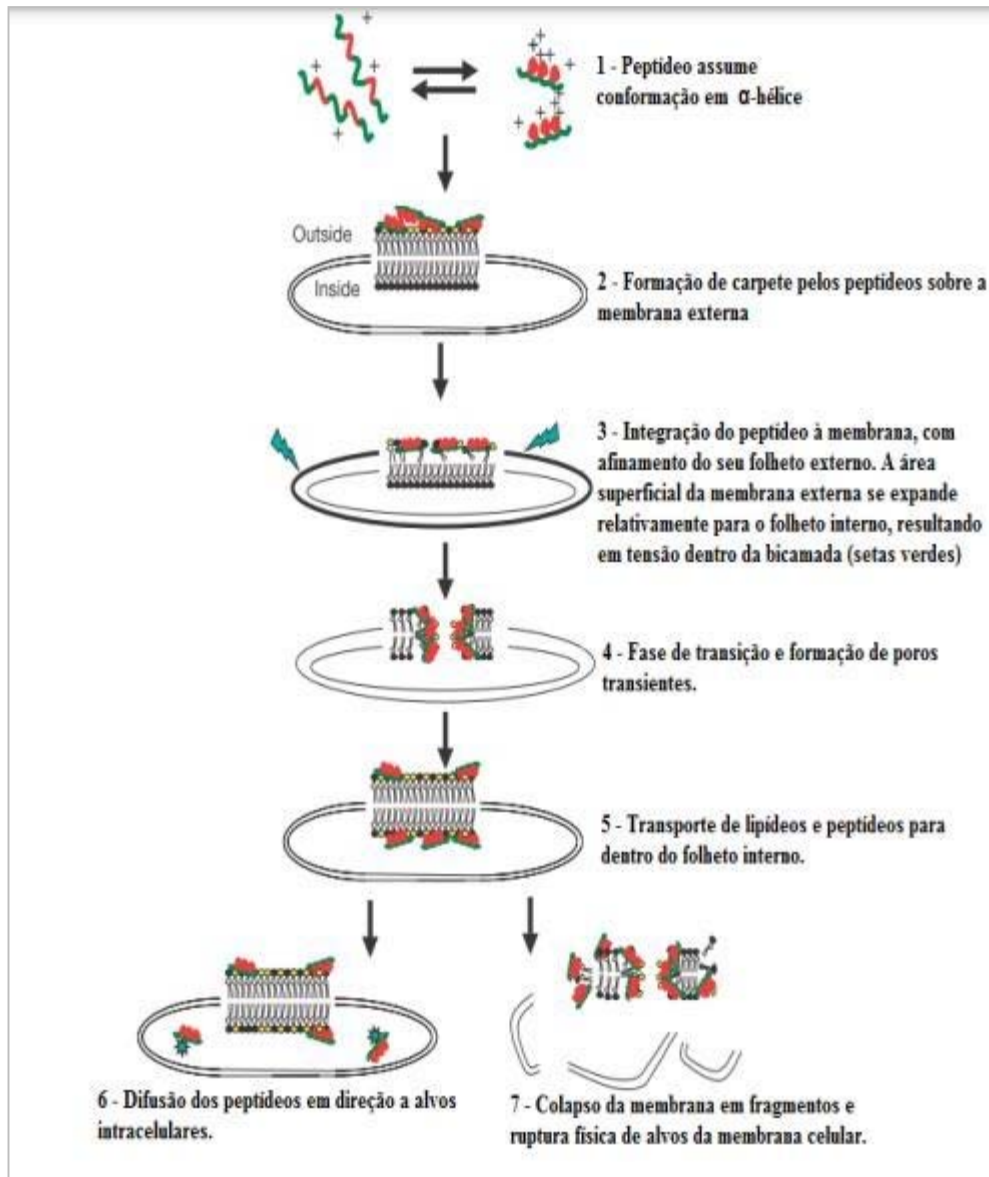


Figura 7. Representação esquemática do modelo de Shai-Matsuzaki-Huang. Fonte: SHAI, 2002; HUANG, 2006.

O estudo dos mecanismos pelos quais os PAMs levam ao rompimento das membranas de microrganismos têm como objetivo elucidar as interações peptídeo-membrana, permitindo à comunidade científica avançar cada vez mais em pesquisas com o uso de PAMs para o combate de bactérias multirresistentes, alavancando o desenvolvimento de novas terapias (OLIVEIRA, 2021).

Além dos modelos de interação com a membrana, também são conhecidos mecanismos de ação intracelulares, onde os peptídeos se ligam ao DNA das bactérias, perturbando a atividade fisiológica e metabólica celular. Tal mecanismo confere uma maior potência aos PAMs, que pode agir de forma dupla, atuando concomitantemente nas membranas e em alvos citoplasmáticos (LEI et al., 2019).

1.6. Células imunes como alvo de peptídeos antimicrobianos

O sistema imune tem um papel crucial na defesa do organismo, sendo dividido didaticamente em imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata é a primeira barreira de defesa do organismo sendo formada por pele, células epiteliais, leucócitos polimorfonucleares (PMNs), como neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e mononucleares, como os macrófagos, além das células dendríticas e das células *natural killers* (NK). Quando ocorre um dano ou uma infecção, essas células são rapidamente ativadas. Os neutrófilos, em especial, são altamente especializados em fagocitar e destruir patógenos, sendo conhecidos como fagócitos profissionais (JOHNSON et al.,1992).

Além dos componentes celulares supracitados, a imunidade inata conta também com componentes humorais, como proteínas do sistema complemento, proteína C reativa, colectinas, pentraxinas e peptídeos antimicrobianos (KAUR e SECORD, 2021). Esse sistema reconhece moléculas associadas à presença de bactérias, vírus e fungos, como proteínas, fitas de RNA, LPS, etc. Essas moléculas, denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), ligam-se aos receptores do tipo *Toll-like* (TLR), o que resulta na ativação de vias de sinalização que estimulam a produção de fatores de transcrição como o fator nuclear κ B (NF κ B), a proteína de ativação 1 (AP-1), o fator regulador de interferon 3 (IRF3), atores importantes para a expressão de moléculas necessárias à resposta inflamatória, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial (ALQUINO, 2022).

Ademais, quando as células do próprio organismo se encontram danificadas ou em processo de morte, são liberadas moléculas específicas denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são identificadas e destruídas pelo sistema imune. Esses processos ocorrem de maneira rápida, em questão de minutos ou horas, e incluem respostas como ativação de leucócitos e células dendríticas, fagocitose, migração celular em massa e produção de citocinas pró inflamatórias (ABBAS, 2022).

Em relação à imunidade adaptativa, os efeitos são mais lentos, porém mais específicos. As células efectoras são denominadas linfócitos, que podem ser do tipo T ou B. Os linfócitos do tipo T podem se diferenciar em três tipos: linfócitos T auxiliares ou “helpers”, linfócitos T citotóxicos e linfócitos T supressores. Basicamente, são células que possuem funções específicas de: ativação de células B, eliminação de células danificadas e finalização da produção de anticorpos, respectivamente. Além das células T, o sistema adaptativo também conta com a presença de linfócitos B, que produzem anticorpos específicos para cada tipo de padrão apresentado, como por exemplo, proteínas de uma determinada bactéria ou vírus as quais o organismo já foi exposto. Não obstante, os linfócitos B

possuem função de memória imunitária, ou seja, caso esse organismo seja infectado novamente, anticorpos são liberados rapidamente contra tal antígeno, garantindo uma proteção mais rápida e eficaz (NETEA et al., 2020; ABBAS, 2022) (Figura 8).

Desse modo, a imunidade tem a função de neutralizar agentes infecciosos externos e promover a limpeza e detoxificação do organismo.

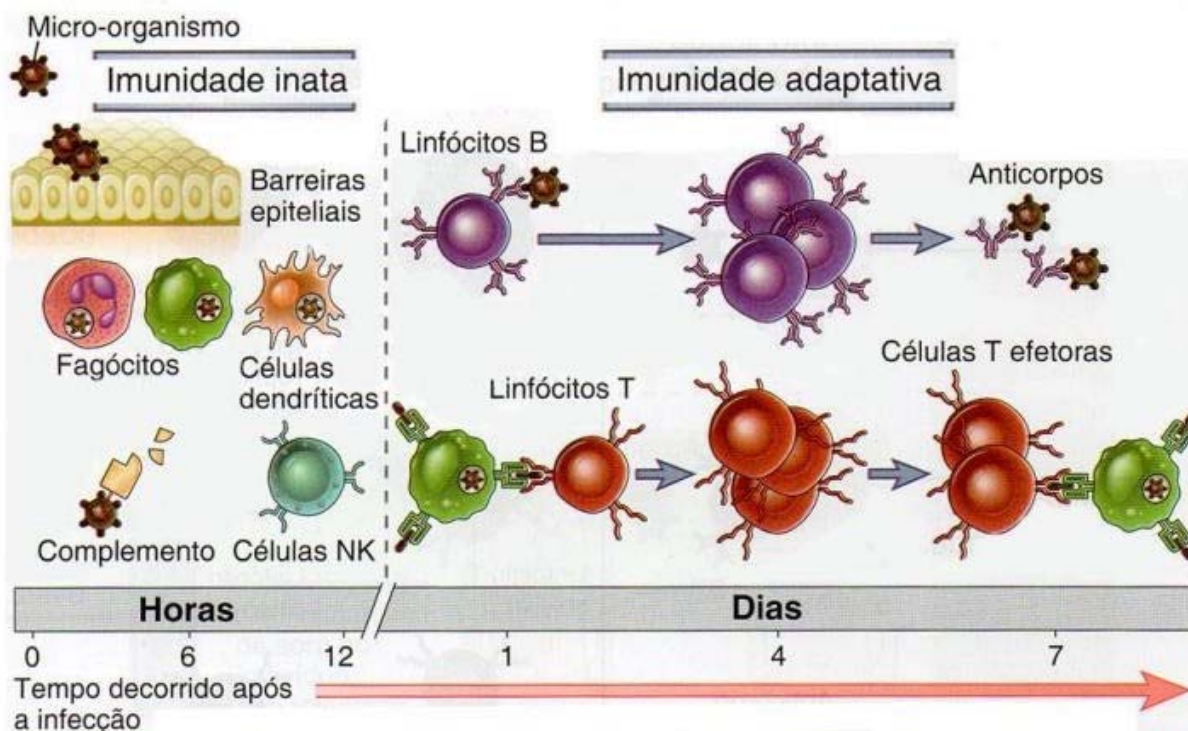


Figura 8. Esquema representativo da imunidade inata e adaptativa demonstrando o tempo de resposta de cada fase. Fonte: ABBAS, 2022.

Logo, além de propriedades antimicrobianas de ação direta na membrana plasmática, muitos PAMs de mamíferos têm demonstrado efeitos interessantes nas células do sistema imunológico como a promoção de quimiotaxia, ativação e diferenciação de neutrófilos, estímulo à liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, liberação de EROs (Figura 9) estimulação de angiogênese, melhora da cicatrização e diminuição da formação de cicatrizes (ZASLOFF, 2019; MAHLAPUU, 2020).

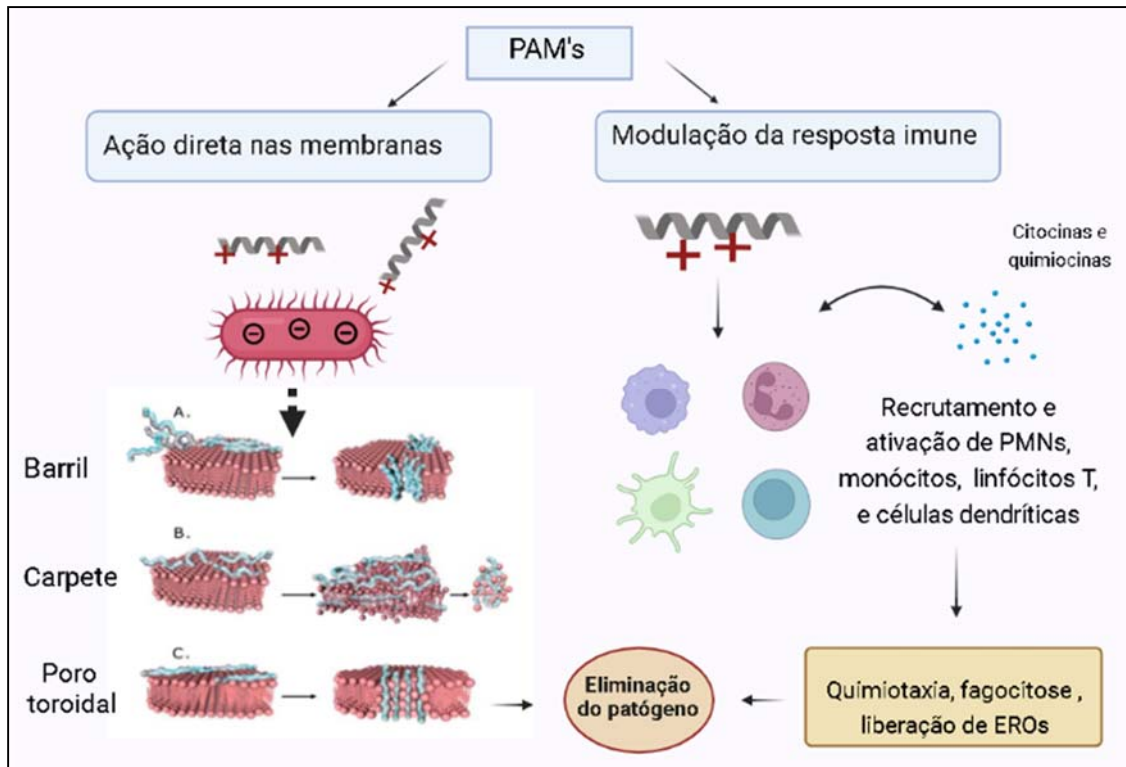


Figura 9. Mecanismos biológicos de ação de PAMs mediante uma exposição a patógeno. Além de alterar a permeabilidade da membrana através dos principais modelos descritos (*carpet-like*, *barrel-stave* e toroidal pore) os PAMs também podem modular o sistema imune, promovendo um aumento da quimiotaxia, fagocitose, liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) entre outras atividades, auxiliando na eliminação do patógeno invasor. Imagem elaborada pela autora com biorender.com.

