



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Atividade *in vitro* e *in vivo* dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP
1.9 derivados de *Pleuronectes americanus* contra *Klebsiella
pneumoniae* ATCC 13883**

MARIANA DORNELLES CHEROBIM

BRASÍLIA – DF
2014

MARIANA DORNELLES CHEROBIM

Atividade *in vitro* e *in vivo* dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 derivados de *Pleuronectes americanus* contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

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

Orientadora:

Profa. Dra. Simoni Campos Dias

Co-orientador:

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

BRASÍLIA – DF
2014

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo e grande companheiro Rafael, e aos meus amados pais Mauro e Cecília, que me apoiaram e me deram suporte, sempre e em todos os momentos que precisei. Vocês, sem dúvida, foram o diferencial desta conquista.

Amo demais vocês.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por me dar força, discernimento e coragem para atingir minhas metas e objetivos.
- Ao meu irmão Lucas Dornelles, por sua amizade e carinho.
- À minha orientadora, Profa. Dra. Simoni Campos Dias, que me acolheu e conduziu durante esse trajeto, com toda inteligência e bom humor que lhe são peculiares. Obrigada por ter sido sempre solícita em todas as vezes que recorri a você, e obrigada, sobretudo, por ter confiado em mim.
- Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, por ter sido exemplo durante toda a minha jornada, do que é ser um cientista brilhante.
- Às minhas amigas Amanda Saúde e Alícia Ombredane, por seu apoio incondicional, amizade sincera e braço forte sempre que precisei, vocês sabem o que significam para mim. Obrigada por tudo.
- Àqueles que me ajudaram, me ensinando técnicas que eu não dominava, Stella, Mirna, Profa Taia, Suzana, Marlon e Profa. Susana Moreno, sem vocês eu não teria chegado até aqui.
- Aos amigos do laboratório de bioquímica, em especial à Michele Flaviane e Thais Bergamin, obrigada por todas as vezes que me deram suporte.
- A todos aqueles que depositaram em mim confiança e contribuíram com esta minha vitoriosa caminhada pessoal e profissional, obrigada. Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros dos gigantes.
- À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, do qual fiz parte durante o mestrado.
- À Universidade Católica de Brasília, particularmente ao Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, que me emprestaram suas instalações para a realização de todos os experimentos.
- Às instituições de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Abordagem Geral Sobre Antibióticos.....	12
1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> : Um Patógeno a Ser Controlado	15
1.3. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos.....	18
1.4. Peptídeos Antimicrobianos Derivados de Peixes.....	21
1.5 Peptídeos Antimicrobianos: Uma Estratégia Alternativa no Controle de Patógenos.....	22
1.6 Determinantes Estruturais Para a Atividade Biológica dos PAMs e Desenho Racional de Peptídeos.....	29
1.7 A História dos Peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9.....	36
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVO GERAL	40
3.1 Objetivos Especificos.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Bactéria	41
4.2 Compostos Antimicrobianos	41
4.3 Análises de Massa Molecular	41
4.4 Quantificação de Peptídeos	41
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	42
4.6 Avaliação do Efeito Combinado dos Peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9	42
4.7. Preparação do Inóculo Bacteriano para ensaios <i>in vivo</i>	44
4.8. Avaliação da Viabilidade Celular	44
4.9 Modelo Animal de Pneumonia.....	45
4.10 Modelagem Molecular	46
4.11 Estudo das Interações Peptídeo Membranas (<i>Molecular Docking</i>).....	46
4.12 Análise Estatística dos Dados	47
5. RESULTADOS	48

5.1 Confirmação da Pureza dos Análogos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 por Espectrometria de Massa	48
5.2 Determinação da Concentração e Cálculo dos CIMs dos Peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 Contra <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
5.3 Avaliação do Efeito Antimicrobiano dos Peptídeos Combinados	51
5.4 Avaliação da Viabilidade Celular (MTT).....	53
5.5. Ensaio <i>in vivo</i> : Modelo Animal de Pneumonia	55
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema representativo dos principais mecanismos de ação dos antibióticos ----- 14
- Figura 2:** (Esquerda) Resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* e resistência às cefalosporinas de 3ª geração em *Klebsiella pneumoniae*, na Europa em 2011.-----21
- Figura 3.** Classificação dos PAMs sugerida por Lai & Gallo (2009). Baseada na composição de seus resíduos de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais. (1) Magainina, peptídeo com estrutura α -hélice; (2) β -Defensina humana, peptídeo com estrutura folha- β estabilizada por pontes dissulfeto; (3) Indolicidina, peptídeo de estrutura estendida; (4) Bactenecina, peptídeo com pontes dissulfeto formando estruturas em loop -----25
- Figura 4:** Modo de interação das PAMs com as membranas celulares ----- 27
- Figura 5.** Interrelação entre determinantes estruturais em PAM's. A atividade e a seletividade de peptídeos em membranas fosfolipídicas se originam de vários parâmetros físico-químicos interdependentes como carga (cationicidade), conformação (α -hélice), anfipaticidade e hidrofobicidade. ----- 31
- Figura 6:** Representação do ensaio para medir o efeito antimicrobiano dos peptídeos em combinação em diferentes concentrações. A primeira concentração é referente ao peptídeo Pa-MAP 1.5 e a segunda concentração se refere ao peptídeo Pa-MAP 1.9----- 44
- Figura 7.** Perfil de purificação do peptídeo sintético Pa-MAP 1.5, com [M+H]⁺ igual a 2540 Da purificado por RP-HPLC em coluna de fase reversa C18. -----48
- Figura 8.** Perfil de purificação do peptídeo sintético Pa-MAP 1.9, com [M+H]⁺ igual a 2668,67 Da purificado por RP-HPLC em coluna de fase reversa C18. ----- 49
- Figura 9.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* pelos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 -----50
- Figura 10.** Porcentagem de crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* pelo peptídeo Pa-MAP 1.5 ao longo de onze horas----- 51
- Figura 11.** Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* pelos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9-----51
- Figura 12.** Porcentagem de células Raw 264.7 viáveis após 24 horas (A) e 72 horas (B) de incubação na presença de antígeno e de Interferon- γ . As concentrações utilizadas no experimento foram as mesmas encontradas como concentração inibitória mínima para cada peptídeo ----- 54
- Figura 13.** Efeito antimicrobiano do peptídeo Pa-MAP 1,5 em camundongos inoculados com *Klebsiella pneumoniae*. Para avaliar o efeito de diferentes doses (36, 18 e 9mg.Kg⁻¹ i.v) do peptídeo Pa-MAP 1.5. ----- 56

Figura 14. Efeito antimicrobiano do peptídeo Pa-MAP 1.9 em camundongos inoculados com *Klebsiella pneumoniae*. Para avaliar o efeito de diferentes doses (1, 2 e 4mg.Kg⁻¹ i.v) do peptídeo Pa-MAP 1.9 -----57

Figura 15. Efeito antimicrobiano da associação dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 em camundongos inoculados com *Klebsiella pneumoniae*. Para avaliar o efeito da associação dos peptídeos Pa-MAP 1.5/ Pa-MAP 1.9 (36/4, 18/2, 9/1mg.Kg⁻¹ i.v) -----59

Figura 16: (A) Estrutura tridimensional predita para o peptídeo multifuncional Pa-MAP 1.5. Em creme: resíduos apolares; em laranja: resíduos básicos (carregados positivamente). (B) Mapa de Ramachandran, usado como um dos critérios para a validação do modelo final de Pa-MAP 1.5. (C) Alinhamento múltiplo entre o molde e o peptídeo alvo em estudo. -----61

Figura 17: (A) Estrutura tridimensional predita para o peptídeo multifuncional Pa-MAP 1.9. Em branco: resíduos apolares; em rosa: resíduos polares neutros; em ciano: resíduos básicos (carregados positivamente). (B) Mapa de Ramachandran, usado como um dos critérios para a validação do modelo final de Pa-MAP 1.9. (C) Alinhamento múltiplo entre o molde e o peptídeo alvo em estudo.-----62

Figura 18: Visualização da superfície dos peptídeos (A e B), imagem em *Stick*, em destaque os resíduos envolvidos em interações (C e D).-----64

Figura 19: Modelo teórico tridimensional da interação entre os peptídeos e a membrana mimética. -----65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de aminoácidos, CIM e massas moleculares dos peptídeos de primeira e segunda geração derivados de *Pleuronectes americanus*.-----37

Tabela 2. Avaliação sinérgica da combinação entre Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9-----51

Tabela 3: Comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos peptídeos Pa-MAP 1.5 com Pa-MAP 1.9 contra *Klebsiella pneumoniae* quando separados e combinados-----52

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American type culture collection
ASA	Área de acessibilidade ao solvente
Blastp	Basic Local Alignment Search Tool protein
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMF	N,N-dimetilformamida
EDT	1,2-etaneditiol;
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Kcal	Kilocalorias
MALDI-ToF	matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
Mm	Massa molecular
NCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<i>Pa</i> -MAP	<i>Pleuronectes americanus</i> - Peptídeo com Múltiplas Atividades
PDB	Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank)
RMSD	Desvio médio da raiz quadrada
SD	Desvio padrão da média
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
UFC	Unidade formadora de colônia
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
VRE	enterococco resistente à vancomicina

RESUMO

CHEROBIM, Mariana. **Atividade *in vitro* e *in vivo* dos peptídeos Pa-MAP 1.5 E Pa-MAP 1.9 derivados de *Pleuronectes americanus* contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.** 2014, Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

Peptídeos antimicrobianos (PAM) são componentes do sistema imune inato da maioria dos seres vivos. Estas moléculas vêm despertando um crescente interesse como alternativas aos antibióticos clássicos, uma vez que podem apresentar atividade antimicrobiana potente contra um amplo espectro de microrganismos, inclusive contra microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis. Por mais dinâmica que sejam as indústrias farmacêuticas na busca por novos fármacos, é praticamente impossível o mercado farmacêutico acompanhar o espantoso fenômeno da multirresistência apresentada por muitos microrganismos. Neste contexto, os PAMs surgem como uma alternativa farmacológica, pois podem ser usados isoladamente ou combinados entre si ou com outros antibióticos clássicos. Neste estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana de dois peptídeos sintéticos e análogos denominados Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, derivados de um peptídeo do peixe *Pleuronectes americanus*. Os dois análogos tiveram sua homogeneidade e grau de pureza analisados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF e posteriormente foram submetidos a ensaios antimicrobianos, isoladamente e em combinação, contra a bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* e avaliados também, com relação à sua atividade citotóxica. Os resultados *in vitro* evidenciaram uma forte atividade sinérgica com CIM de $4/4\mu\text{g.ml}^{-1}$, dos peptídeos, sendo que esta concentração não se mostrou citotóxica. Resultados dos testes *In vivo*, mostraram que a combinação de peptídeos foi eficiente, sendo observado um decréscimo notável de UFCs de *K. pneumoniae* no sangue bem como nos pulmões, de camundongos Black C57/bl6. Os animais foram tratados com os peptídeos combinados, inoculados por via intravenosa, utilizando concentrações de 36 mg.Kg^{-1} , 18mg.Kg^{-1} e 9mg.Kg^{-1} para o peptídeo Pa-MAP 1.5; e para o peptídeo Pa-MAP 1.9 as doses utilizadas foram de 4mg.Kg^{-1} , 2mg.Kg^{-1} e 1mg.Kg^{-1} . Com o objetivo de entender como ocorre o acoplamento e a interação destes peptídeos, foram propostos modelos tridimensionais *in silico* através de modelagem molecular. Resultados das modelagens *in silico* sugerem uma estrutura em α -hélice anfipática, para ambos os peptídeos. Quando se realizou o acoplamento molecular dos peptídeos com uma membrana aniônica, os peptídeos conjugados

apresentaram uma alta taxa de afinidade, corroborando assim com os resultados experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, *Klebsiella pneumoniae* Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

CHEROBIM, Mariana. **Activity *in vitro* and *in vivo* of peptides Pa-MAP 1.5 and Pa-MAP 1.9 from *Pleuronectes americanus* against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.** 2014, Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

Antimicrobial peptides (AMPs) are innate immune system components, which are present in several living organisms. This molecules interesting is growing as an alternative for traditional antibiotics due to their potent antimicrobial activities against a broad range of microorganisms including those resistant to classical antibiotics. In spite of pharmaceutical companies dynamism for new drugs discovery, have been virtually impossible to pharmaceutical market to keep up the amazing multidrug resistance phenom shown by many microorganisms. By this way, antimicrobial peptides stand out as promising pharmacological alternatives, since they can be used alone or in combination to classic antibiotic. In this view, the present study characterized the activity of two synthetic analogues, named Pa-MAP 1.5 and Pa-MAP 1.9 from *Pleuronectes americanus* fish. Both analogs had the homogeinity and purity degree checked by MALDI-ToF mass spectrometry. Moreover, peptides were assayed according their antibacterial activity, alone and in combination against Gram-negative *Klebsiella pneumonia* as well as their hemolytic activity. Data *in vitro* assay demonstrate a strong synergistic activity between peptides, with MIC of $4/4\mu\text{g.ml}^{-1}$. Nevertheless at this concentration they did not showed cytolytic effects. The *in vivo* results showed that peptides combination were capable to pronounced decrease *K. pneumoniae*'s UFCs in blood count, as well in black C57/bl6 mouse's lung. The animals were treated with the combined peptides via intravenously using concentrations of 36 mg.Kg^{-1} , 18 mg.Kg^{-1} and 9 mg.Kg^{-1} for Pa-MAP 1.5; and 4mg.Kg^{-1} , 2mg.Kg^{-1} e 1mg.Kg^{-1} for Pa-MAP 1.9. In order to understand these peptides interact *in silico* three-dimensional models were constructed by molecular modeling. Results of *in silico* modeling suggest amphipathic α -helical structures for both peptides. When molecular peptide docking was performed with anionic membranes, conjugated peptides showed high affinity rates, thus corroborating with *in vitro* and *in vivo* data presented.

