



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**DESENHO RACIONAL E PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DO PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO HYLINA α 1 COM MAIOR POTENCIAL
TERAPÊUTICO**

FABIANO JOSÉ QUEIROZ COSTA

BRASÍLIA-DF
2012

FABIANO JOSÉ QUEIROZ COSTA

**DESENHO RACIONAL E PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DO PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO HYLINA α 1 COM MAIOR POTENCIAL
TERAPÊUTICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador:
Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Co-orientadora:
Profa. Dra. Mariana S. Castro.

BRASÍLIA-DF
2012

FABIANO JOSÉ QUEIROZ COSTA

**DESENHO RACIONAL E PRODUÇÃO DE ANÁLOGOS DO PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO HYLINA α 1 COM MAIOR POTENCIAL
TERAPÊUTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Presidente - UnB

Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz
Membro Titular
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau
Membro Titular
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Osmindo Rodrigues Pires Júnior
Membro Suplente
Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

À minha esposa e grande companheira Sabrina,
e aos meus dois filhotinhos João Victor e Thiago,
que compreenderam e abdicaram de várias coisas
em suas vidas em prol desta minha meta. Vocês,
sem dúvida, foram o diferencial desta conquista.

Amo demais vocês.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por me dar força e discernimento para que eu percorra sempre o melhor caminho para atingir com êxito cada uma das metas de minha vida.
- Ao meu pai, hoje meu anjo da guarda, minha proteção incondicional.
- À minha mãe, pela força, pelos seus ensinamentos e pelo seu amor; e aos meus irmãos, simplesmente pelo fato de serem meus irmãos, amigos de verdade.
- À minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Mariana S. Castro, que com toda calma, paciência e inteligência que lhes são peculiares, me conduziu, sem medir esforços, à conquista deste objetivo. Obrigado por ter confiado em mim.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos André O. Ricart, obrigado por ter me confiado sua orientação, e ter sido sempre solícito em todas as vezes que a ele recorri.
- Aos meus amigos do LACEN-DF, em especial ao Chiquinho, que me acompanhou e me orientou com toda sua calma e seu conhecimento, nos testes com as micobactérias, em todas as repetições necessárias.
- A todos os meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, obrigado pela amizade, companhia e excelente acolhimento.
- Aos amigos do Laboratório de Toxinologia, em especial ao Rafael e ao Prof. Dr. Osmino R. Pires Júnior, obrigado pelas tantas vezes que me deram suporte e orientação na utilização do HPLC.
- Aos meus chefes imediatos na Secretaria de Saúde, Dr. Otávio e Dra. Tereza, e no Hospital Universitário de Brasília, Dra. Ana Beatriz, obrigado pela compreensão e colaboração com meus estudos.
- Ao Sr. Subsecretário de Atenção à Saúde, Dr. Ivan Castelli, obrigado pela compreensão e concessão do meu afastamento para conclusão de meus experimentos.
- A todos aqueles que depositaram em mim confiança e contribuíram com esta minha vitoriosa caminhada pessoal e profissional, obrigado. As dificuldades foram grandes, porém pequenas frente ao meu ímpeto em superá-las.

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

Leonardo da Vinci

A vida é uma peça de teatro que não permite ensaio. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.

Charles Chaplin

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Lista de figuras	vi
Lista de tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xi
Abstract.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O surgimento dos antibióticos e a evolução da resistência microbiana	1
1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) de anuros	3
1.3. Aplicações dos PAMs na medicina	4
1.4. Determinantes estruturais para a atividade biológica dos PAMs	7
1.4.1. Carga	7
1.4.2. Conformação	9
1.4.3. Anfipaticidade	10
1.4.4. Ângulo Polar	11
1.4.5. Hidrofobicidade.....	12
1.5. Bases moleculares para a especificidade celular de ação dos PAMs	12
1.5.1. O papel dos lipopolissacarídeos e da membrana externa bacteriana na especificidade celular dos PAMs	13
1.5.2. Papel dos lipídeos da membrana na ligação peptídeo-célula.....	15
1.6. Modelos de inserção e permeabilização das membranas pelos PAMs	16
1.6.1. Modelo em barrel stave	17
1.6.2. Modelo carpet like	18
1.6.3. Modelo do poro poroidal	19
1.7. O PAM Hylina a1	22
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo Geral.....	25
3.2. Estratégias para o alcance dos objetivos.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Reagentes Químicos	26
4.2. Desenho racional e síntese química dos análogos do peptídeo citolítico Hylina	

a1.....	26
4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)	26
4.4. Espectrometria de massas	27
4.5. Ensaio hemolítico (Determinação da HC ₅₀)	27
4.6. Citometria de fluxo	28
4.6.1. Preparo do sangue total lavado com solução fisiológica	28
4.6.2. Preparo da suspensão de peptídeo Ha1_1996 a 64 µM em sangue total ...	28
4.6.3. Preparo dos controles negativo e positivo	29
4.7. Ensaio antimicrobianos	29
4.7.1. Ensaio antibacterianos.....	29
4.7.2. Ensaio com leveduras.....	29
4.7.3. Ensaio com micobactérias	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Desenho racional e síntese de análogos da Hylina a1	34
5.2. Purificação dos análogos sintéticos por RP-HPLC	36
5.3. Confirmação da pureza dos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883 por espectrometria de massas.....	36
5.4. Efeitos hemolíticos dos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883.....	38
5.5 Efeitos citolíticos sobre leucócitos totais dos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883	40
5.6. Efeitos antimicrobianos dos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883.....	48
5.6.1. Ensaio antibacterianos com cepas ATCC Gram-positivas.....	48
5.6.2. Ensaio antibacterianos com cepas ATCC Gram-negativas	52
5.6.3 Ensaio antibacterianos com cepas multirresistentes.....	57
5.6.3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	57
5.6.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	58
5.6.4. Ensaio antimicrobianos com leveduras.....	60
5.6.5. Ensaio com micobactérias	63
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inter-relação entre os determinantes estruturais dos PAMs.....	7
Figura 2. Bases moleculares da seletividade celular dos PAMs.....	14
Figura 3 0 H F D Q L V P R V G H D o m R S U R S - R e v i d e i s ... S . D . U . D	16 3 \$ 0 V
Figura 4. Representação do modelo em barrel stave	18
Figura 5. Representação do modelo carpet like	19
Figura 6. Representação do modelo do poro toroidal	20
Figura 7. Mecanismos de ação propostos para os PAMs sobre células microbianas.	21
Figura 8. Projeção em roda helicoidal da Hylina a1.. ..	23
Figura 9. Projeção em roda helicoidal do análogo da Hylina-a1 denominado Ha1_1996.....	35
Figura 10. Projeção em roda helicoidal do análogo da Hylina-a1 denominado Ha1_1883.....	35
Figura 11. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da mistura de análogos produzidos quimicamente.	36
Figura 12. Espectro de massas do análogo Ha1_1996.. ..	37
Figura 13. Espectro de massas do análogo Ha1_1883.....	38
Figura 14. Porcentagem de hemólise de eritrócitos humanos (O+) pelos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883.. ..	40
Figura 15. Análise por citometria de fluxo mostrando a contagem global dos leucócitos em sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.	41
Figura 16. Porcentagem de destruição dos leucócitos totais após exposição do sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.....	42
Figura 17. Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos Ha1_1996 na concentração de 64 µM (1), Ha1_1883 na concentração de 64 µM (2), controle negativo (3) e controle positivo (4) no tempo 7 ¶.....	44

- Figura 18.** Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos Ha1_1996 na concentração de 64 μ M (1), Ha1_1883 na concentração de 64 μ M (2), controle negativo (3) e controle positivo (4) no tempo 7 h.....**45**
- Figura 19.** Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos Ha1_1996 na concentração de 64 μ M (1), Ha1_1883 na concentração de 64 μ M (2), controle negativo (3) e controle positivo (4) após 120 minutos de incubação.**46**
- Figura 20.** Análise por citometria de fluxo evidenciando os efeitos do peptídeo Ha1_1996 na concentração de 64 μ M sobre linhagens específicas de leucócitos após 0, 30 e 120 minutos de incubação.....**47**
- Figura 21.** Análise por citometria de fluxo evidenciando os efeitos do peptídeo Ha1_1883 na concentração de 64 μ M sobre linhagens específicas de leucócitos após 0, 30 e 120 minutos de incubação.....**47**
- Figura 22.** Comparação dos efeitos dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 na concentração de 64 μ M sobre linhagens específicas de leucócitos após 0, 30 e 120 minutos de incubação.**48**
- Figura 23.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.....**49**
- Figura 24.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. epidermidis* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.**50**
- Figura 25.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *E. faecalis* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883**51**
- Figura 26.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883**53**
- Figura 27.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883**54**
- Figura 28.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *E. cloacae* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883**54**
- Figura 29.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *E. coli* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883**55**
- Figura 30.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *P. mirabilis* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883**56**
- Figura 31.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* KPC pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.....**58**

Figura 32. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.....**59**

Figura 33. Porcentagem de inibição do crescimento da levedura *C. albicans* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.....**61**

Figura 34. Porcentagem de inibição do crescimento da levedura *C. parapsilosis* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.**62**

Figura 35. Porcentagem de inibição do crescimento da levedura *C. krusei* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.....**63**

Figura 36. Porcentagem de inibição do crescimento de *M. tuberculosis* H37Ra pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.....**64**

Figura 37. Porcentagem de inibição do crescimento de *M. tuberculosis* MDR pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883.....**65**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de PAMs e seus representantes.....	6
Tabela 2. Exemplos de PAMs e mecanismos pelos quais induzem seus efeitos deletérios.....	22
Tabela 3. Tabela de microrganismos e meios de cultura utilizados na determinação das CIMs.....	33
Tabela 4. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre bactérias Gram-positivas	52
Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre bactérias Gram-negativas.	57
Tabela 6. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre microrganismos multirresistentes.	60
Tabela 7. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre leveduras patogênicas.	63
Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre M. tuberculosis H37Ra e MDR.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CA-MRSA	Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus
CFU	Colony Forming Unit
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL	Cardiolipina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
HC₅₀	Concentração capaz de promover 50% de hemólise
HCCA	-ciano-4-hidroxicinâmico
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Multi Drug Resistance
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MTT	3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OADC	Oleic Acid, Albumin, Dextrose, Catalase
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
3 % 3 D 3 % 3	Penicillin-Binding Protein 2a
PG	Fosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography
RPM	Rotações por minuto
TFA	Ácido trifluoroacético
WBC	White Blood Cell
WIC	WBC Impedance Count
WOC	WBC Optical Count

RESUMO

Desde os primórdios da terapêutica antimicrobiana têm-se relatos de microrganismos resistentes às drogas antimicrobianas clássicas. Com o seu uso indiscriminado, cada vez mais vêm surgindo microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis. Por mais dinâmicas que sejam as indústrias farmacêuticas na busca por novas drogas, elas não conseguem acompanhar o espantoso fenômeno da multirresistência apresentada por muitos microrganismos. Esta constante mudança nos perfis de sensibilidade dos microrganismos conduz a uma incessante busca por novas drogas antimicrobianas, onde os peptídeos antimicrobianos se destacam como agentes promissores. As secreções cutâneas dos anfíbios são uma riquíssima fonte de peptídeos antimicrobianos. O presente estudo avaliou a atividade biológica de dois análogos sintéticos da Hylina a1, um peptídeo antimicrobiano isolado da espécie de anuro *Hypsiboas albopunctatus*. Os dois análogos, denominados Ha1_1996 e Ha1_1883, foram produzidos por síntese química manual pela técnica Fmoc, purificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP) e sua homogeneidade, bem com, a correção dos produtos produzidos avaliadas por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF. Após confirmação da pureza, os análogos foram utilizados em ensaios *in vitro* com o objetivo de se avaliar suas atividades antibacterianas, fungicidas, micobactericidas e hemolíticas. Os dois análogos apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive frente à cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Também apresentaram atividade fungicida contra três espécies de *Candida*, além de atividade micobactericida contra duas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar da pronunciada atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos (tipo O⁺) e ao efeito citolítico observado sobre leucócitos humanos, deve ser levado em conta que refinamentos na estrutura desses peptídeos podem levar ao surgimento de análogos com propriedades antimicrobianas melhoradas ou mantidas e perda ou redução da atividade hemolítica. Espera-se com isto que os peptídeos antimicrobianos se constituam em novas armas de um arsenal medicamentoso capaz de combater microrganismos multirresistentes.

ABSTRACT

Since the beginning of antimicrobial therapy reports of microorganisms resistant to conventional antimicrobial drugs have been described. Due to its indiscriminate use, more resistant microorganisms to the available antimicrobials are emerging. For more dynamic than the pharmaceutical companies are in search for new drugs, they can not keep up the amazing phenomenon of multidrug resistance shown by many microorganisms. This constant change in the sensitivity profiles of microorganisms leads to an endless search for new antimicrobial drugs, where antimicrobial peptides stand out as promising agents. The D P S K L E L S D R Q V H secretions are a rich source of antimicrobial peptides. The present study characterized biologically two synthetic analogues of Hylin a1, an antimicrobial peptide isolated from the anuran species *Hypsiboas albopunctatus*. Both analogs, named Ha1_1996 and Ha1_1883, were produced by manual chemical synthesis by Fmoc technique, purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC-RP) and purity assessment, as well as, the quality of the synthetic peptides produced were evaluated by MALDI-TOF mass spectrometry. After confirmation of their purity, these two analogs were tested on in vitro assays to evaluate their antibacterial, fungicidal, hemolytic and mycobactericidal activities. Both analogues showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). They also showed antifungal activity against three species of *Candida*, and mycobactericidal activity against two strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Despite pronounced hemolytic activity against human erythrocytes (type O⁺) and cytolytic effects on human leukocytes, additional refinements in their structures can lead to the development of analogues with antimicrobial properties improved or maintained and loss or reduction of hemolytic activity. It is thus expected that antimicrobial peptides become a new weapons arsenal able to combat the multiresistant microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

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

A descoberta da penicilina G ou benzilpenicilina ocorreu em 1929 quando Alexander Fleming ao estudar culturas de *Staphylococcus aureus* QR 6W 0DU\T Hospital de Londres observou que colônias de um fungo do ar inibiam o crescimento da bactéria. Fleming estudou este fungo e verificou que o mesmo pertencia ao gênero *Penicillium*, sendo identificado mais tarde como *Penicillium notatum* (hoje *Penicillium chrysogenum*). A penicilina G somente foi introduzida como agente terapêutico a partir de 1940. Após a sua industrialização, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial, um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos foi observado.

Desde que a penicilina foi descoberta por Fleming, um grande número de antibióticos foi identificado, desenvolvidos e usados clinicamente como opções terapêuticas. Inicialmente, o acesso aos primeiros antibióticos sistêmicos disponíveis (sulfonamidas e penicilina) era restrito, de uso reservado para as forças armadas durante a Segunda Guerra Mundial. Contudo, com o aumento no número de novos antibióticos, a simplificação do processo de manufatura e o desenvolvimento de novas formulações mais eficazes e econômicas, o acesso aos antibióticos foi consideravelmente facilitado, a ponto de tornarem-se verdadeiras panacéias da medicina, sendo usados para os mais comuns e triviais tipos de infecção, muitas das quais não-bacterianas (Alanis, 2005).

Nos últimos anos, a maioria das grandes empresas farmacêuticas abandonou a busca por novos compostos antimicrobianos devido a questões econômicas, pois concluíram que as drogas contra doenças crônicas oferecem um fluxo de receita melhor do que os agentes antimicrobianos (Livermore, 2004).

O uso indiscriminado destas drogas tem levado ao surgimento de cepas de microrganismos cada vez mais resistentes, onde a emergência de microrganismos resistentes a múltiplas drogas (MDR) tem se revelado como um sério problema de saúde pública (Park et al., 2011).

Além de causar graves infecções hospitalares, afetando pacientes hospitalizados, recentemente essas bactérias vêm se espalhando na comunidade

provocando doenças severas em pacientes previamente saudáveis (Alanis, 2005). Um exemplo clássico, tido como o principal agente infeccioso envolvido em infecções hospitalares, o *Staphylococcus aureus* MRSA (methicillin-resistant *S.aureus*) surgiu em 1961, apenas dois anos após a introdução da meticilina para tratar cepas de *S.aureus* resistentes à penicilina. (Enright et al., 2002) Até a década de 1990, as cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA eram basicamente de origem hospitalar. Nos últimos anos, no entanto, surgiram relatos de cepas MRSA em pacientes da comunidade, sendo denominados CA-MRSA. (Ferreira, 2009; Vandenesch et al., 2003) O *Enterococcus* também é considerado um dos principais patógenos causadores de infecção hospitalar (Rossi & Andreazzi, 2005). Dentre as infecções causadas por enterococos, 85 a 90% são atribuídas ao *Enterococcus faecalis* e 5 a 10% ao *Enterococcus faecium*, sendo que este vem se tornando um patógeno de grande importância nas infecções hospitalares, devido à associação de resistência a vancomicina e a outros antimicrobianos, como a ampicilina. (Rice, 2001; Tavares, 2000; Willems et al., 2005; Treitman et al., 2005).

Outro grande problema relacionado a falta de opções terapêuticas para combater microrganismos multirresistentes veio com o surgimento de cepas bacterianas produtoras de KPCs, enzimas capazes de hidrolizar antibióticos carbapenêmicos e conferir resistência a um amplo espectro de antibióticos. (Hirsch & Tam, 2010). Estas enzimas KPCs são predominantemente encontradas em *Klebsiella pneumoniae*, porém são vistas em outras Enterobactérias, tais *Escherichia coli*, espécies de *Enterobacter*, *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* e *Citrobacter freundii*, além de bactérias Gram-negativas não-fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Queenan & Bush, 2007; Villegas et al., 2007)

As infecções fúngicas também têm seu papel nos quadros de infecção hospitalar, onde aproximadamente 40% das mortes são causadas por fungos, sendo que 80% destas são causadas por *Candida* e *Aspergillus* (Enoch et al., 2006)

Outro evento relacionado a multirresistência diz respeito ao *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose humana e incluído entre os agentes infecciosos mais letais. Embora a incidência de casos de tuberculose tenha declinado nas últimas décadas, a emergência de casos de HIV e de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB) tem revertido este quadro, reduzindo o êxito nos tratamentos da doença. O surgimento destas cepas MDR-TB promoveu uma redução drástica no número de antibióticos efetivos no combate à

tuberculose, impulsionando a busca por novas drogas no combate desta patologia (Linde et al., 2001).

1.2. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) de anuros

A classe Amphibia apresenta cerca de 6000 espécies vivas descritas divididas entre as ordens Ápoda (cecílias), Caudata (salamandras) e Anura (sapos e rãs). Esses animais conseguiram ocupar tanto o ambiente terrestre quanto o aquático. O tegumento dos anfíbios é um órgão multifuncional envolvido na proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e, finalmente, secreção de substâncias protetoras (Barra & Simmaco, 1995; Nascimento et al., 2003). Quanto a essa última função, a pele dos anfíbios se destaca como uma fonte riquíssima de compostos bioativos, incluindo aminas biogênicas, alcalóides, bufodienólídeos, proteínas e peptídeos, com diversas funções biológicas (Clarke, 1997; Lu et al., 2008). Dentre esses compostos, os PAMs vêm ganhando cada vez mais destaque no cenário científico como uma alternativa no combate aos microrganismos patogênicos (Mangoni, 2006; Pukala et al., 2006; Azevedo Calderon et al., 2011).

Desde a descoberta das magaininas por Zasloff há mais de 25 anos a partir da secreção da rã africana *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987), centenas de peptídeos antimicrobianos já foram isolados e caracterizados quanto aos seus efeitos citolíticos sobre diferentes tipos celulares, incluindo bactérias, fungos, protozoários e células tumorais (Rinaldi, 2002; Nascimento et al., 2003; Conlon et al., 2009; Conlon, 2011). Tais peptídeos tem despertado interesse crescente como uma alternativa no combate à multirresistência bacteriana (Hancock & Sahl, 2006; Marr et al., 2006; Yeung et al., 2011). Os peptídeos antimicrobianos de anuros se caracterizam por apresentarem de 10 a 48 resíduos de aminoácidos; com poucas exceções, são catiônicos, em virtude da presença de inúmeros resíduos de lisina em suas cadeias polipeptídicas e possuem, pelo menos, 50% de resíduos hidrofóbicos em suas estruturas (Conlon, 2011). Análises por dicroísmo circular e RMN demonstraram que, em ambientes aquosos, os PAMs não evidenciam elementos de estrutura secundária, mas, na presença de solventes que mimetizam o ambiente da membrana celular, como trifluoretanol 50%, ou em contato com vesículas de fosfolípídeos, assumem conformação em α -hélice anfipática (Giangaspero et al., 2001; Castro et al., 2009).

O potencial terapêutico dos PAMs está diretamente relacionado com a sua capacidade de lisar membranas, destruindo rapidamente um amplo espectro de microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários (Reddy et al., 2004; Leite et al., 2005; Mangoni et al., 2006). No entanto, existem vários obstáculos para o uso dos PAMs como agentes anti-infecciosos. Dentre eles, destacam-se sua toxicidade, principalmente se forem administrados sistemicamente, e a pequena meia-vida na circulação. A síntese de peptídeos contendo D-aminoácidos tem sido sugerida como uma alternativa ao seu uso sistêmico, visto que tais peptídeos não são degradados pelas enzimas plasmáticas, mantêm a atividade antimicrobiana e, muitas vezes, apresentam redução na atividade hemolítica (Mangoni et al., 2006).

1.3. Aplicações dos PAMs na medicina

Os peptídeos antimicrobianos têm sido propostos como potentes candidatos para o desenvolvimento de uma nova classe de antibióticos, em virtude de algumas de suas características como a habilidade de eliminar as células-alvo rapidamente, espectro extraordinariamente amplo de atividades, com atividade contra alguns dos patógenos mais resistentes aos antibióticos empregados atualmente na clínica, e uma relativa dificuldade em dar origem a mutantes resistentes *in vitro* (Hancock & Chappel, 1999; Zasloff, 2002). Devido à alta toxicidade de alguns peptídeos antimicrobianos e também devido ao seu alto custo de produção, o uso disseminado desta classe terapêutica de antimicrobianos ainda é limitado (Duval et al., 2009), sendo que apenas uma pequena parcela destes agentes têm sido empregada na medicina. (Kamysz, 2005). Nos últimos anos, tem surgido alternativas que diminuem os custos da sua produção (Castro et al., 2006) e assim uma ampla gama de utilizações clínicas vem sendo sugeridas para essa classe de antimicrobianos, como o seu uso no tratamento de úlceras gástricas (Braunstein et al., 2004) e de pele, onde, neste último caso, o pexiganan, um análogo da magainina, se tornou um atrativo candidato no desenvolvimento de agentes antimicrobianos de uso tópico (Ge et al., 1999). Há também estudos que envolvem o uso destes agentes em doenças da cavidade oral (Komatsuzawa et al., 2007), doenças oftálmicas (Mannis, 2002), doenças sexualmente transmissíveis (Penberthy et al., 2011), sepse (Jerala & Porro, 2004), bem como espermicidas (Yedery & Reddy, 2005).

Em uma pesquisa conduzida por Welling et al. (2000), foi avaliada a utilidade de peptídeos antimicrobianos na produção de radiofármacos, e observou-se que,

apesar dos peptídeos marcados serem rapidamente depurados da circulação por excreção renal, eles se acumularam e discriminaram os tecidos infectados dos não-infectados, com até 5 vezes de ligação aumentada em relação aos tecidos infectados, isto devido à afinidade preferencial dos peptídeos para associar a superfícies de microrganismos. Assim, diante da atual crise dos antibióticos associada ao aumento crescente e disseminação de bactérias multi-resistentes, os PAMs vem despontando como uma opção atraente para o desenvolvimento de novos fármacos com mecanismos de ação bastante distintos dos atualmente disponíveis. A tabela 1 traz alguns exemplos de PAMs com aplicações terapêuticas.

Tabela 1. Principais classes de PAMs e seus representantes.

Peptídeo	Sequência	Fonte	Efeitos
/-helicoidais			
Bombinina	GIGALSAKGALKGLAKGLAEHFAN	Anuro	G+,G, céls.mamífero
Cecropina P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGG	Porco	G+,G
Magainina 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Anuro	G+,G,céls. cancerígenas Fungos
Peptídeos antimicrobianos com uma ponte dissulfeto			
Bactenecina	RLCRIVVIRVCR	Neutrófilos bovin	G+,G
Esculetina 2A	GILSLVKGVAKLAGKGLAKEGGKFGLELIAC	Anuro	G+,G, céls.mamífero
Peptídeos em folha β			
Defensina HNF 1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAF	Humanos	G+,G,vírus e fungos
Protegrina 1	RGGRLCYCRRRFCVCV- WGR	Porco	G+
Peptídeos com composição incomum			
Histatina 3	DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNY	Humanos	G+,G,fungos
Indolicidina	ILPWKWPWWP WR R2	Bovinos	G+,G,vírus e fungos
Temporina A	FLPLIGRVL SN LH2	Anuro	G+
Peptídeos antimicrobianos derivados de peptídeos maiores ou proteínas			
Lactoferricina I	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF	Céls.cancerígenos bovinos	G+,G,vírus e fungos
MUC7	LAHQKPFIRKSYKCLHKRCR	Humanos	G+,G, fungos

Tabela modificada de Kamysz, 2005.

G+,Bactérias Gram positivas; G-, Bactérias Gram negativas

1.4. Determinantes estruturais para a atividade biológica dos PAMs

A ação antimicrobiana dos PAMs depende, em geral, de perturbações na membrana bacteriana por interações eletrostáticas e hidrofóbicas que levam à formação de poros na membrana. Vários estudos têm sido realizados sobre a relação estrutura-função dos PAMs através da modulação dos seus parâmetros estruturais. No entanto, a modulação de um parâmetro comumente induz alterações simultâneas em outros parâmetros, o que torna difícil avaliar a influência específica de uma única variável (Kim & Cha, 2010).