1.7. Neutrófilos e quimiotaxia

Os neutrófilos são células leucocitárias polimorfonucleares (PNM) predominantes no sistema imunitário de mamíferos e representam por volta de 70% das células brancas presentes na circulação sanguínea. Essas células são consideradas pioneiras em sítios inflamatórios e combatem patógenos de forma muito eficiente através de processos como fagocitose, liberação de peptídeos antimicrobianos, degranulação, liberação de armadilhas extracelulares (do inglês *Neutrophil extracellular traps*, NETs) e produção de radicais livres (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Após ultrapassarem a barreira endotelial, os leucócitos se inserem nos tecidos e são guiados por moléculas quimioatraentes, através de um processo denominado quimiotaxia. Esse processo é responsável pelo recrutamento de uma grande quantidade de neutrófilos que são atraídos por diversas moléculas produzidas no foco da inflamação, como quimiocinas, leucotrienos e componentes do sistema complemento. Uma das moléculas quimioatraentes mais conhecidas é o fMLP (N-formyl-met-leu-phe), um peptídeo de apenas três aminoácidos, derivado de bactérias Gram-positivas que também é liberado quando há dano mitocondrial estéril. O reconhecimento desse peptídeo é realizado pelo receptor formil peptídeo tipo 1 e 2 (FPRL1 e FPRL2), receptores acoplados à proteína G

formados por sete alças transmembranares (PANARO e MITOLO, 1999; YANG, 2008).

A ligação do fMLP ao seu receptor desencadeia diversas cascatas de sinalização intracelulares que culminam na ativação do neutrófilo, resultando em fenômenos como a produção de EROs, liberação de grânulos citoplasmáticos, dentre outros mediadores e reguladores imunológicos como interleucina-8, leocotrieno A4 e B4 e TNF- α (DORWARD et al., 2015). Além disso, a ligação ao receptor estimula, também, a polarização morfológica do neutrófilo, condição necessária para migração em direção à um gradiente quimiotático. Com isso, tal molécula é reconhecida como uma potente ativadora e quimioatraente de neutrófilos, sendo muito utilizada em estudos com células imunes (MARASCO et al., 1984).

1.8. Peptídeos antimicrobianos em anuros

A classe amphibia possui mais de 8.000 espécies descritas, divididas entre os grupos Gymnophiona (cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, rãs e pererecas) sendo a última a ordem mais abundante, com 7577 espécies documentadas (FROST, 2023). Os anfíbios possuem características peculiares em relação a outros vertebrados, visto que apresentam um ciclo de vida bifásico, ou seja, metade aquático, metade terrestre. Com isso, foi necessário o desenvolvimento de severas adaptações evolutivas que conferissem a proteção contra predadores naturais ou particularidades de ambos os ambientes. Sendo assim, por não possuírem presas, garras ou ferrões, o principal foco evolutivo desses animais está em sua superfície tegumentar, que é responsável por diversas funções, como respiração, termorregulação, osmorregulação e secreção de toxinas protetoras (KÖNIG; BININDA-EMONDS; SHAW, 2015).

A pele dos anfíbios conta com dois tipos glandulares: as glândulas mucosas e as granulosas (Figura 10). As primeiras são responsáveis basicamente pela secreção de mucinas e mucopolissacarídeos, que garantem a lubrificação e umidificação da superfície tegumentar, além de diminuir a perda de água. Em contraste, as glândulas granulosas produzem um arsenal protetivo de toxinas que são ativas contra uma gama de predadores e microrganismos. (DEMORI et al., 2019). A liberação desses compostos geralmente é acionada pelo estímulo aos adrenoreceptores presentes na parte exterior da glândula, portanto, quando o animal é exposto a algum estresse, ocorre a liberação de adrenalina e noradrenalina, que estimula os receptores desencadeia a compressão de células mioepiteliais adjacentes à glândula, resultando na liberação das substâncias (CONLON et al., 2014; DEMORI et al., 2019).

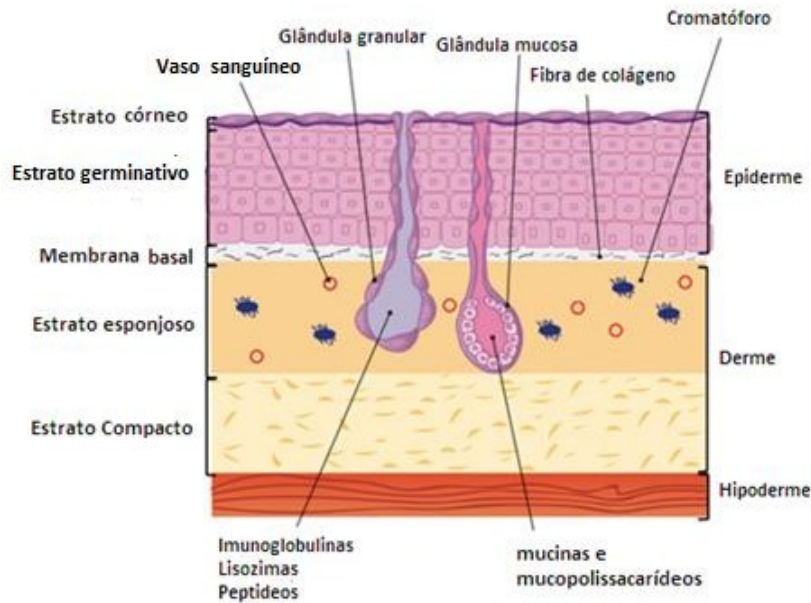


Figura 10. Representação esquemática do tegumento de anfíbios. Fonte: DEMORI, et al 2019.

Uma das substâncias presentes nesse conjunto de compostos protetivos de anfíbios são os peptídeos antimicrobianos. O primeiro estudo com esses peptídeos em anuros data de 1987 e foi realizado por Michael Zasloff com a espécie *Xenopus laevis*, de onde foram isolados os peptídeos Magainina 1 e Mangainina II. A partir desse momento, foram isolados diversos outros peptídeos antimicrobianos de anfíbios, classificados em pelo menos 26 famílias distintas, como as dermaseptinas, temporinas, bombininas, esculetinas, entre outras. Não obstante, a cada ano novos peptídeos são descobertos e suas peculiaridades acabam por originar novas famílias, como é o caso das japonicanas, tigerininas e nigrocinas (CARVALHO, 2011).

1.9. Peptídeos antimicrobianos da subfamília Phyllomedusinae

Anuros Hilídeos (Hylidae) pertencentes à subfamília Phyllomedusinae possuem um arsenal peptídico em suas secreções cutâneas. Até o momento, foram identificados agentes antimicrobianos, miotrópicos, inibidores de protease, antioxidantes, imunomodulatórios potenciadores da bradiginina, moduladores do sistema nervoso central, entre outros. Esses peptídeos têm sido amplamente estudados, tendo os peptídeos antimicrobianos um grande foco, devido à situação emergente de resistência a antibióticos (SENA, 2021). Em relação aos peptídeos antimicrobianos, a família possui seis classes descritas: dermaseptinas, filoxinas, dermatoxinas, filoseptinas, plasticininas e polipeptídios de pele YY (Tabela 1) (SENA, 2021).

Tabela 1. Peptídeos da subfamília Phyllomesinae.

Classe peptídica	Número de resíduos de aminoácidos
Dermaseptinas	24-34
Filoxinas	19
Dermatoxinas	32
Filoseptinas	19-21
Plasticininas	23
Polipeptídios de pele YY	36

Fonte: SENA, 2021.

As dermaseptinas têm chamado bastante atenção devido a sua capacidade antimicrobiana associada ao baixo efeito hemolítico. São peptídeos antimicrobianos policatiônicos formadores de α -hélice e possuem significativos efeitos tanto em bactérias, como em fungos, vírus e protozoários. Além disso, descobertas recentes demonstram alguns efeitos antitumorais associados (BARTELS, 2019).

Existem diversas dermaseptinas descritas, o peptídeo DRS- CA-1, por exemplo, é uma dermaseptina isolada de *Phyllomedusa camba* que demonstra atividades antimicrobianas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive resistentes a drogas, sem apresentar efeitos hemolíticos significantes (Zhu, et al., 2018). Assim, peptídeos dessa classe possuem características marcantes e se mostram promissores para o estudo e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, podendo, também, ter sua atividade melhorada por alterações estruturais ou outros mecanismos, como é o caso de um estudo recente feito por Hazime e colaboradores (2022) em que foram associadas nano partículas de alginato à dermaseptina DRS-B2 de *Phyllomedusa bicolor*, resultando em uma melhora do efeito antimicrobiano (HAZIME et al., 2022).

A espécie *Pithecopus rohdei* (Mertens, 1926) (Figura 11) pertence à subfamília Phyllomedusinae e é rotineiramente apelidada de perereca das folhagens. Essa espécie de anfíbio possui glândulas parotóides (pequenas protuberâncias localizadas na dorsal do tímpano) e costumam ser encontrados em regiões subtropicais e tropicais úmidas de baixa altitude, além de savanas úmidas, rios e plantações. É possível encontrá-los também em regiões do sudeste do Brasil, como São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais (SBH, 2023).



Figura 11. Exemplar adulto de *Pithecopus rohdei*. Foto de Gabriel Rodrigues. Fonte: SBH, 2023.

Segundo estudos, machos dessa espécie, quando ameaçados, adotam um comportamento defensivo de encolher-se, de forma a permanecer com o corpo arqueado para dentro e patas retraídas (ENNES e WOGEL, 2017). Esse comportamento pode ser justificado por favorecer a exposição das glândulas, facilitando a liberação de toxinas caso o animal seja atacado (TOLEDO; SAZIMA; HADDAD, 2010; ENNES e WOGEL, 2017). Assim, tais glândulas são responsáveis principalmente pela secreção de compostos importantes para a defesa do animal, sendo ativos contra bactérias, fungos, protozoários, dentre outros, o que torna esse tipo de secreção muito visada por pesquisadores na área de bioprospecção de compostos biologicamente ativos.

2. Justificativa

A resistência microbiana é uma realidade bastante preocupante no âmbito hospitalar e terapias alternativas têm sido alvo de intensos estudos no meio científico, principalmente devido às dificuldades de tratamento em cepas resistentes. (CAMOU et al., 2017). Esse cenário desestimula a indústria farmacêutica, uma vez que antes do lançamento do produto farmacêutico são necessárias quatro fases dispendiosas de estudos, sendo uma fase pré-clínica e três clínicas. Tal processo tem duração média de 10 anos e são gastos aproximadamente 1 bilhão de dólares; dessa forma, o alto investimento está associado a um risco de baixo retorno financeiro, o que torna a pesquisa por novos fármacos antimicrobianos desvantajosa para as empresas (BRENNAN, 2016). Assim, os peptídeos antimicrobianos são uma opção promissora, já que possuem um amplo espectro de atividades associadas a baixas chances de desenvolvimento de resistência, devido ao fato de apresentarem múltiplos mecanismos de ação (PATOCKA, 2019) Além disso, a alternativa do uso de PAMs, em esquema de monoterapia ou associados a outros antibióticos, traz consigo a possível diminuição da

dosagem e, conseqüentemente, a redução de efeitos colaterais associados ao fármaco, sem prejudicar o efeito sobre as bactérias. (LEÓN-BUITIMEA et al., 2020). Considerando esse cenário, o grupo de pesquisa liderado pela Profa.Dra. Mariana S. Castro tem trabalhado há vários anos na busca por peptídeos biologicamente ativos na secreção cutânea de anuros, tendo em vista a pesquisa de possíveis agentes anti-infecciosos que possam auxiliar no combate da resistência microbiana. Assim, neste trabalho, serão expostos os passos voltados à caracterização biológica do peptídeo Dermaseptina PR-1, isolado da secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei*.

3. Objetivo-Geral

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar as propriedades biológicas de um novo peptídeo da classe das dermaseptinas proveniente da secreção cutânea de *Phithecopus rohdei*, com foco na avaliação de atividades antimicrobianas em bactérias sensíveis e resistente a Polimixina B, além de atividades quimiotáticas em neutrófilos, hemolíticas e sinérgicas.

4. Resultados e Discussão

As metodologias, resultados e a discussões estão apresentados em formato de artigo científico, empregando o *template* da revista Biomolecules (<http://www.mdpi.com/journal/biomolecules>). Optou-se por apresentar o artigo científico ainda em língua portuguesa, com exceção do título e *abstract*, porém, oportunamente será feita a tradução total para a língua inglesa e a conseqüente submissão do artigo.



Purification and Biological Characterization of Dermaseptin PR-1, a Novel Antimicrobial Peptide Isolated from the Skin Secretion of the Frog *Pithecopus rohdei* (Mertens, 1926)

Joyce Silva dos Santos ^{1,2}, Gabriela Calvi Zeidan ^{1,3}, Brunna de Oliveira Silva ^{1,2}, Daiane Ribeiro ², Isabelle Souza Luz ², Raquel Takaya ², Izadora Cristina Moreira de Oliveira ⁴, Sonia Maria de Freitas ⁴, Sônia Nair Bão ⁵, Ricardo Bentes de Azevedo ⁶, Fabiano José Q. Costa ⁷; Wagner Fontes ² and Mariana S. Castro ^{1,2,*}

¹Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil; joycee.silva1709@gmail.com (J.S.S.); brunna.oliveira014@gmail.com (B.O.S.); gabizeidan@hotmail.com (G.C.Z.); osmindo@unb.br (O.R.P.J.); mscastro@unb.br (M.S.C.)

²Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil; daianeribeiro92@gmail.com (D.R.); isabelle.sluz@gmail.com (I.S.L.); raquel.takaya@hotmail.com (R.T.); wagnerf@unb.br (W.F.)

³Institute of Agriculture Sciences, Federal University of Viçosa, *campus* Florestal, MG, 35690-000, Brazil; gabizeidan@hotmail.com (G.C.Z.)

⁴Laboratory of Biophysics, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil; nina@unb.br (S.M.F.); izadorabiomed@gmail.com (I.C.M.O.)

⁵Electron Microscopy Laboratory, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil; snbao@unb.br (S.N.B.)

⁶Laboratory of Nanobiotechnology, Department of Morphology and Genetics, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, 70.910-900, Brazil; razevedo@unb.br (R.B.A.)

⁷Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN/DF), Brasilia, DF, 70830-010, Brazil; fj3unb@gmail.com (F.J.Q.C)

*Correspondence: mscastro@unb.br (M.S.C.)