Keywords: Antimicrobial peptides, *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Abordagem Geral Sobre Antibióticos

Alexander Fleming, em 1928, descobriu o primeiro antibiótico comercializado da história da humanidade: a penicilina. A partir desta descoberta abriram-se as portas de um novo mundo, com o surgimento de uma grande indústria que passou a se dedicar à produção deste e de outros antibióticos responsáveis pela possibilidade de vida com qualidade para pessoas que sofriam com doenças infecciosas, como a tuberculose, a pneumonia, a meningite, a sífilis, e outras infecções microbianas (Bourque, 2009). Apesar desta descoberta, a penicilina começou a ser utilizada em humanos na década de 40, em decorrência do evento da segunda Guerra Mundial. Inicialmente, apenas as forças armadas eram autorizadas a utilizar os poucos antibióticos disponíveis (penicilina e sulfonamidas). Porém, com o aumento da produção e desenvolvimento de novas classes de antibióticos, o acesso a esses medicamentos foi consideravelmente facilitado, a ponto de serem usados para qualquer tipo de infecção, inclusive as de origem não bacteriana (Berdy, 2012). O uso deste e de outros antibióticos segue uma curva crescente, de uso e descobrimento. De 1928 até hoje, os cientistas descobriram e desenvolveram 19 classes de antibióticos, levando ao tratamento e cura de milhares de tipos de infecções e salvando mais de 200 milhões de vidas (IFPMA, 2011). Quando se analisa as principais causas de doenças ao longo da história da humanidade, o número de infecções comparadas a outras doenças é alarmante, sendo a quarta principal causa de morte. Com a introdução dos antibióticos, esta situação foi razoavelmente controlada por um tempo. Contudo, os microrganismos vêm desenvolvendo mecanismos de resistência que têm ultrapassado os avanços alcançados no tratamento de infecções (Nikolaidis et al., 2013).

Os antibióticos diferem uns dos outros nas suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas, assim como no espectro e mecanismos de ação (Goodman & Gilman's, 2008; Katzung, 2007). Os antibióticos podem apresentar duas funções distintas: a destruição de uma população bacteriana por uma ação bactericida, e a inibição do crescimento bacteriano através da ação bacteriostática (Noga et al., 2011). A ação bacteriostática impede a multiplicação das mesmas, mantendo-as na fase estacionária, sendo que os bactericidas atuam em processos vitais para a célula, levando à morte celular (Lewis, 2013). Os antibióticos podem ser separados e definidos por características diversas, como: sua capacidade de alcançar rapidamente o alvo, ser seletivo e específico, baixo nível tóxico e elevados níveis terapêuticos, ação individualizada de modo a não afetar o meio ambiente quando descartado, apresentar baixo índice de reações adversas associadas, seja por reação alérgica ou toxicidade intrínseca, várias vias de administração, tais como, oral (VO), intravenosa (IV) e intramuscular (IM) (Berdy, 2012).

A classificação mais comum dos antibióticos baseia-se no seu mecanismo de ação. De acordo com Brogden e Brogden (2011), são descritos cinco mecanismos de ação: inibição da síntese da parede celular; inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática; inibição da síntese proteica nos ribossomos; alterações na síntese dos ácidos nucleicos; alteração de metabolismos celulares, tal como representado na figura 1:

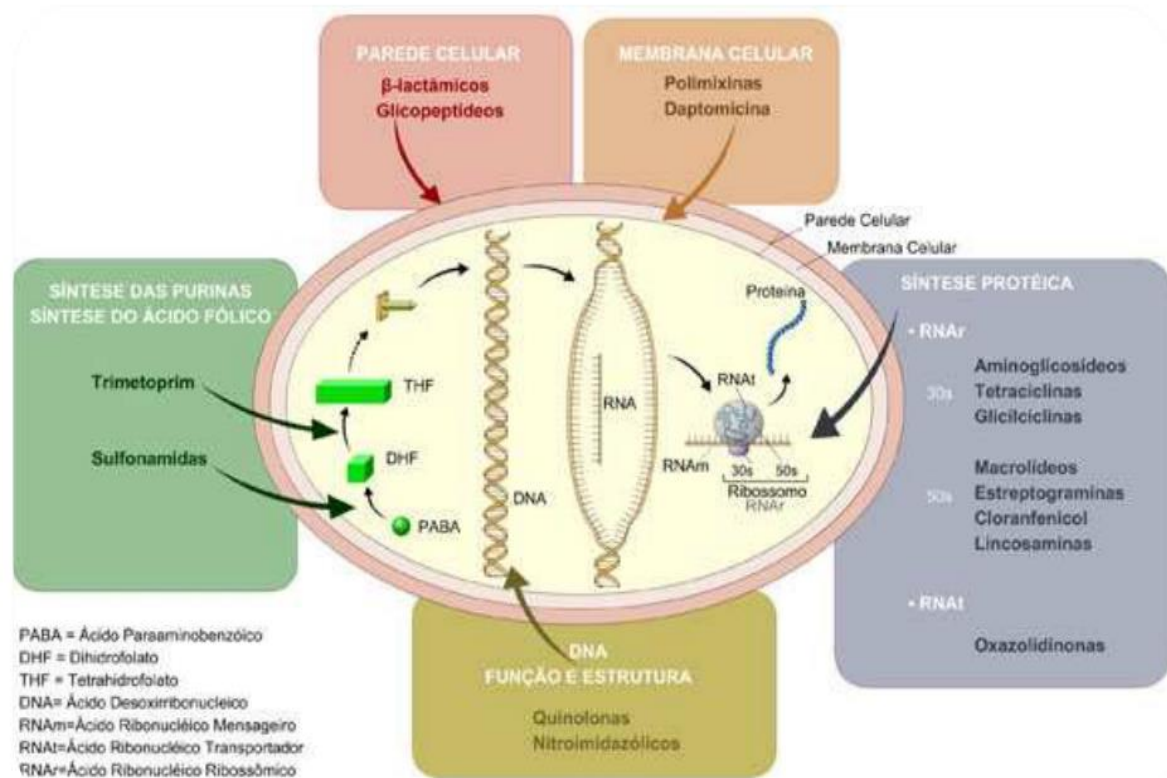


Figura 1: Esquema representativo dos principais mecanismos de ação dos antibióticos (ANVISA, 2007).

A sobrevivência das bactérias está diretamente relacionada com a manutenção da integridade de sua parede celular. A parede celular das bactérias é constituída por uma estrutura entrelaçada que confere certo grau de flexibilidade devido ao seu principal constituinte, o peptideoglicano. A penicilina e outros antibióticos representantes desta classe como, as cefalosporinas, os carbapenemes e os monolactâmicos, impedem a síntese completa do peptideoglicano e por consequência enfraquecem a parede celular, fazendo com que a célula bacteriana sofra lise. A baixa toxicidade dessa classe de antibióticos se deve ao fato de que as células de mamíferos não apresenta parede celular constituídas de peptideoglicanos (Dathe et al., 2001).

Existem ainda aqueles antibióticos que são capazes de desordenar a membrana plasmática, podendo ser agentes aniônicos, catiônicos ou neutros. Dois exemplos bem conhecidos são as polimixinas C e E, que possuem grupos lipofóbicos que interagem com o polissacarídeo da membrana, alterando sua permeabilidade, e a entrada de água na célula causando a morte da bactéria (Al-Mariri and Safi, 2014; Baysari et al., 2013).

Os antibióticos como os aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, anfenicóis, macrólitos, lincosamida e oxazolinidonas agem ligando-se às duas subunidades de 30s e 50s dos ribossomos de forma que inibem ou modificam a síntese proteica (Carvalho et al., 2013). Os antibióticos que interferem na síntese de ácidos nucleicos são as fluoroquinolonas e a rifampicina. Esses antimicrobianos se ligam à RNA polimerase dependente de DNA e inibem a iniciação da síntese de RNA, ou à subunidade A do DNA girase impedindo o superenovelamento do DNA, e consequente função do mesmo (Cui and Zhou, 2014). Existem ainda os antibióticos que alteram o metabolismo celular, nesse caso mais especificamente a síntese de ácido fólico. As sulfonamidas são inibidores competitivos da diidropteroato-sintase, uma enzima responsável pela integração do ácido paraminobenzóico (PABA) no ácido diidropteróico, precursor imediato do ácido fólico (Shah, 2013; Soraas et al., 2014).

Atualmente, as grandes indústrias farmacêuticas têm investido menos na busca por novos compostos antimicrobianos, pois os antibióticos comercializados atualmente são capazes de controlar a maior parte das infecções a baixo custo e também porque concluíram que os fármacos contra doenças crônicas oferecem uma possibilidade maior de lucro. Houve, portanto, da descoberta dos primeiros antibióticos até hoje, uma redução dramática na identificação de novos agentes antibióticos. Simultaneamente ocorre também um aumento na incidência de resistência bacteriana, provocada primordialmente pelo uso indiscriminado destes fármacos (Livermore, 2012).

1.2 *Klebsiella pneumoniae*: Um Patógeno a Ser Controlado

K. pneumoniae é um bacilo Gram-negativo, membro da família Enterobacteriaceae, encontrado em locais como água, solo, plantas e esgoto (Brisse et al., 2009). Sua colonização em seres humanos provavelmente ocorre por contato com as diversas fontes ambientais e este pode ser encontrado colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis. Entretanto, no organismo de pessoas imunocomprometidas, esta bactéria encontra um ambiente propício para seu crescimento, levando aos quadros de infecção (March et al., 2013; Shon et al., 2013).

As razões pelas quais este microrganismo pode ser tão patogênico está intimamente ligado aos aspectos morfológicos e moleculares da bactéria, como por exemplo os fatores de virulência capsulares e lipopolissacarídeos, que são componentes utilizados para sorotipagem de *K. pneumoniae*, sendo o tipo K relacionado a estrutura da cápsula e o tipo O, baseado na estrutura específica de lipopolissacarídeos. A bactéria KPC apresenta sua membrana constituída pelo lipopolissacarídeo que, devido à variação na sua estrutura, confere uma grande diversidade sorológica de antígenos O (Lavigne et al., 2013). Já a cápsula apresenta componentes de constituição polissacarídica capaz de proteger *K. pneumoniae* da fagocitose, além de prevenir a morte dessa bactéria por componentes antibacterianos presentes no soro. De acordo com a composição desses polissacarídeos, *K. pneumoniae* pode ser classificada em mais 70 antígenos sorológicos K, sendo o K1 e K2, os mais virulentos (Giamarellou et al., 2013; Mosca et al., 2013).

A bactéria *K. pneumoniae* vem se mostrando um patógeno de grande importância nas infecções hospitalares, resistente a um número expressivo de antimicrobianos. Segundo dados do Ministério da Saúde, no Distrito Federal foram feitas 187 notificações de infecção por *K. pneumoniae* no ano de 2010, sendo registrados 18 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010). O surgimento de cepas de *K. pneumoniae* produtoras da enzima carbapenemase (KPC), capazes de hidrolisar antibióticos carbapenêmicos e conferir multirresistência tornou essa bactéria um dos grandes desafios no desenvolvimento de novos fármacos (Hirsh & Tam, 2010).