Alguns exemplos específicos destes parâmetros estruturais como carga, conformação, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, anfipaticidade, e ângulo polar, são determinantes moleculares interdependentes (Figura 1) e, conforme mencionado acima, a modificação em um parâmetro freqüentemente leva a alterações compensatórias em outros (Yeaman & Yount, 2003).

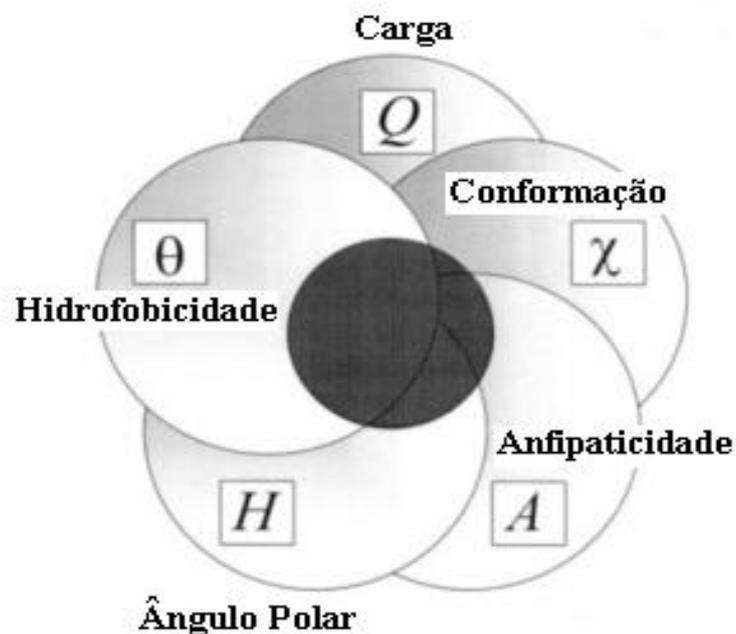


Figura 1. Inter-relação entre os determinantes estruturais dos PAMs. A eficácia antimicrobiana ideal dos peptídeos ocorre na zona de coordenação entre elas (área circular escura). Figura modificada de Yeaman & Yount, 2003.

1.4.1. Carga

A maior parte dos PAMs caracterizados até hoje apresentam uma carga líquida positiva, que varia de +2 a +9, podendo conter um domínio catiônico altamente definido. Esta cationicidade é, sem dúvida, de grande importância para a

atração eletrostática do PAM pela membrana fosfolipídica carregada negativamente das bactérias e outros microrganismos, o que garante aos PAMs uma certa seletividade no que diz respeito aos tecidos do hospedeiro (Yeaman & Yount, 2003). Conforme demonstrado por Matsuzaki et al. (1991), a atração eletrostática dos PAMs pelas membranas de determinados microrganismos ocorre devido à presença de ácidos fosfolipídicos como fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e cardiolipina, os quais conferem uma carga global negativa às membranas bacterianas. Além destes compostos, os lipopolissacarídeos (LPSs) das bactérias Gram-negativas, e os ácidos teicóicos e teicurônicos das bactérias Gram-positivas garantem à superfície destes microrganismos uma carga negativa adicional.

Os peptídeos catiônicos apresentam afinidade pelos LPSs de membranas bacterianas três vezes maior do que a afinidade dos LPSs por cátions divalentes Ca^{+2} e Mg^{+2} . Logo, tais íons são desalojados competitivamente pelos PAMs e, devido ao grande volume destes grupos, há uma desorganização da membrana externa, que sofre pequenas rachaduras por onde passam várias moléculas, inclusive os PAMs (Hancock & Chapple, 1999). Baseado nestas informações, não é surpreendente que haja uma forte correlação entre a cationicidade do peptídeo e sua atividade antimicrobiana, conforme observado em estudos com o peptídeo magainina 2 (Matsuzaki et al., 1996).

Esta relação, porém, nem sempre é totalmente linear, pois há exemplos de relações indiretas ou inversas entre essas variáveis, onde um aumento na cationicidade do peptídeo gera um análogo com perda ou diminuição de atividade antimicrobiana (Bessalle et al., 1992). Cationicidade excessiva pode levar a uma repulsão intermolecular dos poros da membrana, podendo ocorrer assim um aumento na atividade hemolítica com redução na atividade antimicrobiana (Dathe & Wieprecht, 1999; Conlon et al, 2007).

Estudos com análogos da magainina 2, onde parâmetros como hidrofobicidade e helicidade foram mantidos constantes, mostraram que aumentos na carga positiva de +3 para +5 levaram a aumentos na atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, há um limite além do qual este aumento de carga positiva já não confere maior atividade. Para estes análogos da magainina descritos acima, uma elevação na carga positiva de +6 a +7 levou a um aumento na capacidade hemolítica e uma perda de atividade antimicrobiana (Dathe et al., 2001). Esta diminuição da atividade antimicrobiana

pode ser devida, em parte, às fortes interações do peptídeo com as cabeças polares dos fosfolipídeos, evitando assim a translocação deste peptídeo para o interior da célula. Há ainda exemplos de bactérias com resistência intrínseca a determinados PAMs, como por exemplo, *Burkholderia cepacia* e *Serratia marcescens*, que podem ser resistentes a peptídeos catiônicos em virtude de uma membrana externa não interativa e devido à produção de proteases específicas, respectivamente (Hancock et al., 1997).

1.4.2. Conformação

Embora os PAMs sejam bastante diferentes no que diz respeito à suas estruturas primárias e fontes de obtenção, algumas de suas características são comuns, como, por exemplo, os elementos de estrutura secundária presentes em suas cadeias polipeptídicas, sendo estes usados como critérios para sua classificação (Yeaman & Yount, 2003; Zhao, 2003).

2 V G R L V P D L R U H V J U X S R V - helicidade e aqueles em Rwha:β pregueada, enquanto que os peptídeos restantes são classificados naqueles enriquecidos com um ou mais resíduos de aminoácidos (p.ex. ricos em prolina, arginina ou triptofano) (Hancock et al., 1997). Há também esquemas de classificação baseados nas fontes de obtenção destes peptídeos (de neutrófilos ou outros leucócitos), na extensão das pontes intramoleculares (arranjos de cisteína ou ciclização nos peptídeos) e outros parâmetros. Um dos grupos de peptídeos mais H V W X G D G R - helicoidais, têm como exemplos as magaininas (Zasloff, 1987; Matsuzaki, 1998), cecropina A (Andreu et al., 1983) e temporinas (Mangoni et al., 2000; Mangoni, 2006). A helicidade destes peptídeos é fundamental para a interação com as membrana V zwitteriônica V dos eucarióticas e menos necessária na interação com membranas aniônicas procarióticas. Sendo assim, trocas de aminoácidos podem levar à quebra na estrutura helicoidal, ocasionando pequena diminuição na atividade antimicrobiana, com interessante e relevante diminuição na atividade hemolítica (Zhang et al., 1999; Dathe & Wieprecht, 1999; Zhao, 2003).

Em um estudo realizado por Song et al. (2004), empregando-se um peptídeo V L Q W p - helicoidal anfipático, K L W, dotado de citotoxicidade não-seletiva, ficou demonstrado que a incorporação de L ou D-3 U R H P . : / U H G - helicoidal deste peptídeo e a incorporação de D-Pro induziu a ruptura mais acentuada na H V W U X - helicoidal que a incorporação de L-Pro. Estes resultados sugeriram que a

incorporação de D-Pro na face hidrofóbica da hélice deste peptídeo α -helicoidal anfipático não-seletivo poderia vir a ser usada no desenho de novos peptídeos antimicrobianos com alta atividade bacteriana e isentos de atividade hemolítica. Em outro trabalho, realizado por Oren et al. (1997), um peptídeo α -helicoidal anfipático, dotado de atividades antimicrobiana e hemolítica, teve determinados resíduos substituídos por D-aminoácidos, passando a assumir uma conformação em folha- β pregueada. Desta maneira, tal peptídeo perdeu sua atividade hemolítica, porém manteve a desejada atividade antimicrobiana.

1.4.3. Anfipaticidade

Em geral, todos os peptídeos antimicrobianos apresentam uma estrutura anfipática na interação com membranas-alvo. Esta anfipaticidade pode ser conseguida através das conformações das proteínas, no entanto, a mais simples é a hélice anfipática. Ela é formada por um intervalo de três a quatro resíduos, e é extremamente importante para a interação com biomembranas.

Enquanto a extensão da helicidade anfipática influencia a atividade do peptídeo contra membranas carregadas negativamente, isto pode acarretar um efeito ainda mais pronunciado na atividade hemolítica dos peptídeos hemolíticos contra membranas zwitteriônicas ou neutras.

Assim, um alto grau de helicidade e/ou anfipaticidade, que gere um domínio hidrofóbico bem segregado, está diretamente relacionado a um aumento da toxicidade frente às células compostas por fosfolipídios neutros (Dathe & Wieprecht, 1999; Yeaman & Yount, 2003). Desta maneira, observa-se que o momento hidrofóbico tem pequeno papel na permeabilização das membranas lipídicas altamente carregadas, porém, influencia fortemente os efeitos dos PAMs sobre membranas lipídicas neutras (Dathe & Wieprecht, 1999). Pela análise de resultados obtidos por meio da técnica de dicroísmo circular, pôde-se observar que a conformação em hélice somente é atingida quando do contato com vesículas fosfolipídicas ou com um solvente que mimetize as condições da membrana, o que altera o momento hidrofóbico e o ângulo polar, prevenindo assim que o PAM exerça atividade citotóxica antes de seu alvo ser atingido (Conlon et al., 2007).

A anfipaticidade reflete tanto a abundância quanto à polarização dos domínios hidrofóbicos e hidrofílicos em uma proteína. Uma medida quantitativa da

anfipaticidade é o momento hidrofóbico, MH, calculado como sendo a soma vetorial da hidrofobicidade de cada aminoácido, normalizado para uma hélice ideal (Eisenberg, 1984). Promovendo-se um aumento no momento hidrofóbico, gera-se um aumento significativo nas atividades de permeabilização e hemolítica de determinados peptídeos modelos frente a membranas-alvo, como observado no estudo realizado por Pathak et al. (1995), onde ficou demonstrado que a anfipaticidade teve papel mais importante que a hidrofobicidade e que o próprio conteúdo helicoidal na atividade de certos peptídeos antimicrobianos. No entanto, para a maioria das membranas neutras, onde as interações eletrostáticas peptídeo-lipídeo são minimizadas, o momento hidrofóbico parece exercer um papel predominante no grau de toxicidade sobre as células do hospedeiro (Yeaman & Yount, 2003).

1.4.4. Ângulo Polar

Ângulo polar é uma medida da proporção relativa de facetas polares versus não-polares de um peptídeo H P -hélice anfipática. Por ex H P S O R H P X P S H S W t G helicoidal hipotético, em que uma faceta é composta exclusivamente de resíduos hidrofóbicos e a outra é composta exclusivamente de resíduos carregados, o ângulo polar será de 180° . A segregação reduzida entre estes domínios ou um aumento na proporção hidrofóbica da hélice reduziria proporcionalmente o ângulo polar. Em vários estudos com peptídeos naturais e sintéticos, um menor ângulo polar (e, portanto, uma maior superfície hidrofóbica) está associado com uma maior capacidade de permeabilizar membranas, bem como a uma maior estabilidade e meia-vida dos poros. (Yeaman & Yount, 2003).

Em um estudo realizado por Uematsu & Matsuzaki (2000), dois peptídeos com ângulos polares de 100° e 180° foram desenhados, sintetizados e suas interações com membranas avaliadas, no que diz respeito à permeabilização destas membranas e à formação de poros. Os resultados desses estudos indicaram que os peptídeos com menores ângulos polares induziram a uma maior permeabilização da membrana, maior translocação e maiores taxas de formação de poros. No entanto, embora a taxa de formação de poros tenha sido maior naqueles peptídeos com menores ângulos polares, a taxa de colapso destes poros também foi maior. Estes resultados sugerem que os peptídeos com menores ângulos polares levam a formação de poros menos estáveis em comparação com peptídeos de maiores

ângulos polares. A maior estabilidade dos poros formados pelos peptídeos de maior ângulo polar pode ser devido a maiores superfícies carregadas, e/ou mais moléculas de peptídeo por canal (Uematsu & Matsuzaki, 2000).

1.4.5. Hidrofobicidade

A hidrofobicidade do peptídeo é definida como a porcentagem de resíduos hidrofóbicos presentes no peptídeo, a qual é de aproximadamente 50% para a maioria dos PAMs. Esta hidrofobicidade é uma característica essencial para as interações dos PAMs com as membranas biológicas. Embora esta hidrofobicidade seja necessária para a permeabilização efetiva da membrana, níveis elevados de hidrofobicidade estão fortemente correlacionados com uma maior toxicidade frente às células de mamíferos e com uma menor especificidade antimicrobiana. Esta especificidade antimicrobiana reduzida foi demonstrada em um estudo de Wieprecht et al. (1997), onde análogos mais hidrofóbicos de magainina preservaram a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, porém esta especificidade antimicrobiana diminuiu em relação a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* com o aumento da hidrofobicidade. Há estudos que demonstram que um aumento na hidrofobicidade leva a uma maior permeabilização das bicamadas zwitteriônicas, e conseqüentemente, aumento na atividade hemolítica (Yeaman & Yount, 2003).

1.5. Bases moleculares para a especificidade celular de ação dos PAMs

Uma das propriedades que mais chamam a atenção em relação aos PAMs, senão a mais atraente, diz respeito à especificidade celular, através da qual estes peptídeos destroem os microrganismos, sem apresentar, em alguns casos, efeitos tóxicos para as células de mamíferos. A relativa insensibilidade das células eucarióticas aos PAMs é geralmente atribuída a diferenças na composição lipídica entre as membranas das células eucarióticas e procarióticas (Dathe & Wieprecht, 1999; Matsuzaki, 1999, Zasloff, 2002). Tem sido proposto que a carga líquida positiva dos PAMs é a responsável por sua ligação preferencial à superfície externa negativamente carregada das bactérias, a qual difere da superfície predominantemente zwitteriônica das células normais de mamíferos (Devaux, 1991). Outro aspecto desta ligação preferencial dos peptídeos às membranas bacterianas reside na diferença de separação de cargas entre a porção intracelular e

extracelular da membrana citoplasmática de células de mamíferos e dos microrganismos. Este gradiente eletroquímico menos negativo em eucariontes do que em procariontes desempenha um papel importante em sua seletividade (Matsuzaki, 1999). Esse gradiente eletroquímico, chamado potencial transmembrana, resulta das diferentes extensões e taxas de fluxos de prótons através das membranas. A diferença entre certos microrganismos e células hospedeiras pode fornecer um meio de direcionamento seletivo de microrganismos por PAMs. Por exemplo, células normais de mamíferos exibem um potencial de membrana que varia de -90 a -110 mV. No entanto, patógenos bacterianos em fase logarítmica de crescimento geralmente exibem um potencial transmembrana variando de -130 a -150 mV. Tais diferenças significativas no potencial eletroquímico da membrana têm sido propostas como parâmetros adicionais que guiam a toxicidade seletiva dos PAMs. (Yeaman & Yount, 2003)

Algumas células tumorais perdem parte de sua assimetria lipídica e, portanto, apresentam um caráter mais aniônico na porção externa de sua membrana plasmática, o que as tornam mais suscetíveis a ligação aos peptídeos antimicrobianos catiônicos. Além disso, a seletividade de alguns PAMs para células tumorais tem sido sugerida como decorrente de um maior potencial de membrana negativo sobre as membranas citoplasmáticas de muitos tipos de células cancerosas (Utsugi et al., 1991). Deve ser enfatizado também que o potencial negativo das membranas das células cancerígenas é devido, em parte, à presença de moléculas aniônicas, tais como a fosfatidilserina, as mucinas O-glicosiladas e o ácido siálico. A reduzida quantidade de colesterol nas membranas destas células tumorais leva a uma maior fluidez da membrana, facilitando sua desestabilização. Somado-se a isto, há também a maior área superficial das células tumorais, devido à presença de inúmeras microvilosidades que permitem a ligação de uma quantidade maior de peptídeos (Dennison et al., 2006)

1.5.1. O papel dos lipopolissacarídeos e da membrana externa bacteriana na especificidade celular dos PAMs

Para exercer sua atividade citolítica, o peptídeo precisa, além de resistir à exposição ao soro, passar por diferentes barreiras, tais como a matriz extracelular, os lipopolissacarídeos de determinadas bactérias, a membrana externa e, em alguns casos, camadas de peptideoglicano (Andreu & Rivas, 1999).

A superfície externa das bactérias Gram-negativas contém lipopolissacarídeos, enquanto a das bactérias Gram-positivas é rica em ácidos teicóicos, dando à superfície destes dois tipos de bactérias carga líquida negativa. Além disso, os fosfolipídeos que compõem a membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas, e as membranas das bactérias Gram-positivas, são carregados negativamente. Em contraste, a camada externa das células normais de mamíferos é composta predominantemente de fosfolipídeos zwitteriônicos; tais como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e esfingomiéline (Devaux, 1991; Dolis et al., 1997; Zasloff, 2002). As interações hidrofóbicas entre a face hidrofóbica de um peptídeo anfipático e os fosfolipídeos zwitteriônicos na superfície celular têm um importante papel na interação dos PAMs com as membranas celulares de células de mamíferos. Peptídeos hemolíticos exibem uma forte interação com a fosfatidilcolina, enquanto peptídeos não hemolíticos não apresentam esta forte interação (Matsuzaki, 2009).

O papel da membrana externa e LPSs sobre a atividade antimicrobiana foi investigado com as magaininas (Rana et al., 1991). A figura 2 ilustra as diferenças existentes na composição das membranas bacterianas e de células de mamíferos.

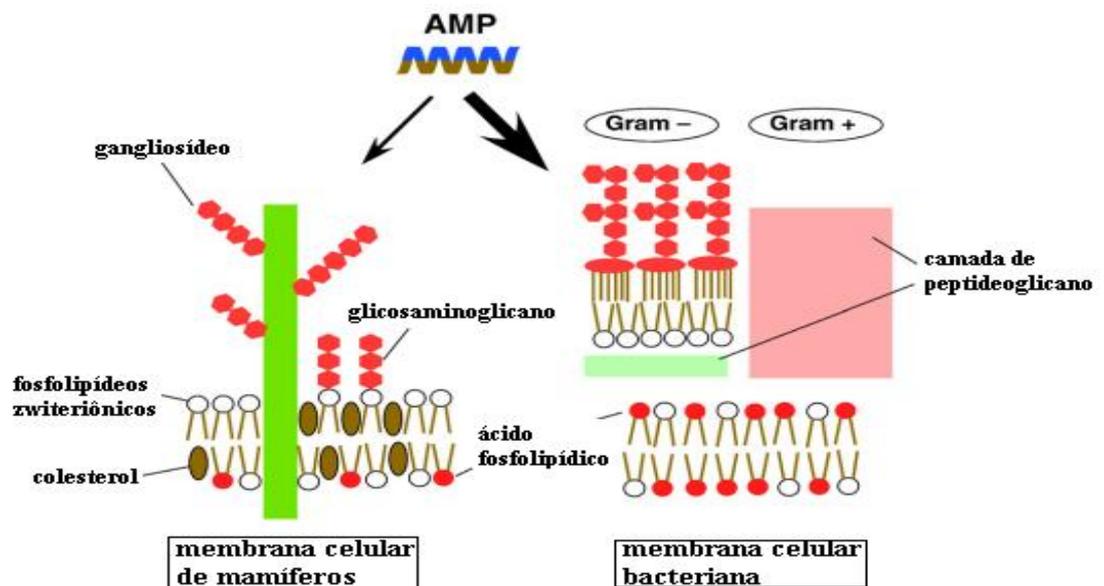


Figura 2. Bases moleculares da seletividade celular dos PAMs. Os PAMs apresentam estrutura anfipática com uma face polar carregada positivamente (em azul) e a outra face hidrofóbica (em marrom). A interação eletrostática entre os PAMs catiônicos e os componentes negativamente carregados (em vermelho) na superfície das células de mamíferos (à esquerda) e na superfície bacteriana (à direita) é a principal força que leva à associação celular. A interação hidrofóbica da face hidrofóbica com regiões apolares das biomembranas (em marrom) também direciona a ligação peptídeo-célula. Figura modificada de Matsuzaki, 2009.

1.5.2. Papel dos lipídeos da membrana na ligação peptídeo-célula

É sabido que há uma grande diversidade de fosfolipídios nas membranas biológicas, e que eles estão relacionados às funções específicas da membrana. O componente básico de praticamente todas as biomembranas é a bicamada fosfolipídica. Por definição, tais bicamadas são anfipáticas, tendo ambos os domínios, hidrofóbico e hidrofílico. No entanto, com base em sua composição, as biomembranas de células procariotas e eucariotas diferem significativamente. (Yeaman & Yount, 2003). Especialmente as propriedades físico-químicas dos fosfolipídios presentes nas membranas dos microrganismos têm despertado um grande interesse, uma vez que se sugere que a composição lipídica das membranas bacterianas tem um papel importante na interação com peptídeos antimicrobianos (Lohner & Prenner, 1999; Lohner, 2001).

Os PAMs catiônicos se ligam preferencialmente às membranas ricas em cardiolipina e fosfolipídios ácidos, tais como fosfatidilglicerol e fosfatidilserina, devido às fortes interações eletrostáticas (Matsuzaki et al., 1991; Matsuzaki, 1998). Em vários casos, uma correlação direta é encontrada entre a eficácia em permeabilizar membranas e a potência em destruir bactérias (Oren et al., 1997). Da mesma forma, a fluidez e a curvatura da bicamada lipídica influenciam a interação entre os peptídeos e os lipídios. Bicamadas fluidas geralmente são mais suscetíveis aos peptídeos, como por exemplo, no caso das magaininas, as quais atuam permeabilizando de forma mais eficaz bicamadas lipídicas em fase líquida do que aquelas em fase gel (Matsuzaki et al., 1991). O colesterol afeta a fluidez e o potencial de dipolo dos fosfolipídeos das membranas e, portanto, modula a atividade de inserção dos peptídeos nestas membranas (Matsuzaki et al., 1995). Conforme demonstrado por Silvestro et al., o colesterol diminui os efeitos líticos da cecropina sobre membranas, porém sem abolí-lo. A imposição de um obstáculo à inserção do peptídeo na membrana permite que proteases atuem sobre estes peptídeos, removendo-os da superfície celular (Resnick et al., 1991; Silvestro et al., 1997; Andreu & Rivas, 1999).

1.6. Modelos de inserção e permeabilização das membranas pelos PAMs

Em uma etapa anterior à inserção dos peptídeos antimicrobianos nas membranas bacterianas tem-se primeiramente a atração destes peptídeos pelas membranas, onde os PAMs catiônicos são eletrostaticamente atraídos pelas cargas negativas do envelope externo de bactérias Gram-negativas ± por exemplo, fosfolipídeos aniônicos e grupos fosfato no lipopolissacarídeo ± e os ácidos teicóicos na superfície de bactérias Gram-positivas. Uma vez próximos às células bacterianas, os peptídeos necessitam atravessar a cápsula polissacarídica, antes de sua interação com a membrana externa das bactérias Gram-negativas, que contém LPS, e atravessar a cápsula polissacarídica, os ácidos teicóicos e lipoteicóicos, antes de interagirem com a membrana citoplasmática das bactérias Gram-positivas. Uma vez atingida a membrana citoplasmática, os peptídeos podem agora interagirem com as bicamadas lipídicas (Brogden, 2005). A figura 3 ilustra resumidamente o passo a passo dos modelos propostos de mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. Como efeitos secundários podemos citar interferências em mecanismos celulares, tais como interferência na respiração, na síntese de proteínas e DNA, no desencadeamento de enzimas que promovem a autólise do peptídeo glicano. Como exemplo destes efeitos secundários podemos citar o PAM Buforina II, relacionado na Tabela 2. Em um estudo realizado por Park et al. (1998) este peptídeo demonstrou atividade lítica contra *E. coli* sem promover a permeabilização da membrana deste microrganismo.

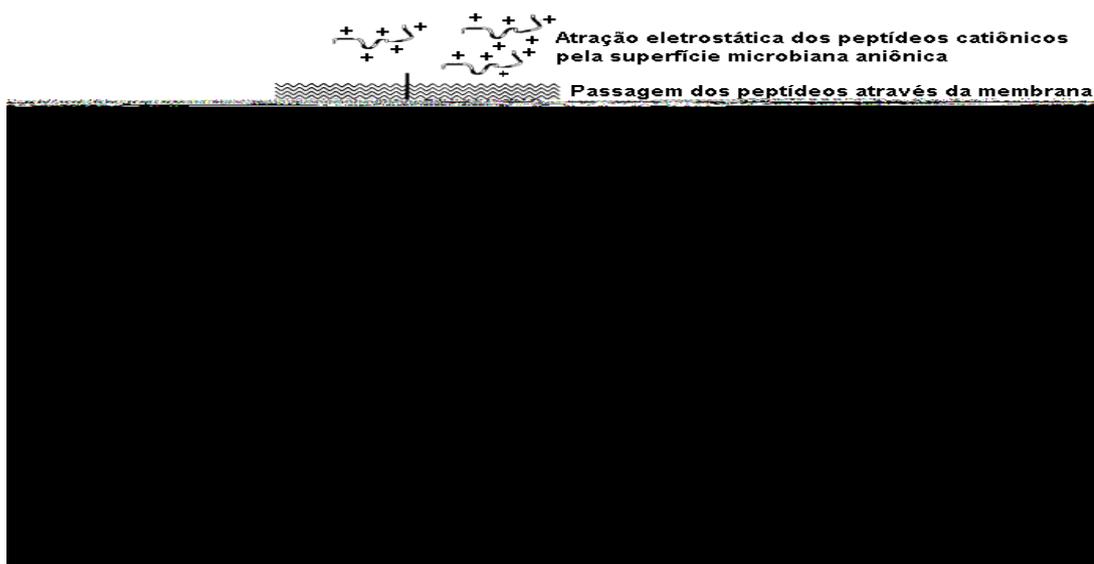


Figura 3. Mecanismos de ação propo V W R V S D U D - Rev. Col. Biotoss, 2000).