Abstract:

The indiscriminate use of antibiotics has caused high levels of bacterial resistance around the world. As a result, there was a significant increase in resistant superbugs, leading to the need for the use of high-spectrum antibiotics and serious side effects, such as Polymyxin B, one of the last treatment alternatives for hospital superbugs associated with intense nephrotoxicity. In view of this, research involving molecules with antimicrobial potential is of great importance to society and has gained space in the scientific community. An interesting option for this scenario is the study of natural antimicrobial molecules, such as antimicrobial peptides (AMPs) also called host defense peptides (HDPs). These peptides are short molecules, cationic, amphipathic and abundant in nature, being often found in the cutaneous secretion of amphibians. In this work, a potent antimicrobial peptide present in the cutaneous secretion of *Pithecopus rohdei* was isolated and characterized. This peptide was purified by RP-HPLC, exhibited a molecular mass of 3080.66 Da, and presented a peptide sequence of 30 amino acid residues (GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQGPES-COOH). This novel peptide was named as Dermaseptin PR-1 (PR in reference to *Pithecopus rohdei*, DRS PR-1). The secondary structure of the peptide in the presence of SDS and TFE was evaluated by circular dichroism, making it possible to infer that DRS PR-1 forms an alpha helix structure when in contact with membranes. The peptide showed inhibitory effects on Gram-positive bacteria, Gram-negative susceptible and in a multiresistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), a result that was corroborated by Scanning Electron Microscopy (SEM) where it was possible to observe the formation of pores and deep roughness in the membrane of this bacterium, which leads to disruption of the wall and lysis of the microorganism. Furthermore, as a preliminary assay to evaluate the immunomodulatory capacity of this dermaseptin, DRS PR-1 was tested for its ability to induce neutrophil chemotaxis, where a moderate chemotactic activity was observed. These results suggest that the peptide can act in a dual way, eradicating bacteria directly and indirectly. Finally, the hemolytic activity of the peptide was evaluated and resulted in a low percentage of hemolysis in the concentrations related to the MICs of sensitive bacteria (2% to 9% of hemolysis) also observing a moderate hemolytic activity in the inhibitory concentration of the superbug *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (23% of hemolysis).

Keywords: anurans; *Pithecopus rohdei*; skin secretion; antimicrobial peptides; Dermaseptins; neutrophils; quimiotaxis; Polimixin B; KPC; synergism.

1. Introdução

A resistência a antimicrobianos tem se tornado um sério problema de saúde pública, não sendo restrita apenas a países subdesenvolvidos, mas sim se tratando de uma dificuldade em escala global. Esse cenário causa sofrimentos imensuráveis e desfalques significativos na economia (MURRAY et al., 2022). Infecções por patógenos multirresistentes têm sido relatadas constantemente, sendo que, após a pandemia de COVID-19, devido ao mau uso de agentes antimicrobianos, o número de casos sofreu aumentos significativos e preocupantes (GASPAR et al., 2021). Com isso, a busca por novos compostos com atividade antimicrobiana se mostra necessária e urgente. Peptídeos antimicrobianos de anuros têm sido amplamente estudados para esse fim, sendo uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos. Esses peptídeos geralmente são catiônicos, apresentam de 10 a 46 resíduos de aminoácidos, são anfipáticos e podem apresentar estruturas alfa-hélice, folha beta ou mistas. Além disso, geralmente é observado uma quantidade maior de aminoácidos hidrofóbicos na composição. Essas características influenciam diretamente nos mecanismos de atividade desses compostos, que podem agir tanto na superfície da membrana plasmática, quanto em alvos intracelulares (NASCIMENTO et al., 2005; CONLON, 2011; LADRAN e NICOLAS, 2016).

A subfamília *Phyllomedusinae* (família *Hylidae*) possui um arsenal de peptídeos antimicrobianos descritos, como é o caso das dermaseptinas, um amplo grupo de peptídeos com diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, fungicida, antiparasitária imunomodulatória, antitumoral (PRESTINACI et al., 2015). Compostos com atividade antimicrobiana e imunomodulatória são uma excelente opção para o tratamento de infecções, já que se trata de um mecanismo duplo de eliminação de patógenos. Além disso, outra possibilidade promissora é a combinação de drogas antimicrobianas comerciais com peptídeos antimicrobianos naturais, o que pode simbolizar um aumento da atividade do agente em uso na clínica, e consequentemente a diminuição da dose empregada e redução dos efeitos colaterais (ZHU et al., 2022).

O presente estudo descreve a purificação e a caracterização química e biológica de uma nova dermaseptina isolada do anuro *Pithecopus rohdei*, demonstrando seus efeitos antimicrobianos, quimiotáticos e sinérgicos com o antibiótico Polimixina B sobre o microrganismo resistente *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta dos espécimes e extração da secreção cutânea de *Pithecopus rohdei*

Sob licença da ICMBIO (SISBIO no. 71054-1) foram coletados espécimes adultos da espécie *Pithecopus rohdei* no município de Uruçuca, Bahia. A secreção cutânea dos animais foi obtida por meio da aplicação de uma corrente elétrica branda nas regiões dorsais dos anuros, sendo esses posteriormente libertados na natureza. Após a coleta, o material foi congelado, liofilizado e armazenado a -20 °C. O procedimento de coleta da secreção foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso Animal da Universidade de Brasília.

2.2. Fracionamento cromatográfico da secreção cutânea de *P. rohdei*

Alíquotas da secreção cutânea obtida foram ressuspensas em água deionizada com TFA 0,1% (v/v), centrifugadas e inseridas em coluna de fase reversa (RP-HPLC) do tipo C₁₈ (Shimadzu Shim-pack CLC ODS 6,0 ID x 150 mm, 5 µm) para o fracionamento. O comprimento de onda utilizado na detecção foi de 216 nm na região do ultravioleta (UV). As condições de eluição foram gradientes lineares de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% em acetonitrila (solução de eluição) nas seguintes proporções: 0 a 25% de solução de eluição em 5 min; 25 a 45% de solução de eluição em 25 min; 50 a 100% de solução de eluição A em 10 min, seguido de lavagem final por 5 min com 100% de solução de eluição. A coleta das frações cromatográficas resultantes da eluição foi realizada manualmente, sendo as amostras posteriormente secas em concentrador a vácuo (SpeedVac Modelo SC 100, Savant) e armazenadas a -20°C.

2.3. Análise por espectrometria de massas

Após a realização de um ensaio de varredura para detecção de atividade antimicrobiana (como descrito no item 2.9) nas frações cromatográficas coletadas, as frações ativas foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para isso, as frações que exibiram atividade antimicrobiana foram ressuspensas em TFA 1% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v), homogeneizadas e aplicadas em placa de aço inoxidável juntamente com a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA 10 µg/µL em TFA 1% (v/v) em acetonitrila de forma proporcional (1:1). O kit padrão

“Pepmix” foi utilizado para calibração, sendo essa uma referência de amostras peptídicas de massas conhecidas. A análise foi realizada em modo positivo refletido, utilizando-se a faixa de m/z de 750 a 4000.

2.4. Quantificação empregando espectroscopia UV

As amostras peptídicas foram quantificadas com o emprego de espectroscopia UV nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm como descrito por AITKEN e LEARMONTH (1996) em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brazil). Os peptídeos foram alíquotados, secos em concentrador à vácuo (SpeedVac Modelo SC 100, Savant) e armazenados a -20 °C até o momento de sua utilização.

2.5. Sequenciamento químico

Para se determinar a estrutura primária do peptídeo purificado, a fração de interesse foi sequenciada pelo processo de degradação de Edman, utilizando um sequenciador de peptídeos e proteínas automático modelo PSSQ 33A (Shimadzu, Japão). A calibração do equipamento foi realizada com uma mistura padrão PTH-aminoácidos.

2.6. Análises computacionais

Os bancos de dados utilizados para nas buscas de similaridades foram BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e APD (<http://aps.unmc.edu/AP/>). Para o alinhamento das sequências, foi utilizada a ferramenta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), NetWheels (<http://tools.alanmol.com.br/NetWheels/>) (MOR; CASTRO; FONTES, 2018), I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) além de várias ferramentas disponíveis em <https://www.expasy.org/>, que foram utilizadas para obter as propriedades físico-químicas do peptídeo, projeções em alfa-hélices e predições de estrutura tridimensional (GASTEIGER et al., 2005).

2.7. Síntese química

O peptídeo foi produzido por síntese química em fase sólida por estratégia Fmoc pela empresa especializada Genone (<https://www.genone.com.br/>). Os resultados relacionados à pureza da molécula produzida estão disponíveis nos Anexos I e II.

2.8. Análise por dicroísmo circular

O tipo de estrutura secundária do peptídeo foi estimado por Dicroísmo Circular (DC), utilizando-se o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier, conectado a uma bomba de água (Instrumentos analíticos, Japão). Os ensaios foram realizados com o peptídeo na concentração de 12 µM (0,036 mg/mL), em água (controle) e na presença de diferentes concentrações de dodecil sulfato de sódio (SDS) (0,05 a 10 mM) e trifluoretanol (TFE) diluídos também em água (10, 20 e 50%). O primeiro reagente forma micelas que simulam as membranas plasmáticas dos microrganismos, enquanto o segundo é um conhecido indutor de alfa hélice. Os espectros dicroicos foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, na faixa de comprimentos de onda distantes da luz UV (190-260 nm) com intervalos de 0,2 nm, taxa de escaneamento de 50 nm/min, tempo de resposta de 1 segundo e largura da banda de 1,7, na temperatura de 25 °C. Os resultados foram analisados no software Spectra Manager II. Os resultados foram obtidos a partir da média decinco leituras consecutivas e a subtração dos valores do sinal dicroico do espectro do controle, sem a presença do peptídeo, utilizado como branco. As elipticidades (mdeg) obtidas no ensaio foram convertidas em elipticidade molar ([θ]).

2.9. Atividade antimicrobiana

Os experimentos de varredura e para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados baseados no protocolo de inibição por microdiluição em caldo padronizadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (M07-A9, 2018).

O ensaio de varredura foi realizado com as bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, a fim de verificar quais componentes resultantes do fracionamento da secreção de *P. rohdei* apresentavam atividade inibitória sobre o crescimento microbiano. Cada fração cromatográfica de cinco corridas de RP-HPLC foram reunidas, solubilizadas em 250 µL de água deionizada e incubadas com 50 µL da suspensão bacteriana, preparado de acordo com o método descrito abaixo.

Para determinação da CIM, os efeitos antimicrobianos foram avaliados em seis bactérias sensíveis,

sendo três Gram-positivas: *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *E. faecalis* (ATCC 29292) - e três Gram-negativas: *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Além disso, o ensaio foi realizado com a superbactéria *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) de um isolado clínico do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Inicialmente, para cultivar os microrganismos, 200 µL dos inóculos mencionados foram adicionados a 7 mL de caldo Muller-Hinton. A solução foi incubada por 24 h a 37 °C sob agitação constante. Passado este período, a densidade óptica foi avaliada e ajustada para uma faixa entre 0,08-0,1 utilizando um espectrofotômetro a 625 nm, para que a concentração de bactérias de trabalho chegasse ao valor aproximado de 1×10^8 células. Posteriormente, foram realizadas duas diluições: a primeira de 1:10 a partir do inóculo com a densidade óptica ajustada, e a segunda de 1:20 a partir do inóculo diluído (CLSI, 2018). Todo o experimento foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato contendo os peptídeos em diferentes concentrações, iniciando na concentração de 256 µM no primeiro poço, sendo esse volume diluído seriamente até a concentração de 0,125 µM no último poço. Posteriormente à diluição, foram adicionados aos poços 50 µL do inóculo diluído (diluição 1:20) de cada bactéria, obtendo-se uma concentração final de 5×10^6 células/mL e um volume de 100 µL por poço. Os controles utilizados foram água deionizada para indicar crescimento pleno e formaldeído 0,4% (v/v) para inibição do crescimento. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A leitura foi realizada a 620 nm em leitora de placas Multiskan®FC (Thermo Scientific, USA) após o tratamento. Para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), as leituras foram realizadas e a CIM foi assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

2.10. Avaliação dos efeitos de Dermaseptina PR-1 sobre a morfologia celular de KPC por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O protocolo deste experimento foi proposto baseado em LUCA et al. (2013) e MANGONI et al. (2004), com as devidas adaptações. O inóculo bacteriano de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) foi preparado retirando-se as bactérias diretamente da placa de cultura, com o auxílio de uma alça calibrada de 10 µL, e colocado-as em tubos falcon contendo 7 mL de tampão PBS 1x. O inóculo foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm e ajustado para a faixa de 0,08-0,1 (aproximadamente 1×10^8 células). 100 µL desse material foram inseridos em tubos de polipropileno contendo 100 µL do peptídeo em diferentes concentrações finais (8 µM, 16 µM e 32 µM) escolhidas conforme os valores de CIM obtidas no ensaio antimicrobiano, sendo a primeira referente à metade da CIM, a segunda ao valor da CIM e a terceira ao dobro da CIM. A suspensão obtida foi então encubada por 30 min a 37 °C. Como controle foram utilizados 100 µL de água deionizada juntamente com a bactéria.

Passado o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi retirado e o sedimento restante foi dissolvido em 500 µL de fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% em 0,2 M tampão cacodilato de sódio, pH 7,2) e incubado por 24 h. Após a fixação primária, a amostra foi então centrifugada a 10.000 g durante 2 min e o sobrenadante foi novamente descartado. Com isso, a suspensão foi lavada por 2 vezes com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Logo após, foi adicionado o reagente tetróxido de ósmio 1% e, após 1 h de incubação, foi realizada a lavagem com tampão e as amostras foram inseridas em uma lamínula, onde adicionou-se 1 gota da solução de poli-L-lisina, que foi então espalhada pela superfície. O material resultante foi reservado por 5 minutos para secagem e, posteriormente, foi retirado o excesso de reagente. A amostra passou então por uma série de banhos com acetona em diferentes concentrações (50%, 70%, 90% e 100%) para garantir sua desidratação gradual, sendo a última concentração repetida por 2 vezes. Após a desidratação, a amostra foi inserida em câmara de ponto crítico por 40 min, para que toda a água fosse retirada. Por fim, a amostra foi submetida ao processo de metalização com ouro e o material foi analisado a partir das imagens geradas no equipamento Quanta 450 – FEI (Philips/FEI), com um aumento de 10.000 vezes no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) da UnB.

2.11. Ensaio de sinergismo pelo método de checkerboard

A avaliação de sinergismo foi realizado por ensaio de *checkerboard*. Esse método permite avaliar concentrações combinadas dos agentes antimicrobianos, sendo possível observar se as combinações resultam em atividades sinérgicas, antagônicas ou indiferentes, comparadas às concentrações isoladas de cada agente. (ORHAN et al., 2005; KARAOGLAN et al., 2013).

Em um primeiro momento, foi realizado o ensaio antimicrobiano em triplicata com o antibiótico Polimixina B contra *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) seguindo a metodologia do tópico 2.9, com o objetivo de se obter a concentração inibitória mínima do antibiótico contra a cepa resistente avaliada.