Este microrganismo pode expressar resistência a até 95% dos antimicrobianos existentes no mercado farmacêutico como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas, devido em grande parte ao fato de cepas desta bactéria serem produtoras de uma enzima denominada beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), enzima essa que confere resistência a antimicrobianos de importância clínica (BRADFORD, 2004). A maior parte das ocorrências de infecção por *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) afetam pacientes imunodeprimidos hospitalizados e/ou com dispositivos invasivos como cateter, sonda, pulsão venosa periférica ou outra situação que facilita o acesso da bactéria ao paciente (Pontikis et al., 2013). Uma das portas

mais importantes para a entrada de microrganismos no corpo humano é o pulmão, por estar em constante contato com a atmosfera, expondo as vias aéreas às diversas bactérias. Também como consequência dessa exposição pode ocorrer a entrada de microrganismos patogênicos e virulentos, que podem gerar infecções graves e até mesmo fatais. Uma das formas do pulmão se proteger contra a invasão de patógenos são as barreiras físicas das vias respiratórias como o muco produzido nas cavidades nasais ou no próprio pulmão, que envolvem as partículas ou microrganismos estranhos. Posteriormente, o próprio corpo expulsa estes microrganismos das vias respiratórias por movimentos ritmados das células ciliares. Outra forma de se conter a entrada e estabelecimento dos microrganismos é o sistema imune inato, que inclui mediadores solúveis constitutivos ou induzidos, que lizam, opsonizam ou recrutam células inflamatórias para eliminar o patógeno (Boyton and Openshaw, 2002).

Bactérias como a *K. pneumoniae* podem ultrapassar as barreiras impostas pelas defesas das vias respiratórias, causando no hospedeiro um quadro de infecção pulmonar. Entre os muitos tipos de infecções pulmonares, uma das mais graves é a pneumonia. A pneumonia causa injúrias ao tecido epitelial pulmonar, inflamação e super ativação dos mecanismos de reparo do pulmão. As respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro ao patógeno promovem ainda a formação de pequenos acidentes vasculares e edemas nos tecidos vizinhos, os quais permitem o acesso das bactérias ao sangue e possível espalhamento sistêmico destes patógenos, que podem resultar em uma infecção generalizada (Eisele and Anderson, 2011).

Algumas células como as parenquimatosas e mielóides que são ativas no sistema de defesa pulmonar, exercem também um importante papel na defesa contra bactérias específicas. Existem trabalhos que demonstram que macrófagos, devido à sua capacidade de fagocitose, são fundamentais na eliminação de *K. pneumoniae* no pulmão e em outros órgãos. Em testes *in vivo*, quando o corpo do hospedeiro gera preferencialmente esse tipo de células migratórias, o resultado é o aumento na taxa de morte de *K. pneumoniae* e o aumento nos níveis de citocinas que estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares, de TNF- α (*tumor necrosis factor*

alpha) e de MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2), (Broug-Holub et al., 1997). As citocinas, nesse cenário, exibem um papel fundamental, qualquer desregulação na produção das mesmas pode provocar mudanças inflamatórias que alteram a arquitetura ou funcionamento das vias aéreas (Boyton and Openshaw, 2002).

1.3. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenômeno que ocorre como resposta à seleção natural frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (Schmieder, 2012). Devido à sua rápida multiplicação, alta capacidade de sofrer mutação, promiscuidade e a troca de material genético entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes, as bactérias apresentam uma alta capacidade de adaptação a fatores múltiplos, a qual confere a esses microrganismos uma alta taxa de resistência quando expostos a um ambiente de forte pressão de seleção (Fernandes, 2011). Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos do microrganismo ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação (Steel et al., 2013).

A resistência acontece através de dois grandes mecanismos: mutação num *loci* do cromossoma ou transferência horizontal de genes, isto é, por aquisição de genes de resistência anteriormente presentes em outros microrganismos (Tigen et al., 2014; Yue and Schifferli, 2014). Os genes responsáveis pela resistência contidos em plasmídeos, normalmente codificam enzimas que inativam os antibióticos ou reduzem a permeabilidade das células. Em contraste, a resistência conferida por mutações cromossomais envolve a modificação do alvo (Jiang et al., 2013).

Quando se fala da evolução das bactérias é importante evidenciar que as mutações ocorrem de forma induzida ou espontânea (Berglund et al., 2014). As mutações induzidas devem-se à ação da radiação, como por exemplo, a ultravioleta ou ionizante, os agentes alquilantes, à hidroxilamina ou à presença de espécies reativas de oxigênio (ROS). Se a mutação for benéfica para a bactéria, como no caso da resistência aos antibióticos, então tenderá a predominar naquela espécie. Assim o maior problema da resistência mediada

por mutação é a sua transmissão às gerações seguintes, o que torna a bactéria resistente predominante (Claud et al., 2013; Lin et al., 2014; Liu et al., 2013b).

A transferência horizontal de genes consiste em um processo de aquisição de material genético entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes. As bactérias possuem diversos elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons, sequências de inserção e integrons), que contribuem para a disseminação de genes de resistência aos antibióticos entre diferentes espécies, por meio de um dos três mecanismos de transferência de genes de resistência entre células bacterianas: transformação, conjugação e transdução (Furuya and Lowy, 2006).

Na transformação, a bactéria recebe partes de DNA presentes no meio. A bactéria receptora irá englobar no seu material genético as frações de DNA adquiridas. Esta porção de DNA deve possuir um tamanho mínimo de 500 nucleotídeos para se conseguir integrar no DNA hospedeiro, e o resultado é a morte ou lise de outra bactéria (B et al., 2014; Becker et al., 2014). A transdução envolve a presença de fagos, que funcionam como vetores do DNA, do doador para o hospedeiro. Cada fago transporta uma porção pequena de DNA da bactéria destruída anteriormente, protegendo a sua integridade das nucleases existentes no meio (Fadli et al., 2014). Ao infectar uma nova bactéria, a porção de DNA irá integrar-se no DNA da bactéria infectada (Lindsay, 2013; Oglesby-Sherrouse et al., 2014; Ondeyka et al., 2014). A conjugação é um processo que ocorre entre células bacterianas, da mesma ou de diferentes espécies, que ao entrarem em contato direto trocam pequenas porções de material genético, como por exemplo, plasmídeos (Otto et al., 2013).

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou natural ou adquirida. A intrínseca corresponde a uma característica da espécie bacteriana, que “naturalmente” cria uma barreira de permeabilidade contra o antibiótico, como por exemplo, a presença de membrana externa nas bactérias Gram-negativas. Ainda se refere ao gênero e algumas vezes espécie-específica, o que define o espectro de ação do antibiótico. Podem-se citar como exemplos de resistência intrínseca os microrganismos do gênero *Klebsiella* resistente à ampicilina,

amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina e o *S. aureus* resistente a todos os β -lactâmicos. A resistência bacteriana adquirida corresponde a uma característica da espécie resultante da alteração do material genético existente ou a aquisição de novo material genético de outra fonte. Ela pode ser revelada em apenas algumas cepas de uma mesma espécie bacteriana resultando da mutação ou desrepressão (na inativação do gene repressor, o gene operador torna-se ativo novamente, fazendo com que se manifeste a resistência não só à droga em uso, mas também a outros antibióticos). Este tipo de resistência já foi descrita em praticamente todas as espécies de bactérias, conhecendo-se detalhes dos mecanismos de aquisição e os mecanismos moleculares da manifestação da resistência.

Antes do século XXI, a resistência bacteriana estava basicamente restrita a ambientes hospitalares, porém com a disseminação de cepas resistentes, é possível encontrá-las nos mais ambientes, chegando a atingir até mesmo indivíduos saudáveis (Alanis, 2005). Os primeiros relatos de resistência bacteriana estavam ligados à bactéria *Staphylococcus aureus* resistente ao antibiótico oxacilina, posteriormente, as Enterobactérias que excretavam uma enzima capaz de promover a lise de diversos antimicrobianos. Hoje temos *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina e bactérias Gram-negativas capazes de digerir antibióticos carbapênemicos, como a *Klebsiella pneumoniae* (Del Peloso et al., 2010).

Estudos realizados em 29 países da comunidade europeia, relativos à resistência bacteriana entre 2008 e 2011 (dois dos estudos indicados na figura 2) revelam um crescimento da resistência em bactérias Gram negativas, como *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Martinez et al., 2014). Sendo que se observou que em 2011, a resistência combinada às cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram as mais predominantes (Maseda et al., 2013).

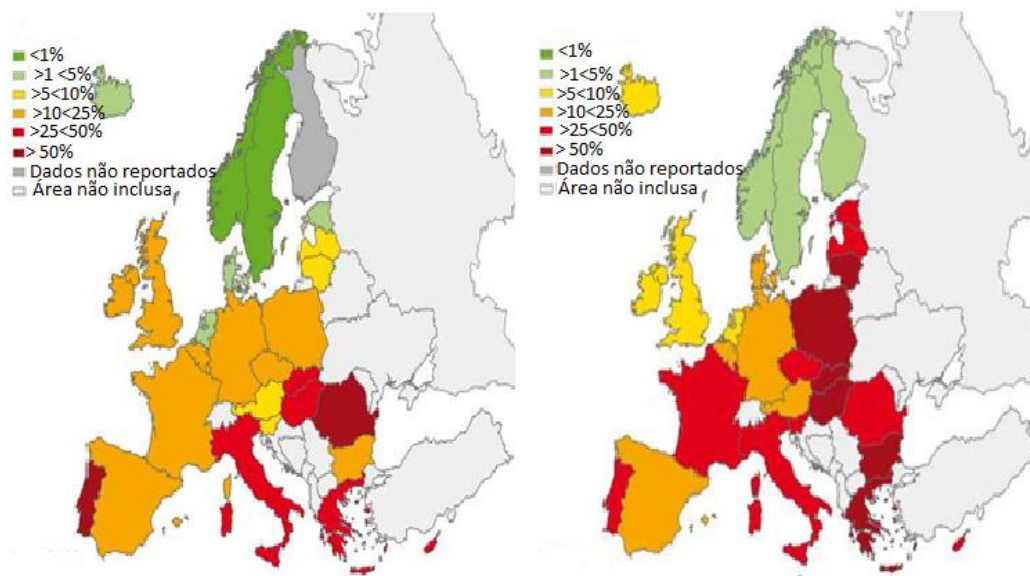


Figura 2: Mapa de Resistência de Microrganismos no mundo. À esquerda: Resistência à metilina em *Staphylococcus aureus* e à direita: resistência às cefalosporinas de 3ª geração em *Klebsiella pneumoniae*, na Europa em 2011. (ECPD, 2011)

1.4. Peptídeos Antimicrobianos Derivados de Peixes

O ambiente aquático apresenta frequentemente um alto nível de exposição a uma elevada quantidade de patógenos, portanto os peixes possuem um forte sistema imune inata, que age como primeira linha de defesa contra um grande número de patógenos (Rajanbabu and Chen, 2011). Peptídeos bioativos derivados de peixe, baseados em sua estrutura secundária, composição e sequência dos aminoácidos, estão envolvidos em várias funções biológicas incluindo a inibição do conversor de enzima angiotensina I (ACE), atividade antioxidante, imunomodulatória, anticoagulante e antimicrobiana (Najafian and Babji, 2012).

Inúmeros peptídeos com atividade antimicrobiana derivados de peixe têm sido isolados, dentre eles encontram-se a pardaxina, isolado de secreção de pele do peixe *Pardachirus marmoratus*, a misgurina do peixe *Misgurnus anguillicaudatus* e as catelecidinas que tem sido isoladas do peixe primitivo *Myxine glutinosa* (Noga et al., 2011). Outra família de peptídeos antimicrobianos derivados de peixe, as piscidinas, inclui peptídeos que possuem potente atividade contra diversos microrganismos tais quais vírus, bactérias, fungos e parasitas, além de estarem associadas à resposta imune para infecção parasitária (Dezfuli et al., 2010).

Alguns estudos tem demonstrado o modo de ação dos peptídeos citados acima, como por exemplo, o da pardaxina, um peptídeo positivamente carregado que interage provavelmente pelo modelo de poro toroidal, onde os aminoácidos constitutivos se ligam às moléculas carregadas negativamente na membrana dos patógenos, e formam poros que degradam a membrana provocando a lise celular (Pan et al., 2009).

Além da forte ação bactericida, outra característica que vem chamando atenção nos peptídeos antimicrobianos derivados de peixe, é a capacidade de estimular o sistema imune. Um bom exemplo são as defensinas de truta (*Oncorhynchus mykiss*), que pode servir como uma potencial alternativa para indivíduos que sofrem de desordens genéticas na produção de defensina, como indica o estudo realizado por Falco e colaboradores (2008), onde uma injeção intramuscular da defensina alfa-1 humana (HNP1) sintética, induziu no peixe a expressão da transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (IL-1beta, TNF-alfa1 e especialmente IL-8), bem como genes relatados para codificar o IFN tipo I, em diferentes tecidos da truta, provando ser um indutor da resposta imune em peixe.