A seguir, os mecanismos de ação propostos para os PAMs sobre membranas celulares serão brevemente discutidos.

1.6.1. Modelo em *barrel-stave*

Os peptídeos em hélice formam um feixe na membrana com um lúmen central, muito parecido com um barril, onde as regiões hidrofóbicas dos peptídeos se alinham com o núcleo lipídico da bicamada da membrana, ao passo que a face hidrofílica do peptídeo forma a porção interna de um poro aquoso (Brogden, 2005) (Figura 4). À medida que mais monômeros são recrutados, mais viável se torna a inserção dos peptídeos nas membranas, mais aumenta o diâmetro do poro transmembrana, e conseqüentemente vai ocorrendo extravasamento do conteúdo celular até a morte da célula (Hancock & Chapple, 1999; Nascimento et al., 2003).

Este tipo de poro transmembrana é único e está bem ilustrado pelos estudos realizados com a alameticona (Figura 4B), onde foi observado que este peptídeo DGRWRX XPD FRQHELDLDR se .à membrana, formaram-se agregados que se inseriram na bicamada lipídica. A principal característica deste tipo de poro é que nele, peptídeos helicoidais revestem completamente a superfície interna do poro, com suas superfícies hidrofóbicas interagindo diretamente entre si e com as cadeias acílicas dos fosfolipídeos, e suas superfícies hidrofílicas voltadas para o interior do canal. Deve ser enfatizado que mudanças na composição lipídica da bicamada podem modular o equilíbrio de agregação do peptídeo, bem como o número de peptídeos nestes agregados (Brogden, 2005).

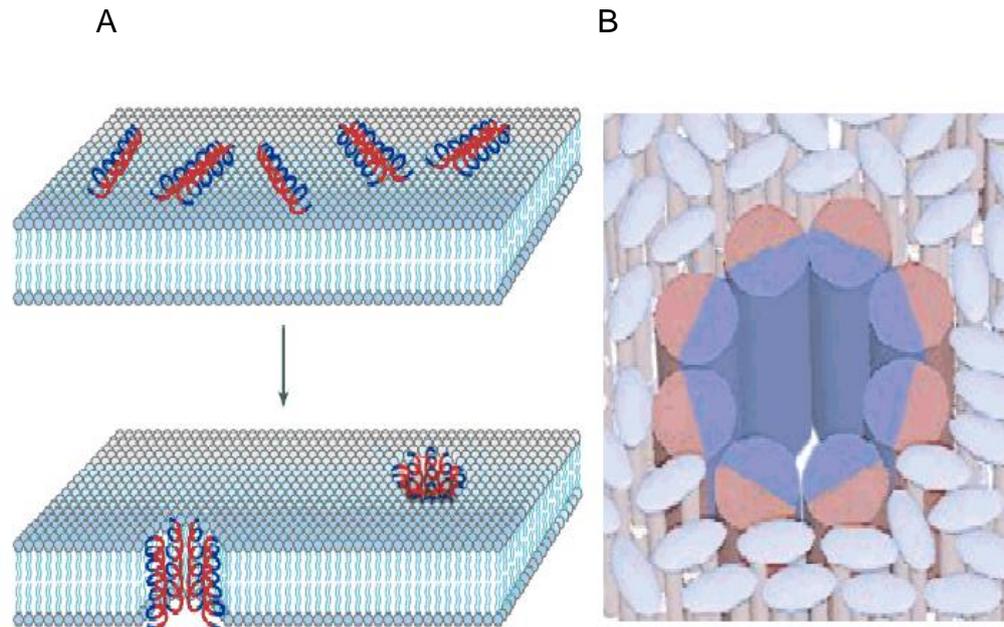


Figura 4. Representação do modelo em barrel-stave. (A) Os PAMs, após se inserirem na bicamada da membrana de modo que as regiões hidrofóbicas do peptídeo se alinhem com o núcleo lipídico da membrana e as regiões hidrofílicas dos peptídeos formem o interior do poro aquoso. A porção em azul das hélices dos peptídeos representa a face hidrofílica, enquanto que a porção em vermelho representa a região hidrofóbica (Brogden, 2005). (B) No modelo em barrel-stave acima, a alameticina é representado pelo cilindro, onde em azul temos a porção hidrofílica e em vermelho a porção hidrofóbica deste peptídeo anfipático. O diâmetro do poro formado é de 18 Å. A molécula lipídica é representada por um grupo de cabeça oval com duas pernas (Huang, 2000).

1.6.2. Modelo *carpet-like*

Neste modelo, os peptídeos se acumulam na superfície de bicamada, orientando-se paralelamente à superfície da membrana. Os peptídeos são atraídos eletrostaticamente pelas membranas, de modo que sua porção hidrofílica sofre atração pelas cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos em inúmeros locais que recobrem a superfície da membrana, formando uma espécie de tapete. Em altas concentrações de peptídeos, estes peptídeos orientados paralelamente à superfície são então reorientados, de forma que sua porção hidrofílica se direcione ao centro hidrofóbico da membrana, mantendo ainda aquele contato com as cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos. Desta forma, semelhante a uma ação detergente e, eventualmente, levando à formação de micelas, eles irão causar uma perturbação na bicamada, quebrando a integridade de sua curvatura, culminando assim com a desagregação da membrana (Nascimento et al. 2003; Yeaman & Yount, 2003; Brogden, 2005) (Figura 5).

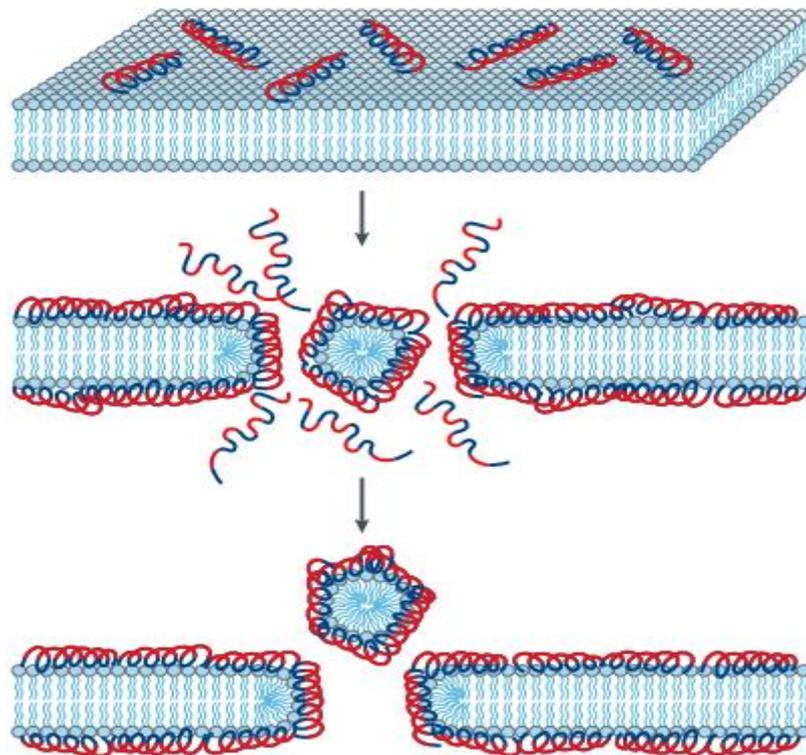


Figura 5. Representação do modelo carpet-like. Neste modelo, os peptídeos rompem a membrana através da orientação paralela à superfície da bicamada lipídica, formando uma extensa camada ou tapete. As regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, enquanto as regiões hidrofóbicas são mostradas em azul. (Brogden, 2005).

1.6.3. Modelo do poro toroidal

No modelo do poro toroidal, os peptídeos em α -hélice se orientam paralelamente à membrana e, após atingirem um limiar de concentração, inserem-se perpendicularmente na camada lipídica, induzindo as monocamadas lipídicas a se dobrarem continuamente através dos poros de modo que o núcleo aquoso esteja revestido pelos peptídeos inseridos e pelas cabeças dos grupos lipídicos. Na formação do poro toroidal, as faces polares dos peptídeos se associam com as cabeças polares dos grupos lipídicos. Há de se destacar uma importante restrição deste modelo, onde o peptídeo deve estar sempre associado às cabeças dos fosfolípídeos e nunca com a região das cadeias acílicas (Huang, 2000). Não há quebra da ligação entre o monômero do peptídeo e o lipídio durante a reorganização da camada lipídica, sendo que, ao final deste processo, ocorre a formação de um poro aquoso de curta meia-vida, íon seletivo, cuja parede é constituída por monômeros do peptídeo intercalados com lipídios da membrana biológica. O modelo

do poro-toroidal difere do modelo em barril, pois os monômeros dos peptídeos estão sempre associados às cabeças dos grupos lipídicos, mesmo quando inseridos perpendicularmente na bicamada lipídica (Nascimento et al., 2003; Brogden, 2005) (Figura 6).

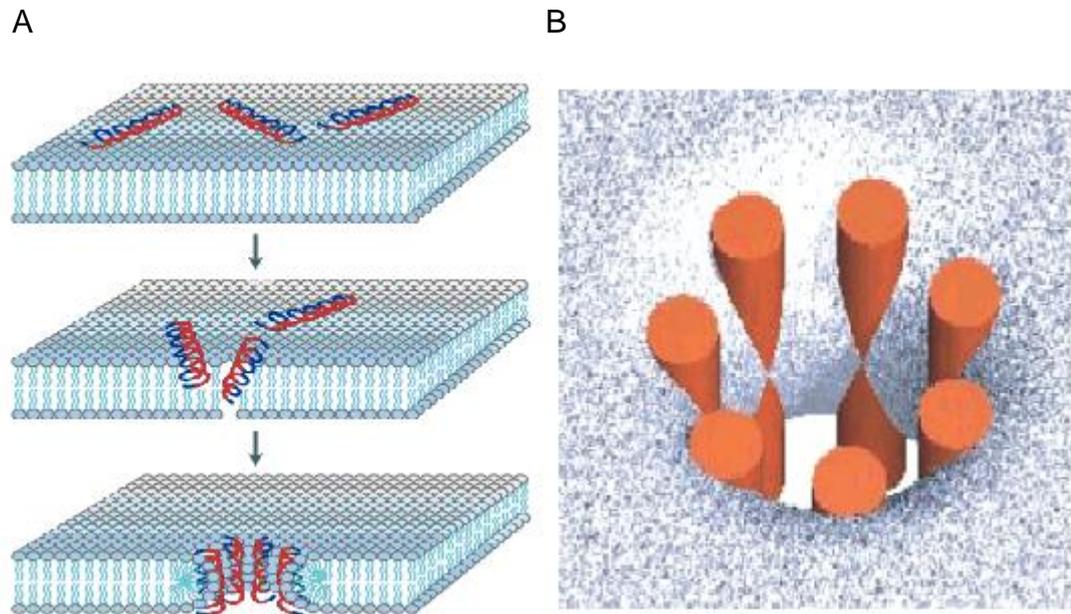


Figura 6. Representação do modelo do poro toroidal. (A) Neste modelo, as faces polares dos peptídeos se associam com as cabeças polares dos grupos lipídicos. Não há quebra da ligação entre os monômeros do peptídeo e o lipídio durante a reorganização da camada lipídica, ocorrendo a formação de um poro aquoso. As regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, enquanto as regiões hidrofóbicas são mostradas em azul. (Brogden, 2005). (B) A formação de poros pela magainina está representada pelos cilindros avermelhados embebidos na bicamada lipídica. (Huang, 2000)

Além dos mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos exercem seus efeitos via membrana, há também aqueles onde seus efeitos provêm da inibição da síntese de DNA, bloqueio na síntese de RNA, inibição de funções ribossômicas e síntese de proteínas, dentre outros, conforme ilustrado na figura 7.

A tabela 2 apresenta alguns exemplos de PAMs e seus principais efeitos seja diretamente sobre a membrana plasmática ou sobre importantes processos celulares.

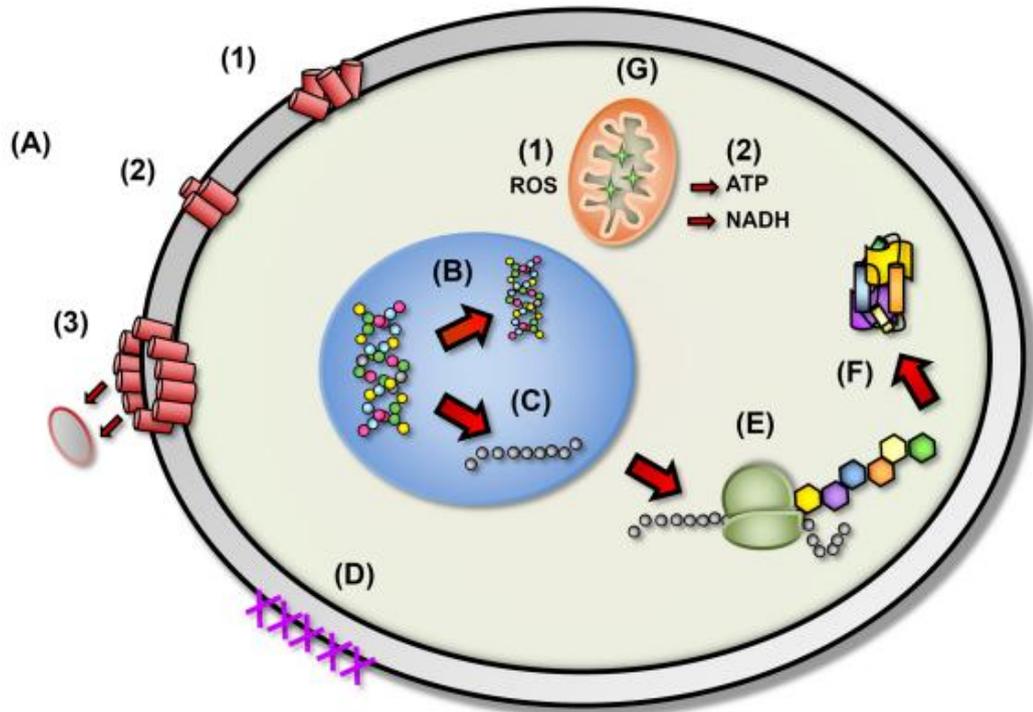


Figura 7. Mecanismos de ação propostos para os PAMs sobre células microbianas. (A) ruptura da integridade da membrana celular: (1) inserção na membrana, (2) alinhamento de regiões hidrofóbicas e (3) remoção de partes da membrana com formação de poros. (B) Inibição da síntese de DNA. (C) Bloqueio na síntese de RNA. (D) Inibição de enzimas necessárias para a ligação de proteínas estruturais da parede celular. (E) Inibição de funções ribossômicas e síntese de proteínas. (F) Bloqueio das proteínas chaperonas necessárias ao dobramento das proteínas. (G) Efeitos sobre as mitocôndrias: (1) inibição da respiração celular e indução da formação de ROS e (2) rompimento da integridade da membrana celular mitocondrial e efluxo de ATP and NADH. (Figura modificada de Peters et al., 2010).

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

Modelo de atividade antimicrobiana	Peptídeos
Mecanismo de formação dos poros transmembrânicos	
Poros - toroidal	Magainina 2, protegrina-1, melitina, LL-37 MSI-78
Carpete	Dermaseptina S, cecropina, melitina caerina 1.1, ovispirina
Poros em barril	Alameticina
Modelos de morte intracelular	
Floculação e conteúdo intracelular	Peptídeos aniônicos
Alterações na membrana citoplasmática	PR-39, PR-26, indolicidina-1, microcina 25
Inibição da síntese da parede celular	Mersacidina
Ligação a ácidos nucleicos	Buforina II, tachiplesina
Inibição da síntese de ácidos nucléicos	Pleurocidina, dermaseptina, PR-39 HNP-1, HNP-2 e indolicidina
Inibição da síntese de proteínas	Pleurocidina, dermaseptina, PR-39 HNP-1, HNP-2 e indolicidina
Inibição da atividade enzimática	Histatinas, pirhocoricina, drosocina, apidacina

1.7. O PAM Hylina a1

A Hylina a1 foi o primeiro peptídeo citolítico isolado da secreção da pele da rã arborícola da espécie *Hypsiboas albopunctatus* encontrada na América do Sul. Este peptídeo apresenta 18 resíduos de aminoácidos (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂), e apresenta estrutura H P -hélice (Figura 8) confirmada por espectroscopia de dicroísmo circular. A Hylina a1 apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, e também contra fungos (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*). Além destas atividades antimicrobianas, a Hylina a1 se mostrou citolítica frente a eritrócitos humanos (Castro et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

O aparecimento de resistência aos antibióticos tem se revelado nos últimos anos como um dos grandes desafios da medicina. Vários microrganismos multirresistentes vêm surgindo atualmente e, em sua grande parte, envolvidos em infecções hospitalares. O uso indiscriminado e inadequado de drogas antimicrobianas tem promovido o surgimento de cepas de microrganismos cada vez mais resistentes e a sua emergência tem se revelado um grave problema de saúde pública (Park et al., 2011). Dificuldades associadas à emergência destes microrganismos multirresistentes estão relacionadas com a falta de opções terapêuticas para combatê-los, visto que, nos últimos anos, a maioria das grandes empresas farmacêuticas se dedicou ao desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças crônicas que oferecem um fluxo de receita melhor do que os agentes antimicrobianos (Livermore, 2004).

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

Os peptídeos antimicrobianos são candidatos promissores no desenvolvimento de uma nova classe de antimicrobianos, tanto pelo fato de apresentarem características como a habilidade de eliminar as células-alvo rapidamente e apresentarem um amplo espectro de atividade, quanto pelo fato de apresentarem atividade contra patógenos resistentes a potentes drogas empregadas no meio clínico, além da sua relativa dificuldade em promover a seleção de microrganismos resistentes *in vitro*. O desenho racional de peptídeos pode levar ao surgimento de drogas com alta atividade antimicrobiana, porém sem o efeito citotóxico característico de alguns peptídeos (Hancock, 1999; Zasloff, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente projeto teve como objetivo geral a produção de um análogo da Hylina a1, um peptídeo antimicrobiano isolado de uma espécie de anuro da fauna do cerrado, com vistas a aumentar seu potencial terapêutico, seja pelo aumento na atividade biológica ou na especificidade, reduzindo sua toxicidade sobre células eucarióticas.

3.2. Estratégias para o alcance dos objetivos

- ¾ Avaliar a estrutura primária e propor mudanças nas faces polar e apolar da Hylina a1, visando obter um análogo com atividade microbicida aumentada ou mantida, e atividade hemolítica reduzida;
- ¾ Produzir, por meio de síntese química, o análogo da Hylina a1 proposto e obtê-lo em alto grau de pureza por RP-HPLC;
- ¾ Caracterizar biologicamente o análogo produzido por meio da realização de ensaios in vitro para avaliação da atividade antibacteriana (contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas), fungicida (contra espécies de leveduras), micobactericida (contra espécies de micobactérias) e hemolítica (contra eritrócitos humanos).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes Químicos

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

4.2. Desenho racional e síntese química de um análogo do peptídeo citolítico Hylina a1

Um análogo do peptídeo citolítico Hylina a1 foi proposto com base em substituições nas faces polares e apolares dessa molécula visando à manutenção ou aumento na atividade antimicrobiana, bem como redução nos efeitos hemolíticos. Tal análogo foi produzido por síntese química manual empregando-se a técnica Fmoc. No curso da realização deste trabalho, observou-se a presença de um contaminante resultante da incorporação, durante o processo de síntese manual, de um resíduo adicional de leucina na estrutura do análogo previamente proposto. Tal análogo foi co-purificado juntamente com o análogo proposto neste trabalho e foi submetido a todos os ensaios biológicos descritos a fim de se avaliar sua atividade biológica.

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

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

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

Inicialmente equilibrou-se a coluna com solvente A, sendo posteriormente aplicado um gradiente linear de 0 a 40% por 10 min e de 40 a 60% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA (solvente B) por 20 min, seguido de um gradiente de

60-100% de solvente B por 5 min, finalizando a corrida com uma lavagem de 5 min com 100% de solvente B. A absorvância foi monitorada a 216 nm e as frações foram coletadas manualmente.

4.4. Espectrometria de massas

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

Alíquotas dos dois análogos purificados por meio de RP-HPLC foram dissolvidas em 0,1% (v/v) de TFA em i J X D H / G peptide Cfdi aplicado em placa de aço inoxidável junto a / G D P D W U L J U H F R Q V W i a n w - x - t G D G H hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL) ressuspendidas em 50% (v/v) acetonitrila/0,1% (v/v) TFA.

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

4.5. Ensaio hemolítico (Determinação da HC₅₀)

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

Alíquotas G H L do sobrenadante de cada peptídeo foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo chato (TPP) e a leitura da absorvância realizada a 405 nm (leitora Multiskan[®] FC, Thermo Scientific, USA). Para as amostras de referência utilizaram- V H / G D V X V S H Q V m a 10% (v/v) U L W U y

L Q F X E D G D F R P /-100H%7 (W/V) W R Q referênci de 100% de lise e / G D V X V S H Q V m R 6 1% (N/U) L o m U a m p e d e s a i n o como referênci de 0% de hemólise. O ensaio foi realizado em triplicata. O valor da HC₅₀ foi obtido após ajuste por regressão logarítmica.

4.6. Citometria de fluxo

As análises das alterações provocadas pelos análogos da Hylina a1 sobre as células brancas do sangue (leucócitos) foram realizadas em contador hematológico CellDyn 3700 (Abbot). Esta tecnologia analisa os leucócitos em dois canais separados, WOC (óptico) e WIC (impedância).

4.6.1. Preparo do sangue total lavado com solução fisiológica

Um volume de 8 mL de sangue tipo O⁺ foi colhido em tubo com EDTA. Este sangue passou por três lavagens sucessivas com solução salina fisiológica (Marca Fresenius), sendo que após cada lavagem era realizada uma centrifugação a 3000 rpm por 5 min. Após cada etapa de lavagem e centrifugação a fase plasmática era removida, e o volume final completado com solução salina fisiológica, de modo que ao final das três lavagens fosse mantido o volume inicial de 8 mL. A fase plasmática foi removida com o propósito de serem retirados possíveis fatores que interferissem com a atividade do peptídeo, e conseqüentemente seus efeitos sobre as linhagens celulares.

4.6.2. Preparo das suspensões dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 a 64 µM em sangue total

Uma alíquota de 0,27 mg do peptídeo Ha1_1996 e outra de 0,25 mg do peptídeo Ha1_1883 foram dissolvidas separadamente em 200 µL de solução de NaCl 0,9% (p/v), Na⁺ 154 mEq/L; Cl⁻ 154 mEq/L, osmolaridade 308 mOsm/L, pH 4,5 a 7,0 (solução fisiológica - Fresenius). Um volume de 1,9 mL de sangue total O⁺ lavado com a solução fisiológica foi adicionado aos 200 µL de solução contendo cada um dos peptídeos, perfazendo assim um volume final de 2,1 mL de solução destes (Ha1_1996 e Ha1_1883) na concentração final de 64 µM.

Triplicatas de 200 µL destas suspensões foram coletadas imediatamente após R S U H S D U R G D V X V S H Q V m R 7 D S 120 min (P 120 ¶ 7 G H ¶ H incubação e analisadas no CellDyn 3700 (Analisador Hematológico Automatizado

por Citometria de Fluxo, Abbott), obtendo-se assim a contagem total e diferencial das células brancas (leucócitos).

4.6.3. Preparo dos controles negativo e positivo

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

4.7. Ensaios antimicrobianos

4.7.1. Ensaios antibacterianos

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, e cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* (KPC) obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Brasília, foram cultivadas em 5 mL de meio Mueller-Hinton fresco sob agitação a 37°C até a densidade óptica igual a 1 em 595 nm. As bactérias, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas. O peptídeo puro, ressuspendidas em água Milli-Q estéril, feitas a partir de uma solução esterilizada por autoclave a 121°C por 15 minutos. As bactérias foram diluídas em água Milli-Q estéril nas proporções de 2 a 7 x 10⁵ CFUs e incubadas por 22 h a 37°C em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato). Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm com uma leitora de placas (Multiskan[®] FC, Thermo Scientific, USA).

4.7.2. Ensaios com leveduras

Cepas ATCC de *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do LACEN ± DF, foram cultivadas em Ágar Sabouraud dextrose

(MicroMed), sendo executadas passagens (repiques) para assegurar sua pureza e viabilidade.