Já se tratando do ensaio de sinergismo propriamente dito, inicialmente, tanto o antibiótico comercial quanto o peptídeo foram filtrados em filtro Millex GV 0,22 µm e, logo após, foram inseridos 100 µL da solução de polimixina B a 550 µM na coluna 12, da linha A a F de uma placa de 96 poços. Foi então realizada uma diluição seriada do antibiótico da coluna 12 a 2, sendo que, na coluna 1, foi plaqueado o peptídeo em sua concentração mínima inibitória. Após a diluição do antibiótico, foram inseridos 50 µL de Dermaseptina PR-1 na concentração de 256 µM, dessa vez, foi feita uma diluição de cima para baixo, da linha A – F, dessa forma, foi possível obter diferentes combinações dos agentes antimicrobianos. Ao finalizar as diluições, 50 µL da suspensão bacteriana (aproximadamente 5x10⁸ células/mL) foram inseridos. Os respectivos controles foram: solução de Polimixina 550 µM + KPC para inibição do crescimento, água + KPC para crescimento pleno, DRS PR-1 + KPC para CIM do peptídeo e água deionizada + meio Mueller Hinton como branco. A leitura foi realizada a 625 nm em leitora de placas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, EUA) após 22 h de incubação a 37 °C. O esquema de plaqueamento está demonstrado na Figura 1. Apesar da concentração do antibiótico se apresentar na unidade µm/mL, para uniformizar as unidades de trabalho, as concentrações de Polimixina B foram convertidas em µM para. Assim, ao fim da tripla diluição, a concentração inicial da Polimixina B passou a ser 137,5 µM e a do peptídeo 64 µM.

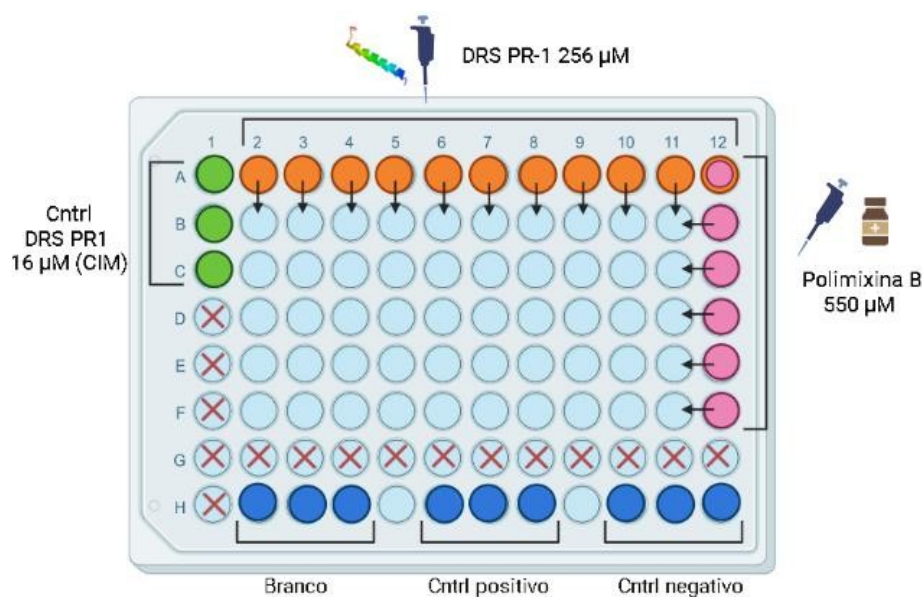


Figura 1. Esquema de plaqueamento de Polimixina B e DRS PR-1 para avaliação do possível sinergismo entre as duas drogas.

Para isso, analisa-se as concentrações inibitórias fracionadas em relação às concentrações inibitórias isoladas, que foram comparadas a partir da formula:

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

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

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

Os resultados considerados sinérgicos, antagonísticos e indiferentes são analisados de acordo com BONAPACE et al. (2002), como mostrado abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de ICIF e relação com atividade sinérgica, antagonista ou indiferente.

ICIF = \sum CIF A+B	
CIF \leq 0,5	Sinergismo
CIF $>$ 1,0	Antagonismo
ICIF entre 0,5 e 1	Indiferente

CIM: Concentração Inibitória Mínima
CIF: Concentração Inibitória Fracionada
ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada

2.12. Atividade citolítica em eritrócitos humanos

As avaliações do efeito hemolítico do peptídeo Dermaseptina PR-1 e foi realizada segundo o protocolo estabelecido em CASTRO et al. (2009). Inicialmente, foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue humano*. Após a coleta, o sangue total foi centrifugado a 800 g por 5 min a 25 °C, gerando uma porção inferior contendo eritrócitos e uma porção superior contendo plasma. O plasma foi retirado e os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão-salina Tris-HCl 0,01 M contendo NaCl 0,15 M em um pH de 7,4. Posterior à lavagem, foi preparada uma solução de 1% (v/v) de eritrócitos em tampão, sendo esta a solução de trabalho. A solução de eritrócitos preparada foi então tratada com o peptídeo em concentrações decrescentes (128 μ M a 0,0625 μ M) em uma placa de 96 poços de fundo redondo. Os controles negativo (ausência de hemólise) e positivo (hemólise completa) foram, respectivamente, solução tampão Tris-HCl 0,1 M + NaCl 0,15 M e solução Triton X-100 1% (v/v). Após o tratamento, os eritrócitos foram incubados por 1h em temperatura ambiente. Passado esse tempo, as placas foram centrifugadas e 100 μ L do sobrenadante foi plaqueado em placa de 96 poços, dessa vez de fundo chato. A leitura foi realizada em leitora de placas Multiskan® FC (Thermo Scientific, USA) a 405 nm. Os resultados obtidos foram expressos em média \pm DP. A porcentagem de hemólise foi calculada a partir da fórmula abaixo:

$$\% \text{ Hemólise} = 100 (A_{\text{peptídeo}} - A_{\text{Tris-salina}}) / (A_{\text{Triton}} - A_{\text{Tris-salina}})$$

Utilizando o programa GraphPad Prism v.5.04, foi possível calcular as concentrações capazes de promover 50% de hemólise e obter o gráfico resultante do experimento.

Todo procedimento adotado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

2.13. Ativação de neutrófilos e avaliação do efeito quimiotático do peptídeo

A doação de sangue para a obtenção das células PNMs (polimorfonucleares) foi realizada por doador do sexo masculino, em jejum, para que fossem evitadas influências hormonais. Um volume de 20 mL foi coletado e 12 mL foram inseridas em um gradiente de Percoll 60% sobre 70%, o material foi centrifugado por 15 min a 1300 rpm. Ao fim da centrifugação, foram realizadas duas lavagens com tampão HBSS somadas à duas lavagens com água milli-Q para lisar as hemácias e retirar completamente o Percoll. (TELES et al., 2012). As células foram então ressuspendidas em HBSS e separadas para contagem (1 μ L em 49 μ L de azul de tripan 0,2%) e avaliação da morfologia (coloração com Kit Panótico). A avaliação da influência do peptídeo na migração de células imunes, mais especificamente em neutrófilos, foi realizada como descrito por (CANO; VARGAS; LAVOIE, 2016), em equipamento de RTCA (do inglês *Real Time Cell Analyzer*). Utilizando uma placa CIM (CIM-Plate 16; ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA) de 16 poços, que possui dois compartimentos

sobrepostos em contato com uma fina lâmina de outro, responsável por medir a impedância das células migrantes. A montagem da placa inferior foi realizada inserindo 160 μL de fMLP a 100 nM de 160 μL de tampão HBSS como controle negativo. A placa superior foi então encaixada na inferior, e 25 μL de HBSS foram adicionados a todos os poços superiores. As placas foram fechadas e o material foi incubado durante 1h em temperatura ambiente antes da adição das células, para que fosse formado um gradiente quimiotático entre as câmaras. Após a incubação, foram adicionados 60 μL de peptídeo (para avaliar a migração do peptídeo sozinho para fMLP) e peptídeo + neutrófilos (para avaliar o efeito competitivo do peptídeo em relação ao fMLP na migração). A análise foi programada para realizar leituras de 5 em 5 minutos durante 3 horas. Ao fim do experimento, as placas foram lavadas com PBS, tripsina e água deionizada para posterior reutilização.

Todo procedimento adotado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

3. Resultados e Discussão

3.1. Purificação da Dermaseptina PR-1

A secreção cutânea de *P. rohdei* foi fracionada por RP-HPLC usando uma coluna C18 e resultou em um perfil cromatográfico típico com a eluição de 34 frações (Figura 2). A partir de um ensaio antimicrobiano de triagem de *com E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) foram observadas diversas frações ativas, eluídas em concentrações próximas de 40% de acetonitrila. Em 2009 e 2011, CASTRO et al. e CONLON et al. demonstraram que existe uma relação entre um maior tempo de retenção na coluna com um maior índice de hidrofobicidade, características marcantes de peptídeos antimicrobianos. (CASTRO et al., 2009; CONLON et al., 2011) Dentre as frações que apresentaram atividade antimicrobiana, a fração 27 se mostrou bastante promissora, sendo assim a escolhida para dar continuidade aos estudos. Tal fração foi analisada por espectrometria de massas de dessorção/ionização a laser assistida por matriz- tempo de voo (MALDI-TOF MS) com matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), mostrando que a massa molecular do componente principal foi de 3081,107 Da $[M + H]^+$ (Figura 3).

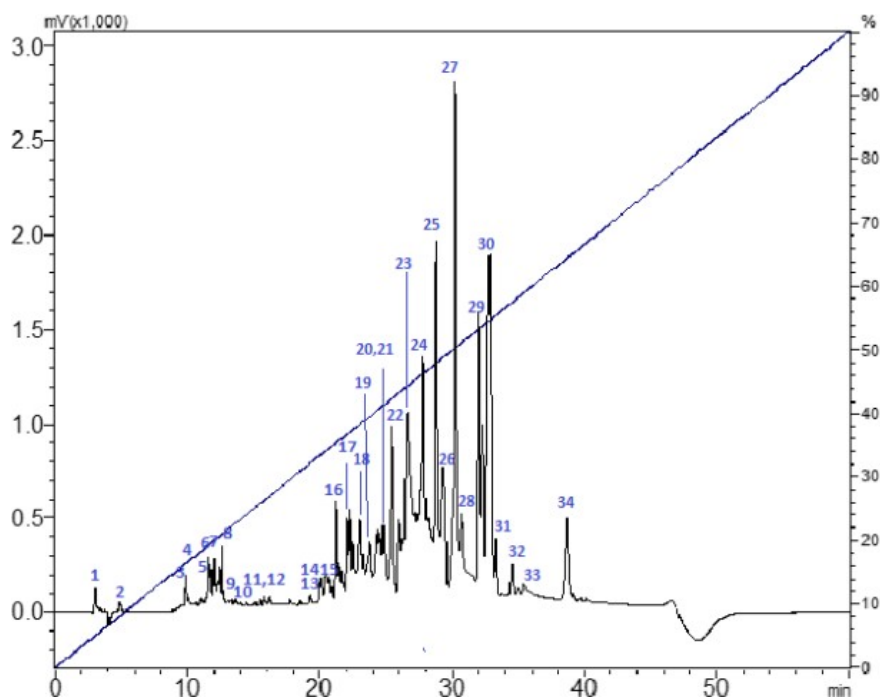


Figura 2. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção cutânea de *P. rohdei* em coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS 6,0 ID x 150 mm, 5 μm) em sistema HPLC com fluxo de 1 mL/min e monitoramento ao UV em 216 nm.

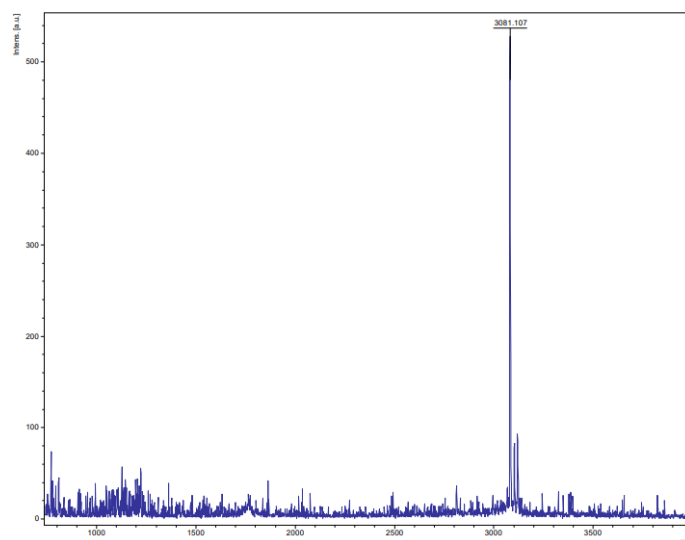


Figura 3. Espectro de massas da fração 27 obtida em modo positivo com uso de refletor (matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico).

3.2. Caracterização estrutural da Dermaseptina PR-1

O peptídeo de *P. rohdei* foi sequenciado por degradação de Edman e apresentou uma cadeia peptídica composta por 30 resíduos de aminoácidos: ¹GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES³⁰-COOH. Com o auxílio das bases de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e APD (<http://aps.unmc.edu/AP/>), foi possível comparar a estrutura peptídica encontrada com outras presentes na natureza, observando-se um perfil de alta similaridade (entre 80-83%) com as dermaseptinas 11PS isoladas de *Phyllomedusa sauvagii* e 3.1TR1 e 3.2, de *Phyllomedusa trinitatis* (Figura 4). Por esse motivo, o inédito peptídeo aqui isolado foi denominado Dermaseptina PR-1 (PR em alusão à espécie *Pithecopus rohdei*).

Dermaseptin-1PR	GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES	30
Dermaseptin-11PS	ALWKTLLKGAGKVFVGHVAKQFLGSQGQPES	30
Dermaseptin-3.1TR	GLFKTLIKGAGKMLGHVAKQFLGSQGQPES	30
Dermaseptin-3.2TR	GLFKTLIKGAGKMLGHVAKQFLGSQGQPES	30
	* *	

Figura 4. Alinhamento entre o peptídeo dermaseptin PR-1 isolado de *P. rohdei* e as dermaseptinas 11PS de *Phyllomedusa sauvagii* e 3.1TR e 3.2TR de *P. trinitatis*. O símbolo "*" indica resíduos idênticos e ":" indica substituições conservativas.