1.5 Peptídeos Antimicrobianos: Uma Estratégia Alternativa no Controle de Patógenos

Desde a descoberta das magaininas há mais de 25 anos (Zasloff, 1987) muitos PAMs já foram isolados e caracterizados, quanto aos seus efeitos citolíticos sobre diferentes tipos celulares, incluindo fungos, protozoários, células tumorais e também atividade antimicrobiana (Conlon, 2011). A ação antimicrobiana das 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 (Kim e Cha, 2010).

Historicamente, os PAMs foram descobertos como alternativa aos antibióticos convencionais há seis décadas atrás, quando peptídeos cíclicos catiônicos com atividade bactericida, nomeados Polimixinas e Tirotricina, foram descobertos e aplicados em tratamentos clínicos em um período relativamente curto. Os mecanismos de ação desses peptídeos só foram descobertos anos

mais tarde, contudo o estudo de novos PAMs foi encoberto em detrimento de novas classes de antibióticos potentes e baratos que surgiram ao mesmo tempo, e só voltaram a serem estudados devido ao aumento da resistência bacteriana frente aos antibióticos comerciais (Kruse and Kristensen, 2008).

Como já descrito anteriormente, a resistência antimicrobiana tem sido indiscutivelmente uma preocupação mundial e poucos antibióticos têm sido desenvolvidos e disponibilizados comercialmente. Desta maneira, existe uma necessidade urgente no desenvolvimento de novos antibióticos. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) vêm ganhando cada vez mais destaque no cenário científico como uma alternativa no combate aos microrganismos patogênicos (Azevedo Calderon et al., 2011). Novas estratégias, tais como os PAMs poderiam exibir um importante papel no combate a infecções causadas por microrganismos patogênicos em vários organismos (Hancock and Sahl, 2006).

Peptídeos antimicrobianos têm sido isolados de uma ampla variedade de organismos, como bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados. Alguns podem ser considerados como parte da imunidade inata de organismos multicelulares e normalmente estão associados à defesa contra patógenos (Hancock and Lehrer, 1998; Terras et al., 1995) e por esse motivo eles têm sido denominados como peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) (Hancock and Sahl, 2006). Exaustivas pesquisas nas últimas décadas, em relação a sua biossíntese, atividade contra microrganismos, mecanismo de ação e potencial aplicação clínica tem sido realizados (Lofgren et al., 2008; Nguyen et al., 2011).

PAMs simbolizam uma nova classe de antibióticos e são definidos como pequenas moléculas proteicas que contém até 100 resíduos de aminoácidos e oferecem uma rápida e imediata contra o microrganismo invasor (Bartlett et al., 2002; Huang et al., 2010). Possuem características moleculares como (a) seu pequeno tamanho, geralmente menor que 10 kDa; (b) sua carga, frequentemente entre +2 e +7 em pH 7,0; e estereogeometria anfipática, que confere faces hidrofílicas e hidrofóbicas relativamente polarizadas (Yount and Yeaman, 2013), características estas que os tornam potenciais compostos contra membranas microbianas (Hancock and Lehrer, 1998).

Diversos estudos levaram a descobertas de peptídeos de defesas de organismos tais como: defensinas, cecropinas, magaininas e catelecidinas com diferentes perfis estruturais e variado espectro de ação. Estes peptídeos podem apresentar atividade contra bactérias Gram-negativas e positivas. Por esta razão têm sido propostos que PAMs poderiam representar potenciais quimioterápicos no tratamento de infecções bacterianas (Takahashi et al., 2010). Eles poderiam ser usados sozinhos ou em combinação com outros antibióticos para obtenção de efeito antibacteriano sinérgico (Cassone and Otvos, 2010). Adicionalmente, PAMs poderiam ser usados como imunomodulatórios e/ou neutralizantes de endotoxinas, limitando dessa forma a chance de desenvolvimento de aspectos negativos relacionados ao processo de inflamação, como choque séptico (Alba et al., 2012). O potencial terapêutico dos PAMs está diretamente relacionado com sua estrutura e habilidade para lizar membranas, destruindo rapidamente um amplo espectro de microrganismos como fungos, protozoários e bactérias (Oglesby-Sherrouse et al., 2014).

Um das mais utilizadas classificações dos PAMs (Figura 3), sugerida por Lai & Gallo (2009), baseia-se na composição de seus resíduos de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais, sendo divididos em: (1) peptídeos com uma estrutura α -hélice como as cecropinas, metilinas, magaininas e dermaseptinas; (2) peptídeos com estruturas folha- β estabilizadas por pontes dissulfeto entre resíduos Cys conservados como as β -defensinas humanas. Alguns peptídeos desta classe perturbam as membranas bacterianas por meio da formação de poros toroidais como descrito no peptídeo protegrina 1 porcina. Nesse peptídeo, a parte hidrofóbica interage com o núcleo hidrofóbico da bicamada permitindo que as cadeias laterais catiônicas de arginina possam interagir com os grupos fosfato aniônicos. Na protegrina, os resíduos de arginina estão localizados nas extremidades da folha- β o que torna a molécula anfipática; (3) peptídeos de estrutura estendida que muitas vezes possui um único aminoácido predominante sendo arginina, triptofano ou resíduos de prolina em altas proporções, como a indolicidina extraída a partir de grânulos citoplasmáticos de neutrófilos bovinos constituídos por apenas 13 resíduos ricos nos aminoácidos: triptofano (cinco resíduos), prolina (três resíduos e

arginina (dois resíduos); (4) peptídeos com pontes dissulfeto formando estruturas loop como a bacterenecina, peptídeo catiônico de neutrófilos bovinos que apresenta 12 resíduos de aminoácidos sendo quatro resíduos de arginina, dois resíduos de cisteína e seis de outros resíduos hidrofóbicos. Os dois resíduos de cisteína são responsáveis pela ligação dissulfeto formando uma estrutura em *loop* (Brogden and Brogden, 2011; Hancock, 1999; Nguyen et al., 2011).

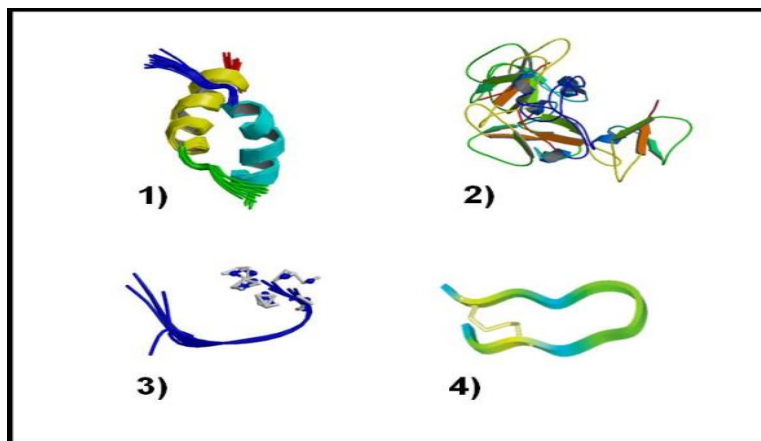


Figura 3. Classificação dos PAMs sugerida por Lai & Gallo (2009). Baseada na composição de seus resíduos de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais. (1) Magainina, peptídeo com estrutura α -hélice; (2) β -Defensina humana, peptídeo com estrutura folha- β estabilizada por pontes dissulfeto; (3) Indolicidina, peptídeo de estrutura estendida; (4) Bactenecina, peptídeo com pontes dissulfeto formando estruturas em loop (Hancock and Sahl, 2006).

Por possuírem características especiais como: (i) habilidade de eliminar rapidamente células-alvo, (ii) tamanho reduzido, (iii) serem catiônicos e anfifílicos, (iv) amplo espectro de atividade microbiana, (v) uma relativa dificuldade em dar origem a mutantes resistentes, além de demonstrar atividade contra alguns dos patógenos mais resistentes aos antibióticos convencionais, estas moléculas têm sido propostas como fortes candidatos para o desenvolvimento de uma nova classe de antibióticos (Korting et al., 2012).

Entretanto, algumas características presentes em alguns PAMs podem limitar a sua ação. Entre elas podemos citar: (i) a toxicidade para células humanas, (ii) instabilidade, (iii) alto custo de produção e (IV) mecanismo de ação não completamente compreendido. Além do mais, mesmo que os peptídeos apresentem uma alta atividade *in vitro*, não obrigatoriamente

apresentam também uma alta atividade *in vivo* (Marr et al., 2006). Muitos desses peptídeos podem ser antagonizados por cátions monovalentes e divalentes, polímeros polianiônicos como glicosaminoglicanos e mucinas e, além disso, alguns peptídeos podem ser suscetíveis a proteases, comprometendo assim a sua atividade (Hancock and Sahl, 2006). Uma alternativa tem sido sugerida como solução, a síntese de peptídeos contendo D-aminoácidos, pois alguns dos peptídeos que possuem essa estrutura não são degradados pelas enzimas plasmáticas, mantêm a atividade antimicrobiana e, muitas vezes, apresentam redução na atividade hemolítica (Mangoni, 2006).

Recentes avanços que visam minimizar as limitações dos PAMs já têm sido incorporados em muitos estudos. Tais métodos inclui um melhoramento na produção de peptídeos através da síntese de alto rendimento, que envolve arranjos de peptídeos em celulose e tecnologias de rápida triagem (Hilpert et al., 2005). Isso tem permitido a geração de bibliotecas que arquivam centenas de peptídeos. O resultado desses avanços tem implicado na redução do tamanho de PAMs e conseqüentemente na redução dos custos de produção (Hilpert et al., 2005). Nesses estudos, PDHs têm sido utilizados como modelos, devido à diversificada atividade antimicrobiana e imunomodulatória. Isso tem permitido o desenvolvimento de pequenos peptídeos antibióticos efetivos contra um amplo espectro de bactérias altamente resistentes a antibióticos (Cherkasov et al., 2009), e também de peptídeos antimicrobianos sintéticos com atividade regulatória da defesa inata, mais conhecidos como IDRs (Innate Defense Regulatory Peptides) (Wieczorek et al., 2010).

Os mecanismos de ação dos PAMs estão intimamente relacionados com a alteração da permeabilidade da membrana plasmática dos microrganismos. Esta habilidade, por sua vez, está relacionada com diversas características dessas moléculas, como por exemplo, as propriedades bioquímicas e conformação tridimensional. Antes mesmo que os peptídeos estejam inseridos na membrana plasmática das bactérias, acontece à primeira atração eletrostática entre a carga positiva dos PAMs e a carga negativa presentes no envoltório externo das bactérias (Ahmad et al., 2013). Após a primeira atração eletrostática, os peptídeos precisam atravessar a cápsula polissacarídea, para

só então terem acesso à membrana plasmática das bactérias (Ausbacher et al., 2012). A figura 4 ilustra resumidamente os modelos propostos para os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. Podemos citar o modelo barril; poro toroidal, e formação de carpete como os mais conhecidos e aceitos atualmente.

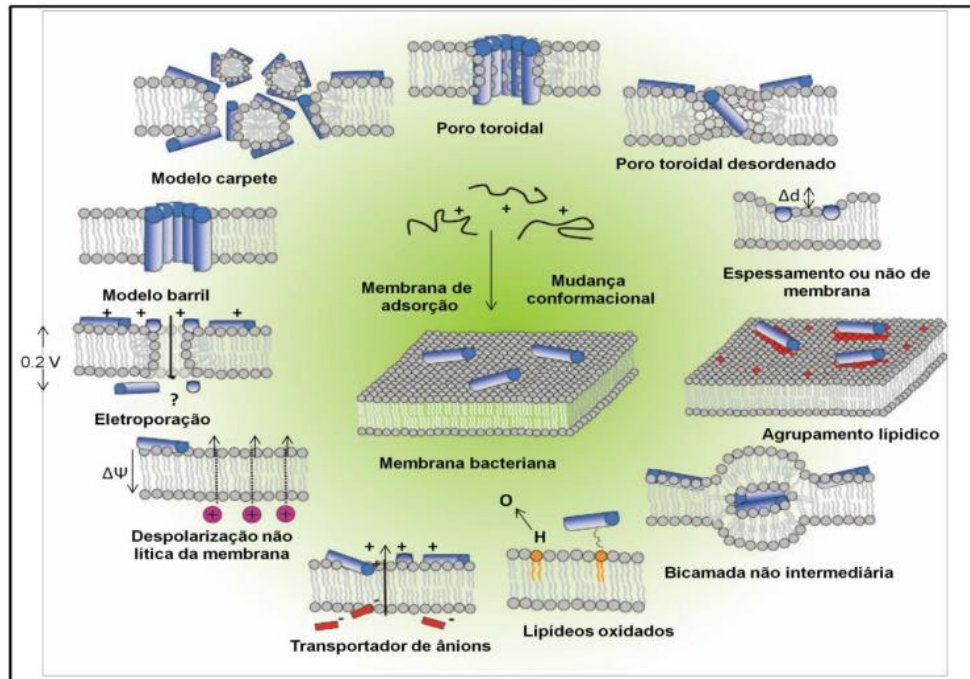


Figura 4: Modo de interação das PAMs com as membranas celulares. Modificado de (Nguyen et al., 2011).