O inóculo foi preparado a partir de colônias frescas de *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* crescidas em ágar Sabouraud após 24 horas em 35°C, as quais foram suspensas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, HIMEDIA). Estas cepas foram cultivadas em 5 mL de meio BHI fresco sob agitação a 35°C até a densidade óptica igual a 1 em 595 nm. As leveduras, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção 1:100. 8 P D D O t T X R W D G Ma / suspensão de levedura a 1:100 (contendo aproximadamente 2×10^3 CFUs) foi incubada por 22 h a 35 f & F R P de cada análogo ressuspendido em água Milli-Q estéril, em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato). A partir de uma solução de peptídeo a 256 μM foi realizada a diluição seriada. A concentração dos peptídeos de interesse variaram de 128 μM a 0,0625 μM . Foi adicionado em cada poço da microplaca 50 μL do inóculo contendo aproximadamente 2×10^3 CFUs, ficando cada poço com volume final de 100 μL . Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões das leveduras. A concentração final do inóculo nos poços contendo 100 μL da suspensão de células foi de aproximadamente 2×10^4 por mL. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 35°C, com leitura de absorbância em 595 nm após 24 e 48 horas em leitora de placas (Multiskan[®] FC, Thermo Scientific, USA). A concentração inibitória mínima (CIM) para cada análogo foi assumida como sendo a menor concentração onde não houve crescimento detectável espectrofotometricamente.

4.7.3. Ensaio com micobactérias

Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra e MDR, cedidas pelo Laboratório de Micobactérias do LACEN ±DF, recém-cultivadas em meio Lowstein Jensen inclinado, foram transferidas para um tubo contendo 3 a 4 ml de água destilada estéril, com 6 a 9 pérolas de vidro esterilizadas. Os tubos foram vigorosamente agitados em um vórtex e deixados sedimentar por 5 min. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos estéreis. Estes sobrenadantes foram ajustados com água destilada estéril para igualar a densidade da escala padrão 1 de McFarland. Esta suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* na escala 1

de McFarland foi diluída a 1:25 em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10 % de ácido oléico, albumina, dextrose e catalase (OADC) e 5% de glicerol, e foi utilizada como inóculo padrão no método de microdiluição em caldo.

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

Um volume de 200 μ L da solução do peptídeo a 256 μ M foi adicionado à primeira coluna de poços da microplaca, a partir do qual foram retirados 100 μ L e realizada diluição seriada. A concentração do peptídeo variou de 64 μ M a 0,0625 μ M. Cada poço apresentou um volume final de 200 μ L. Os poços de controle positivo de crescimento continham 100 μ L de meio Middlebrook 7H9 estéril, suplementado com 10% de OADC e 5% de glicerol, isento de peptídeo, e mais 100 μ L de suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv. A concentração final do inóculo nos poços de 200 μ L foi de aproximadamente 6×10^6 CFU/mL. Os poços de controle negativo, para ausência de crescimento, continham 200 μ L deste mesmo meio, porém sem a adição de suspensão de micobactérias.

Após a inoculação, as placas foram seladas, colocadas em sacos plásticos e incubadas a 37° C em estufas com hidratação, onde permaneceram por 7 dias. Após 5 dias de incubação das microplacas, um volume de 10 μ L de solução de MTT 5 mg/mL foi adicionado a um dos poços de controle de crescimento positivo, com o objetivo de verificar o crescimento das micobactérias. Estas microplacas foram reincubadas por um período de 24 horas, após o qual a visualização de uma coloração azul indicava o crescimento das micobactérias. Com esta confirmação, a mesma quantidade de MTT foi adicionada aos demais poços da microplaca, que foram incubadas por mais 24 horas e posteriormente, um volume de 50 μ L de dimetil sulfoxido (DMSO) foi adicionado a cada poço da microplaca, com devida homogeneização para dissolução dos cristais formados. Esta microplaca foi posteriormente submetida a leitura de absorbância em 570 nm, em leitora de placas (Multiskan[®] FC, Thermo Scientific, USA). A concentração inibitória mínima (CIM) dos

peptídeos foi definida como sendo a menor concentração capaz de impedir mudança de coloração, ou seja, capaz de inibir o crescimento dos isolados clínicos de micobactérias.

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

	Bactéria	Origem	Meio de cultura	
Gram positivos	Enterococcus faecalis ATCC 29212	LT ±UnB	Mueller Hinton	
	Staphylococcus aureus ATCC 25923	LT ±UnB	Mueller Hinton	
	Staphylococcus aureus metilicina resistente (MRSA)	LM/HUB ±UnB	Mueller Hinton	
	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	LT ±UnB	Mueller Hinton	
	Enterobacter aerogenes ATCC29212	LT ±UnB	Mueller Hinton	
Gram-negativos	Escherichia coli ATCC 25922	LT ±UnB	Mueller Hinton	
	Klebsiella pneumoniae ATCC 27736	LT ±UnB	Mueller Hinton	
	Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)	LM/HUB ±UnB	Mueller Hinton	
	Proteus mirabilis ATCC 25933	LT ±UnB	Mueller Hinton	
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	LT ±UnB	Mueller Hinton	
	Leveduras	Candida albicans ATCC 14053	Lacen ±DF	Brain
Candida parapsilosis ATCC 22019		Lacen ±DF	Brain	Heart
Candida krusei ATCC 6258		Lacen ±DF	Brain	Heart
			Infusion	
Micobactérias	Mycobacterium tuberculosis H37Ra	Lacen ±DF	Middlebrook 7H9 suplementado com OADC	
	Mycobacterium tuberculosis Multirresistente - MDR	Lacen ±DF	Middlebrook 7H9 suplementado com OADC	

LT ±UnB: Laboratório de Toxinologia ±Universidade de Brasília; LM/HUB ±UnB: Laboratório de Microbiologia/Hospital Universitário de Brasília ±Universidade de Brasília; Lacen ±DF: Laboratório Central de Saúde Pública ±Distrito Federal; MDR: multi droga resistente; OADC: ácido oléico, albumina, dextrose e catalase.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenho racional e síntese de análogos da Hylina a1

No presente trabalho, um análogo da Hylina a1 foi proposto e sintetizado quimicamente. Durante a realização deste trabalho, observou-se a presença de um contaminante resultante da incorporação, durante o processo de síntese manual, de um resíduo adicional de leucina à estrutura do análogo aqui proposto. Tal análogo foi co-purificado juntamente com o análogo proposto e foi submetido a todos os ensaios biológicos descritos a fim de se avaliar sua atividade biológica.

Tais análogos foram denominados Ha1_1883 e Ha1_1996 em virtude de suas massas moleculares (1883,049 Da e 1995,969 Da, respectivamente).

Em relação à Hylina a1, o peptídeo Ha1_1883 (Figura 9) apresenta substituições nas posições 4 (substituição de alanina por serina), 7 (substituição de prolina por serina) e 15 (substituição de asparagina por lisina), apresentando 18 resíduos de aminoácidos. Esperava-se com tais substituições aumentar a anfipaticidade do peptídeo e, conseqüentemente, aumentar sua capacidade citolítica.

O peptídeo Ha1_1996 (Figura 10), resultante de uma falha no processo de síntese química manual, apresenta substituições nas posições 4 (substituição de alanina por serina), 7 (substituição de prolina por serina) e 15 (substituição de asparagina por lisina), além da inclusão de um resíduo de leucina entre as posições 8 e 9 (confirmado por degradação de Edman), ficando este análogo com 19 resíduos de aminoácidos.

Ha1_1883: IFG**S**IL**S**LALGALK**K**L**I**K-NH₂

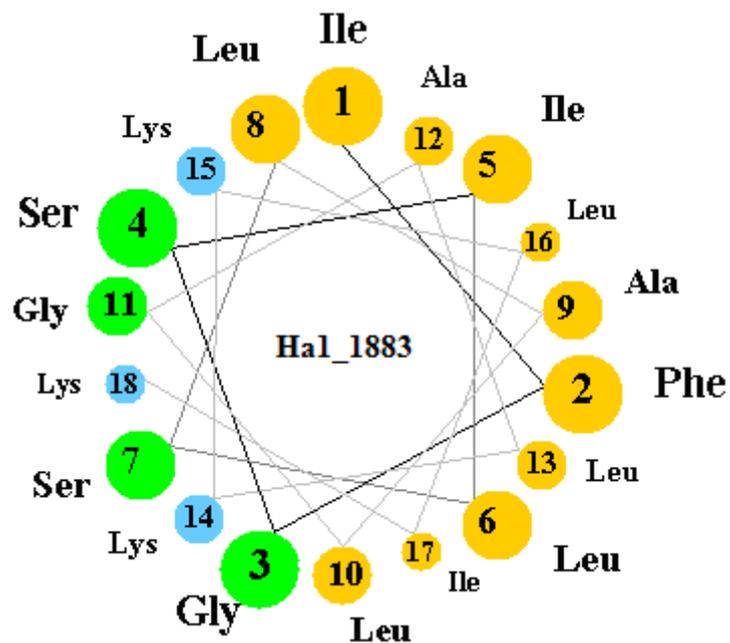


Figura 9. Projeção em roda helicoidal do análogo da Hylina-a1 denominado Ha1_1883. Em amarelo os resíduos não polares; em verde, os resíduos polares não carregados; em azul os resíduos básicos.

Ha1_1996: IFG**S**IL**S**LLALGALK**K**L**I**K-NH₂

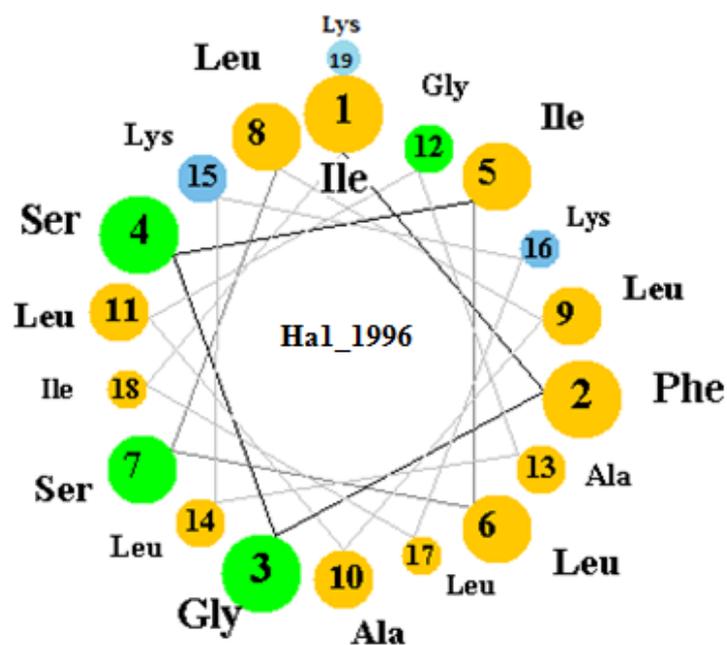


Figura 10. Projeção em roda helicoidal do análogo da Hylina-a1 denominado Ha1_1996. Em amarelo os resíduos não polares; em verde, os resíduos polares não carregados; em azul os resíduos básicos.

5.2. Purificação dos análogos sintéticos por RP-HPLC

Alíquotas de 3,0 mg dos peptídeos brutos produzidos por síntese química manual foram purificados empregando-se coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm), resultando em perfis cromatográficos, nos quais destacavam-se duas frações principais, os análogos Ha1_1996 e Ha1_1883 (Figura 11).

Os perfis cromatográficos obtidos apresentaram boa reprodutibilidade ao longo de todas as 62 corridas cromatográficas realizadas. Os análogos Ha1_1996 e Ha1_1883, objetos deste estudo, estão destacados na figura 11. (Ha1_1996, em vermelho, com tempo de retenção em torno de 21,852 segundos; e Ha1_1883, em verde, com tempo de retenção em torno de 28,884 segundos).

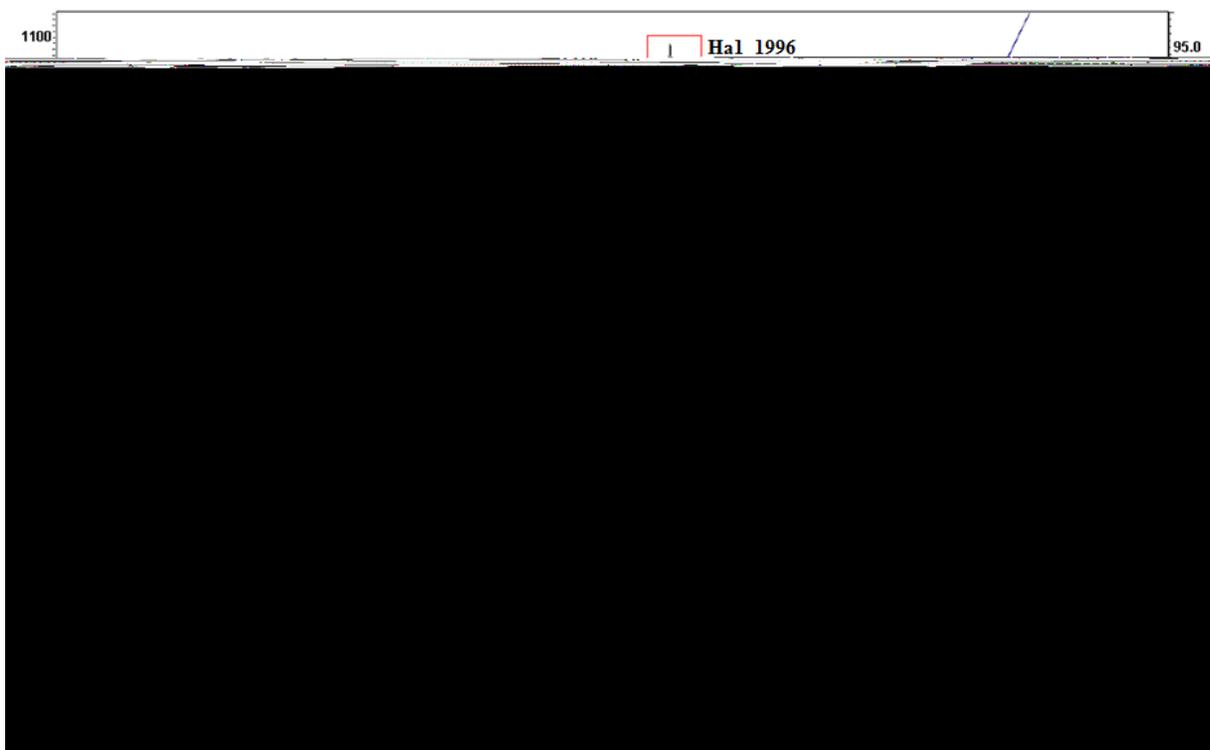


Figura 11. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da mistura de análogos produzidos quimicamente. Alíquotas (3 mg) liofilizadas da amostra sintética bruta foram UHV V X V S H Q G L G D V HP / G Hem água e centrifugadas por 10 min a 15.887 g. O sobrenadante obtido foi filtrado em filtro de 0,22 µm e um volume de 200 µL foi injetado em uma coluna analítica C₁₈ de fase reversa (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm), com eluição realizada com fluxo de 1 mL/min. A linha azul representa o gradiente de acetonitrila empregado. A absorvância foi monitorada em 216 nm.

5.3. Confirmação da pureza dos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883 por espectrometria de massas

Os análogos purificados por RP-HPLC foram individualmente coletados, secos

em Speed-Vac e ressuspensos em 0,1% (v/v) TFA em água. Uma alíquota de cada um dos análogos (1 μ L) foi aplicada em poços de uma placa de aço inoxidável junto a 1 μ L da PDWUL] UHFRLQVWLWXO-G-Drocidinãrico (HCCA 20 μ g/ μ L) e analisado em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (Autoflex II, Bruker Daltonics, Alemanha) cobrindo uma faixa de m/z de 500 a 4000 Da no modo refletor de íons positivos calibrado com Pepmix. Os peptídeos Ha1_1996 (Figura 12) e Ha1_1883 (Figura 13) tiveram suas massas moleculares determinadas, além disso foi possível observar que tais frações encontravam-se com alto grau de pureza, compatível com a realização dos testes biológicos previstos.

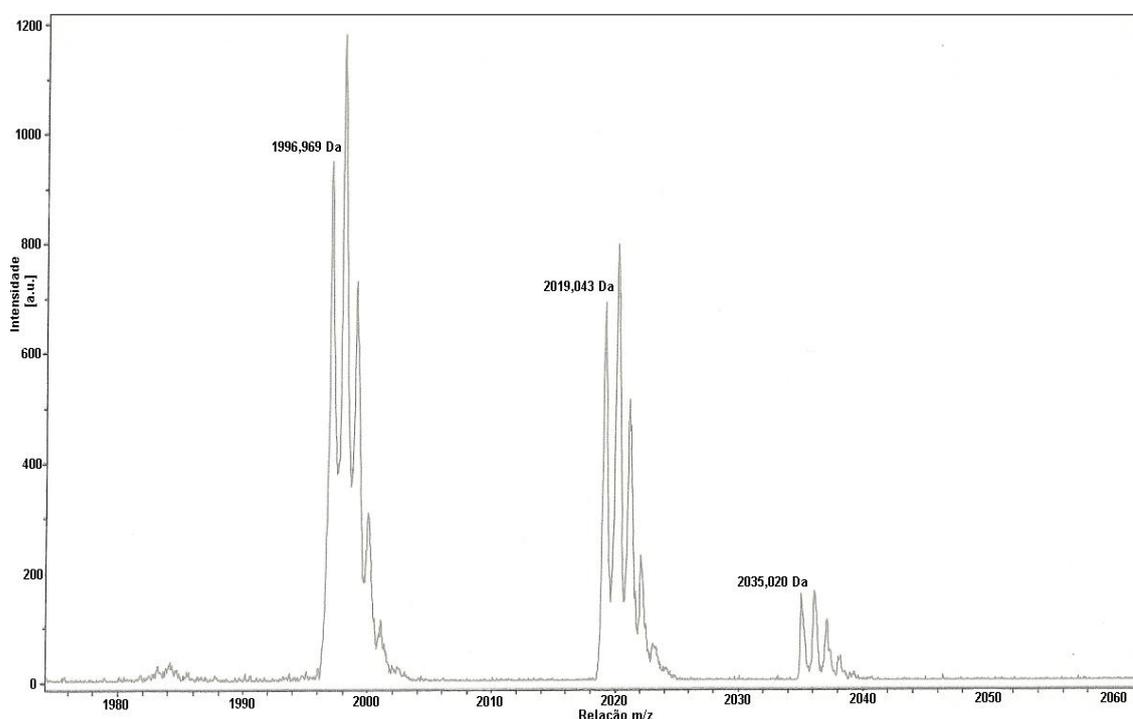


Figura 12. Espectro de massas do análogo Ha1_1996, com $[M+H]^+$ igual a 1996,97 Da purificado por RP-HPLC em coluna de fase reversa C_{18} . Pode-se observar a presença de adutos com os íons sódio e e potássio. Espectros obtidos após plaqueamento das amostras em placa de aço inoxidável junto a matriz de HCCA 20 μ g/ μ L. Análises realizadas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF, tendo sido utilizada a solução Peptide Mix para a calibração, sendo a faixa analisada de 500 a 4000 Da.

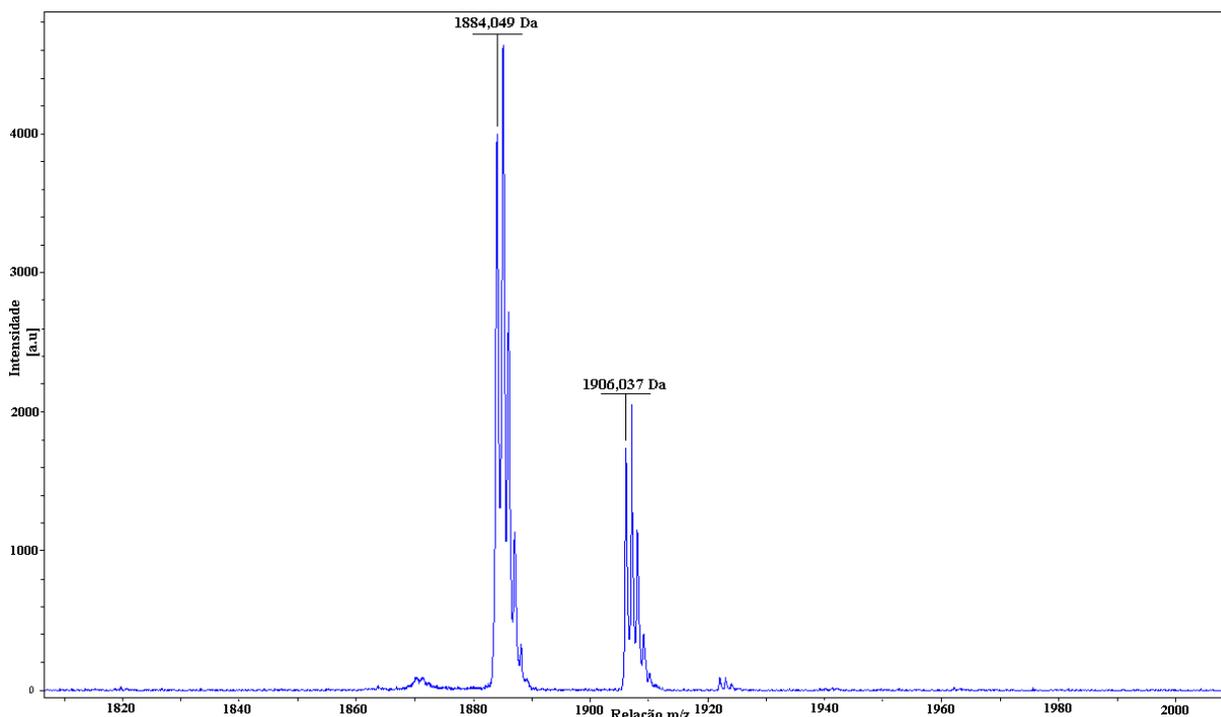


Figura 13. Espectro de massas do análogo Ha1_1883, com $[M+H]^+$ igual a 1884,04 Da purificado por RP-HPLC em coluna de fase reversa C18. Pode-se observar a presença de aduto com o íon sódio. Espectros obtidos após plaqueamento das amostras em placa de aço inoxidável junto a matriz de HCCA 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Análises realizadas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF, tendo sido utilizada a solução Peptide Mix para a calibração, sendo a faixa analisada de 500 a 4000.

5.4. Efeitos hemolíticos dos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883

De maneira geral, os dois análogos da Hylina a1 sintetizados no presente estudo apresentaram potentes efeitos hemolíticos, que podem estar associados à substituição do resíduo de prolina na posição 7, visto que este aminoácido oferece resistência a conformação helicoidal. Logo, sua substituição pode ter tornado mais propensa a conformação em hélice, conformação esta muito associada aos efeitos hemolíticos dos peptídeos antimicrobianos alfa-helicoidais. A figura 14 representa os efeitos hemolíticos (porcentagem de hemólise) sobre uma suspensão de eritrócitos humanos produzida por concentrações (μM) decrescentes dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883. Nota-se que até a concentração de 16 μM , as atividades hemolíticas destes dois peptídeos foram semelhantes (92,1% de hemólise promovida pelo peptídeo Ha1_1996 e 95,1% de hemólise promovida pelo peptídeo Ha1_1883). Na concentração de 4 μM o peptídeo Ha1_1996 teve sua atividade hemolítica reduzida amplamente, causando um percentual de 46,8% de hemólise. Já o peptídeo Ha1_1883, nesta mesma concentração, ainda mantinha uma atividade

superior a 95% de hemólise. A atividade hemolítica do peptídeo Ha1_1883 só se mostrou inferior a 50% em concentrações inferiores a 2 μM . Na concentração de 1 μM , sua atividade hemolítica apresentou-se em torno 32%, evidenciando o alto poder hemolítico desse peptídeo. Nesta mesma concentração, o peptídeo Ha1_1996 apresentou pouco mais de 15% de atividade hemolítica.

Assim como nos estudos de Conlon et al. (2007), onde os peptídeos com maior tempo de retenção em RP-HPLC estiveram associados a uma maior atividade hemolítica, notamos aqui que o peptídeo Ha1_1996, com menor tempo de retenção, 21,9 segundos, apresentou menor atividade hemolítica que o peptídeo Ha1_1883, com tempo de retenção de 28,9 segundos. Assim como o tempo de retenção em RP-HPLC, a atividade hemolítica está diretamente relacionada à hidrofobicidade do peptídeo.

No estudo realizado por Castro et al. (2009), o peptídeo Hylina a1 também apresentou considerável atividade hemolítica, com HC_{50} de 18 μM . A forte atividade hemolítica, tanto da Hylina a1 quanto de seus análogos sintéticos Ha1_1996 ($\text{HC}_{50} = 4,4 \mu\text{M}$) e Ha1_1883 ($\text{HC}_{50} = 1,5 \mu\text{M}$) pode representar um problema no que diz respeito ao seu uso clínico como opção terapêutica aos antibióticos clássicos e convencionais, porém mudanças na estrutura destes peptídeos, principalmente visando reduzir a hidrofobicidade, podem acarretar compostos com atividade antimicrobiana melhorada ou mantida, e com perda ou redução da atividade hemolítica. Mudanças como aquelas realizadas por Chen et al., (2005), onde foi observada uma grande redução na atividade hemolítica dos análogos sintetizados quando L-aminoácidos da porção hidrofóbica foram substituídos por D-aminoácidos, atribuindo-se esta redução ao fato de que os análogos D-diastereoisômeros exibiram menor capacidade de auto-agregação que os análogos L-diastereoisômeros. Neste mesmo estudo, foi detectada grande redução nas atividades hemolíticas dos análogos quando resíduos hidrofóbicos da face apolar foram substituídos por resíduos menos hidrofóbicos.