O peptídeo dermaseptina-PR1 apresenta em sua composição uma variedade de resíduos de aminoácidos comuns em peptídeos de defesa do hospedeiro (PHDs) como glicina, lisina, alanina e leucina (WANG, 2017). Trata-se de um peptídeo catiónico, com carga +3 e massa molecular de 3080 Da. O índice GRAVY diz respeito a hidrofobicidade do peptídeo ou proteína. Um índice positivo indica hidrofobicidade, enquanto um índice negativo indica maior hidrofiliabilidade. A grande maioria dos peptídeos antimicrobianos apresentam uma estrutura majoritariamente hidrofóbica e, do contrário do que se espera, a Dermaseptina PR1 apresentou um perfil hidrofílico, já que possui um índice de hidrofobicidade de 40 % e um índice GRAVY negativo (Tabela 2).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas de Dermaseptina PR-1.

Peptídeo	Mass Calc. (Da)	Mass Obs. (Da)	Carga Líquida	Razão Hidrofóbica (%)	GRAVY
DRS PR-1	3080,66	3080,10	+3	40%	-0,09

A massa molecular calculada (calc) e a massa molecular observada (obs) são expressas na forma desprotonada

O peptídeo foi avaliado por dicroísmo circular para avaliação dos componentes de estrutura secundária presentes. Sabe-se que, quando em contato com as micelas formadas por SDS ou na presença de um solvente indutor de alfa-hélice como o TFE, alguns peptídeos antimicrobianos tendem a se enovelar e assumir uma conformação alfa helicoidal (KRITTANAI e JOHNSON, 2000). O perfil do espectro dicroico do peptídeo Dermaseptina PR-1 em água a 25 °C apresentou uma banda de valor negativo a partir de 190 nm, o que sugere que a molécula assume uma estrutura desordenada em meio aquoso. Já os espectros obtidos na presença de SDS e TFE, em diferentes concentrações, foram observadas a formação de uma banda positiva por volta de 190 nm e bandas negativas em 208 e 222 nm, resultado compatível com o padrão observado para a formação de alfa-hélice em proteínas e peptídeos. Pode-se observar, também, que a formação de estruturas helicoidais parece se mostrar dose-depente a partir do aumento da concentração dos reagents (CORRÊA, 2009) (Figura 5).

Ensaio de dicroísmo circular (CD), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) demonstraram que Dermaseptinas DS-01 de *Phithecopus oreades* e Dermaseptina B2 de *P. bicolor*, por exemplo, seguem o mesmo padrão e assumem uma estrutura em alfa-hélice anfipática quando em contato com micelas formadas por SDS ou solventes apolares. Esses resultados corroboram com a premissa que dermaseptinas adotam esse tipo de enovelamento; (SHALEV et al., 2002; LEQUIN et al., 2003; CASTIGLIONE, et al., 2005; DOURADO, 2021). Além disso, Vanhoye et al. (2004) demonstraram que existe uma relação entre a presença de resíduos de glicina e lisina e a formação de estruturas em alfa-hélice. Devido a essa estrutura, os aminoácidos polares e apolares ficam dispostos em faces opostas do eixo da hélice, e, quando interage com a membrana, o peptídeo insere uma porção majoritariamente hidrofóbica na bicamada lipídica. À medida que as moléculas interagem com a superfície celular, são formados buracos transitórios que muitas vezes permitem a entrada de moléculas de baixo peso molecular antes de provocarem a ruptura total da membrana.

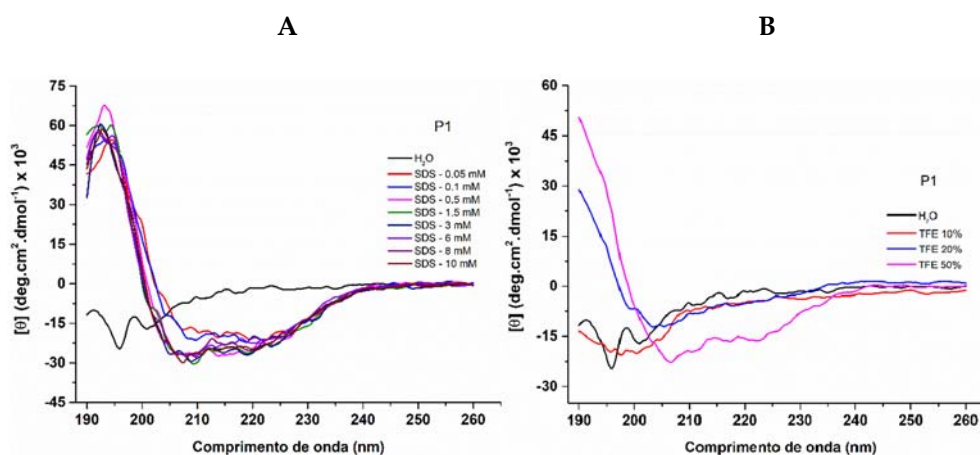


Figura 5. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 a 260 nm) de Dermaseptina PR-1 em água e em diferentes concentrações de (A) SDS e (B) TFE a 25 °C.

A projeção em roda helicoidal proposta por Schiffer-Edmunson indica que a Dermaseptina PR-1 apresenta um comportamento coerente com essa premissa (Figura 6A), apresentando resíduos hidrofóbicos (amarelo) dispostos majoritariamente do lado contrário aos hidrofílicos. Logo, considerando esses resultados, presume-se que a Dermaseptina PR-1 assumira uma conformação helicoidal quando em contato com superfície celular. Na projeção em roda helicoidal de Schifer-Edmunson e no modelo tridimensional feita pelo servidor I-Tasser (Figura 6B) é possível observar que o peptídeo possui uma região hidrofóbica e outra que possui alguns resíduos hidrofílicos, caracterizando uma molécula anfipática, o que é comum em PAMs. Os resíduos positivos são ligados à membrana na interface hidrofílica e o núcleo hidrofóbico interage com a região de hidrocarbonetos (apolar), promovendo, assim, a destabilização da membrana e a lise celular.

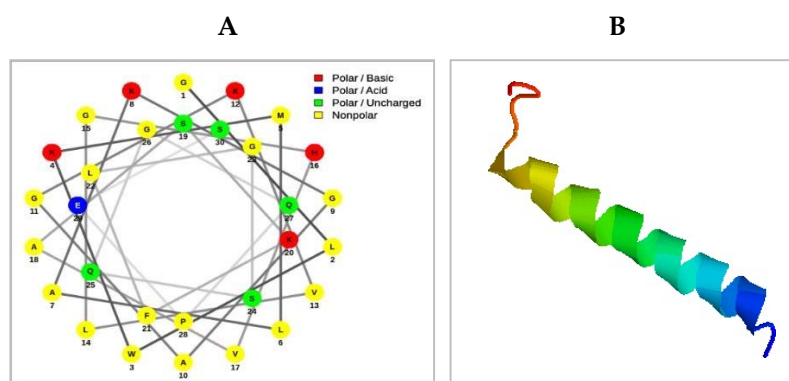


Figura 6. (A) Projeção em roda helicoidal de Schiffer-Edmunson de Dermaseptina PR-1 mostrando a face hidrofílica polar e a face apolar e hidrofóbica. **(B)** Modelo de estrutura secundária 3D usando o servidor I-Tasser.

3.3. Caracterização da atividade antimicrobiana da Dermaseptina PR-1

O ensaio antimicrobiano demonstrou que a Dermaseptina PR-1 possui atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo uma superbactéria multirresistente. Os valores das CIMs obtidos foram inferiores a 4 μM , para bactérias sensíveis, com exceção de *E. faecalis*, cujo CIM foi de 32 μM . Já para a bactéria multirresistente *K. pneumoniae carbapenase* (KPC) a CIM ficou em 16 μM (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de Dermaseptina PR-1 (CIM, μM).

Microrganismos	DRS PR-1
Bactérias Gram-negativas	
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	1
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	2
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	4
Bactérias Gram-positivas	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	4
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	8
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	32
Bactéria multirresistente (MR)	
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	16

Em relação às bactérias Gram-negativas, foi observado valor de CIM de 1 μM para *E. coli*, em concordância com o resultado obtido por MOR; HANI e NICOLAS (1994). Porém, em outros trabalhos, foram observados valores de CIMs superiores, como nos trabalhos de CONCEIÇÃO et al. (2006) e ZHU et al. (2018) com as dermaseptinas DRS-H3, DRS-DU1, em que foram observados os valores de 6 μM e 4 μM , respectivamente. Em relação à *P. aeruginosa*, nosso resultado está em concordância com o trabalho de NAVON-VENEZIA et al. (2002) com a Dermaseptina DRS-S4, no qual também foi observado uma CIM de 4 μM . Em contrapartida, a grande maioria dos estudos mais atuais com dermaseptinas trazem CIMs superiores a 10 μM para essa bactéria, como descrito por SHAMS et al. (2019), que obteve um valor de atividade mínimo de 34 μM com a DRS-B1 e HUANG et al. (2017) que demonstrou o valor de 64 μM com a DRS-PH. Já para *K. pneumoniae*, foi observado uma CIM de 2 μM , metade do valor encontrado por CHEN (2021) com a DRS-AC.

No que concerne às bactérias Gram-positivas, foram observadas inibições a partir da concentração de 4 μM para *S. aureus* e *S. epidermidis*, assim como demonstrado por ZHU et al. (2018) com a Dermaseptina DRS CA-1. Porém, diversos trabalhos trazem CIMs superiores, no gênero *Staphylococcus*, como CONLON et al. (2007), que encontrou uma CIM de 128 μM para *S. aureus*. Além disso, a bactéria *E. faecalis* foi uma exceção aos resultados de CIMs encontrados em outras bactérias sensíveis testadas, pois no caso dessa bactéria, a inibição de crescimento só começou a ocorrer a partir de 32 μM . Um resultado bastante superior aos encontrados, o que reflete um padrão observado no meio científico; um exemplo é o trabalho realizado em 2017 por HUANG et al. que também encontrou um valor de CIM de 32 μM para a Dermaseptina DRS-PH contra *E. faecalis*, bem

como no trabalho de CHEN et al. (2021), que demonstrou o mesmo valor de CIM para Dermaseptina PS4. Já no trabalho de ZHU (2018) realizado com as Dermaseptinas DRS-DU1 e DRS-CA1, foram observados CIMs mais elevadas, de 64 μM e 128 μM , respectivamente. Esses altos valores se devem, provavelmente, a uma resistência intrínseca presente no gênero *Enterococcus* (tipo de resistência não adquirida que faz parte das características genéticas naturais do microrganismo). Nesse caso, o gênero *Enterococcus* pode expressar resistência por diversos mecanismos, como a produção de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) de baixa afinidade, diminuição da permeabilidade membranar, alteração da parede celular e produção de bombas de efluxo. (HOLLENBECK,2012).

Outro resultado promissor foi a atividade em *K. pneumoniae carbapenemase* (KPC), que apresentou uma CIM de 16 μM , um valor baixo, levando em consideração que essa bactéria possui um abundante arsenal de mecanismos de resistência associados. Em seu trabalho realizado em 2012, COSTA demonstrou que dois análogos do peptídeo Hylina a1 de *Boana albopunctata* (HA1_1996 e HA1_1883) apresentaram atividade inibitória em KPC com uma CIM de 128 μM , uma concentração 8 vezes maior do que a encontrada para a Dermaseptina PR-1. Esses resultados demonstram um grande potencial antimicrobiano do peptídeo de *P. rohdei*, e indicam uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento de infecções por KPC.

BARTELS et al. (2019) publicaram uma revisão bibliográfica apresentando uma visão geral dos efeitos de dermaseptinas em bactérias patogênicas, e eritrócitos humanos. O estudo contou com a avaliação dos resultados de diversos autores, considerando as concentrações inibitórias mínimas encontradas até o momento para as principais dermaseptinas isoladas de anuros em bactérias como *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. O estudo demonstrou que diversas dermaseptinas apresentam valores de CIM menores que 10 μM para essas bactérias, ilustrando o interessante potencial antimicrobiano dessa classe de peptídeos em baixas concentrações. Em adição, pode-se observar também nesse estudo que as dermaseptinas, em geral, possuem baixa toxicidade em eritrócitos, o que pode ser justificado pela carga mais próxima à neutralidade das células humanas, em oposição às membranas plasmáticas de bactérias que apresentam cargas negativas em suas superfícies (KUMAR, 2018). Essa característica torna a classe das dermaseptinas ainda mais interessante para estudos de novas moléculas para fins terapêuticos.

A microscopia eletrônica de varredura é comumente usada para avaliar alterações na morfologia bacteriana após o tratamento com peptídeos antimicrobianos, avaliando principalmente danos relacionados à integridade da membrana plasmática (LI et al., 2021) Esses dados podem auxiliar no desvendamento dos possíveis mecanismos de ação do peptídeo, como a interação do tipo barrel-stave, carpet-like e poro toroidal. A bactéria multirresistente *K. pneumoniae carbapenemase* (KPC) foi submetida ao tratamento com a Dermaseptina PR-1 durante 30 min nas concentrações de 8 μM (Figura 7B) e 16 μM (Figura 7C), onde pôde-se observar, em um aumento de 10.000 vezes, rugosidades e depressões formadas na superfície celular até mesmo em metade da concentração inibitória mínima, o que demonstra que o peptídeo possui uma ação dose-dependente rápida e potente.

Tais resultados sugerem que a Dermaseptina PR-1 atua desestruturando e desestabilizando a membrana celular da bactéria, promovendo, assim, a morte do microrganismo. Peptídeos como Temporina L de *Rana temporaria* também foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura em *E. coli*, demonstrando rugosidades e poros profundos na superfície celular dessa bactéria na concentração de 2 μM , assim como foi observado com a Brevinina-OS, de *Odorrana schmackeri*, confirmando, mais uma vez, o efeito da interação de peptídeos catiônicos com a membrana celular de bactérias, que interrompem a integridade da membrana e levam ao extravasamento do conteúdo citoplasmático (ZHOU et al., 2020).

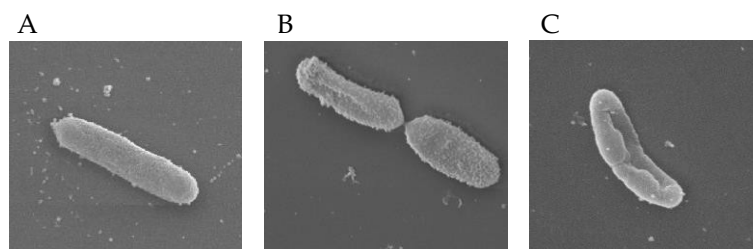


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura da bactéria KPC após 30 min de incubação com Dermaseptina PR-1. (A) Controle sem tratamento; (B) Incubação da bactéria com a Dermaseptina PR-1 a 8 μM (metade da CIM); (C) Incubação da bactéria com a Dermaseptina PR-1 a 16 μM (CIM).