No modelo barril (Figura 4), os peptídeos em hélice formam um feixe na membrana com um lúmen central, semelhante a um barril, onde o núcleo da bicamada lipídica da membrana se alinha com as regiões hidrofóbicas dos peptídeos, ao passo que a face hidrofílica do peptídeo forma a porção interna de um poro aquoso (Jang et al., 2012). À medida que mais monômeros são recrutados, o diâmetro do poro transmembrana aumenta e conseqüentemente a inserção dos peptídeos é facilitada. O resultado para a célula bacteriana é que ocorre o extravasamento do conteúdo interno, levando a bactéria à morte (Hancock, 1999). Um exemplo bem ilustrado desse modelo de inserção foi apresentado no estudo realizado com a alameticina, um peptídeo produzido por cepas de *Trichoderma*, onde se pôde observar que o peptídeo ligou-se à membrana, posteriormente formaram-se agregados que se inseriram na bicamada lipídica. O que diferencia esse modelo de formação de poro dos

demais, é que nele os peptídeos helicoidais revestem completamente a superfície interna do poro, com suas porções hidrofóbicas interagindo livremente entre si e suas porções hidrofílicas voltadas para o interior do canal (Brogden and Brogden, 2011).

No modelo formação de carpete (Figura 4), os peptídeos são atraídos eletrostaticamente pela superfície da bicamada lipídica, de tal forma que sua parte hidrofílica fica ligada às cabeças aniônicas dos grupos fosfolipídicos da membrana bacteriana, os peptídeos então se acumulam nessa superfície, orientando-se paralelamente na membrana, formando uma espécie de tapete (Paulsen et al., 2013). Dessa forma, os peptídeos causam uma perturbação na bicamada, quebrando a integridade de sua estrutura através da formação de micelas, culminando na desagregação da membrana (Brogden and Brogden, 2011; Yeaman and Yount, 2003).

O modelo do poro toroidal (Figura 4) foi proposto pela primeira vez para o peptídeo magainina encontrado na espécie de rã *Xenopus laevis* (Elgar, 2006). Outros peptídeos nos quais esse modelo pode ser aplicado são protegrina, LL-37 e MSI-78 (Brogden and Brogden, 2011). Nesse modelo, os peptídeos em α -hélice se orientam paralelamente à membrana e, após atingirem uma determinada concentração, inserem-se perpendicularmente na bicamada lipídica, induzindo as bicamadas lipídicas a se dobrarem continuamente através dos poros, de modo que o núcleo aquoso fica preenchido pelos peptídeos e pelas cabeças aniônicas dos fosfolipídios (Lorin et al., 2012). Quando este modelo é comparado com o modelo barril, diferem-se no que diz respeito aos peptídeos, que nesse caso, estão continuamente associados às cabeças dos fosfolipídios e nunca com a região das cadeias acíclicas (Ausbacher et al., 2012). Não há quebra de ligação entre o monômero do peptídeo e o lipídio durante a reorganização da camada lipídica, sendo que, no final deste processo, ocorre a formação de um poro aquoso de curta meia-vida, cuja parede é constituída por monômeros do peptídeo, intercalados com lipídios da membrana biológica (Okoroichenkov et al., 2012). Semelhantemente ao modelo Barril, os peptídeos inserem-se perpendicularmente à membrana para formar um poro, enquanto as regiões hidrofílicas dos peptídeos mantêm contato com grupos lipídicos, e as regiões hidrofóbicas dos peptídeos ficam

associadas com a porção hidrofóbica dos lipídios da membrana (Gee et al., 2013). Além dos mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos exercem seus efeitos via membrana, há também aqueles onde seu efeito provém da inibição da síntese de DNA, bloqueio da síntese de RNA, inibição de funções ribossômicas e síntese de proteínas (Ahmad et al., 2013).

Na medicina, observa-se uma ampla gama de utilizações clínicas para os diversos PAMs descritos em literatura, como por exemplo, seu uso no tratamento de câncer oral (McCormick and Weinberg, 2010) e ulceração gástrica (Patel et al., 2013). Em alguns casos como dos peptídeos KLAL, MK5E (peptídeo derivado de Magainina), Magainina I e os peptídeos Tet (Tet-20, Tet-26, Tet-213 e 1010) podem ser acoplados a resinas ou escovas tornando essas superfícies antimicrobianas (Brogden and Brogden, 2011). Há também estudos envolvendo o uso destas moléculas para prevenir a formação de superfícies de biofilme contra agentes que causam doenças da cavidade oral, (Yoshinari et al., 2006), doenças oftálmicas (Gordon et al; 2005) e sepse (Augustyniak et al., 2012; de Tejada et al., 2012; Robinson et al., 2011; Thacker et al., 2012).

Assim, mediante a crise evidente dos antibióticos comerciais frente ao aumento crescente e disseminação de bactérias multirresistentes, os peptídeos antimicrobianos se apresentam como uma opção viável para o desenvolvimento de fármacos que trazem mecanismos de ação diferentes dos atualmente disponíveis na indústria farmacêutica.

1.6 Determinantes Estruturais Para a Atividade Biológica dos PAMs e Desenho Racional de Peptídeos

Um dos principais alvos de peptídeos antimicrobianos parece ser a membrana fosfolipídica. Diversos estudos realizados através das técnicas de microscopia eletrônica e microscopia de força atômica demonstraram o efeito de lise desses peptídeos em membranas parasitárias, devido provavelmente à alteração nas propriedades físico-químicas das membranas e consequente desbalanço osmótico celular (Morton et al., 2007).

Ao que parece, o motivo central pelo qual os peptídeos antimicrobianos, até então caracterizados, conseguem diferenciar células eucarióticas de células procarióticas é o fato de que a membrana plasmática dos microrganismos

difere da membrana eucariótica na composição de fosfolipídios, bem como de outros componentes como esteroides, porém essas características estão condicionadas também à concentração, condição e características do próprio peptídeo. A composição da membrana está diretamente relacionada com o modo como esses peptídeos interagem com a mesma, sendo que este parece ser o ponto principal da seletividade de antimicrobianos (Yeaman and Yount, 2003).

O modo de ação do PAM's em membranas pode ser ditado por suas propriedades físico-químicas, principalmente por sua natureza catiônica e anfipática, bem como pelas características intrínsecas dos patógenos e dependem de alterações hidrofóbicas e eletrostáticas que levam a formação de poros na membrana bacteriana. Vários pesquisadores tem se empenhado em desvendar a relação estrutura-função dos peptídeos antimicrobianos através da modulação de seus parâmetros estruturais, porém a modificação de um parâmetro com frequência leva a alteração compensatória em outros, o que torna difícil avaliar a influência específica de cada determinante estrutural (Kim and Cha, 2010).

Desta maneira, características como conformação, carga, momento hidrofóbico, índice de agregação, geometria, ângulo polar, flexibilidade estrutural, anfipaticidade, cationicidade, entre outros, são características compartilhadas entre muitos peptídeos antimicrobianos (Figura 5). Neste contexto, é válido destacar conceitos atuais relativos à base molecular dos mecanismos de ação dos peptídeos com atividade antimicrobiana (Liu et al., 2013a).

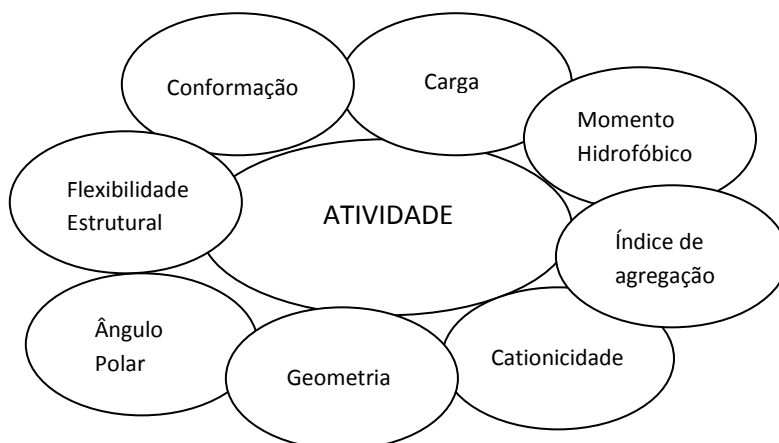


Figura 5. Interrelação entre determinantes estruturais em PAM's. A atividade e a seletividade de peptídeos em membranas fosfolipídicas se originam de vários parâmetros físico-químicos interdependentes como carga (cationicidade), conformação (α -hélice), anfipaticidade e hidrofobicidade.

A maior parte dos PAM's descritos até então, apresentam uma carga líquida positiva, que varia de +2 a +6, podendo conter um domínio catiônico altamente definido (Conlon, 2011; Hancock and Sahl, 2006; Pukala et al., 2006). O domínio catiônico bem definido se deve à alta porcentagem de aminoácidos básicos como Arginina, Lisina e Histidina. Esta cationicidade é uma das características que garante aos PAM's seletividade em relação aos tecidos do hospedeiro, já que gera uma atração eletrostática do PAM pela membrana fosfolipídica carregada negativamente das bactérias e outros microrganismos (Yeaman and Yount, 2003).

A carga positiva global faz com que esses peptídeos se acumulem na superfície polianiônica da célula microbiana, que contém polímeros ácidos tais como lipopolissacarídeos (LPS), e ácido teicóico e teicurônico associados à parede das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. (Hancock and Sahl, 2006). Posteriormente, estes peptídeos entram em contato com a superfície aniônica da membrana citoplasmática, e se inserem de forma tal que se posicionam entre a cabeça hidrofílica e a cadeia lipídica interna da membrana fosfolipídica. Após a inserção na membrana, os peptídeos antimicrobianos agem rompendo a integridade física da bicamada, através do desgaste da membrana, formação de poros, ou qualquer perturbação da função de barreira, ou mesmo se translocar através da membrana e atuar internamente (Conlon, 2011).

É válido notar que a capacidade antimicrobiana catiônica de alguns peptídeos pode ser antagonizada pela extensa variedade de cátions divalentes como Mg^{2+} e Ca^{2+} (em concentrações fisiológicas de 1-2 mM), cátions monovalentes como Na^+ e K^+ (100 mM), e poliânions como os glicosaminoglicanos (heparina e outros) (Hancock and Sahl, 2006). Contudo, os peptídeos catiônicos apresentam afinidade até três vezes maior pelos LPSs das membranas bacterianas quando comparados aos LPSs dos cátions

divalentes, conseqüentemente tais íons são desalojados competitivamente pelos PAM's que oportunamente podem desorganizar a membrana externa (Hancock, 1999). Com base nessas informações pode-se concluir que há uma forte correlação entre a carga líquida positiva dos peptídeos e a sua capacidade antimicrobiana, o que corrobora com o estudo realizado por Zhao e colaboradores (2001) que demonstrou essa correlação com os peptídeos magainina 2 e Indolicidina.

Estudos realizados por Yin e colaboradores (2012) demonstraram que o aumento da hidrofobicidade pode levar a um aumento no potencial de associação do peptídeo com a superfície da membrana do microrganismo, levando conseqüentemente a um aumento na sua capacidade antimicrobiana, e manteve estável a capacidade hemolítica dos peptídeos. Neste estudo quatro diferentes peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAPs), foram testados quanto ao aumento da distribuição de carga positiva, seis resíduos de Lisina foram adicionados à porção N-terminal *versus* três resíduos que existiam anteriormente. O resultado demonstrou que os peptídeos modificados foram capazes de aumentar significativamente a sua capacidade antimicrobiana, enquanto permaneceram inertes frente às células de mamíferos (Yin et al., 2012).