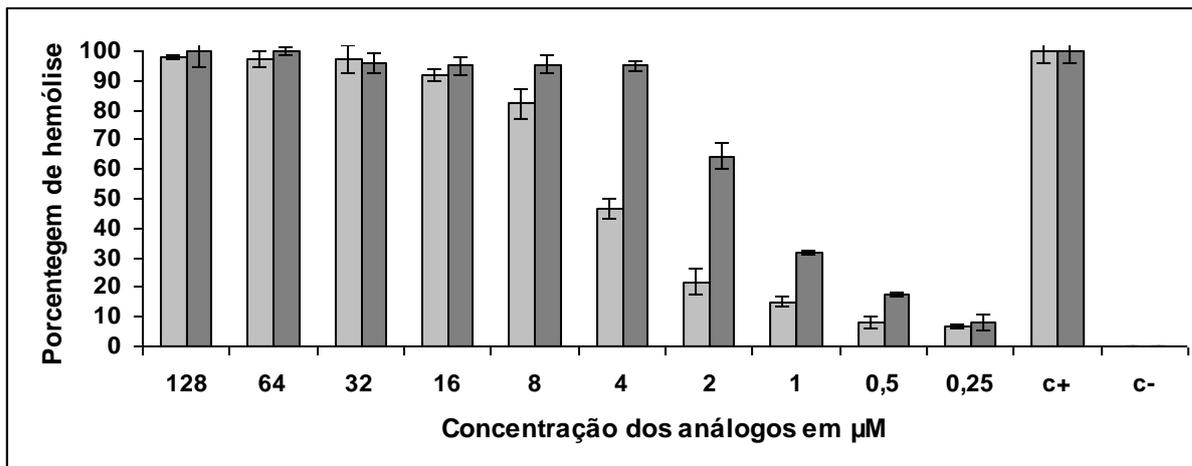


Figura 14. Percentagem de hemólise de eritrócitos humanos (O+) pelos análogos Ha1_1996 (em cinza claro) e Ha1_1883 (em cinza escuro) em função da concentração de peptídeos empregada. Como controle da ausência de hemólise (C-), a suspensão de eritrócitos foi incubada com tampão Tris-salina (Tris-HCL 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e CaCl₂ 0,01 M) e como controle hemolítico (C+) os eritrócitos foram lisados com a adição de uma solução de Triton X-100 na concentração final de 0,1% (v/v). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

5.5 Efeitos citolíticos sobre leucócitos totais dos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883

A figura 15 representa os efeitos citolíticos sobre os leucócitos totais dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 na concentração de 64 µM. A fase plasmática do sangue foi retirada com o objetivo de se eliminar possíveis interferentes presentes neste plasma que pudessem vir a inibir ou diminuir a atividade dos peptídeos testados. Expressando em números, enquanto a leucometria encontrada no controle negativo no tempo T0 foi, em média, de 5.371 leucócitos/mm³, neste mesmo tempo, as leucometrias das amostras submetidas à ação dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 foram de, respectivamente, 4.819 leucócitos/mm³ e de apenas 539 leucócitos/mm³. Já no tempo 120 minutos, a leucometria do controle negativo atingiu uma média de aproximadamente 5.000 leucócitos/mm³, frente a 4.356 leucócitos/mm³ encontrados nas amostras submetidas ao peptídeo Ha1_1996, ao passo que a média de leucócitos encontrada nas amostras sob efeito do peptídeo Ha1_1883 foi de apenas 399 leucócitos/mm³. As leucometrias encontradas com o controle positivo (na presença do detergente Triton X-100) nos

1 R W H P S R P L Q X W R V 7 ¶ D V O H X F R P H W U
 ¶ H 7 ¶ I R U D P U H V S H F W L Y D ¶. H Q W H

Pela observação das contagem dos leucócitos, após a ação dos dois

peptídeos testados, ficou claramente demonstrado que o peptídeo Ha1_1883 causa maior destruição dos leucócitos totais quando comparado ao peptídeo Ha1_1996, além de ser também mais hemolítico, como ficou demonstrado no ensaio realizado com a suspensão de eritrócitos humanos. Esta redução na contagem total dos leucócitos não foi observada por Prates et al., (2004), em seu estudo com o peptídeo HSP1.

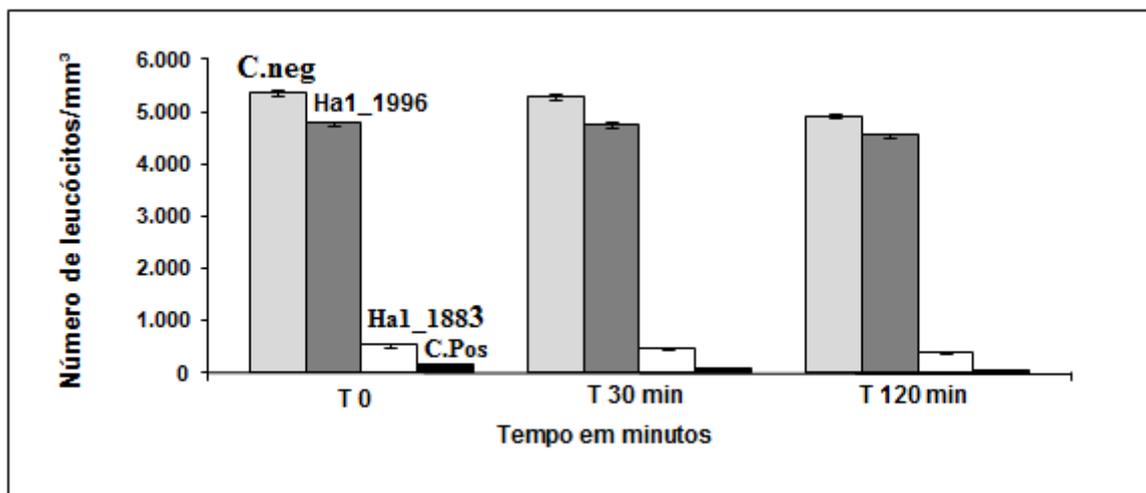


Figura 15. Análise por citometria de fluxo mostrando a contagem global dos leucócitos em sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos Ha1_1996 (área cinza escuro) e Ha1_1883 (região branca) na concentração de 64 μ M, comparada aos controles negativo (solução fisiológica, representada pela área cinza claro) e positivo (Triton X-100 10% (v/v), representado pela área escura). As barras representam o desvio padrão.

A figura 16 ilustra a porcentagem de destruição dos leucócitos após a exposição do sangue aos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 na concentração de 64 μ M nos tempos 0, 30 e 120 minutos. Observa-se que a redução na leucometria causada pelo peptídeo Ha1_1996, em comparação ao controle negativo, variou de pouco mais de 10% no tempo 0, chegando a 11,62% após 120 minutos de atuação do peptídeo. Já o peptídeo Ha1_1883 demonstrou um forte efeito lisante sobre as células brancas (leucócitos), bem superior ao peptídeo Ha1_1996, causando uma redução de cerca de 93% quando comparado ao controle negativo. Diferentemente dos resultados obtidos por Prates et al., (2004), em nosso estudo, observamos a destruição dos leucócitos totais pelos peptídeos, sobretudo pelo peptídeo Ha1_1883.

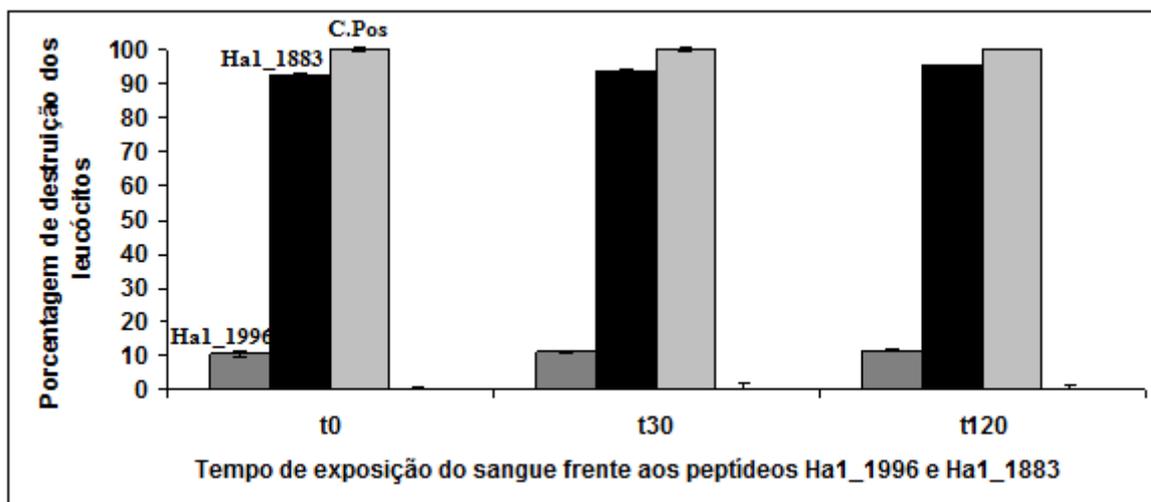


Figura 16. Porcentagem de destruição dos leucócitos totais após exposição do sangue total nos tempos 0, 30 e 120 minutos sob ação dos peptídeos Ha1_1996 (cinza escuro) e Ha1_1883 (cor negra) na concentração de 64 μ M, comparada aos controles negativo (solução salina fisiológica) e positivo (Triton X-100 10% (v/v), cor cinza claro). As barras representam o desvio padrão.

Na figura 17 pode-se observar, através da análise dos gráficos que comparam tamanho (dispersão 90°) e complexidade (dispersão 10°), os efeitos dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 (figuras 17-1 e 17-2, respectivamente), bem como dos controles negativo (figura 17-3) e positivo (figura 17-4) sobre cada uma das linhagens de células brancas, analisadas em contador hematológico Cell-Dyn 3700. Em comparação ao controle negativo, nota-se uma grande destruição dos leucócitos nas amostras submetidas às ações do peptídeo Ha1_1883 (figura 17-2) e do controle positivo (Triton X-100 10% (v/v), figura 17-4). Neste tipo de metodologia, os leucócitos são analisados em dois canais, um óptico (WOC) e um por impedância (WIC). Através do canal óptico, um feixe de laser atua sobre o fluxo celular e o núcleo das células promove uma dispersão da luz em quatro ângulos diferentes (0°, para avaliar o tamanho da célula; 10°, que avalia a complexidade celular; 90° polarizada, que mede a superfície celular e a estrutura interna ou lobularidade; e 90° despolarizada, que mede certos tipos de granularidades celulares). Por meio da impedância elétrica, os núcleos dos leucócitos são quantificados e medidos, à medida, que os leucócitos fluem por um orifício de abertura conhecida e promovem mudanças transitórias na resistência entre dois eletrodos. A amplitude de cada pulso é proporcional ao volume da partícula que o produziu.

Através da análise das figuras 17, 18, e 19, que correspondem aos efeitos dos peptídeos sobre a leucometria nos tempos 0, 30 e 120 minutos, constata-se que

o peptídeo Ha1_1996 exerce uma discreta destruição dos neutrófilos (plotados nos JUILLFRV FRPR RV SRQWRV DPUHORV TXH YDULD GH conforme mostrado na figura 20. Ainda de acordo com a figura 20, as células brancas mais afetadas pelo peptídeo Ha1_1996 foram os basófilos (plotados nas figuras na cor branca), com um percentual de destruição variando de 39,7% no tempo 0 chegando a 42,05% após 120 minutos de incubação. Os linfócitos também apresentaram um percentual relativamente alto de lise, variando de 19,35% no tempo 0 e alcançando 22,87% após 120 minutos de incubação.

Em relação ao peptídeo Ha1_1883 pode-se notar uma grande diferença de resposta sobre a leucometria quando comparado ao controle negativo e ao peptídeo Ha1_1996. Observa-se nas figuras 17, 18 e 19 que as áreas amarelas dos gráficos, correspondentes aos neutrófilos, praticamente são eliminadas. Estes elevados percentuais de destruição dos neutrófilos pelo peptídeo Ha1_1883 são evidenciados na figura 21, e aparecem variando de 99,2% no tempo 0, chegando a 100% de destruição após 120 minutos de incubação. Os basófilos (células plotadas na cor branca) são também destruídos nesta mesma proporção. Uma observação deve ser feita em relação às áreas verdes dos gráficos referentes ao peptídeo Ha1_1883, nas quais pode-se observar que elas são bastante preservadas nos três tempos (0, 30 e 120 minutos de incubação). Estas áreas correspondem aos eosinófilos, que são os leucócitos que possuem uma complexa granularidade e que, de acordo com a figura 21 foram as células brancas mais resistentes à ação do peptídeo Ha1_1883, com percentual de destruição de aproximadamente 25% em cada um dos três tempos.

A figura 22 traz uma comparação dos percentuais de destruição de cada linhagem dos leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 na concentração de 64 μ M nos tempos 0, 30 e 120 minutos de incubação. Nota-se uma marcante diferença nos percentuais de destruição entre estes dois peptídeos, onde o peptídeo Ha1_1883 se destaca pelo alto poder de lise sobre as células brancas.

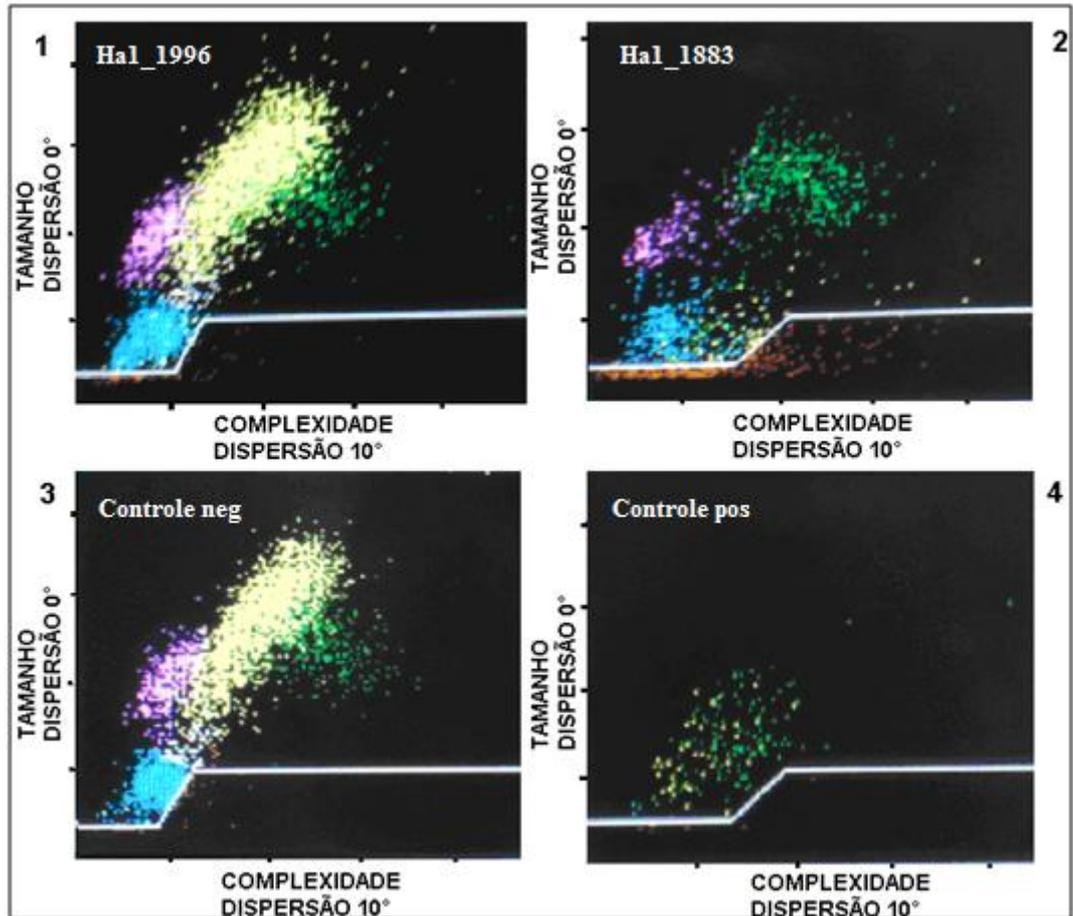


Figura 17. Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos Ha1_1996 na concentração de 64 μ M (1), Ha1_1883 na concentração de — 0 FRQWUROH QHJDWLYR H FRQWUROH, SRVLWLY neutrófilos; em azul, os linfócitos; os monócitos são representados em roxo e os eosinófilos estão em verde. As raras células representadas na cor branca são os basófilos. Cada ponto nos gráficos corresponde a um único tipo celular, plotado à medida que passa pelo detector celular. As análises foram realizadas em contador hematológico automatizado Cell-Dyn 3700, Marca Abbott.

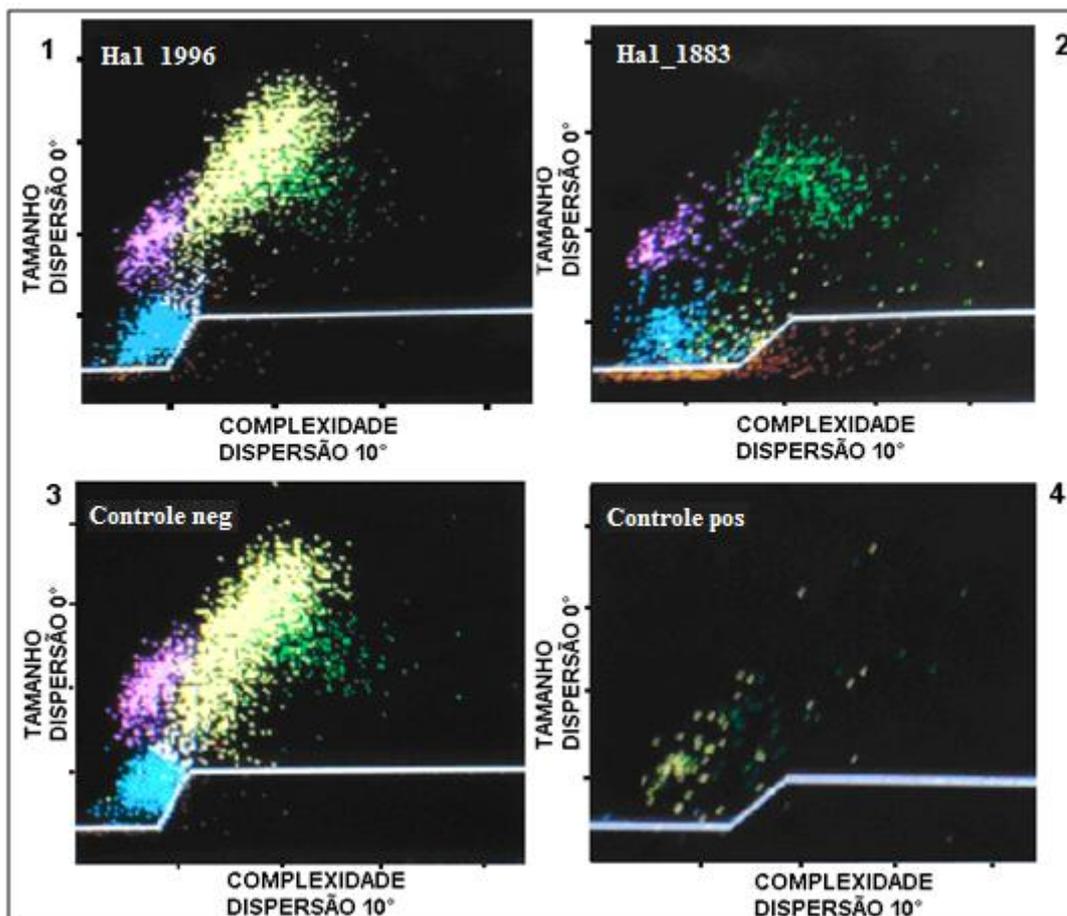


Figura 18. Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos Ha1_1996 na concentração de 64 μ M (1), Ha1_1883 na concentração de 64 μ M (2), controle negativo (3) e controle positivo (4) após 30 minutos de incubação. Em amarelo, os neutrófilos; em azul, os linfócitos; os monócitos são representados em roxo e os eosinófilos estão em verde. As raras células representadas na cor branca são os basófilos. Cada ponto nos gráficos corresponde a um único tipo celular, plotado à medida que passa pelo detector celular. As análises foram realizadas em contador hematológico automatizado Cell-Dyn 3700, Marca Abbott.

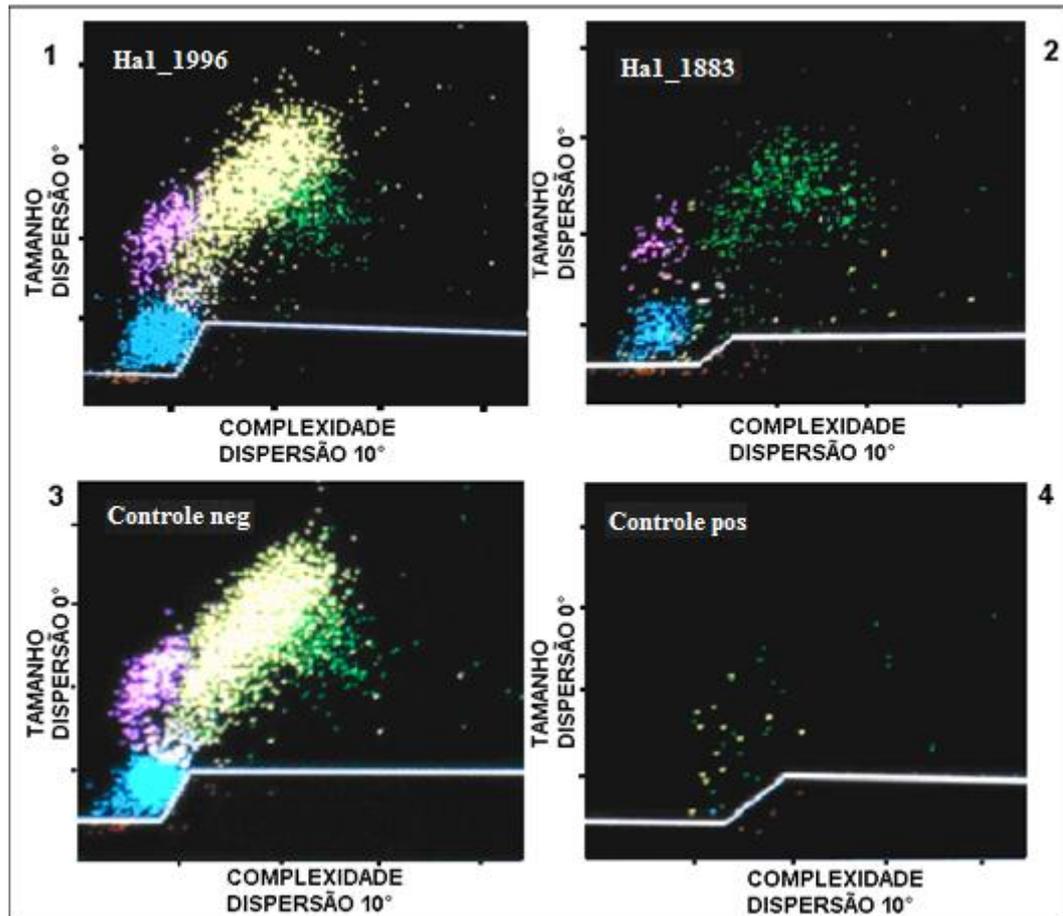


Figura 19. Análise diferencial dos leucócitos nas amostras sanguíneas submetidas à ação dos peptídeos Ha1_1996 na concentração de 64 μM (1), Ha1_1883 na concentração de 64 μM (2), controle negativo (3) e controle positivo (4) após 120 minutos de incubação. Em amarelo, os neutrófilos; em azul, os linfócitos; os monócitos são representados em roxo e os eosinófilos estão em verde. As raras células representadas na cor branca são os basófilos. Cada ponto nos gráficos corresponde a um único tipo celular, plotado à medida que passa pelo detector celular. As análises foram realizadas em contador hematológico automatizado Cell-Dyn 3700, Marca Abbott.

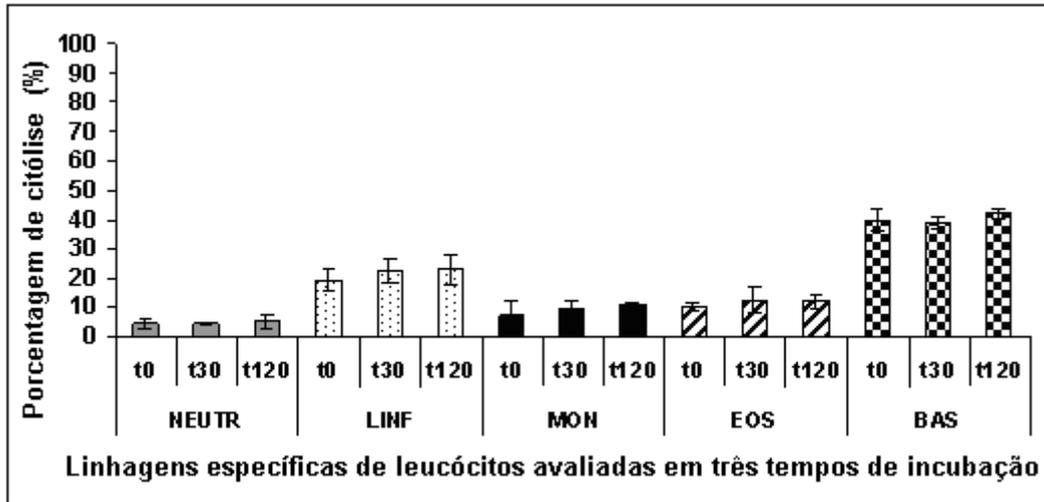


Figura 20. Análise por citometria de fluxo evidenciando os efeitos do peptídeo Ha1_1996 na concentração de 64 μ M sobre linhagens específicas de leucócitos após 0, 30 e 120 minutos de incubação, em comparação aos controles negativo (solução fisiológica) e positivo (Triton X-100 10% (v/v)). NEUTR, neutrófilos; LINF, linfócitos; MON, monócitos; EOS, eosinófilos; BAS, basófilos.