O peptídeo foi avaliado quanto à sua capacidade em agir sinergicamente em relação à polimixina B sobre o isolado clínico de KPC. A cepa de *K. pneumoniae* carbapenemase apresentou CIM de 4,25 μM (4 μg/mL) para Polimixina B, o que a caracteriza como resistente à droga, segundo o ponto de corte estabelecido pelo CLSI (2018) (CIM > 2 μ/mL) enquanto o peptídeo apresentou CIM de 16 μM como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas para a Polimixina B e a Dermaseptina PR-1.

CIM de Polimixina B	CIM de DRS PR-1
4,25 μM	16 μM

Diante da escassez de antibióticos eficazes contra bactérias Gram-negativas resistentes, drogas usadas no passado têm sido reinseridas, como é o caso da Polimixina B. Esse medicamento é um lipopeptídeo policatiônico que tem como mecanismo de ação a interação com o LPS de bactérias Gram-negativas, porém, apesar do uso, o antimicrobiano é causador de intensa nefrotoxicidade, o que ilustra a urgência no desenvolvimento de novas terapias ou a descoberta de tratamentos combinados (LIMA et al., 2021).

A combinação de drogas tem como objetivo a redução das doses empregadas, o que consequentemente leva à diminuição dos efeitos adversos. Nesse ensaio, quando associada, a Dermaseptina PR-1 demonstrou a capacidade de manter a atividade inibitória da Polimixina B em doses menores que a CIM obtida no ensaio antimicrobiano. Para demonstrar esse resultado, avaliou-se o o poço com a menor concentração de ambos os agentes capazes de inibir o crescimento do inóculo, nesse poço, as concentrações de Polimixina B e Dermaseptina PR-1 foram, respectivamente, 0,133 μM e 2 μM (Poço 8F). Identificadas as concentrações de interesse, foi realizado o cálculo para avaliar o efeito dessa interação, relacionando as concentrações inibitórias combinadas às individuais de cada agente antimicrobiano. Os cálculos realizados resultaram em um ICF de 0,156 μM, o que significa uma ação sinérgica entre os dois compostos nas concentrações avaliadas (Tabela 5).

Tabela 5. Cálculo para avaliação do efeito sinérgico, antagônico ou indiferente da combinação de drogas.

Poço	IF P= PB.C/ [PB]	IF DRS= DRS.C/ [DRS]	CIF = CIF PB + CIF DRS	Resultado
Poço 8F	0,133/ 4,25= 0,031	2/16=0,125	0,031+0,125 = 0,156	0,5 = Sinergismo

PB: Polimixina B; PB.C = Polimixina B combinada; DRS = Dermaseptina PR-1; DRS.C = Dermaseptina PR-1 combinada; CIF= Concentrações Inibitórias Fracionadas; ICF= Índice de Concentração Fracionada.

A figura 8 exibe esse resultado graficamente, onde a concentração 0,133 μM de Polimixina B e a concentração de 2 μM de peptídeo não promoviam a inibição do crescimento bacteriano quando testadas isoladamente, enquanto essas mesmas concentrações combinadas resultaram em 100% de inibição da bactéria.

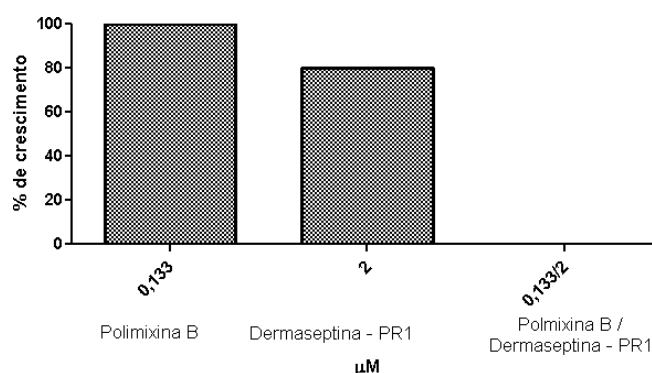


Figura 8. Influência sobre o percentual de crescimento bacteriano promovido pela associação de Dermaseptina PR-1 e Polimixina B.

Esses resultados sugerem que a Dermaseptina PR-1 atua em sinergismo com a Polimixina B, reduzindo em 32 vezes a concentração inibitória do antibiótico e em 8 vezes a concentração do peptídeo (Tabela 6). Com isso, é possível presumir que o efeito sinérgico entre Dermaseptina PR-1 e Polimixina B poderia promover uma redução dos efeitos de nefrotoxicidade causados pela Polimixina B, aumentando também as possibilidades de utilização do peptídeo, visto que, em associação, a atividade hemolítica do peptídeo não se mostra significativa devido à redução da sua concentração efetiva para 2 µM.

Tabela 6. Influência na concentração promovida pela associação de Polimixina B e Dermaseptina PR-1.

CIM Polimixina B	Menor concentração inibitória combinada de Polimixina B	Redução da dose
4,25 µM	0,133 µM	32 x
CIM Dermaseptina PR-1	Menor concentração inibitória combinada de DRS PR-1	-
16 µM	2 µM	8 x

Diversos estudos com peptídeos antimicrobianos de anuros tem explorado as atividades sinérgicas dessas moléculas, como é o caso dos PAMs LL-37 e Magainina II, que demonstraram grande aumento da atividade antimicrobiana em *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) em combinação com antibióticos comerciais como polimixina E, piperacilina, azitromicina, linezolida, entre outros (FATIMA, 2021). Também foram demonstrados efeitos desse peptídeo em bactérias Gram-negativas resistentes, como *P. aeruginosa*. Outro exemplo de peptídeo antimicrobiano que apresenta sinergismo com antibióticos comerciais é o peptídeo 1018 que apresenta sinergismo em cepas de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae*. O peptídeo DJK-5, nesse mesmo trabalho, apresentou ação sinérgica com meropenem, eritromicina, gentamicina, ciprofloxacina e vancomicina contra *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. aureus* (PLETZER et al., 2018).

O efeito de sinergismo entre Polimixina B e Dermaseptina PR-1 pode ocorrer em virtude da polimixina apresentar uma estrutura química catiônica e anfipática, muito semelhante as estruturas observadas em PAMs. Essa estrutura promove a formação de poros na membrana através da interação eletrostática do peptídeo pelas cargas negativas da superfície celular das bactérias (VELKOV et al., 2013).

3.4. Caracterização da atividade hemolítica da Dermaseptina PR-1 sobre eritrócitos humanos

Uma importante fase para o avanço dos estudos com peptídeos antimicrobianos é a avaliação da sua capacidade citolítica em eritrócitos, já que esse aspecto é uma das limitações do uso de novas moléculas na clínica. Assim, é essencial que esses efeitos sejam conhecidos e driblados através de modificações moleculares feitas com estratégias de bioinformática (WANG, 2020). No caso da Dermaseptina PR-1, com exceção de *E. faecalis* e KPC, foi observada uma baixa atividade hemolítica nas concentrações inibitórias mínimas associadas aos testes antimicrobianos das demais bactérias testadas (entre 1 µM e 8 µM – hemólise de 2% a 9%), indicando potencial efeito antimicrobiano associado à uma baixa taxa hemolítica (Figura 9). Em CIMs mais altas, como em 32 µM (*E. faecalis*), foi observada uma taxa de hemólise bastante superior, próxima a 50%. No que diz respeito à bactéria multirresistente KPC, foi obtido um valor de aproximadamente 23% de hemólise na concentração referente à CIM (16 µM).

Apesar desses resultados, podem ser realizadas modificações na estrutura e carga do peptídeo, de forma a diminuir a atividade hemolítica. CHEN et al. (2005), ao realizarem estudos de bioinformática em peptídeos antimicrobianos, observaram uma diminuição do efeito hemolítico quando houve a substituição de L-aminoácidos por D-aminoácidos na porção hidrofóbica. Outro critério observado nesse mesmo estudo foi a redução da hemólise em análogos em que se substituiu alguns resíduos hidrofóbicos da face polar por resíduos um pouco menos apolares. Assim, essas e outras estratégias podem ser empregadas visando a obtenção de compostos com baixa atividade hemolítica e atividade antimicrobiana mantida ou melhorada.

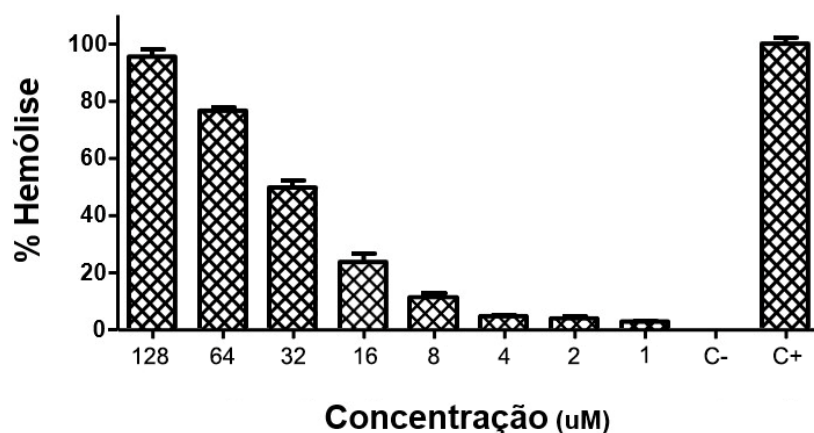


Figura 9. Atividade hemolítica promovida pela incubação da Dermaseptina PR-1 com eritrócitos humanos. Controle positivo (hemólise completa, C+): solução de Triton X-100 1% (v/v) e controle negativo (ausência de hemólise, C-): tampão Tris-salina.

3.5. Avaliação do efeito quimiotático da Dermaseptina PR-1 sobre neutrófilos humanos

O ensaio de RTCA demonstrou que a Dermaseptina PR-1 estimula a migração direcional de neutrófilos. Para isso, o ensaio foi realizado em duas partes: a primeira visava demonstrar a quimiotaxia dos neutrófilos migrando diretamente para o peptídeo, sendo o peptídeo plaqueado na placa inferior e as células ativadas nos poços superiores, e a segunda teve como objetivo avaliar a força quimioatraente entre neutrófilo e peptídeo, sendo o peptídeo incubado juntamente com os neutrófilos na placa superior e fMLP na placa inferior. Dessa forma, em uma primeira análise, foi possível inferir que o peptídeo Dermaseptina PR-1 apresentou capacidade quimiotática, ou seja, ocorreu migração dos neutrófilos em direção ao peptídeo (curva em verde: aumento da migração em relação ao controle negativo, em azul). Essa observação foi confirmada com a segunda parte do ensaio, onde foi possível observar a diminuição da migração de neutrófilos para fMLP, quando esses estão associados ao peptídeo (curva em roxo: diminuição da migração para fMLP em relação ao controle positivo, em vermelho), revelando uma competição quimiotática entre a Dermaseptina PR-1 e fMLP, demonstrando, assim, o efeito quimiotático do peptídeo devido à interferência na migração para o agente quimiotático padrão (Figura 10).

Nossos resultados se assemelham com os obtidos por DOURADO (2021) em que se observou um padrão de migração semelhante para a Dermaseptina B2 de *Phyllomedusa bicolor*. Outro trabalho com resultados semelhantes de quimiotaxia é o de AUVYNET (2008) que avaliou a capacidade quimiotática de DRS-S9 obtendo resultados positivos para a migração. Alguns peptídeos antimicrobianos conhecidos possuem capacidade quimiotática, como a Temporina A (RADZISHEVSKY et al., 2005) e LL-37 (BRAVO, 2016), ambos formadores de alfa-hélice, um padrão que se repete na maioria dos peptídeos antimicrobianos descritos com essa ação, indicando que tal atividade possa estar relacionada à estrutura tridimensional do peptídeo (DOURADO, 2021).

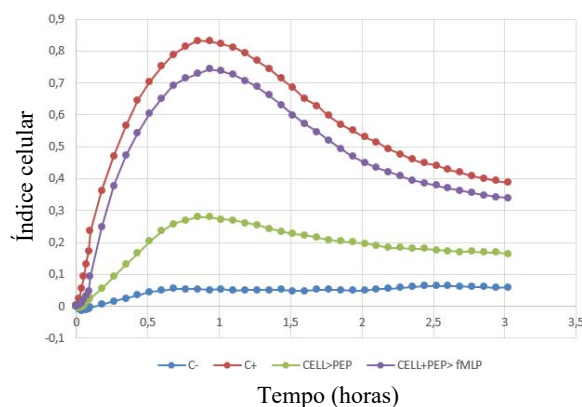


Figura 10. Avaliação do potencial quimioatraente da Dermaseptina PR-1. As amostras foram avaliadas por um período de 3 horas, com intervalos de 5 minutos entre as leituras.

4. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento, caracterização química e avaliação dos efeitos biológicos da Dermaseptina PR-1, uma nova dermaseptina isolada da secreção cutânea do anuro *Pithecopus rohdei*. A estratégia de fracionamento por RP-HPLC associada ao monitoramento da atividade antimicrobiana resultou na purificação de um peptídeo com massa molecular de 3080,66 Da. Esse peptídeo foi sequenciado por degradação de Edman, resultando em um peptídeo com 30 resíduos de aminoácidos (GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQQQPES-COOH), rico em resíduos de lisina, leucina e glicina. Estudos de dicroísmo circular na presença de SDS e TFE demonstraram que o peptídeo adota uma conformação predominantemente alfa-hélice, um padrão bastante observado em peptídeos antimicrobianos de anuros com atividades antibacterianas. Em relação às atividades biológicas, o peptídeo demonstrou uma interessante atividade antimicrobiana em bactérias de importância clínica em baixas concentrações, sendo que, além de bactérias sensíveis aos antibióticos convencionais, foi observada uma atividade promissora em (KPC), para a qual se obteve uma CIM de 16 µM, um valor baixo considerando os diversos mecanismos de resistência associados a esse patógeno. Para um maior entendimento dos mecanismos de ação do peptídeo, a bactéria submetida ao tratamento foi avaliada por MEV, em que foi observada a formação de profundas depressões e poros na membrana celular do microrganismo, validando a hipótese que o peptídeo desestabiliza a membrana através de sua ligação catiônica à superfície negativamente carregada das bactérias. O ensaio de sinergismo demonstrou que a Dermaseptina PR-1 age sinergicamente com polimixina B, reduzindo em até 32 vezes a CIM de polimixina e em 8 vezes a CIM do peptídeo para KPC. Além disso, foi realizado um ensaio de quimiotaxia para uma avaliação inicial dos efeitos imunomodulatórios do peptídeo, sendo possível inferir que Dermaseptina PR-1 induz a migração de neutrófilos na concentração de 16 µM. Por fim, para que o peptídeo tenha condições de seguir em objetivos terapêuticos, foi avaliada a capacidade citolítica em eritrócitos humanos, obtendo-se resultados baixos (<10%) para a maioria das bactérias testadas. Em relação à KPC, foi obtido uma hemólise de aproximadamente 23%, porém, estudos podem ser realizados para que se faça um desenho racional de análogos que contenham alterações que permitam a diminuição do efeito hemolítico sem influenciar na potente ação antimicrobiana da dermaseptina sobre a KPC. Esses resultados trazem perspectivas positivas em relação à dermaseptina de *Pithecopus rohdei*, que pode atuar tanto diretamente na membrana de bactérias, como no recrutamento de células imunes para o sítio inflamatório, sugerindo uma potente ação dupla do peptídeo.