Estudos análogos realizados com o peptídeo magainina 2, mostraram que o aumento na carga positiva de +3 até +5 levaram a aumento na capacidade antimicrobiana com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém quando se aumentou além de +5 na carga positiva, houve um decréscimo na atividade antimicrobiana e também aumento na hemólise contra células de mamíferos (Dathe et al., 2001). Entretanto, esta relação relativa ao aumento da carga positiva *versus* aumento da capacidade antimicrobiana, nem sempre é constante, pois existem exemplos de relações indiretas ou inversamente proporcionais entre essas variáveis, onde um aumento na cationicidade do peptídeo gera um análogo com diminuição e até mesmo perda da atividade antimicrobiana (Conlon, 2011). A hipótese é que a cationicidade excessiva pode resultar em uma repulsão entre as moléculas presentes nos poros da membrana, gerando conseqüentemente uma baixa na atividade antimicrobiana (Conlon et al., 2007), outra hipótese é que o aumento da carga

positiva resulte em uma ligação tão forte do peptídeo com as cabeças polares dos fosfolípidios que evitem a translocação do peptídeo para o interior da célula. Há ainda bactérias com resistência intrínseca a determinados peptídeos antimicrobianos, e que podem ser resistentes a peptídeos catiônicos devido a uma membrana externa não reativa (Hancock and Sahl, 2006).

De acordo com Yeaman e Yount (2003) existem duas características que permeiam a classificação de PAMs: a anfipaticidade e o ângulo polar. O que diz respeito à capacidade anfipática de um peptídeo interagir com uma membrana alvo, a extensão da helicidade influencia a atividade do peptídeo contra membranas carregadas negativamente, isso pode acarretar um efeito ainda mais pronunciado na atividade hemolítica dos peptídeos contra membranas *zwitteriônicas* ou neutras, já o ângulo polar, que nada mais é que uma medida da proporção relativa de facetas polares em relação as não-polares, pode influenciar a capacidade do peptídeo em permeabilizar membranas, bem como uma maior estabilidade e meia-vida dos poros (Uematsu and Matsuzaki, 2000).

Outro critério de agrupamento e classificação dos PAM's são os elementos de sua estrutura secundária, presentes em suas cadeias polipeptídicas (Salwiczek et al., 2013; Yeaman and Yount, 2003), as duas maiores classes de peptídeos antimicrobianos catiônicos são os α -helicoidais e os de folha- β pregueada (Gaspar et al., 2013; Hancock, 1997). A classe de folha- β consiste em peptídeos cíclicos restritos a esta conformação por pontes dissulfeto, por exemplo, defensinas (Kagan et al., 1994) e protegrinas (Steinberg, 1997), ou por uma ligação covalente entre o N-terminal ao C-terminal, por exemplo, gramicidina S (Solanas et al., 2010) e tirocidinas (Marahiel, 1997). Diferentemente dos peptídeos em folha- β , os peptídeos α -helicoidais são lineares e existem principalmente como estrutura desordenada em meio aquoso, e uma vez que interagem com membranas hidrofóbicas se tornam hélices anfipáticas, por exemplo, cecropinas (Christensen, 1988), magaininas (Zaslhoff, 1987) e melitinas (Veen, 1995). A partir de diversos estudos relacionando estrutura peptídica com sua atividade antimicrobiana, tanto em peptídeos sintéticos como naturais, é possível hoje

apontar diversos fatores que se acredita ser importante para a atividade antimicrobiana, incluindo a presença de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos e a estrutura secundária pré-formada em α -hélice ou folha- β (Chen et al., 2005).

A estrutura secundária linear de PAMs anfipáticos e catiônicos influencia na habilidade do peptídeo de se associar e de se inserir na membrana plasmática. Essas propriedades contribuem tanto para a atividade antimicrobiana quanto para o nível de citotoxicidade do peptídeo em interação com as células do hospedeiro. Muitos PAMs α -helicoidais permitem incorporar em suas estruturas, resíduos de Glicina e Prolina, o que pode permitir que seções helicoidais pudessem ser interrompidas, conferindo flexibilidade conformacional ao peptídeo (Vermeer et al., 2012). Contudo, a depender da forma como a prolina é inserida no PAM, ela pode reduzir a capacidade desse peptídeo em permeabilizar a membrana citoplasmática da bactéria e conseqüentemente reduzir sua atividade antimicrobiana (Andreu et al., 1985; Gazit et al., 1995; Zhang et al., 1999). Similarmente, substituindo alguns resíduos por glicina, na estrutura primária de magainina, observou-se uma alta considerável em sua atividade antimicrobiana, porém um pequeno aumento na atividade citolítica também foi observado (Chen et al., 1988).

Em contraste, outros estudos que incorporaram L- ou D-prolina tanto na face hidrofóbica quanto hidrofílica de um peptídeo alpha-helicoidal anfipático, KLW, com citotoxicidade não seletiva, demonstrou que essa incorporação pode levar a um aumento ou a manutenção da atividade antimicrobiana, enquanto reduz consideravelmente a capacidade citolítica do peptídeo em células eucarióticas (Song et al., 2004; Yang et al., 2006). Estes resultados assinalam a habilidade de determinados peptídeos que contém prolina, associarem-se e interagirem seletivamente com lipídios aniônicos como os encontrados em membranas de bactérias, e diferentes daqueles encontrados em eritrócitos (Vermeer et al., 2012).

A quantidade de resíduos hidrofóbicos presentes nos peptídeos define o seu percentual de hidrofobicidade, que para a maioria dos PAMs é de aproximadamente 50%. Esta característica permite uma melhor interação com

a membrana lipídica dos microrganismos, muito embora um alto nível de hidrofobicidade possa provocar no peptídeo uma menor seletividade frente às células dos microrganismos, e conseqüentemente um efeito aumentado de toxicidade para células de mamíferos (Yeaman and Yount, 2003).

Um trabalho interessante que mostra essa correlação entre hidrofobicidade *versus* interação com membranas é o de Shental-Bechor e colaboradores (2012). Estes autores demonstraram que análogos de magainina que tiveram um aumento no percentual hidrofóbico, conservaram a atividade antimicrobiana, mas tiveram a sua especificidade de interação com membranas procarióticas diminuídas.

As proteínas constituintes de membranas integrais são organizadas de maneira que se pode observar uma separação das regiões que abrangem a parte hidrofóbica e a flanqueadora hidrofílica da mesma (Kelly et al., 2009). Apesar da quantidade de informações estruturais sobre proteínas transmembrana permanecer escassa, existe hoje métodos que auxiliam na determinação de sua estrutura em alta resolução, como, por exemplo, a cristalografia e a mesófase lipídica (Caffrey et al., 2012), porém análises menos complexas são feitas rotineiramente, como por exemplo, a análise de sequências de DNA, e a partir da sequência primária é possível retirar informações importantes sobre a hidrofobicidade e previsão algorítmica estrutural de domínios alpha-helicoidais transmembrana (Bechinger, 2001), a confiabilidade desses resultados depende em grande medida da qualidade da base de dados subjacente que atribui valores de hidrofobicidade para aminoácidos individualmente, e muitas das escalas utilizadas para medir a hidrofobicidade de aminoácidos, levam em consideração estudos de resíduos individualmente, ou pequenos polipeptídeos dissolvidos em meio isotrópico, o que dificulta a previsão de uma hidrofobicidade real onde os aminoácidos estão em cadeias polipeptídicas e dissolvidas em meios aquosos variados (Lomize et al., 2011).

Na maior parte das escalas de hidrofobicidade estabelecidas, o aminoácido alanina é considerado moderadamente apolar (Engelman et al., 1986; Kyte and Doolittle, 1982; von Heijne, 1981), porém estudos mais

recentes confirmam que peptídeos polialanínicos excedem a hidrofobicidade necessária para se inserir em membranas fosfolipídicas, ainda que a alanina mostre uma alta propensão para conformação em α -hélice em ambientes não polares (Liu and Deber, 1998; Oma et al., 2007; Tavanez et al., 2009; Wang and Monteiro, 2007). Neste contexto, os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 ganham uma vantagem estrutural frente a outros peptídeos que não possuem o mesmo número de alaninas devido ao fato de possuírem uma hidrofobicidade elevada.

1.7 A História dos Peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9

Como observado em muitos estudos (Dzeja and Terzic, 2009; Hardie, 2011; Srivastava et al., 2012; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2013), peptídeos sintéticos baseados em peptídeos naturais, apresentam grande potencial para o tratamento de diversos tipos de infecções bacterianas. O desenho racional de pequenos peptídeos com cerca de 10 resíduos de aminoácidos associados às novas tecnologias de produção, como a nanotecnologia que amplia a efetividade e estabilidade do PAM (Brown et al., 2012; Ngwuluka et al., 2011; Shu et al., 2011), ou o uso de peptídeos combinados com antibióticos ou com outros peptídeos (Zhou and Peng, 2013), minimiza a quantidade para combater uma infecção, diminuindo assim os efeitos colaterais, tem possibilitado a redução dos custos de produção dos mesmos e, sobretudo possibilitando um controle mais efetivo de infecções bacterianas.

Uma grande quantidade de peptídeos pode ser obtida utilizando métodos de extração purificação e isolamento de fontes naturais, ou isolamento por clonagem utilizando regiões conservadas dos genes, assim como a prospecção de alto desempenho (Dzeja and Terzic, 2009; Hardie, 2011; Srivastava et al., 2012; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2013) conhecida como *High-throughput screening* (HTS). Esta é uma estratégia moderna que vem sendo amplamente utilizada para a identificação de novos compostos com atividade biológica. Entretanto apesar dos avanços nas técnicas de automação para HTS, essa é uma técnica de difícil execução e onerosa (CONGREVE, MURRAY E BLUNDELL, 2005 (LIU, LI E HU, 2004).

Alternativamente, vem sendo usada técnicas *in silico* como o desenho de fármacos baseado em estruturas pré-existentes. Esta abordagem vem possibilitando, por exemplo, identificar e selecionar, marcadores moleculares relevantes, estudar a base molecular de interações proteína-ligante e caracterizar sítios de ligação (ANDERSON, 2003). Neste contexto, Migliolo e colaboradores (2012) realizaram o desenho racional de peptídeos multifuncionais baseados em peptídeos anticongelantes isolados do peixe polar *Pleuronectes americanus*. Como resultado, dez peptídeos ricos em alaninas foram sintetizados: Pa-MAP, Pa-MAP 1.2, Pa-MAP 1.3, Pa-MAP 1.4, Pa-MAP 1.5, Pa-MAP 1.6, Pa-MAP 1.7, Pa-MAP 1.8, Pa-MAP 1.9 e Pa-MAP 2.0 (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de aminoácidos, CIM e massas moleculares dos peptídeos de primeira e segunda geração derivados de *Pleuronectes americanus* (Modificado de Migliolo et al.; 2012).

PEPTÍDEOS	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	CIM (μM) <i>E. coli</i>	Massa Molecular (Da)
Pa-MAP	HTASDAAAAAALTAANAAAAAASMA	30	2212,10
Pa-MAP 1.2	AATAATAAAAAAATAVTAAKAAALTAANA	>107	2398,30
Pa-MAP 1.3	KAAAAAALTAAAAAALTKAAAAAALT	--	2323,40
Pa-MAP 1.4	KAAAAAAKTKAAAAAAKTKAAAAAAKT	--	2368,40
Pa-MAP 1.5	LKAAAAAAKLAAKAAKAALKAAAAAKL	3,2	2517,60
Pa-MAP 1.6	KTAATLADTLADTAATLAKAAAA	>120	2130,20
Pa-MAP 1.7	LKAALTAAKTALTAALTALKAAALTAAKT	>96	2667,65
Pa-MAP 1.8	LAAALTAKATALTAKLTALAAALTAKAT	>98	2610,60
Pa-MAP 1.9	LAAKLTKAATKLTAALTKLAAALTAAT	6,0	2667,65
Pa-MAP 2.0	TKAAAAAAKTAAKAAKAATKAAAAAAKT	--	2469,46

Dentre os peptídeos apresentados na Tabela 1 pode-se observar em negrito os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9. Estes peptídeos se destacaram por apresentarem valores menores de Concentração Inibitória Mínima (CIMs) de 3,2 e 6 μM , frente a *E. coli*, respectivamente, quando comparados com os outros peptídeos derivados da mesma sequência (Tabela 1). Estes valores de atividade antimicrobiana também são menores quando comparados com outros peptídeos antimicrobianos isolados de peixes como, por exemplo, a pardaxina, que apresenta um CIM de 40 μM contra *E. coli*. Além disso, todos os peptídeos de segunda geração, ou seja, aqueles que foram sintetizados a partir da mesma sequência original por meio da técnica de fase sólida através da estratégia química Fmoc (Pa-MAP 1.5, Pa-MAP 1.6, Pa-MAP 1.7, Pa-MAP 1.8, Pa-MAP 1.9, Pa-MAP 2.0) mantiveram a ausência de toxicidade quando em contato com hemácias.

Levando em consideração as características já descritas para os peptídeos antimicrobianos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, como a habilidade de eliminar a bactéria Gram-negativa *E. coli* com baixa concentração, a baixa citotoxicidade frente às células de mamíferos (Migliolo et al., 2012), estes

peptídeos se mostraram potenciais candidatos para estudos de caracterização estrutural e funcional e podem ser considerados candidatos promissores no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. Nesse contexto, foram escolhidos como objetos desse estudo para serem testados individualmente e em combinação, objetivando determinar se há um aumento na atividade antimicrobiana.