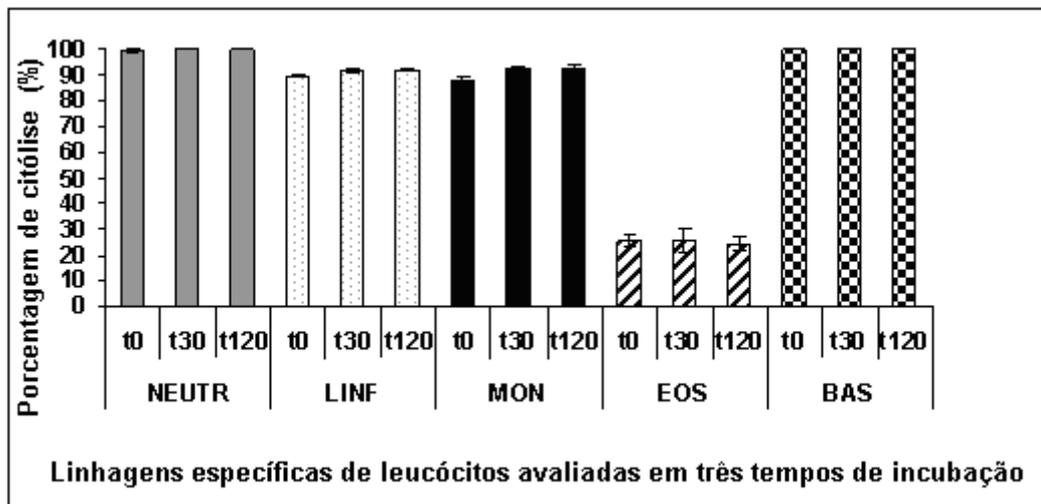


Figura 21. Análise por citometria de fluxo evidenciando os efeitos do peptídeo Ha1_1883 na concentração de 64 μ M sobre linhagens específicas de leucócitos após 0, 30 e 120 minutos de incubação, em comparação aos controles negativo (solução fisiológica) e positivo (Triton X-100 10% (v/v)). NEUTR, neutrófilos; LINF, linfócitos; MON, monócitos; EOS, eosinófilos; BAS, basófilos.

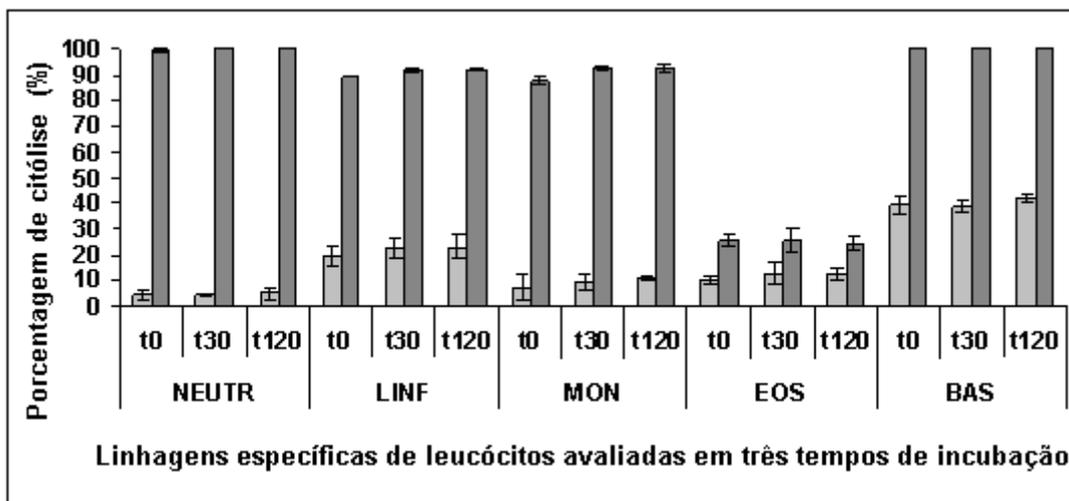


Figura 22. Comparação dos efeitos dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 na concentração de 64 μ M sobre linhagens específicas de leucócitos após 0, 30 e 120 minutos de incubação, em comparação aos controles negativo (solução fisiológica) e positivo (Triton X-100 10% (v/v)). Em cinza claro, os efeitos citolíticos do peptídeo Ha1_1996; em cinza escuro, os efeitos citolíticos do peptídeo Ha1_1883. NEUTR, neutrófilos; LINF, linfócitos; MON, monócitos; EOS, eosinófilos; BAS, basófilos.

5.6. Efeitos antimicrobianos dos análogos Ha1_1996 e Ha1_1883

Os peptídeos sintéticos caracterizados no presente estudo foram testados contra microrganismos patogênicos Gram-positivos (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*), Gram-negativos (*E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*), leveduras (*Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*), micobactérias (cepas H37Ra e MDR) e contra as bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), buscando determinação da CIM para cada microrganismo avaliado. Os resultados dos testes de sensibilidade evidenciaram um comportamento diversificado dos microrganismos frente aos dois peptídeos testados. Esta diferença de susceptibilidade pode estar relacionada às propriedades de cada um dos peptídeos, bem como com as diferenças na composição das membranas dos microrganismos testados.

5.6.1. Ensaios antibacterianos com cepas ATCC Gram-positivas

Os resultados da determinação da CIM dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente a microrganismos Gram-positivos estão representados abaixo. A figura 23 apresenta a porcentagem de inibição no crescimento do patógeno *Staphylococcus aureus* promovida por estes dois peptídeos, em concentrações variando de 128 μ M

a 0,0625 μM . O peptídeo Ha1_1996 apresentou CIM de 16 μM , ao passo que o peptídeo Ha1_1883 apresentou uma CIM de 8 μM . Embora os dois peptídeos tenham apresentado bons resultados sobre o *S. aureus*, destaca-se um melhor desempenho, em termos de inibição do crescimento microbiano, do peptídeo Ha1_1883 quando comparado ao seu análogo Ha1_1996. Mesmo em baixa concentração, como visto em 0,0625 μM , este peptídeo apresentou inibição próxima a 40%.

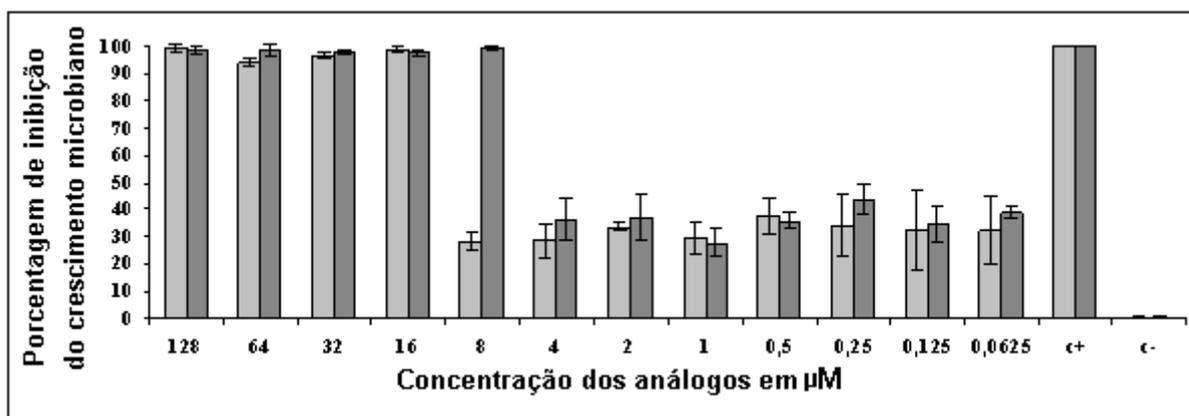


Figura 23. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Os resultados expressos na figura 24 forneceram os dados experimentais empregados na determinação da CIM dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente a bactéria *Staphylococcus epidermidis*. São mostrados os percentuais de inibição sobre o crescimento desse patógeno promovidos por estes dois peptídeos, em concentrações que variaram de 128 a 0,0625 μM .

Os dois peptídeos, Ha1_1996 e Ha1_1883, apresentaram uma CIM de 4 μM . Assim como visto em relação à inibição frente ao *S. aureus*, observamos aqui um melhor desempenho em termos de inibição do crescimento microbiano por parte do peptídeo Ha1_1883 quando comparado ao seu análogo Ha1_1996.

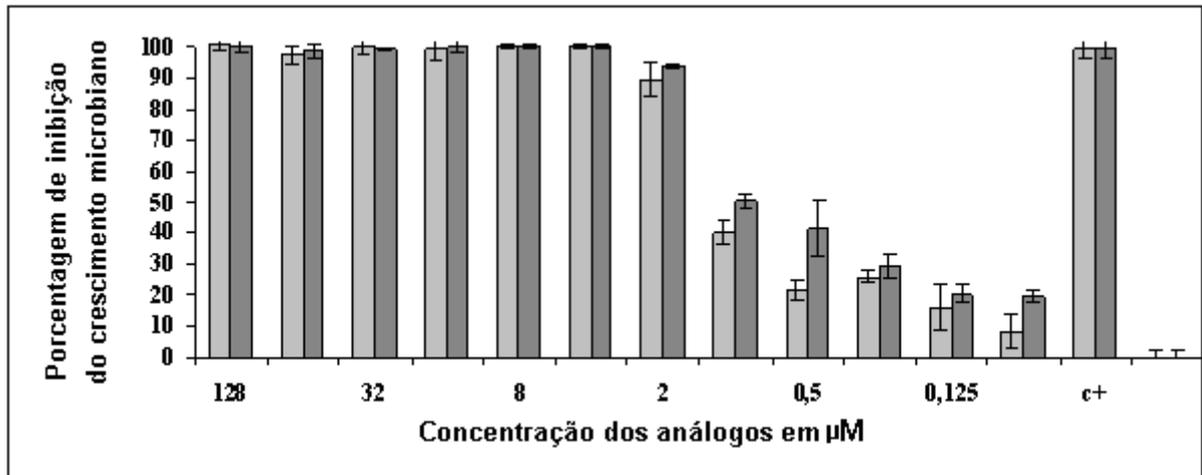


Figura 24. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. epidermidis* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A figura 25 representa a porcentagem de inibição sobre o crescimento da bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis* diante dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883, com concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Nota-se que a atividade inibitória dos dois peptídeos foi bastante semelhante, com uma CIM de 16 μM ambos os análogos. Até a concentração de 4 μM , tanto em relação ao Ha1_1996 quanto em relação ao Ha1_1883, observou-se uma inibição de aproximadamente 77% no crescimento deste microrganismo, sendo que a partir da concentração de 2 μM nenhum efeito inibitório no crescimento do *E. faecalis* foi notado em relação a estes dois peptídeos. No estudo realizado por Castro et al. (2009), o peptídeo Hylina a1 sintético apresentou a mesma CIM (16 μM) observada neste estudo com seus dois análogos sintéticos Ha1_1996 e Ha1_1883. Estes resultados são também equivalentes àqueles obtidos por Conlon et al. (2007), quando foi atingida uma CIM de 16 μM do peptídeo sintético Temporina-1 Dra frente ao *E. faecalis*.

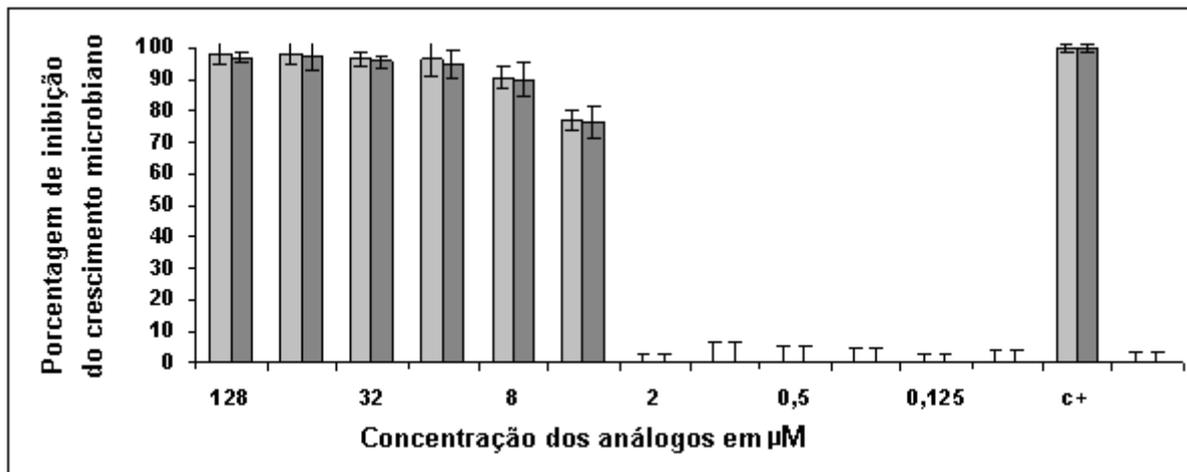


Figura 25. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *E. faecalis* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A tabela 4 apresenta os valores da CIM, em μM , dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente às cepas ATCCs de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*. Ao se comparar esses valores com os encontrados para a Hylina a1, observou-se que o análogo Ha1_1883 apresentou a mesma CIM frente as bactérias *S. aureus* (8 μM) e *E. faecalis* (16 μM). Infelizmente os efeitos inibitórios da Hylina a1 ainda não foram avaliados contra a bactéria *S. epidermidis*, não permitindo assim comparações.

Em outro estudo onde se buscavam estratégias para melhorar o valor terapêutico de peptídeos antimicrobianos, Conlon et al. (2007) testaram a atividade antimicrobiana da Temporina-1Dra frente ao *S. aureus*, obtendo a mesma CIM apresentada pelo peptídeo Ha1_1883. Quando foram realizadas substituições na face hidrofóbica, aqueles análogos da Temporina-1DRa apresentaram excelente redução na atividade hemolítica, porém a CIM frente ao *S. aureus*, que era de 8 μM , passou a ser maior que 128 μM .

A tabela 4 sintetiza os resultados obtidos nos ensaios antibacterianos dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente aos microrganismos Gram-positivos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. Os valores das CIMs estão expressos em μM . São apresentados também os resultados obtidos nos ensaios com Hylina a1 por Castro et al., 2009.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre bactérias Gram-positivas.

	Bactérias Gram-positivas		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>
	CIM (μM)		
Ha1_1996	16	4	16
Ha1_1883	8	4	16
Hylina a1*	8	NT	16

NT: não-testado

*Dados extraídos de Castro et al., 2009.

5.6.2. Ensaios antibacterianos com cepas ATCC Gram-negativas

Os resultados da determinação da CIM dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente às bactérias Gram-negativas estão representados abaixo.

A figura 26 representa a porcentagem de inibição sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* diante dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883, com concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Observa-se que ambos os peptídeos apresentaram uma CIM de 8 μM frente a *K. pneumoniae*. Porém, em concentrações mais baixas destes dois peptídeos, observamos um efeito mais pronunciado do peptídeo Ha1_1883 quando comparado ao Ha1_1996, como pode ser ilustrado na concentração de 4 μM , onde o peptídeo Ha1_1883 exerceu 68,5% de inibição do crescimento deste microorganismo, frente a um percentual de inibição de apenas 23,9% apresentado pelo peptídeo Ha1_1996.

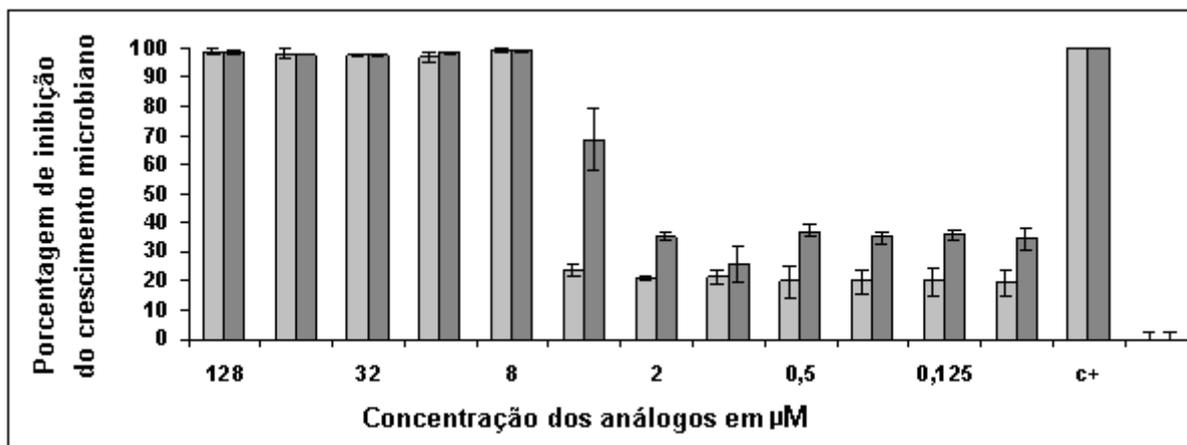


Figura 26. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A figura 27 representa a porcentagem de inibição sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria Gram-negativa do grupo dos não-fermentadores de glicose aparece com grande frequência em casos de infecções hospitalares, e apresenta um grande potencial em desenvolver mecanismos de resistência a diversas classes de antimicrobianos. As CIMs dos dois peptídeos, Ha1_1996 e Ha1_1883, ficaram limitados à concentração de 32 μM . Abaixo desta concentração praticamente nenhum destes peptídeos apresentou atividade inibitória sobre o crescimento de tal microrganismo. Estes resultados, ainda assim, são melhores que aqueles apresentados pela Hylina a1, cuja CIM foi de 64 μM nos estudos conduzidos por Castro et al. (2009), e equivalentes aos resultados obtidos por Conlon et al. (2007), onde o peptídeo Temporina-1 Dra também apresentou CIM de 32 μM frente à *Pseudomonas aeruginosa*. Em outro estudo, realizado por Prates et al., 2004, o peptídeo antimicrobiano catiônico HSP1, isolado do anuro *Hyla punctata*, também foi testado frente a cepas ATCCs de *Pseudomonas aeruginosa*, e apresentou uma CIM de 48,8 μM , superior pois àquela encontrada neste trabalho.

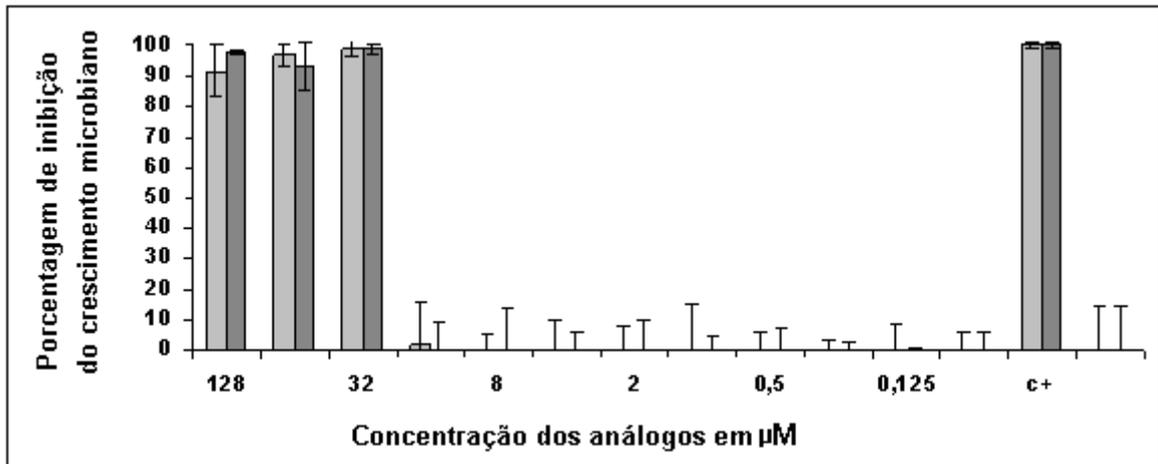


Figura 27. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q -Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Na figura 28 pode-se observar o baixo grau de inibição do crescimento do microrganismo *Enterobacter cloacae* pelos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883. A CIM relativa aos dois peptídeos está acima da concentração de 128 μM . Conlon et al. (2007), em estudos com o peptídeo sintético Temporina-1 Dra obtiveram resultados bem diferentes, com uma CIM de 32 μM .

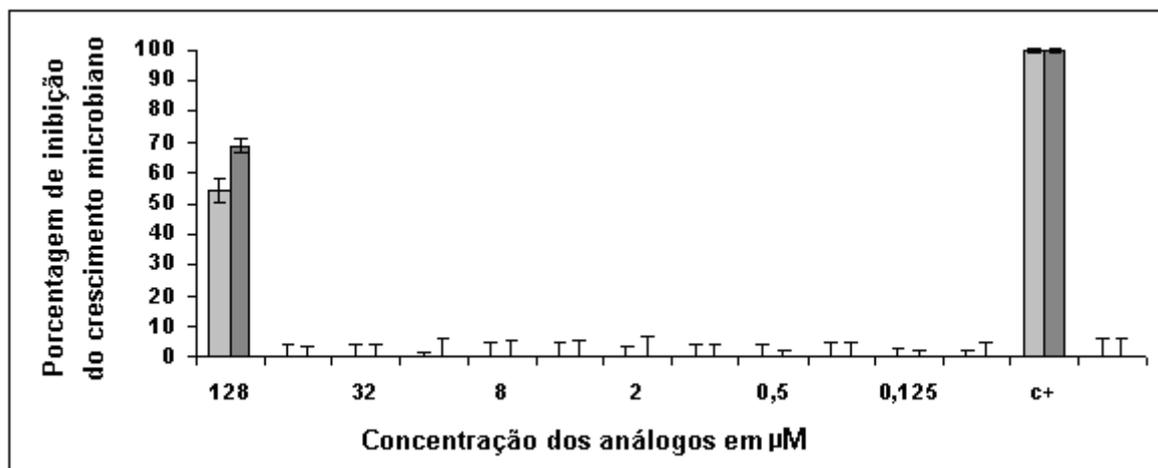


Figura 28. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *E. cloacae* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A figura 29 ilustra a porcentagem de inibição promovida pelos dois peptídeos sobre o crescimento da cepa da enterobactéria *Escherichia coli* nas concentrações variando de 128 μM a 0,0625 μM . Observa-se que tanto Ha1_1996 quanto

Ha1_1883 apresentaram uma CIM de 32 μM frente a este microrganismo. Esta inibição foi semelhante a encontrada por Castro et al.(2009), uma vez que naquele estudo com a *Hylina a1* também se obteve CIM de 32 μM frente a cepa de *E. coli* ATCC 25922, a mesma ATCC empregada em nosso trabalho.

Conlon et al. (2007) conseguiram melhores resultados com o peptídeo Temporina-1 Dra, que apresentou CIM de 16 μM frente a esta mesma bactéria. Naquele estudo, no entanto, análogos que tiveram substituições (introdução do aminoácido lisina) na face hidrofóbica tiveram uma atividade antimicrobiana mais reduzida contra *E. coli*, com concentrações inibitórias mínimas superiores a 128 μM . Há de se destacar o efeito de inibição do crescimento da *E. coli* exercido pelo peptídeo Ha1_1883 que mesmo na concentração de 0,0625 μM apresentou aproximadamente 38% de inibição.

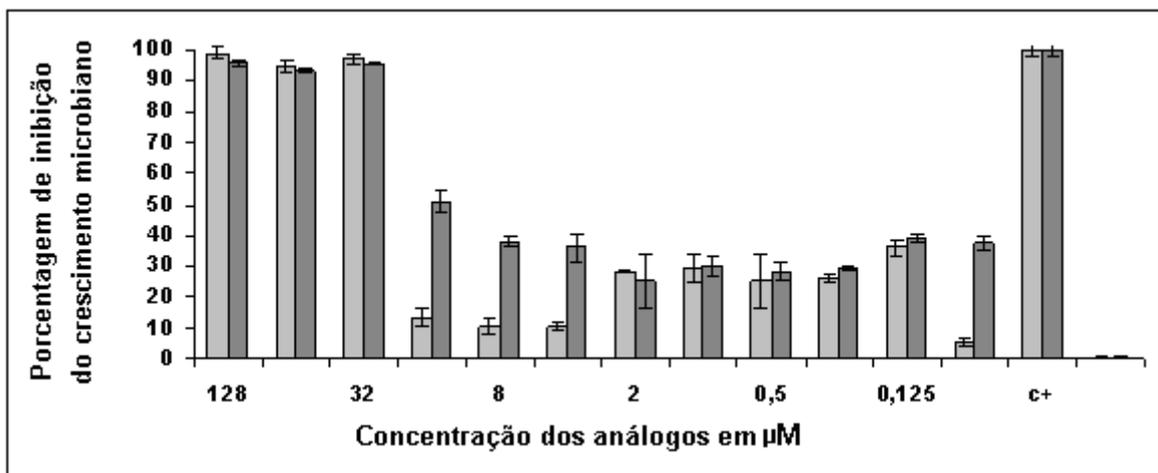


Figura 29. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *E. coli* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A figura 30 representa a porcentagem de inibição promovida pelos dois peptídeos sobre o crescimento de *Proteus mirabilis*, uma bactéria da família das enterobactérias. O peptídeo Ha1_1883 apresentou 50% de inibição sobre o crescimento deste microrganismo nas concentrações de 128 e 64 μM . Já o peptídeo Ha1_1996 somente demonstrou atividade antimicrobiana próxima a esta na concentração de 128 μM , com um percentual de 47,8% de inibição do crescimento de *P.mirabilis*. Assim como visto no estudo de Conlon et al. (2007), onde nenhum dos peptídeos testados teve efeito inibitório no crescimento de *P. mirabilis* (CIM >

128 μM), a atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 também não foi satisfatória contra este germe. Tem sido sugerido que a composição fosfolipídica e glicolipídica da membrana celular deste microrganismo resulta em menor superfície aniônica que pode contribuir para esta resistência aos Peptídeos antimicrobianos (Conlon et al., 2007). Acredita-se que o *P. mirabilis* produza enzimas proteolíticas capazes de impedirem a ação antimicrobiana destes peptídeos (Sênior, 1999).