5. Referências

- AITKEN, A., LEARMONTH, M. The Protein Protocols Handbook. Molecular Biotechnology, v. 4, p. 17-24, 1996.
- AUVYNET, C. et al. Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9. **FEBS Journal**, v. 275, n. 16, p. 4134-4151, 2008.
- BARTELS, E. J. H.; DEKKER, D.; AMICHE, M. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: A review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future directions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1421, 2019.
- BONAPACE, C. R. et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 4, p. 363-366, 2002.
- BRAVO, M. **O Efeito do peptídeo catelicidina LL-37 sobre a propriedade imunossupressora das células-tronco mesenquimais**. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- CASTIGLIONE-MORELLI, M. A. et al. Conformation-activity relationship of a novel peptide antibiotic: Structural characterization of dermaseptin DS 01 in media that mimic the membrane environment. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 80, n. 5, p. 688-696, 2005.
- CASTRO, M. S. et al. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 291-296, 2009.
- CHEN, D. et al. Evaluating the bioactivity of a novel antimicrobial and anticancer peptide, dermaseptin-PS4 (Der-PS4), from the skin secretion of *Phyllomedusa sauvagii*. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2974, 2019.
- CHEN, J. et al. In vitro and in vivo studies on the antibacterial activity and safety of a new antimicrobial peptide dermaseptin-AC. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. e01318-01321, 2021.

CHEN, Y. et al. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12316-12329, 2005.

CIUMAC, D. et al. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 537, p. 163-185, 2019.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 10^a. ed. 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28^a. ed. 2018.

CONLON, J. M. et al. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). **Toxicon**, v. 50, n. 4, p. 498-506, 2007.

CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2303-2315, 2011.

COSTA, F. J. **Desenho racional e produção de análogos do peptídeo antimicrobiano Hylina a1 com maior potencial terapêutico**. 99f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) Universidade de Brasília. Brasília. 2012.

DOURADO, C. **Avaliação dos peptídeos Dermaseptina B2 e Dermatoxina isolados da pele do anuro *Phyllomedusa bicolor* na modulação da imunidade inata**. 69f. Dissertação (Mestrado Biologia Animal) Universidade de Brasília. Brasília. 2021.

FATIMA, H. et al. Recent strategies for inhibiting multidrug-resistant and β -lactamase producing bacteria: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 205, p. 111901, 2021.

GASPAR, G. G.; et al. Incidência de infecções relacionadas à saúde e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* no período pré e durante a pandemia de covid-19 em unidade de terapia intensiva adulto. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 101062, 2021.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v.3, n. 5, p. 421-569, 2012.

HUANG, L. et al. Dermaseptin-PH: A novel peptide with antimicrobial and anticancer activities from the skin secretion of the south American orange-legged leaf frog, *Pithecopus (Phyllomedusa) hypochondrialis*. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1805, 2017.

KARAOGLAN, I. et al. 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. 1830-1837, 2013.

KRITTANAI, C.; JOHNSON, W. C. The relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 39, n. 2, p. 132-141, 2000.

KUMAR, P., KIZHAKKEDATHU, J. N., & Straus, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**. v.8, n.1, p. 4, 2018.

LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 21, n. 7, p. 1341-1371, 2016.

LEQUIN, O. et al. Helical structure of dermaseptin B2 in a membrane-mimetic environment. **Biochemistry**, v.42, n. 34, p. 10311-10323, 2003.

LI, S. et al. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 109, p. 103-115, 2021.

LIMA, S. G. DE; LIMA, N. P.; BRITO, M. A. M. Nefrotoxicity associated with the use of Polymixin B: A systematic review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 11839-11858, 2021.

LUCA, V. et al. Esculentin(1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 15, p. 2773-2786, 2013.

MANGONI, M. L. et al. Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 380, n. 3, p. 859-865, 2004.

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. 31635-31641, 1994.

MURRAY, C et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. **Lancet**. v.399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NASCIMENTO, A. C. et al. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein & Peptide Letters**, v. 10, n. 3, p. 227–238, 2005.

NAVON-VENEZIA, S. et al. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with in vivo activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 689-694, 2002.

ORHAN, G. et al. 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.

PLETZER, D.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. W. Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. 1–14, 2018.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309, 2015.

RADZISHEVSKY, I. S. et al. Effects of acyl versus aminoacyl conjugation on the properties of antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49 n. 6. p. 2412–2420, 2005.

SHALEV, D. E.; MOR, A.; KUSTANOVICH, I. Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptinS3. **Biochemistry**, v. 41, n. 23, p. 7312-7317, 2002.

SHAMS, M. V.; NAZARIAN-FIROUZABADI, F.; ISMAILI, A.; SHIRZADIAN-KHORRAMABAD, R. Production of a recombinant dermaseptin peptide in hairy roots of *Nicotiana tabacum* with enhanced antimicrobial activity. **Molecular Biotechnology** v. 61, n. 4, p. 241–252, 2019.

TELES, L. M. B. et al. Comparison of the neutrophil proteome in trauma patients and normal controls. **Protein& Peptide Letters**, v. 19, n. 6, p. 663-672, 2012.

VANHOYE, D. et al. Membrane association, electrostatic sequestration, and cytotoxicity of Gly-Leu-rich peptide orthologs with differing functions. **Biochemistry**, v. 43, n. 26, p. 8391-409, 2004.

VELKOV, T., et al. Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics. **J Med Chem**, v. 53, n. 5, p. 1898-1916, 2010.

WANG, G. Bioinformatic analysis of 1000 amphibian antimicrobial peptides uncovers multiple length- dependent correlations for peptide design and prediction. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p.491, 2020.

ZHU, H. et al. Discovery of two skin-derived dermaseptins and design of a TAT-fusion analogue with broad-spectrum antimicrobial activity and low cytotoxicity on healthy cells. **PeerJ**, v. 2018, n. 9, p. e5635, 2018.

ZHU, Y. et al. Antimicrobial peptides, conventional antibiotics, and their synergistic utility for the treatment of drug-resistant infections. **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 4, p. 1377-1422, 2022.

5. *Perspectivas Futuras*

O presente trabalho tem como perspectivas futuras:

- ✓ Avaliar funções imunomodulatórias como a produção de EROs, indução de fagocitose e indução de NETs, assim como, indução de citocinas pré e pro-inflamatórias.
- ✓ Avaliar os efeitos antimicrobianos da Dermaseptina PR-1 em outros microrganismos resistentes problemáticos na vivência hospitalar, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) e seus possíveis efeitos sinérgicos com antibióticos comercialmente disponíveis.
- ✓ Produzir análogos da Dermaseptina PR-1 com vistas à reduzir a atividade hemolítica.
- ✓ Avaliar o comportamento dose-resposta de indução de quimiotaxia de neutrófilos humanos.
- ✓ Avaliar o sinergismo da Dermaseptina PR-1 quando em conjunto com antimicrobianos carbapenêmicos.
- ✓ Avaliar os efeitos sobre protozoários de interesse médico e veterinário, como *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
- ✓ Avaliar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos sobre linhagens de células tumorais e não tumorais de mamíferos.

6. *Referências Bibliográficas*

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª Edição. **Elsevier**, 2015.
- ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. DA R. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 240-244. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Módulo 3 Resistência Microbiana – mecanismo e impacto clínico. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2007.
- AITKEN, A., LEARMONTH, M. *The Protein Protocols Handbook*. Molecular Biotechnology, v. 4, p. 17-24, 1996.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v.26, p.43-57.2016.

ATANASOVA, K. **Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell wall toxins in the lungs of pigs**. 130p. Dissertation (Doctoral Veterinary Sciences) Ghent University, Belgium 2010.

AUVYNET, C. et al. Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9. **FEBS Journal**, v. 275, n. 16, p. 4134-4151, 2008.

AZEVEDO CALDERON, L. et al. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. **Amino acids**, v. 40, p. 29-49, 2011.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.

BALTZER, S. A.; BROWN, M. H. Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 228-35, 2011.

BARROS, L. L. DOS S.; MAIA, C. DO S. F.; MONTEIRO, M. C. Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 4, p. 388-396, 2016.

BARTELS, E. J. H.; DEKKER, D.; AMICHE, M. Dermaseptins, multifunctional antimicrobial peptides: A review of their pharmacology, effectivity, mechanism of action, and possible future directions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1421, 2019.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p.1529-1539, 2006.

BLANCO, P. et al. Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p.14, 2016.

BONAPACE, C. R. et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 4, p.363-366, 2002.

BRAVO, M. **O Efeito do peptídeo catelicidina LL-37 sobre a propriedade imunossupressora das células-tronco mesenquimais**. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

BRENNAN, Zachary. Long-awaited UN report calls for breaking link between drug R&D costs and prices. **Regulatory Focus**. 14, September, 2016. Disponível em: <https://www.raps.org/regulatory-focus%E2%84%A2/news-articles/2016/9/long-awaited-un-report-calls-for-breaking-link-between-drug-r-d-costs-and-prices>. Acesso em 12/02/2023.

CAMOU, T.; ZUNINO, P.; HORTAL, M. Cicatrización por segunda intención en carcinomas basocelulares extensos luego de la cirugía micrográfica de Mohs: a propósito de un caso clínico. **Revista Medica Del Uruguay**, v. 34, n. 3, p. 277–284, 2018.

- CANO, P. M.; VARGAS, A.; LAVOIE, J. P. A real-time assay for neutrophil Chemotaxis. **BioTechniques**, v. 60, n. 5, p. 245-251, 2016.
- CARVALHO, A. C. **Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados das secreções cutâneas de anuros dos gêneros *Proceratophrys*, *Physalaemus* e *Hypsiboas***. 2011. 147 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)-Universidade de Brasília, Brasília, 2011
- CASTIGLIONE-MORELLI, M. A. et al. Conformation-activity relationship of a novel peptide antibiotic: Structural characterization of dermaseptin DS 01 in media that mimic the membrane environment. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 80, n. 5, p. 688-696, 2005.
- CASTRO, M. S. et al. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 291-296, 2009.
- CHAPELLE, C. et al. Treatment of utis due to klebsiella pneumoniae carbapenemase-producers: How to use new antibiotic drugs? a narrative review. **Antibiotics**, v.10, n.11, p. 1332, 2021.
- CHEN, D. et al. Evaluating the bioactivity of a novel antimicrobial and anticancer peptide, dermaseptin-PS4(Der-PS4), from the skin secretion of *Phyllomedusa sauvagii*. **Molecules**, v. 24, n. 16, p.2974, 2019.
- CHEN, J. et al. In vitro and in vivo studies on the antibacterial activity and safety of a new antimicrobial peptide dermaseptin-AC . **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p.e01318-01321, 2021.
- CHEN, Y. et al. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p.12316-12329, 2005.
- CIUMAC, D. et al. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 537, p. 163-85, 2019.
- Clinical and Laboratory Satandards Institutte (CLSI) Methods for dilution antimicrobial susceptibilty tests for bacteria that grow aerobically. 10. ed.2018.
- Clinical and Laboratory Satandards Institutte (CLSI). Performance Stardarts for Antimicrobial Suceptibility Testing. 28th Ediction. 2018.
- CONLON, J. M. et al. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). **Toxicon**, v. 50, n. 4, p.498-506, 2007.
- CONLON, J. M. et al. A glycine-leucine-rich peptide structurally related to the plasticins from skin secretions of the frog *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae). **Peptides**, v. 30, n. 5, p.888-892, 2009.
- CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p.2303-2315, 2011.
- CONLON, J.; 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.

COSTA, F. J. **Desenho racional e produção de análogos do peptídeo antimicrobiano Hylina a1 com maior potencial terapêutico**. 99f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) Universidade de Brasília. Brasília. 2012.

DA COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p.45-57, 2017.

DELMAR, J. A.; SU, C. C.; YU, E. W. Bacterial multidrug efflux transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 43, n. 1, p.93-117, 2014.

DEMORI, I. et al. Peptides for skin protection and healing in amphibians. **Molecules**, v. 24, n. 2, p.347, 2019.

DENAMUR, E. et al. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2021v. 19, n. 1, p. 37-54. .

DORWARD, D. A. et al. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 5, p. 1172–1184, 2015.

DOURADO, C. **Avaliação dos peptídeos Dermaseptina B2 e Dermatoxina isolados da pele do anuro *Phyllomedusa bicolor* na modulação da imunidade inata**. 69f. Dissertação (Mestrado Biologia Animal) Universidade de Brasília. Brasília. 2021.

DŽIDIĆ, S. et al . Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

EBENHAN, T. et al. Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **BioMed Research International**, 2014.

ENNES, F. Aspectos quantitativos do comportamento de defesa da perereca-da-folhagem *Phyllomedusa rohdei* Mertens, 1926. **Cadernos UniFOA**, v. 12, n. 34, p. 97-104, 2017.

FATIMA, H. et al. Recent strategies for inhibiting multidrug-resistant and β -lactamase producing bacteria: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 205, p. 111901, 2021.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Electronic Database accessible at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2016. Acesso em 13/03/2023.

GASPAR, G. G.; et al. Incidência de infecções relacionadas à saúde e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* no período pré e durante a pandemia de covid-19 em unidade de terapia intensiva adulto. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p.101062, 2021.

GOOTZ, T. D. et al. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p.1998-2004, 2009.

GUISADO-GIL, A. et al. Impact of the COVID-19 pandemic on antimicrobial consumption and hospital-acquired candidemia and multidrug-resistant bloodstream infections. **Antibiotics**, v.9, n.11, p. 816, 2020.

HAZIME, N. et al. Enhanced antibacterial activity of dermaseptin through its immobilization on alginate nanoparticles—effects of menthol and lactic acid on its potentialization. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 787, 2022.

HERPETO – Atlas colaborativo da herpetologia brasileira. Disponível em: <https://herpeto.org/anuro/pithecopus-rohdei/>. Acesso em: 2 fev 2023.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012.