2. JUSTIFICATIVA

A resistência de patógenos a antimicrobianos é o maior problema clínico mundial de interesse na saúde pública. Vários microrganismos multirresistentes vêm surgindo atualmente e, em sua grande parte, envolvidos em infecções hospitalares (Ball et al., 2013). A presença destes patógenos aumenta, não somente a mortalidade, mas também o custo do tratamento, a expansão da doença e a duração da mesma (Fernandez et al., 2014). Dentre os microrganismos com resistência aos antibióticos clássicos potentes, podem-se citar as cepas de MRSA e VRE e cepas resistentes à múltiplos fármacos como a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC). Diversas estratégias vêm emergindo com o objetivo de auxiliar na solução dessa situação crítica. Dentre as soluções correntes, encontram-se o uso moderado dos antimicrobianos, e a descoberta de antimicrobianos alternativos. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos os quais podem utilizados em combinação ou não com outros fármacos são candidatos promissores no desenvolvimento de uma nova classe de antimicrobianos, tanto pelo fato de apresentarem características como a habilidade de eliminar células-alvo rapidamente e seletivamente, quanto pelo fato de apresentarem atividade contra patógenos humanos multirresistentes aos fármacos comerciais.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana bem como o nível de citotoxicidade dos peptídeos sintéticos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, isolados e em combinação utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a pureza e quantificar os peptídeos sintéticos.
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) de modo isolado e combinado, dos peptídeos sintéticos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, contra a bactéria patogênica *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883;
- Determinar a ação combinada dos dois peptídeos através da técnica de microdiluição conhecida como “tabuleiro de xadrez”;
- Determinar a atividade citotóxica dos peptídeos análogos contra células RAW 264.7;
- Determinar a ação antimicrobiana, isolada e combinada, dos peptídeos em modelos animais de infecção;
- Realizar a predição da estrutura secundária dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 em combinação, por meio de modelagem molecular;
- Validar a estrutura do modelo de menor energia livre;
- Realizar estudos de interação peptídeos combinados-membrana *in silico* com modelo de membrana similar à de bactérias Gram-negativas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bactéria

Para os ensaios antibacterianos *in vitro* e *in vivo*, foi utilizada a bactéria *K. pneumoniae* ATCC 13883 proveniente da coleção da Universidade Católica de Brasília (UCB)

4.2 Compostos Antimicrobianos

Cloranfenicol foi obtido comercialmente (Sigma Aldrich). Os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 foram sintetizados e liofilizados pela Peptide 2.0 Inc.(EUA). A síntese foi realizada em fase sólida a partir da metodologia Fmoc. Os mesmos foram purificados por HPLC em coluna analítica C18 a 95 % de pureza e confirmados por espectrometria de massa MALDI-ToF MS/MS (*matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*)

4.3 Análises de Massa Molecular

A massa molecular dos peptídeos foi verificada por MALDI-ToF MS/MS, analisada no UltraFlex III, Bruker Daltonics, Billerica, MA. Para análise das massas, uma alíquota dos peptídeos sintéticos foram dissolvidos em 2µl de água bidestilada e misturados com uma solução de ácido 50mM de α-ciano-4-hidroxicinâmico (H₂O:ACN:TFA/ 50:50:0.3, v:v:v) em uma razão de (1:3, v:v) e depositados sob uma placa de MALDI e mantidos a temperatura ambiente por 5 min. A massa monoisotópica foi obtida em modo refletido usando calibrante externo Peptide Calibration Standard II (massas com extensão acima de 4000 Da, Bruker Daltonics, Billerica, MA).

4.4 Quantificação de Peptídeos

Os peptídeos foram quantificados pelo método de fluorimetria por Qubit®, que permite a quantificação de moléculas biológicas utilizando corantes fluorescentes. Estes corantes são específicos para cada tipo de biomolécula, mesmo em baixas concentrações, conferindo a essa metodologia uma alta especificidade e sensibilidade. Inicialmente foi preparada uma solução de trabalho (*working solution*) utilizando com 200µl de tampão e 1µl de corante. Para calibração do aparelho foram preparadas duas amostras padrão com 190µl de *working solution* e 10µl de padrão negativo ou positivo. De cada

amostra de peptídeo, diluído em água, foi utilizado 1µl, ao qual se adicionou 199µl de *working solution*. Todos os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados à temperatura ambiente (25°C) por 2 minutos. As amostras foram então lidas no Qubit® fluorômetro.

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2009) em microplaca de 96 poços. Os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 foram diluídos em concentrações que variaram de 2µg/ml a uma concentração de 512µg/ml diluídos em água Milli-Q. Foi utilizado cloranfenicol na concentração de 200 µg/ml como controle negativo, como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q autoclavada. Em seguida 50µL de cada concentração dos peptídeos foram adicionados nos poços da microplaca em triplicata e mantidos a temperatura ambiente até a adição da suspensão bacteriana. A cultura estéril de Muller-Hinton (5 mL) foi inoculada com uma colônia isolada de *K. pneumoniae* ATCC 13883 a partir de uma placa com meio ágar de Muller-Hinton, por 20h. As bactérias foram cultivadas até atingir a metade da fase logarítmica, e em seguida, a suspensão foi ajustada à concentração de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias por mililitros). Em seguida, 50µL de suspensão bacteriana foram adicionadas em cada poço da microplaca com os peptídeos diluídos nas concentrações citadas anteriormente. A concentração final dos peptídeos variou de 2-512µg/mL⁻¹, e a suspensão bacteriana final no ensaio foi de 1×10^5 UFC.mL⁻¹. As microplacas foram incubadas a 37°C sob agitação constante e a leitura da densidade óptica (D.O. 600 nm) foi realizada a cada 30 min no leitor de microplacas BioTek durante 12 horas.

4.6 Avaliação do Efeito Combinado dos Peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9

O efeito da combinação dos peptídeos foi avaliado pelo método de ensaio de microdiluição em tabuleiro de xadrez (PILLAI, 2005). Os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 foram avaliados combinados e testados em diferentes concentrações (Figura 6). O ensaio de susceptibilidade foi

desenvolvido pelo método de microdiluição, de acordo com as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2009). As diluições dos peptídeos utilizados nestes experimentos foram baseadas no CIM de cada peptídeo isoladamente. Inicialmente foram preparadas diluições dos peptídeos em concentrações 4X maiores que a concentração desejada, uma vez que ocorreu a diluição 1:4 das amostras testadas quando combinadas com o inóculo bacteriano. Posteriormente, 25µL de cada concentração da série de diluição de Pa-MAP 1.5 foram combinados com 25µL de cada concentração de uma série de diluição de Pa-MAP 1.9. Em cada poço da microplaca foi adicionado 50µL da suspensão bacteriana de *K. pneumoniae* ATCC 13883 com aproximadamente 1×10^6 UFC.mL⁻¹. O crescimento bacteriano foi observado após incubação das microplacas a 37°C. por 18h de incubação, e o índice de concentração inibitória fracional (ICIF) foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{ICIF} = \frac{\text{MIC (1 em combinação com 2)}}{\text{MIC de 1}} + \frac{\text{MIC (2 em combinação com 1)}}{\text{MIC de 2}}$$

O ICIF foi interpretado da seguinte forma:

- ICIF ≤ 0,5: sinergismo;
- ICIF > 0.50 e < 1,0: Aditiva;
- ICIF >1,0 e ≤ 4: indiferente;
- ICIF ≥4: antagonismo.

Pa-MAP 1.5								
	1µg	2µg	4µg	8µg	16µg	64µg		Pa-MAP 1.9
512µg								
64µg	1µg/64µg	2µg/64µg	4µg/64µg	8µg/64µg	16µg/64µg			
32µg	1µg/32µg	2µg/32µg	4µg/32µg	8µg/32µg	16µg/32µg			
16µg	1µg/16µg	2µg/16µg	4µg/16µg	8µg/16µg	16µg/16µg			
8µg	1µg/8µg	2µg/8µg	4µg/8µg	8µg/8µg	16µg/8µg			
4µg	1µg/4µg	2µg/4µg	4µg/4µg	8µg/4µg	16µg/4µg			
2µg	1µg/2µg	2µg/2µg	4µg/2µg	8µg/2µg	16µg/2µg			

Figura 6: Representação do ensaio para medir o efeito antimicrobiano dos peptídeos em combinação em diferentes concentrações. A primeira concentração é referente ao peptídeo Pa-MAP 1.5 e a segunda concentração se refere ao peptídeo Pa-MAP 1.9.

4.7. Preparação do Inóculo Bacteriano para ensaios *in vivo*

Colônias isoladas de *K. pneumoniae* ATCC 13883 foram cultivadas em meio Mueller Hinton (MH) líquido, e incubadas a 37°C a 240 rpm por 18 horas. Posteriormente, uma alíquota de 600µL da cultura bacteriana foi cultivada em 60mL de meio MH fresco e incubada a 37°C a uma agitação de 240 rpm até que a cultura alcançasse a densidade óptica de 0,6 unidades de absorbância ($\sim 2,5 \times 10^8$ UFC. mL⁻¹), correspondente à fase logarítmica. A cultura foi centrifugada e o precipitado celular foi lavado uma vez em solução salina a 0,9%. Após a lavagem, a massa celular foi ressuspensa em solução salina, para obtenção de um inóculo infectante correspondente a 1×10^8 UFC. mL⁻¹. O número de unidades formadoras de colônias na suspensão ajustada foi confirmado por diluição e plaqueamento em meio MH sólido.

4.8. Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT estabelecido por Mosman (1983). Em células metabolicamente viáveis, enzimas mitocondriais, como a succinil-desidrogenas, reduzem o substrato MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-*il*)-2,5-difenilttrazólio), formando o formazan, um produto de cor azulada. Dessa forma, a quantificação da produção de formazan por células submetidas a determinado tratamento está correlacionada com sua viabilidade. As células RAW foram cultivadas e tratadas com os peptídeos Pa-MAP 1.5 na concentração inibitória mínima de 512µg, Pa-MAP 1.9 na concentração inibitória mínima de 64µg e a combinação desses peptídeos na concentração inibitória mínima sinérgica de 4µg de peptídeo cada; foram incubadas em placa de 96 poços. Após o período de incubação de 24h e 72h, o meio de cultura das placas foi removido e 150µl de solução de uso de MTT (15µl de MTT 5mg/mL diluídos em 135µl de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por pelo menos 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 100µl de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan formado. A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorbância dos poços no comprimento de onda de 595nm, em espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas BioTek. A viabilidade celular foi determinada pela média da

triplicata de cada concentração testada. A concentração inibitória mínima (CIM) representa a concentração em que a viabilidade celular foi reduzida em 100%.

4.9 Modelo Animal de Infecção

Os experimentos *in vivo* foram realizados com camundongos C57/BL6 com 6 a 10 semanas de idade. Os camundongos foram acondicionados e manipulados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob regulamentação da Lei Arouca, número 11.794, e do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade de Católica de Brasília (Brasília/DF), registrado sob o protocolo número UCB/DOC 015/13, todos os esforços foram feitos na tentativa de minimizar o sofrimento animal. Os animais foram separados em grupos de seis animais por gaiola e mantidos sob temperatura constante (22°C) com 12h claro/escuro e alimentados com *ad libitum* e água. 50µL da suspensão bacteriana (1×10^8 UFC por camundongo) foram administrados via intraperitoneal. Posteriormente os camundongos foram sedados intraperitonealmente com ketamina (50mg.Kg⁻¹) e xilazina (10mg.Kg⁻¹) e então os tratamentos foram administrados. O tratamento para o peptídeo Pa-MAP 1.5 foi utilizado nas concentrações de 36mg.Kg⁻¹, 18mg.Kg⁻¹ e 9mg.Kg⁻¹. Para o peptídeo Pa-MAP 1.9 as concentrações escolhidas foram 4mg.Kg⁻¹, 2mg.Kg⁻¹ e 1mg.Kg⁻¹. Os peptídeos foram diluídos em solução salina, 3 horas antes de serem administrados nos camundongos. Tais tratamentos foram administrados por via intravenosa 100µL/animal, em dose única após 1h da indução de pneumonia. Os camundongos foram eutanasiados após 24h da realização do tratamento.