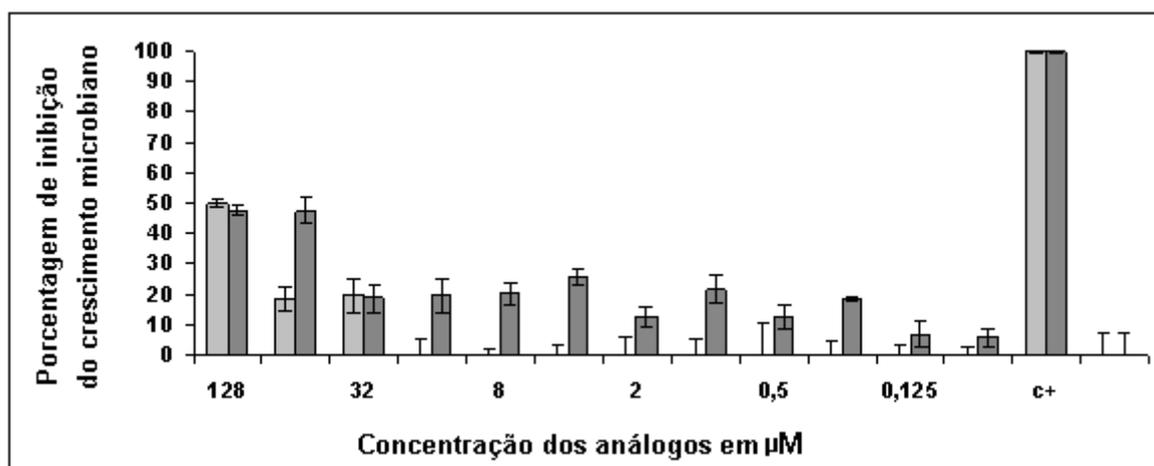


Figura 30. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *P. mirabilis* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A tabela 5 sintetiza os resultados obtidos nos ensaios antibacterianos dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente aos microrganismos Gram-negativos *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginos*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. Apresenta também os resultados do peptídeo Hylina a1 obtidos por Castro et al., 2009. Os valores das CIMs estão expressos em μM .

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre bactérias Gram-negativas.

	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
	CIM (μM)				
Ha1_1996	8	32	>128	32	>128
Ha1_1883	8	32	>128	32	>128
Hylina a1*	NT	64	NT	32	NT

NT: não-testado

*Dados extraídos de Castro et al., 2009.

5.6.3 Ensaios antibacterianos com cepas multirresistentes

Os resultados da determinação da CIM dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente às bactérias multirresistentes *Klebsiella pneumoniae* KPC e *Staphylococcus aureus* meticilina resistente MRSA estão representados abaixo.

5.6.3.1. *Klebsiella pneumoniae* KPC

A figura 31 ilustra a porcentagem de inibição promovida pelos dois peptídeos sobre o crescimento da cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM .

Bactérias produtoras de enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), com resistência a múltiplos antimicrobianos, vêm se disseminando rapidamente e causando infecções difíceis de serem tratadas. Tais bactérias contêm enzimas capazes de hidrolizar um amplo espectro de antimicrobianos β -lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (Hirsch & Tam, 2010).

Dados sobre infecções hospitalares, relatados pelo CDC em 2007, apontam que 8% das cepas de *Klebsiella* resistentes aos carbapenêmicos eram cepas de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, frente a um percentual menor que 1% visto nos dados de 2001 (Srinivasan & Patel, 2008). A rápida disseminação deste patógeno está associada ao fato de que o gene que confere este nível de resistência, gene *bla* KPC, é carregado por plasmídeo (Hirsch & Tam, 2010). Como o tratamento ótimo para cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase ainda não está totalmente definido, estudos com novas drogas se fazem necessários,

visando a descoberta de novos agentes terapêuticos. No presente trabalho, observou-se um interessante efeito inibitório sobre o crescimento de *K. pneumoniae* KPC pelo peptídeo Ha1_1996, o qual apresentou uma CIM de 128 μM . Chama a atenção aqui não o valor da CIM encontrada, mas sim o fato deste peptídeo inibir o crescimento de uma cepa bacteriana dotada de um extenso arsenal de mecanismos de resistência, que vem nos últimos meses se disseminando nos hospitais e, pior que isto, às vezes sem opções terapêuticas disponíveis para seu combate. E como já mencionado acima, os danos causados por esta bactéria são alarmantes, uma vez que sua multirresistência é plasmidial, logo cada vez mais bactérias podem vir a adquirir tal mecanismo de resistência. Não tão notável, porém não desprezível também, o peptídeo Ha1_1883 apresentou inibição em 70% no crescimento desta bactéria na concentração de 128 μM . Apesar do peptídeo Ha1_1996 ter apresentado uma CIM menor quando comparado ao peptídeo Ha1_1883, este último manteve um efeito de inibição parcial sobre o crescimento microbiano até a concentração de 4 μM em torno de 26%, contra menos de 2% de inibição causada por ação do peptídeo Ha1_1996.

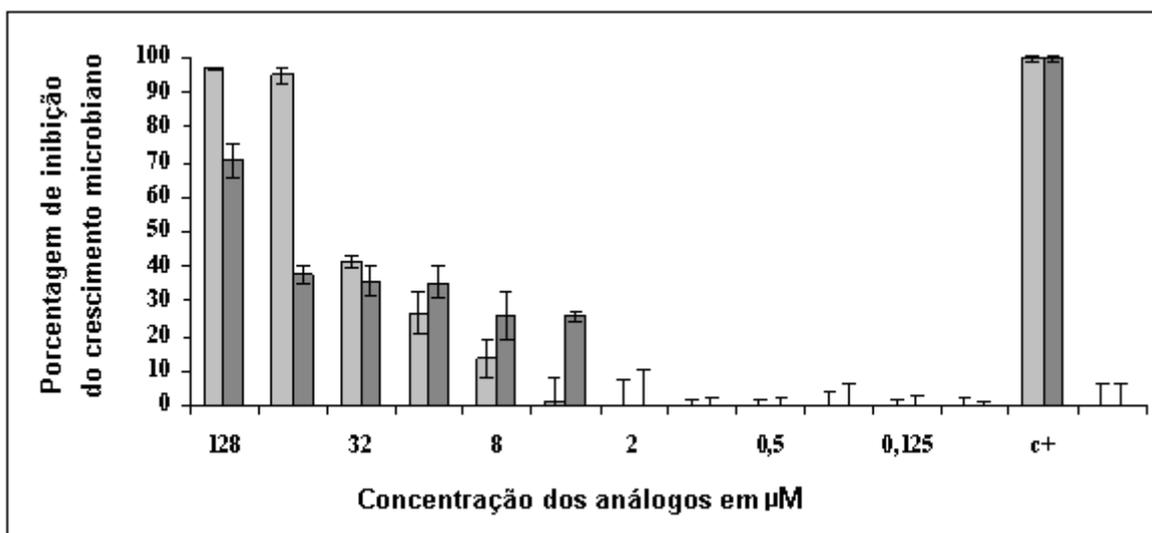


Figura 31. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* KPC pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

5.6.3.2. *Staphylococcus aureus* MRSA

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, mais precisamente um coco Gram-positivo, que se constitui como uma das principais causas de infecções hospitalares, resultando em doença em 2% de todos os pacientes

recém-admitidos. Aparece como sendo a causa mais freqüente de infecções de sítio cirúrgico, infecções do trato respiratório inferior e infecções cardiovasculares, além de estar bastante envolvido em infecções de corrente sanguínea (Nübel et al., 2008). De acordo com estimativas recentes, ocorreram 400.000 hospitalizações relacionadas ao *Staphylococcus aureus* por ano nos Estados Unidos, causando 11 mil mortes neste período (Klein et al., 2007).

O *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) apresenta uma SURWHtQD GH OLJDomR D SHQLFLOLQD PRGLILFDGD 3 % pelos antibióticos β -lactâmicos. As proteínas PBP2a são codificadas pelo gene *mecA*, que está localizado em um grande fragmento de DNA móvel designado FDVVHWH FURPRVV{PLF(SCCmec)W As proteínas de ligação à penicilina são responsáveis por catalizar a ligação cruzada do peptidoglicano na parede celular bacteriana (Nübel et al., 2008).

A capacidade de *S. aureus* de apresentar resistência a todas as classes de agentes antimicrobianos cada vez mais complica os esforços para prevenir e tratar infecções, especialmente em pacientes hospitalizados, justificando assim a importância de se buscar novas opções terapêuticas para combater tal microrganismo. Observa-se na figura 32 uma ótima atividade dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente ao *S. aureus* MRSA, com CIMs de, respectivamente, 8 μ M e 2 μ M.

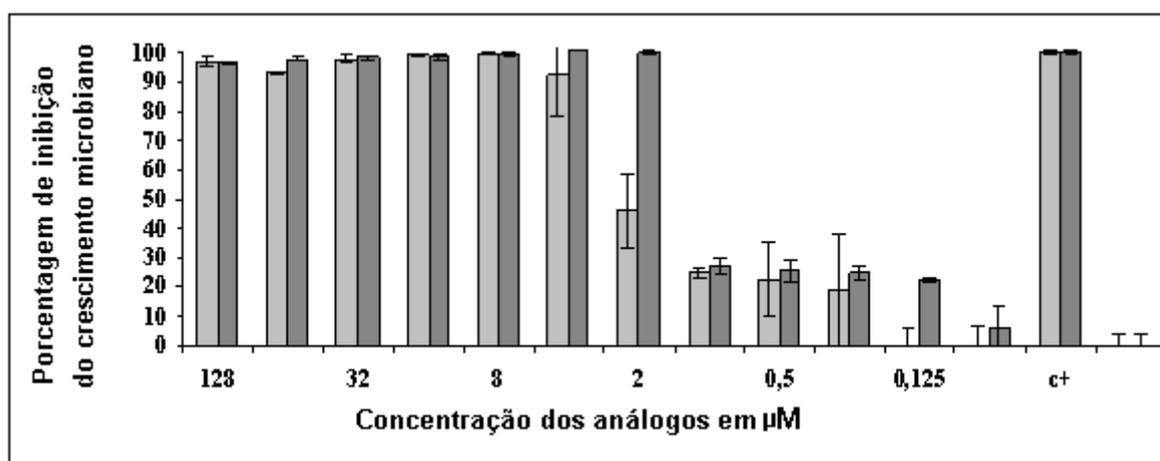


Figura 32. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μ M. Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A tabela 6 sintetiza os resultados obtidos nos ensaios antibacterianos dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente aos microrganismos multirresistentes *S. aureus* MRSA e *K. pneumoniae* KPC. Os valores das CIMs estão expressos em μM .

Tabela 6. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre microrganismos multirresistentes.

	MICROORGANISMOS MULTIRRESISTENTES	
	<i>S. aureus</i> (MRSA)	<i>K. pneumoniae</i> (KPC)
	CIM (μM)	
Ha1_1996	8	128
Ha1_1883	2	>128

5.6.4. Ensaios antimicrobianos com leveduras

Na figura 33 estão representados os efeitos inibitórios dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre o crescimento da levedura *Candida albicans*, um importante patógeno causador de infecções que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, propícios ao desenvolvimento de candidíase oral. No presente estudo, o peptídeo Ha1_1996 apresentou melhor efeito inibitório sobre *C. albicans* quando comparado ao peptídeo Ha1_1883. Na concentração de 128 μM , Ha1_1996 promoveu aproximadamente 78% de inibição sobre o crescimento de *C. albicans*, comparado a um percentual de inibição de pouco mais que 42% do peptídeo Ha1_1883. Pode-se observar que entre o intervalo de concentrações de 128 μM a 32 μM , o peptídeo Ha1_1996 exerceu praticamente o dobro do efeito inibitório apresentado pelo peptídeo Ha1_1883. Já na concentração de 8 μM , não se nota efeito inibitório no crescimento de *C. albicans* por nenhum dos dois peptídeos testados. Em estudo anterior, onde foi empregado o peptídeo Hylina a1, este apresentou melhor efeito inibitório que seus análogos, com CIM de 16,7 μM frente a *C. albicans* (Castro et al., 2009). Porém, CIMs mais elevadas foram encontradas no trabalho de Prates et al.(2004), onde foi obtida uma CIM de 195,2 μM frente a duas cepas distintas de *C. albicans*, uma cepa ATCC e outra um isolado clínico com

resistência a anfotericina B. Em outro estudo realizado por Kavanagh & Dowd (2004), foi demonstrada a importância do peptídeo antimicrobiano Histatina-5 no combate a infecções por *C. albicans*, como também foi proposto o uso de tal peptídeo em dentaduras e próteses situadas na cavidade oral. No estudo realizado por Conlon et al. (2007), o peptídeo Temporina-1 DRa apresentou CIM de 32 μM frente a *C. albicans*. Estudos recentes têm evidenciado a habilidade da *C. albicans* em produzir enzimas proteolíticas do grupo das aspartil-proteases capazes de degradarem o tecido hospedeiro, bem como propiciar a invasão dos tecidos por tais microrganismos. Estas enzimas proteolíticas podem explicar os baixos níveis de sensibilidade da *C. albicans* frente a determinados peptídeos antimicrobianos, tal como visto na resistência deste microrganismo frente a Histatina 5. (Meiller et al., 2009).

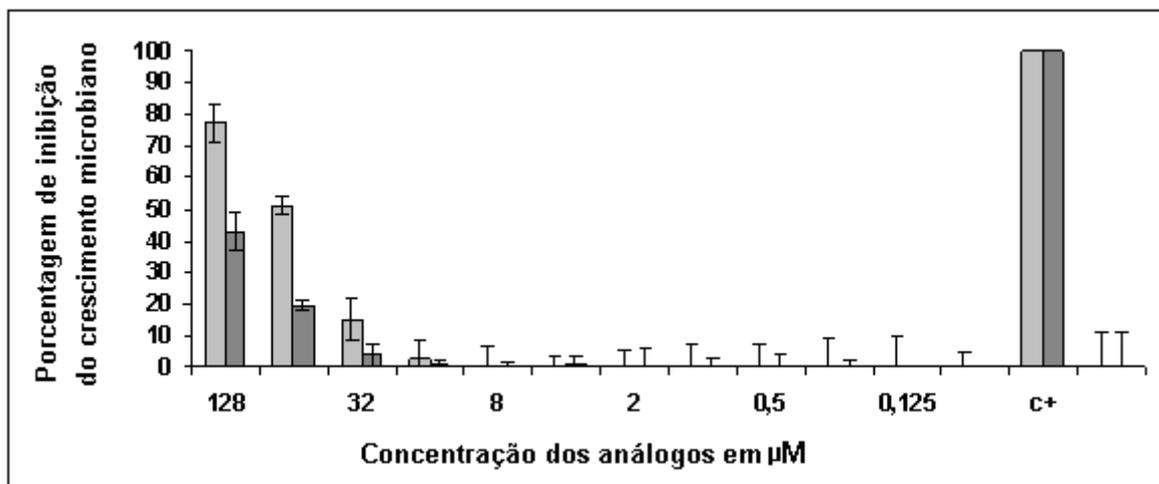


Figura 33. Porcentagem de inibição do crescimento da levedura *C. albicans* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregado água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A figura 34 representa os efeitos inibitórios bem mais pronunciados dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre o crescimento de *Candida parapsilosis* quando comparados àqueles resultados obtidos por estes dois peptídeos quando testados contra *C. albicans*. Os resultados aqui encontrados foram também mais satisfatórios que aqueles obtidos por Castro et al. (2009), onde a *Hylina a1* apresentou CIM de 67 μM quando testada frente a *C. parapsilosis*. No presente trabalho, observou-se uma CIM consideravelmente melhor para o peptídeo

Ha1_1883, na faixa de 4 μM , frente a uma CIM de 16 μM para o peptídeo Ha1_1996.

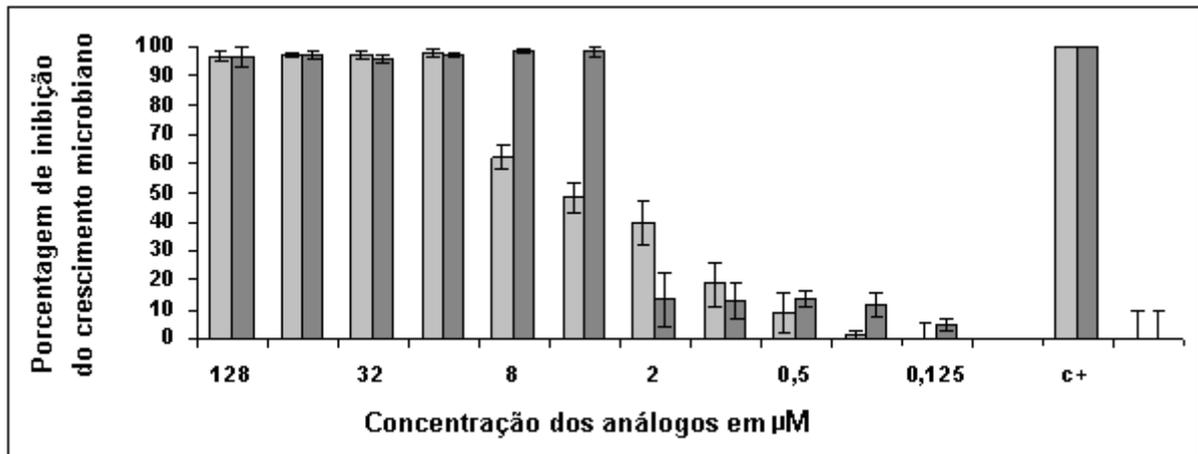


Figura 34. Porcentagem de inibição do crescimento da levedura *C. parapsilosis* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

Na figura 35 estão representados os percentuais de inibição no crescimento da levedura *Candida krusei* frente a diferentes concentrações dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883. O peptídeo Ha1_1996 apresentou CIM de 128 μM , frente a uma concentração acima de 128 μM apresentada pelo peptídeo Ha1_1883.

Os resultados apresentados pelo peptídeo Hylina a1 mostram uma melhor atividade inibitória frente a *C. krusei* quando comparado aos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 (Castro et al., 2009). Merece ser destacado também o fato de, ao se comparar os efeitos destes dois peptídeos frente as três cepas de leveduras aqui empregadas, o peptídeo Ha1_1883 superou os efeitos inibitórios observados em relação ao Ha1_1996 somente frente à *C. parapsilosis*.

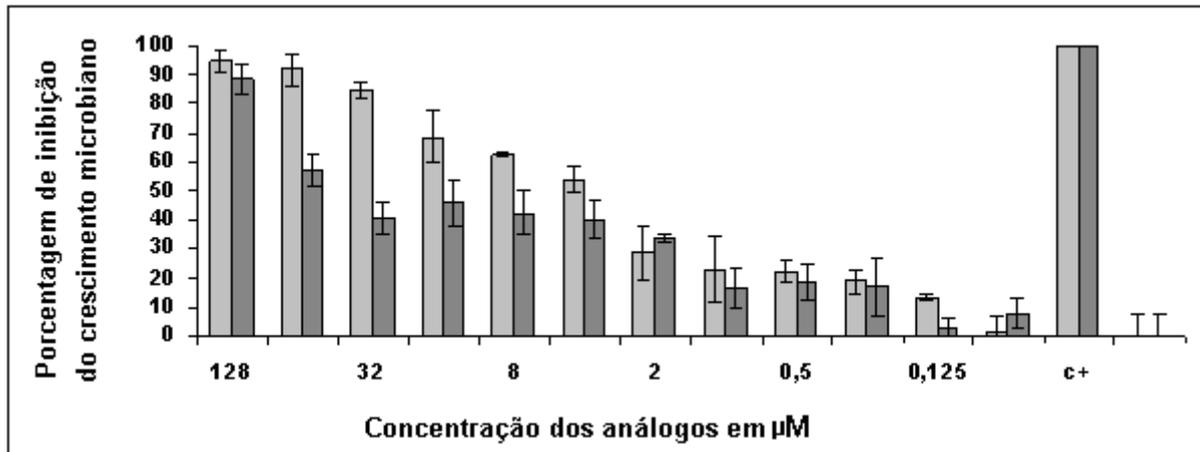


Figura 35. Percentagem de inibição do crescimento da levedura *C. krusei* pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 128 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q estéril e como controle positivo (C+), formaldeído 0,4% (v/v). As barras representam o desvio padrão.

A tabela 7 abaixo sintetiza os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 frente às cepas ATCC das leveduras *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. São apresentados também os resultados obtidos por Castro et al., 2009, nos testes da Hylina frente a estas 3 espécies de *Candida*. Os valores das CIMs estão expressos em μM .

Tabela 7. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre leveduras patogênicas.

	LEVEDURAS		
	<i>C.albicans</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.krusei</i>
	CIM (μM)		
Ha1_1996	>128	16	128
Ha1_1883	>128	4	>128
Hlina a1*	16.7	67	16.7

*Dados extraídos de Castro et al., 2009.

5.6.5. Ensaios com micobactérias

O *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose humana, está entre os agentes infecciosos mais letais. Embora a incidência de tuberculose tenha declinado nas últimas décadas, a emergência de casos de HIV e de cepas de

M. tuberculosis MDR têm revertido este quadro, diminuindo o êxito no tratamento da doença. A quimioterapia anti-tuberculose padrão é considerada um importante componente no controle da tuberculose, porém o surgimento destas cepas MDR tem levado a uma redução drástica no número de antibióticos efetivos, o que impulsiona a busca por novas abordagens terapêuticas anti-tuberculose (Linde et al., 2001). Os PAMs são um novo grupo de antibióticos ativos, com um mecanismo de ação particular, e amplamente distribuídos na natureza, que já demonstraram atividade contra cepas de *M. tuberculosis*, como por exemplo o peptídeo PR-39, rico em arginina e prolina, isolado do intestino de porco, e peptídeos derivados da granulicina, presentes em grânulos dos linfócitos T citotóxicos humanos (Zerbini et al., 2006). Nesse estudo, os peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 apresentaram, respectivamente, 80% e 74% de inibição sobre o crescimento de isolados clínicos de *M. tuberculosis* na concentração de 64 μM (Figura 35).

Contra isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR, os peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 mostraram inibir, respectivamente, 70% e 44% do crescimento deste microrganismo na concentração de 64 μM , conforme ilustrado na figura 36.

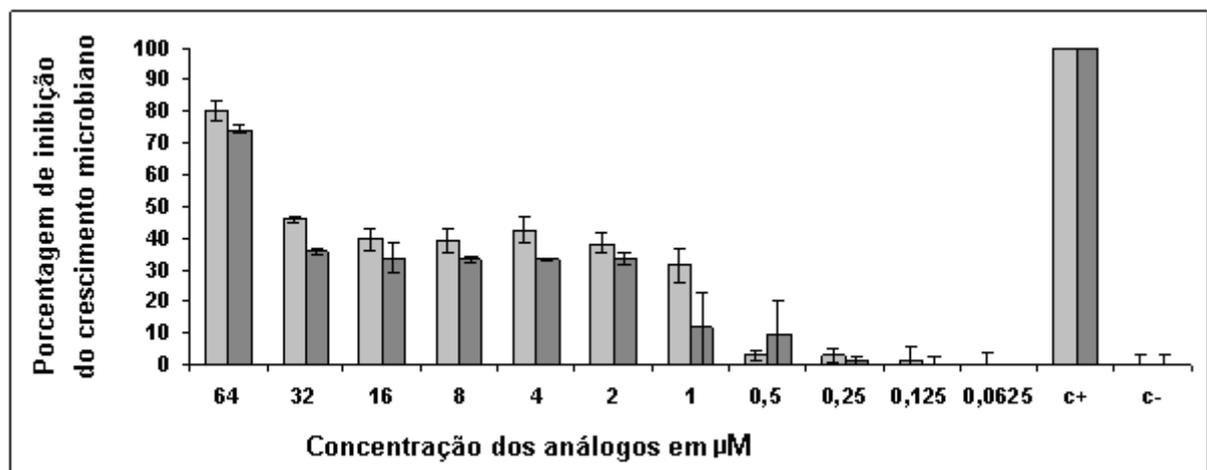


Figura 36. Porcentagem de inibição do crescimento de *M. tuberculosis* H37Ra pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 64 a 0,0625 μM . Como controle negativo (C-) foi utilizado meio Middlebrook 7H9 com OADC e água Milli-Q estéril; o controle positivo constitui de meio Middlebrook 7H9 com suspensão de micobactérias. As barras representam o desvio padrão.