HUANG, H. W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1292-1302, 2006.

HUANG, L. et al. Dermaseptin-PH: A novel peptide with antimicrobial and anticancer activities from the skin secretion of the south American orange-legged leaf frog, *Pithecopus (Phyllomedusa) hypochondrialis*. **Molecules**, v. 22, n. 10, p.1805, 2017.

JENSSEN, H. H am ill P, H ancock R E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p. 491-511, 2006.

JOHNSON, K. J.; VARANI, J.; SMOLEN, J. E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology series**, v. 57, p. 1–46, 1992.

KARAOGLAN, I. et al. 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.1830-1837, 2013.

KAUR, B. P., & SECORD, E. Immunology and allergy clinics of North America. **Innate Immunity**. v. 22, n. 8, p. 4288, 2021.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, mar. 2013.

KÖNIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. **Peptides**, v. 63, p. 96–117, 2015.

KRITTANAI, C.; JOHNSON, W. C. The relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 39, n. 2, p.132-141,. 2000.

KUMAR, A; SCHWEIZER, P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

KUMAR, P., KIZHAKKEDATHU, J. N., & Straus, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**. v.8, n.1, p.4, 2018

KUMAR, S.; SINGH, B. R. An overview of mechanisms and emergence of antimicrobials drug resistance. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, n. 2, p. 7–14, 2013.

KUMAR, S.; VARELA, M. F. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **chemotherapy**, v. 14, p. 522–534, 2013.

LADRAM, A.; NICOLAS, P. Antimicrobial peptides from frog skin: Biodiversity and therapeutic promises. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 21, n. 7, p. 1341-1371, 2016.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, n. 10, pág. 1471-1485, 2005.

LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**, v. 11,n.7, p. 3919–3931. 2019.

LEITE, A. C. et al. Sepsis associada ao cateter venoso central em pacientes adultos internados em Unidade de Terapia Intensiva. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e08101622853-e08101622853, 2021.

LEÓN-BUITIMEA, A. et al. The demand for new antibiotics: Antimicrobial peptides, nanoparticles, and combinatorial therapies as future strategies in antibacterial agent design. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p.1669, 2020.

LEQUIN, O. et al. Helical structure of dermaseptin B2 in a membrane-mimetic environment. **Biochemistry**, v. 42, n. 34, p. 10311-10323, 2003.

LI, S. et al. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 109, p. 103-115, 2021. 2021.

LIMA, S. G. DE; LIMA, N. P.; BRITO, M. A. M. Nephrotoxicity associated with the use of Polymixin B: A systematic review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. p.11839-11858, 2021.

LUCA, V. et al. Esculentin(1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 15, p. 2773-2786, 2013.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 194, 2016.

MAHLAPUU, M.; BJÖRN, C.; EKBLÖM, J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 978-992, 2020.

MANGONI, M. L. et al. Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 380, n. 3, p. 859-865, 2004.

MARASCO, W. A. et al. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5430–5439, 1984.

MCKENNA, M. Antibiotic resistance: The last resort. **Nature**, v. 499, n. 7459, p.394-396, 2013.

MERTENS, R. Herpetologische Mitteilungen VIII-XV. **Senckenbergiana Biologica**, v. 8, p. 137-155, 1926.

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. 31635-31641, 1994.

MORAVEJ, H. et al. Antimicrobial peptides: Features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p.747-767, 2018.

MORETTA, A. et al. Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 453, 2021.

MURRAY, C et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. **Lancet**. v.399, n. 10325, p.629–655, 2022.

NASCIMENTO, A. C. et al. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein & Peptide Letters**, v. 10, n. 3, p. 227–238, 2005.

NAVON-VENEZIA, S. et al. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with in vivo activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 689-694, 2002.

NETEA, M. G. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 375-388, 2020.

OLIVEIRA, R. **Investigação in Silico da Interação de Peptídeos Antimicrobianos Análogos da Stigmurina com Modelos de Membranas**. 77f. Dissertação (Mestrado em química). **Universidade federal do Rio Grande do Norte**. Natal. 2021.

ORHAN, G. et al. 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

PANARO, M. A.; MITOLO, V. Cellular responses to FMLP challenging: A mini-review. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, n. 3, p. 397–419, 1999.

PARENTE, A. M. S. et al. Analogs of the scorpion venom peptide Stigmurin: Structural assessment, toxicity, and increased antimicrobial activity. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 161, 2018.

PATOCKA, J. et al. Antimicrobial peptides: Amphibian host defense peptides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 32, p. 5924-5946, 2019.

PLETZER, D; MANSOUR, S C.; HANCOCK, R EW. Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007084, 2018.

PFEIFER, Y. et al. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International journal of medical microbiology**, v. 300, n. 6, p. 371-379, 2010.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v.109, n.7, p. 309, 2015.

RADZISHEVSKY, I. S. et al. Effects of acyl versus aminoacyl conjugation on the properties of antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49 n.6. p.2412–2420, 2005.

REINER, G. L. et al. Desfecho clínico e fatores associados ao óbito em pacientes com sepse internados em unidade de terapia intensiva. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 49, n. 1, p. 02- 09, 2020.

RUSSO, T. A. & JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 449–456, 2003.

SENA, A.L. **Análise das propriedades biológicas da triptofilina PHA-T2-4 isolada da secreção cutânea de *Pithecopus azureus* (Anura: Phyllomedusidae)**. 101f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília. Brasília, 2021.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002.

SHALEV, D. E.; MOR, A.; KUSTANOVICH, I. Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3. **Biochemistry**, v. 41, n. 23, p.7312-7317, 2002.

SHAMS, M. V.; NAZARIAN-FIROUZABADI, F.; ISMAILI, A.; SHIRZADIAN-KHORRAMABAD, R. Production of a recombinant dermaseptin peptide in hairy roots of *Nicotianatabacum* with enhanced antimicrobial activity. **Molecular Biotechnology** v. 61, n. 4, p. 241–252, 2019.

TEIXEIRA, C.F. et al. **Estafilococos coagulase-negativa: um risco real para a saúde pública**. 93f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2009.

TELES, L. M. B. et al. Comparison of the neutrophil proteome in trauma patients and normal controls. **Protein & Peptide Letters**, v.19, n.6, p. 663-672, 2012.

TOLEDO, L. F.; SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. B. Is it all death feigning? Case in anurans. **Journal of Natural History**, v. 44, n. 31, p. 1979–1988, 2010.

TOLEMAN, M. A. et al. Aminoglycoside Modifying Enzymes. **Sci. York**, v.13, p.151–171, 2011.

VANHOYE, D. et al. Membrane association, electrostatic sequestration, and cytotoxicity of Gly-Leu-rich peptide orthologs with differing functions. **Biochemistry**, v. 43, n. 26, p.8391-409, 2004.

VELKOV, T., et al. Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics. **J Med Chem**, v. 53,n. 5, p. 1898-1916, 2010.

VIHTA, K. D. et al. Trends over time in *Escherichia coli* bloodstream infections, urinary tract infections, and antibiotic susceptibilities in Oxfordshire, UK, 1998–2016: a study of electronic health records. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1138-1149, 2018.

WANG, G. Bioinformatic analysis of 1000 amphibian antimicrobial peptides uncovers multiple length-dependent correlations for peptide design and prediction. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p.491, 2020.

WANG, G . Prediction and design of antimicrobial peptides: Methods and applications to genomes and proteomes. **Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies**, p. 101-118, 2017.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. 2014 Disponível em <https://www.who.int/>. Acesso em 17/01/2023.

XU, J. et al. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of antimicrobial peptides modified silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 4831, 2021.

YANG, K. H. et al. The main functions and structural modifications of tripeptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) as a chemotactic factor. **Pharmazie**, v. 63, n. 11, p. 779–783, 2008.

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. 5449-5453, 1987.

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

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms: My perspective. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1117, p. 3–6, 2019.

ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14–R19, 2016.

ZHOU, X. et al. Enhanced antimicrobial activity of N-terminal derivatives of a novel brevinin-1 peptide from the skin secretion of *Odorrana schmackeri*. **Toxins**, v. 12, n. 8, p. 484, 2020.

ZHU, H. et al. Discovery of two skin-derived dermaseptins and design of a TAT-fusion analogue with broad-spectrum antimicrobial activity and low cytotoxicity on healthy cells. **PeerJ**, v. 2018, n. 9, p. e5635, 2018.

ZHU, Y. et al. Antimicrobial peptides, conventional antibiotics, and their synergistic utility for the treatment of drug-resistant infections. **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 4, p. 1377-1422, 2022.

7. Anexo I

HPLC Report

Structure: GS-30

Sequence: [H]-GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPE-[OH]

Order ID/Name: 134051-1/Item-1

Lot No.: WB400637-P221008

Column: 4.6×250 mm, Sinochrom ODS-BP 5um

Solvent A: 0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile

Solvent B: 0.1% trifluoroacetic in 100% water

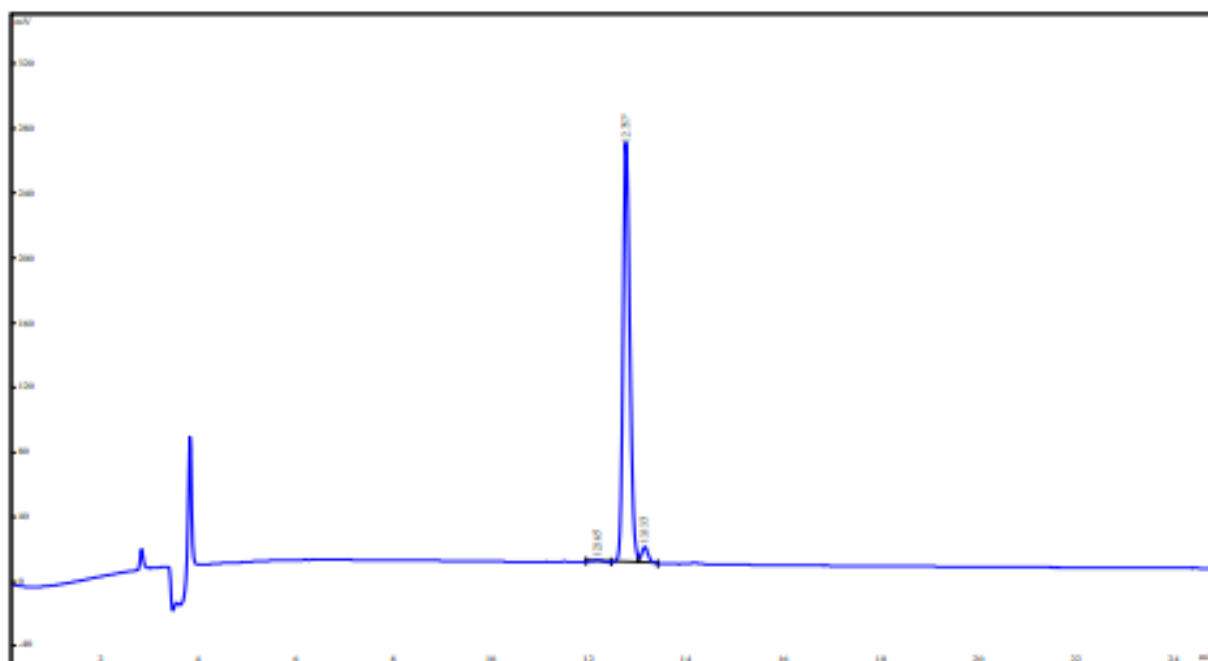
Gradient:

	A	B
0.01min	28%	72%
25min	53%	47%
25.1min	100%	0%
30min	STOP	

Flow rate: 1.0 mL/min

Wavelength: 220 nm

Volume: 10 µL



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	12.165	955	13727	0.5293
2	12.757	261053	2484920	95.82
3	13.133	9922	94666	3.650
Total				100.0000

WatsonBio Sciences | 7505 Fannin Street | Suite 313 | Houston Texas 77054

8. Anexo II

Mass Spectrum Report

Order ID: 134051-1

Sequence: [H]-GLWKMLAKGAGKVLGHVASKFLGSQGQPES-[OH]

Data Acquired: 10/31/2022

Acquired by: SHAO

Injection Volume: 1

Sample Name: 134051-1

MW: 3082.57

Lot No.: WB400637-P221008

Probe: ESI

Nebulizer Gas Flow: 1.5 L/min

CDL: -20.0 V

CDL Temp: 250 °C

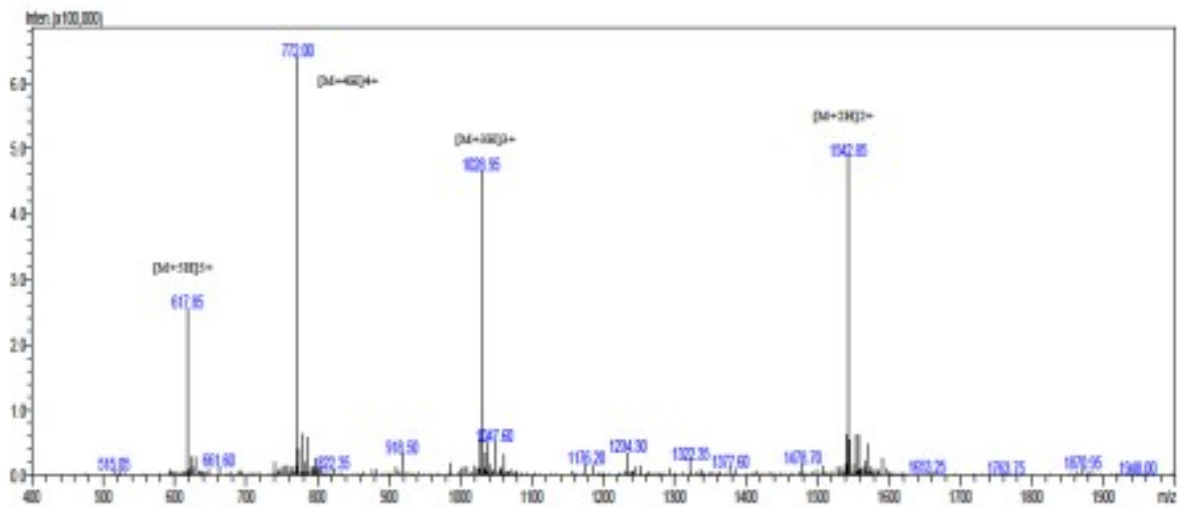
Block Temp: 200 °C

Probe bias: 4.5 kV

Detector: 1.5 kV

T.Flow: 0.2 mL/min

B.conc: 50% H₂O/50% ACN



WatsonBio Sciences | 7505 Fannin Street | Suite 313 | Houston Texas 77054