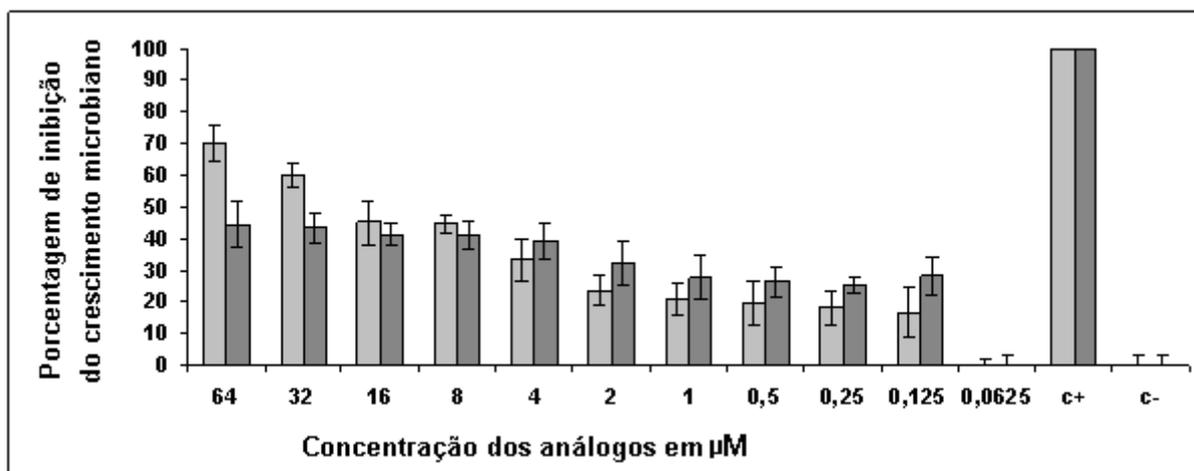


Figura 37. Porcentagem de inibição do crescimento de *M. tuberculosis* MDR pelos peptídeos Ha1_1996 (cinza claro) e Ha1_1883 (cinza escuro) em relação ao controle, em concentrações variando de 64 a 0,0625 µM. Como controle negativo (C-) foi utilizado meio Middlebrook 7H9 com OADC e água Milli-Q estéril; o controle positivo constitui de meio Middlebrook 7H9 com suspensão de micobactérias. As barras representam o desvio padrão.

Estes dois análogos da Hylina a1 exerceram efeitos inibitórios mais satisfatórios que aqueles observados por Zerbini et al. (2006), onde nenhum de seus dois peptídeos testados exerceu inibição sobre isolados de *M. tuberculosis*, somente demonstrando inibição sobre cepas de *M. smegmatis*. Deve se levar em consideração as diferentes cepas empregadas, bem como a técnica utilizada, já que no presente estudo foi empregada microdiluição em caldo 7H9 de Middlebrook, frente a macrodiluição em 7H9 empregada por Zerbini et al. Outro fato que merece atenção, de acordo com Zerbini et al. (2006), diz respeito à composição do fluido de enriquecimento OADC empregado nos dois estudos, uma vez que tal fluido contém albumina bovina que poderia vir a demonstrar atividade inibitória contra determinados peptídeos antimicrobianos.

Em seus estudos com o peptídeo PR-39, Linde et al. (2001) demonstraram a capacidade deste peptídeo em inibir o crescimento de isolados clínicos de *M. tuberculosis* suscetíveis a drogas antituberculosas na faixa de 80 a 90%, a uma concentração de 50 mg/L. Este mesmo peptídeo foi capaz de inibir de 39 a 49% do crescimento de isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR nesta mesma concentração. A técnica empregada por Linde et al. difere da empregada no presente trabalho, uma vez que seus ensaios foram realizados pelo método radiométrico BACTECT.

Apesar de não terem provocado uma inibição total no crescimento das micobactérias, os efeitos dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 devem ser

considerados, sendo conveniente avaliar possíveis sinergismos destes peptídeos com outras drogas anti-tuberculose, aproveitando a capacidade destes peptídeos em permeabilizar as membranas das micobactérias, facilitando assim a ação de outras drogas. Deve ser enfatizada a grande dificuldade de permeabilização da parede das micobactérias, muito ricas em lipídeos e bastante compactas, o que garante às micobactérias a capacidade de sobreviver e se multiplicarem no interior de células fagocíticas bem como resistirem à inserção de moléculas de medicamentos (Linde et al.,2001). O presente estudo, além de fornecer dados sobre a ação de peptídeos antimicrobianos sobre isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes às drogas usadas no tratamento da tuberculose, fornece também mais subsídios para a utilização de uma metodologia que emprega o indicador de viabilidade celular (MTT) para determinação da CIM em microplacas, visto que a metodologia clássica ou padrão-ouro, o Método das Proporções em meio sólido Lowenstein-Jensen, assim também como alguns sistemas automatizados e semi-automatizados, têm um custo mais elevado e execução mais difícil. Corroborando com os resultados obtidos por Ribeiro et al. (2004), pode-se atestar que esta metodologia de determinação da CIM em microplacas pode se constituir em uma alternativa rápida e de fácil execução para testes de sensibilidade frente a cepas de *M. tuberculosis*. Leite et al. (2000) já havia comparado a técnica de microdiluição em caldo com o método padrão-ouro das proporções em testes com *M. tuberculosis*, demonstrando excelentes sensibilidade e especificidade entre eles.

A tabela 8 sintetiza os valores (em porcentagem) de inibição dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre o crescimento dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* H37Ra e *M. tuberculosis* MDR. Os valores das CIMs estão expressos em μM . Entre parênteses estão expressos os valores (em porcentagem) de inibição do crescimento da cepa de micobactéria na maior concentração testada.

Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Ha1_1996 e Ha1_1883 sobre *M. tuberculosis* H37Ra e MDR.

	H37Ra	MDR
	CIM (μM)	
Ha1_1996	>64 (80%)	>64 (69,97%)
Ha1_1883	> 64 (74%)	>64 (44,37%)

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, dois análogos da Hylina a1 foram propostos e sintetizados quimicamente. Tais análogos, denominados Ha1_1996 e Ha1_1883, foram avaliados quanto ao seu potencial citolítico frente a diferentes tipos celulares, incluindo bactérias, leveduras e células sanguíneas humanas.

Observou-se que os dois peptídeos produzidos desempenharam atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive frente a cepas multirresistentes, atividade contra leveduras e também frente a micobactérias. Os resultados obtidos nos ensaios hemolíticos mostraram o forte poder de hemólise destes dois peptídeos frente às hemácias de doador saudável O⁺, e nos experimentos de citometria ficaram demonstradas também as atividades líticas destes peptídeos frente aos leucócitos. Algumas considerações devem ser feitas em relação às substituições de resíduos de aminoácidos nas faces polares e apolares dos dois análogos. A substituição do resíduo de prolina na face polar da Hylina a1 pode ter gerado DGR DQIORJRV FRP PDLRU SURS-HCVRQ que FRQIRU pode ter contribuído para a acentuada atividade hemolítica destes dois análogos quando comparados ao seu protótipo, a Hylina a1. A presença dos resíduos não polares nas posições 12 (Alanina por Glicina) e 16 (Leucina por Lisina) na face hidrofóbica do análogo Ha1_1996 leva a uma redução da hidrofobicidade desta face, quando comparada à face hidrofóbica vista no análogo Ha1_1883. A maior hidrofobicidade do análogo Ha1_1883 justifica não apenas seu maior tempo de retenção em RP-HPLC, como também seus acentuados efeitos hemolíticos e líticos sobre leucócitos humanos. Aumentos nos níveis de hidrofobicidade estão muito relacionados a aumentos na citotoxicidade frente a células de mamíferos e bactérias Gram-positivas (Jenssen et al., 2006). Isto foi observado em nossos ensaios, já que o análogo Ha1_1883 apresentou maior efeito hemolítico, efeito citolítico sobre leucócitos e maior atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e MRSA quando comparado ao análogo Ha1_1996. Nossos dados são corroborados por aqueles encontrados por Chen et al. (2005), onde ficou demonstrado que quanto mais hidrofóbico o aminoácido substituinte na face apolar, mais acentuada a atividade hemolítica do peptídeo. Foi também observado por aquele grupo de pesquisadores que aumentos na hidrofobicidade da face polar

levaram à redução na atividade frente a bactérias Gram-positivas, corroborando assim nossos achados em relação ao análogo Ha1_1996, o qual apresenta os resíduos não polares Leucina, Leucina e Isoleucina, respectivamente, nas posições 11, 14 e 18, e como já mencionado acima exibiu menor atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* MRSA que o análogo Ha1_1883 (o qual apresenta um resíduo de glicina na posição 11 e resíduos de lisina nas posições 14 e 18).

Apesar dos resultados não tão favoráveis nos ensaios hemolíticos e de citometria de fluxo, principalmente referentes ao peptídeo Ha1_1883, bem como de determinadas CIMs muito elevadas frente a certas amostras de microrganismos, deve ser levada em consideração a possibilidade destes peptídeos serem usados em sinergismo com outras drogas, possibilitando uma melhor atividade destas. Além disso, há de se considerar que a atividade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos pode ser melhorada através de alguns artifícios, como alguns refinamentos no desenho desses peptídeos, redistribuindo os resíduos positivamente carregados na superfície da região hidrofílica da roda helicoidal, promovendo uma dispersibilidade mais uniforme dos resíduos que garanta um aumento na força de interação entre os peptídeos antimicrobianos e a superfície aniônica dos microrganismos, culminando com a formação de poros de membrana mais estáveis. A regulação paralela dos outros parâmetros estruturais conhecidos também garante uma melhora na atividade destes peptídeos, tanto no que diz respeito à atividade antimicrobiana quanto no que diz respeito à sua atividade tóxica. Problemas relacionados à curta meia-vida plasmática (alguns peptídeos são vulneráveis às enzimas proteolíticas) podem ser superados por modificações específicas como o emprego de D-aminoácidos, em vez de L-aminoácidos, incorporação de fragmentos não protéicos, amidação e acetilação da porção terminal da cadeia peptídica.

Esta tentativa de otimizar a estrutura, e conseqüentemente, a atividade dos peptídeos antimicrobianos, justifica-se pelo fato de que eles vêm se tornando cada vez mais populares como novos compostos farmacêuticos, e passando a ser progressivamente aplicados em pesquisas clínicas. Há evidências de que os peptídeos antimicrobianos sejam menos suscetíveis à resistência bacteriana que os tradicionais antibióticos, podendo então se constituir em uma nova classe de agentes terapêuticos (Hancock & Patrzykat, 2002). Estudos já mostraram que

determinados PAMs apresentam atividade contra patógenos resistentes a antibióticos como penicilina, tetraciclina e vancomicina (Tiozo et al., 1998).

Espera-se com isto que em um futuro próximo eles possam ser aplicados não apenas em laboratórios, pois com o surgimento crescente de cepas de microrganismos cada vez mais resistentes aos antibióticos clássicos, os peptídeos antimicrobianos podem se constituir em uma boa alternativa a estas drogas, além de poderem ser empregados como potenciais produtos para a saúde, tais como antisépticos e desinfetantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreu, D.; Merrifield, R.B.; Steiner, H.; Boman, H.G. Solid-phase synthesis of cecropin A and related peptides Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1983**, 80, 6475-6479.
- Andreu, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. Biopolymers, **1998**, 47, 415-433.
- Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res. **2005**, 36, 697-705.
- Azevedo Calderon, L.; Silva Ade, A.; Ciancaglini, P.; Stábeli, R.G. Antimicrobial peptides from Phyllomedusa frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. Amino Acids, **2011**, 40(1), 29-49.
- Barra, D.; Simmaco, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. Trends Biothechnol., **1995**, 13, 205-209.
- Bessalle, R.; Haas, H.; Gorla, A.; Fridkin, M. Augmentation of antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. Antimicrob. Agents Chemother., **1992**, 36, 313-317.
- Braunstein, A.; Papo, N.; Shai, Y. In vitro activity and potency of an intravenously injected antimicrobial peptide and its DL amino acid analog in mice infected with bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., **2004**, 48, 3127-3129.
- Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology, **2005**, 3, 238-250.
- Castro, M.S.; Cilli, E.M.; Fontes, W. Directed evolution applied to the production of α -helix forming antimicrobial peptide analogues. Curr. Protein Pept. Sci., **2006**, 7: 473-478.
- Castro, M.S.; Ferreira, T.C.G.; Cilli, E.M.; Crusca, E. Jr.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Sebben, A.; Ricart, C.A.O.; Sousa, M.V.; Fontes, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* 3 V S R W W H G Peptides, **2009**, 30, 291-296.
- Chen, Y; Mant, C.T.; Farmer, S.W.; Hancock, R.E.; Vasil, M.L.; Hodges, R.S. 5 D W L R Q D O ' Medical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity / Therapeutic Index*. Biochemistry, **2005**, 280, 12316-12329.
- Clarke, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., **1997**, 72(3),

- 365-379.
- Conlon, J.M.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1696, 1-14.
- Conlon, J.M.; Abraham, B.; Galadari, S.; Knoop, F.C.; Sonnevend, A.; Pál, T. Antimicrobial and cytolytic properties of the frog skin peptide, kassinatuerin-1 and its L- and D-lysine-substituted derivatives. *Peptides*, **2005**, 26, 2104-2110.
- Conlon, J.M.; Al-Ghaferi, N.; Abraham, B.; Leprince, J. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods*, **2007**, 42, 349-357.
- Conlon, J.M.; Iwamuro, S.; King, J.D. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2009**, 1163, 75-82
- Conlon, J.M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2011**, 68(13), 2303-2315.
- Dathe, M.; Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membrane and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1462, 71-87.
- Dathe, M.; Nikolenko, H.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.*, **2001**, 501, 146-150.
- Dennison, S.R.; Whittaker, M.; Harris, F.; Phoenix, D.A. $\$ Q W L F D K L F A$ peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2006**, 7(6), 487-499.
- Devaux, P.F. Static and dynamic asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, **1991**, 30, 1163-1173.
- Dolis, D.; Moreau, C.; Zachowski, C.; Devaux, P.F. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophys. Chem.*, **1997**, 68, 221-231.
- Duval, E.; Zatylny, C.; Laurencin, M.; Baudy-) O R F ¶ K 0 ¶. H Q U \ KKKKPLFGLFFGLF: a cationic peptide designed to exert antibacterial activity. *Peptides*, **2009**, 30, 1608-1612.
- EISENBERG, D. et al. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1984**, 81, 140-144.
- Enoch, D.A.; Ludlam, H.A.; Brown, N.M. Invasive fungal infections: a review of

- epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.*, **2006**, 55, 809-818.
- Enright, M.C.; Robinson, D.A.; Randle, G.; Feil, E.J.; Grundmann, H.; Spratt, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2002**, 99, 7687-7692.
- Ferreira, W. A.; Vasconcelos, W. S.; Ferreira, C.M.; Silva, M.F.P.; Gomes, J.S.; Alecrim, M.G.C. Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilicilina resistentes (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas. *Revista de Patologia Tropical*, **2009**, 38, 83-92.
- Ge, Y.; MacDonald, D.; Henry, M.M. In vitro susceptibility to pexiganan of bacteria isolated from infected diabetic foot ulcers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **1999**; 35, 45-53.
- Giangaspero, A.; Sandri, L.; Tossi, A. α -P S K L S D-WKLF peptides. A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 5589-5600.
- Hancock, R.E.W. Peptide antibiotics. *Lancet*, **1997**, 349, 418-422.
- Hancock, R.E.; Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, **1998**, 16, 82-88.
- Hancock, R.E.W.; Chapple, D.S. Peptides antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.*, **1999**, Jun;43(6), 1317-1323.
- Hancock, R.E.; Patrzykat, A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, **2002**, 2(1), 79-83.
- Hancock, R.E.; Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.*, **2006**, 24(12), 1551-1557.
- Hirsch, E.B.; Tam, V.H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2010**, 65(6), 1119-1125.
- Huang, H.W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*, **2000**, 39, 8347-8352.
- Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 2006, 19, 491-511.
- Jerala R.; Porro M. Endotoxin neutralizing peptides. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**, 4, 1173-1184.
- Kamysz, W. Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics?

- Nuclear Medicine Review, **2005**, 8, 78-86.
- Kavanagh, K.; Dowd, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2004**, 56(3), 285-289.
- Kim, Y.S.; Cha, H.J. Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. *Biotechnol Bioeng.*, **2010**, 107(2), 216-223.
- Klein, E.; Smith, D.L.; Laxminarayan, R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg. Infect. Dis.*, **2007**, 13:1840-1846.
- Komatsuzawa, H.; Ouhara, K.; Kawai, T.; Yamada, S.; Fujiwara, T.; Shiba, H.; Kurihara, H.; Taubman, M.A.; Sugai, M. Susceptibility of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to defensins and potential therapeutic use of defensins in oral diseases. *Curr. Pharm. Des.*, **2007**, 13, 3084-3095.
- Leite, C.Q.; Beretta, A.L.; Anno, I.S.; Telles, M.A. Standardization of broth microdilution method for *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2000**, 95(1), 127-129.
- Leite, J.R.; Silva, L.P.; Rodrigues, M.I.; Prates, M.V.; Brand, G.D.; Lacava, B.M.; Azevedo, R.B.; Bocca, A.L.; Albuquerque, S.; Bloch, C. Jr. Phylloseptins: a novel class of antibacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*, **2005**, 26, 565-573.
- Linde, C.M.A.; Hoffner, S.E.; Refai, E.; Andersson, M. In vitro activity of PR-39, a proline-arginine rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2001**, 47(5), 575-580.
- Livermore, D.M. The need for new antibiotics. *Clin. Microbiol. Infect.*, **2004**, 10, 1-9.
- Lohner, K.; Prenner, E.J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimic systems. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1462, 141-156.
- Lohner, K. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In: Lohner, K. (ed.), *Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies*, **2001**, Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, UK, pp.149-165.
- Lu, C.X.; Nan, K.J.; Lei, Y. Agents from amphibians with anticancer properties. *Anticancer Drugs*, **2008**, 19(10), 931-939.
- Mangoni, M.L.; Rinaldi, A.C.; Di Giulio, A.; Mignogna, G.; Bozzi, A.; Barra, D.;

- Simmaco, M. Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 1447-1454.
- Mangoni, M.L.; Papo, N.; Saugar, J.M.; Barra, D.; Shai, Y.; Simmaco, M.; Rivas, L. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. *Biochemistry*, **2006**, 45, 4266-4276.
- Mangoni, M.L. Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2006**, 63(9), 1060-1069.
- Mannis, M.J. The use of antimicrobial peptides in ophthalmology: an experimental study in corneal preservation and the management of bacterial keratitis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, **2002**, 100, 243-271.
- Marr, A.K.; Gooderham, W.J.; Hancock, R.E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2006**, 6(5), 468-472.
- Matsuzaki, K.; Harada, M.; Funakoshi, S.; Fujii, N.; Miyajima, M. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1063, 162-170.
- Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Fujii, N.; Miyajima, K. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, **1995**, 34(10), 3423-3429.
- Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, **1996**, 35(35), 11361-11368.
- Matsuzaki, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1376, 391-400.
- Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and Tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1462, 1-10.
- Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Miyajima, K. Interactions of an antimicrobial peptide, Magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett.*, **1999**, 449, 221-224.
- Matsuzaki, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, 1788, 1687-1692.
- Meiller, T.F.; Hube, B.; Schild, L.; Shirliff, M.E.; Scheper, M.A.; Winkler, R.; Ton, A.; Jabra-Rizk, M.A. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*:

- proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One*, **2009**, 4(4), e5039.
- Nascimento, A.C.C.; Fontes, W.; Sebben, A.; Castro, M.S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept. Lett.*, **2003**, 10(3), 227-238.
- Nübel, U.; Roumagnac, P.; Feldkamp, M.; Song, J.H.; Ko, K.S.; Huang, Y.C.; Coombs, G.; Ip, M.; Westh, H.; Skov, R.; Struelens, M.J.; Goering, R.V.; Strommenger, B.; Weller, A.; Witte, W.; Achtman, M. Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**, 105(37), 14130-14135.
- Oren, Z.; Hong, J.; Shai, Y. A repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 14643-14649.
- Oren, Z.; Hong, J.; Shai, Y. A comparative study on the structure and function of a cytolytic alpha-helical peptide and its antimicrobial beta-sheet diastereomer. *Eur. J. Biochem.*, **1999**, 259, 260-369.
- Park, C.B., Kim, H.S. and Kim, S.C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, 244, 253-257.
- Park, S.-C.; Park, Y.; Hahm, K.-S. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, **2011**, 12, 5971-5992.
- Peters, B.M.; Shirliff, M.E.; Jabra-Rizk, M.A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS pathogens*, **2010**, 6, e1001067.
- Pathak, N.; Salas-Auvert, R.; Ruche, G.; Janna, M.H.; McCarthy, D.; Harrison, R.G. Comparison of the effects of hydrophobicity, amphiphilicity and alpha-helicity on the activities of antimicrobial peptides. *Proteins*, **1995**, 22, 182-186.
- Penberthy, W.T.; Chari, S.; Cole, A.L.; Cole, A.M. Retrocyclins and their activity against HIV-1. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2011**, 68, 2231-2242.
- Prates, M.V.; Sforça, M.L.; Regis, W.C.; Leite, J.R.; Silva, L.P.; Pertinhez, T.A.; Araújo, A.L.; Azevedo, R.B.; Spisni, A.; Bloch, C. Jr. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279(13), 13018-13026.
- Pukala, T.L.; Bowie, J.H.; Maselli, V.M.; Musgrave, I.F.; Tyler, M.J. Host-defense peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Nat.*

- Prod. Rep., **2006**, 23, 368-393.
- Queenan, A.M.; Bush, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin. Microbiol. Rev., **2007**, 20, 440-458.
- Rana, F.R.; Macias, E.A.; Sultany, C.M.; Modzrakowski, M.C.; Blazyk, J. Interactions between magainin 2 and *Salmonella typhimurium* outer membranes: effect of lipopolysaccharide structure. Biochemistry, **1991**, 30, 5858-5866.
- Reddy, K.V.R.; Yedery, R.D.; Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. Int. J. Antimicrob. Agents., **2004**, 24(6), 536-547.
- Resnick, N.M.; Maloy, W.L.; Guy, H.R.; Zasloff, M. A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes alpha-helical secondary structure. Cell, **1991**, 66, 541-554.
- Ribeiro, M.O.; Silva, M.G.; Senna, S.G.; Rossetti, M.L.; Fonseca, L.S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. Jornal Brasileiro de Pneumologia, **2004**, 30, 223-228.
- Rice, L.B. Emergence of vancomycin-resistant Enterococci. Emerging Infectious Diseases, **2001**, 7, 183-187.
- Rinaldi, A.C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. Curr. Opin. Chem. Biol., **2002**, 6(6), 799-804.
- Rossi, F.; Andreazzi, D.B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. **2005**, São Paulo: Ed. Atheneu.
- Senior, B.W. Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzymes formed by diverse strains of *Proteus* species. J. Med. Microbiol., **1999**, 48, 623-628.
- Silvestro, L.; Gupta, K.; Weiser, J.N.; Axelsen, P.H. The concentration-dependent membrane activity of cecropin A. Biochemistry, **1997**, 36, 11452-11460.
- Song, Y.M.; Yang, S.T.; Lim, S.S.; Kim, Y.; Hahn, K.S.; Kim, J.I.; Shin, S.Y. Effects of L- or D-Pro incorporation into hydrophobic or hydrophilic helix face of D P S K L S D-NH₂ model peptide on structure and cell selectivity. Biochem. Biophys. Res. Commun., **2004**, 314(2), 615-621.
- Srinivasan, A.; Patel, J.B. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound of cure. Infect. Control Hosp. Epidemiol., **2008**, 29: 1107-1109.

- Tavares, W. Problem Gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **2000**, 33, 281-301.
- Tiozzo, E.; Rocco, G.; Tossi, A.; Romeo, D. Wide-spectrum antibiotic activity of synthetic, amphipathic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, 249, 202 ±206.
- Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **2000**, 55, 4 ±30.
- Treitman, A.N.; Yarnold, P.R.; Warren, J.; Noskin, G.A. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among Hospital Isolates (1993 to 2002). *J. Clin. Microbiol.*, **2005**, 43, 462 ±463.
- Uematsu, N.; Matsuzaki, K. Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophys. J.*, **2000**, 79, 2075 ±083.
- Utsugi, T.; Schoit, A.J.; Connor, J.; Bucana, C.D.; Fidler, I.J. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.*, **1991**, 51, 3062-3066.
- Vandenesch, F.; Naimi, T.; Enright, M.C.; Lina, G.; Nimmo, G.R.; Heffernan, H.; Liassine, N.; Bes, M.; Greenland, T.; Reverdy, M.E.; Etienne, J. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases*, **2003**, 9(8), 978- 984.
- Villegas, M.V.; Lolans, K.; Correa, A.; Kattan, J.N.; Lopez, J.A.; Quinn, J.P.; the Colombian Nosocomial Resistance Study Group First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 51, 1553 ±555.
- Willems, R.J.L.; Top, J.; Van Santen, M.; Robinson, D.A.; Coque, T.M.; Baquero, F.; Grundmann, H.; Bonten, M.J.M. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.*, **2005**, 11(6), 821-828.
- Welling, M.M.; Paulusma-Annema, A.; Balter, H.S.; Pauwels, E.K.; Nibbering, P.H. Technetium-99m labelled antimicrobial peptides discriminate between bacterial infections and sterile inflammations. *Eur. J. Nucl. Med.*, **2000**, 27, 292 ±301.
- Wieprecht, T.; Dathe, M.; Beyermann, M.; Krause, E.; Maoly, W.L.; MacDonald, D.L;

- Bienert, M. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. *Biochemistry*, **1997**, 36, 6124-6132.
- Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, **2003**, 55, 27-55.
- Yedery, R.D.; Reddy, K.V. Antimicrobial peptides as microbicidal contraceptives: prophecies for prophylactics--a mini review. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care*, **2005**, 10, 32-42.
- Yeung, A.T.; Gellatly, S.L.; Hancock, R.E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2011**, 68(13), 2161-2176.
- Zhang, L.; Benz, R.; Hancock, R.E. Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry*, **1999**, 38, 8102-8111.
- Zhao, H. Mode of action of antimicrobial peptides. Academic Dissertation, **2003**, Helsinki Biophysics and Biomembrane Group, Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland.
- Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1987**, 84, 5449-5453.
- Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **2002**, 415, 389-395.
- Zerbini, E.; Andreu, D.; Tonarelli, G.; Sequeira, M.D. Sensibilidad in vitro de micobacterias a dos péptidos sintéticos híbridos con actividad antimicrobiana. *Revista Argentina de Microbiología*, **2006**, 38, 221-223.