Os pulmões inteiros foram coletados e homogeneizados em 1mL de solução salina estéril a 0,9%. Um volume de 10µL dos homogenatos foi depositado em meio Ágar Muller-Hinton, após a realização de diluições seriadas 1:10, para se estimar o número de UFC.g de tecido pulmonar⁻¹. O sangue foi coletado por punção cardíaca e depositado em tubos com EDTA para evitar a coagulação, posteriormente às diluições seriadas foram realizadas em 1:10 e plaqueadas em meio Ágar Muller-Hinton para se estimar o número de UFC.mL⁻¹ de sangue.

4.10 Modelagem Molecular

A metodologia de modelagem molecular foi realizada para os peptídeos sintéticos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 seguindo quatro etapas sucessivas: a identificação da proteína-molde (template), o alinhamento entre as sequências, a construção das coordenadas e a validação do modelo. O passo inicial na modelagem comparativa foi identificar todas as proteínas relacionadas a sequência alvo, selecionando o molde com melhor identidade e score. O programa BlastP (Altschul et al., 1997) foi utilizado na busca por estruturas molde. Definido o molde, a etapa subsequente consistiu no alinhamento múltiplo entre as sequências do peptídeo em estudo e o peptídeo molde, utilizando o programa Modeller 9v12 (Eswar et al., 2007). O método utilizado para a construção do modelo tridimensional foi o de modelagem pela satisfação de restrições espaciais. O programa Modeller 9v12 foi novamente utilizado, desta vez para construção de 200 modelos tridimensionais para o peptídeo em estudo (Eswar et al., 2007). O programa PROCHECK foi utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos (Laskowski et al., 1996), sob avaliação dos comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos das torções da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do Mapa de Ramachandran (Ramachandran and Sasisekharan, 1968). Foi ainda utilizado o programa 3DSS para o cálculo do *root mean square deviation* (RMSD) por meio da sobreposição estrutural do modelo construído com a estrutura molde (Sumathi et al., 2006). As estruturas tridimensionais foram visualizadas e analisadas usando o programa PyMOL - <http://pymol.sourceforge.net/> (DeLano 2002).

4.11 Estudo das Interações Peptídeo Membranas (*Molecular Docking*)

Para a realização dos estudos das interações peptídeo-peptídeo e peptídeo-membrana foi utilizado o programa AUTODOCK 4.2. Para isso, os modelos de membranas foram construídos utilizando-se o servidor CHARMM-GUI, em uma proporção de 9:1 de 1,2-bis(difenilfosfino)etileno (DPPE) e dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG) (Lohner et al., 2008). Com o auxílio da

ferramenta AutoDock Tools, todos os átomos de hidrogênios foram adicionados às estruturas e uma caixa tridimensional de dimensões 50 x 50 x 40 Å³ com espaçamento de 1 Å foi centralizada na superfície da membrana. Para os peptídeos, a liberdade máxima para cadeias laterais foi desbloqueada e bloqueada para a cadeia principal. Cinquenta corridas de acoplamento molecular foram realizadas e as estruturas geradas foram ranqueadas de acordo com seus valores de afinidades em kcal.mol⁻¹. O programa PyMOL foi utilizado para elucidar as interações peptídeo-peptídeo e peptídeo-membrana respeitando a distância de 3.6 Å para todos os átomos acoplados às membranas.

4.12 Análise Estatística dos Dados

Os dados apresentados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM). Os ensaios *In vitro* e *In vivo* foram realizados em triplicata e repetidos em tempos diferentes. Os resultados foram analisados pelo programa Graphpad Prism[®] (<http://www.graphpad.com/>). Para os ensaios que possuíram três ou mais grupos e uma única avaliação das amostras, as diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguindo-se do teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas com valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Confirmação da Pureza dos Análogos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 por Espectrometria de Massa

Os análogos dos peptídeos produzidos quimicamente depois de purificados por RP-HPLC foram individualmente coletados, e ressuspensos em 0,1% (v/v) de TFA em água milli-Q. Uma alíquota de cada um dos peptídeos (1 μ l) foi aplicada em poços de uma placa de aço inoxidável junto a 1 μ l de matriz ácido α -cyano-4-hydroxycinnamico e analisado em espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF/ToF cobrindo uma faixa de m/z de 500 a 4000 Da no modo refletor de íons positivo. Os peptídeos Pa-MAP 1.5 (Figura 7) e Pa-MAP 1.9 (Figura 8) tiveram suas massas moleculares determinadas conferindo com a massa da sequência primária, Pa-MAP 1.5: LKAAAAAKLAAKAALKAAAAAKL, massa: 2519.1Da e Pa-MAP 1.9: sequência: LAAKLTKAATKLTAALTKLAAALTAAAT; massa: 2669.2 Da.

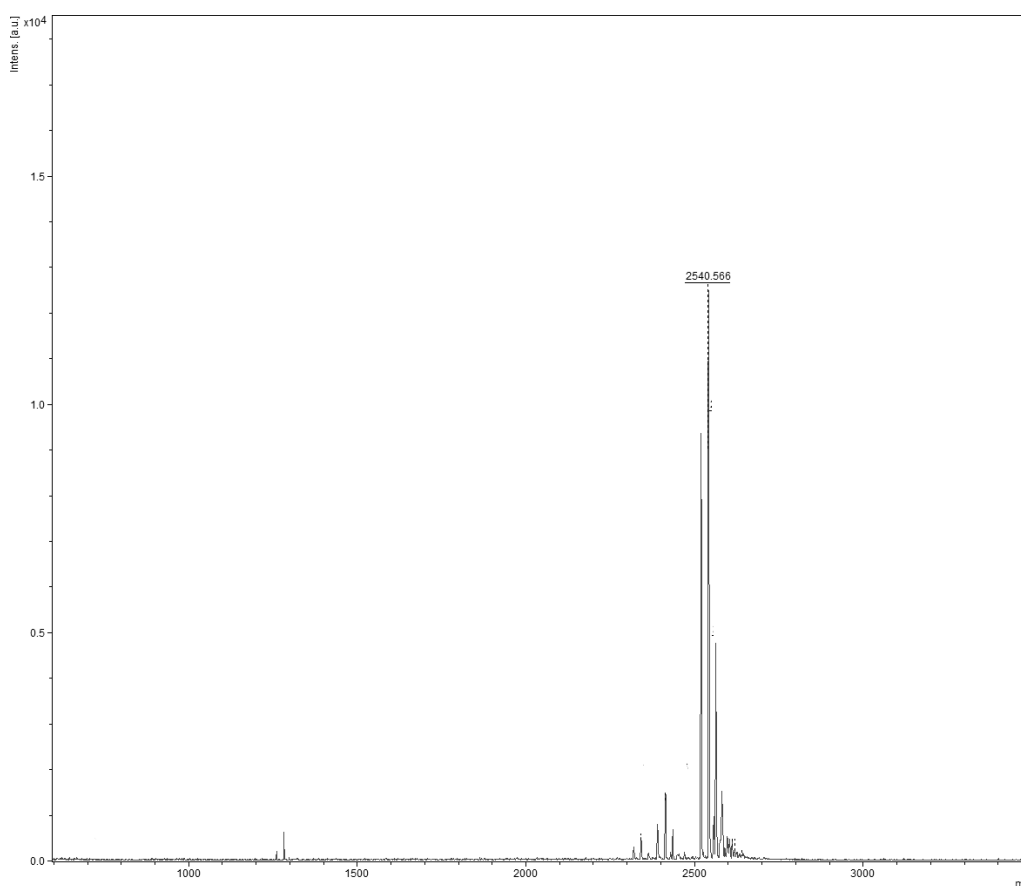


Figura 7. Perfil de purificação acima de 95% do peptídeo sintético Pa-MAP 1.5, com $[M+H]^+$ igual a 2540 Da purificado por RP-HPLC em coluna de fase reversa C18. Pode-se observar a presença de aduto com o íon sódio. Espectros obtidos após o plaqueamento das amostras em placa de aço inoxidável junto a matriz de HCCA 20 μ g/ μ L. É possível ver o peptídeo Pa-MAP 1.5 puro e carregado com os íons Sódio e Potássio. Análise realizada por 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.

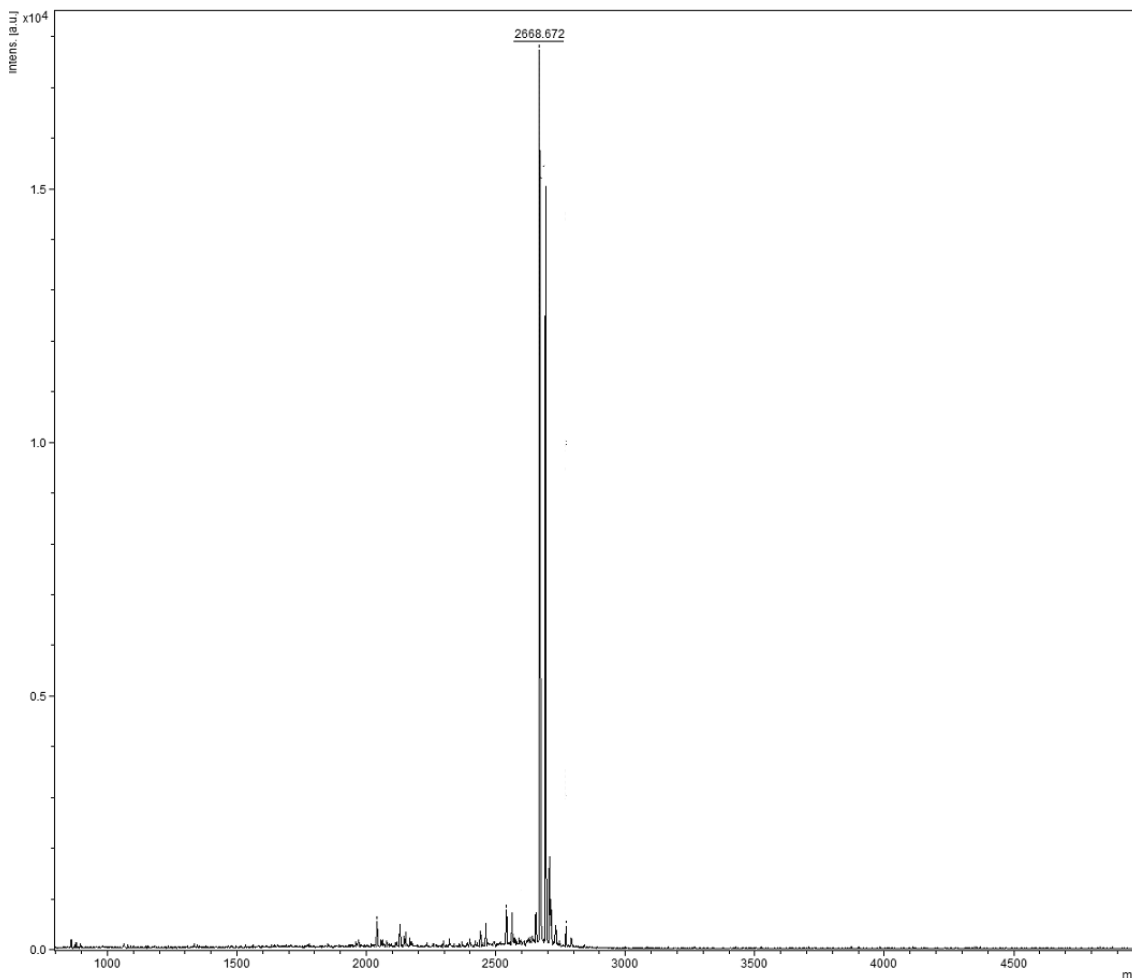


Figura 8. Perfil de purificação acima de 95% do peptídeo sintético Pa-MAP 1.9, com $[M+H]^+$ igual a 2668,67 Da purificado por RP-HPLC em coluna de fase reversa C18. Pode-se observar a presença de aduto com o íon sódio. Espectros obtidos após o plaqueamento das amostras em placa de aço inoxidável junto a matriz de HCCA 20 μ g/ μ L. Análise realizada por 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.

5.2 Determinação da Concentração e Cálculo dos CIMs dos Peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 Contra *Klebsiella pneumoniae*

Após análise da pureza realizou-se a quantificação dos peptídeos através de técnica fluorimétrica (Qubit, Invitrogen). Posteriormente, a atividade antibacteriana dos peptídeos foi testada contra *K. pneumoniae*, buscando a determinação da concentração inibitória mínima (CIM₁₀₀) para cada um dos peptídeos.

Os resultados dos testes de sensibilidade evidenciaram um comportamento diversificado do microrganismo frente aos dois peptídeos testados. A figura 9 representa a porcentagem de inibição sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* ATCC13883 diante dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, com concentrações variando entre 512 μ g até 2 μ g. O peptídeo Pa-MAP 1.5 apresentou uma CIM de 512 μ g enquanto o peptídeo Pa-MAP 1.9 apresentou um CIM de 64 μ g. Esta diferença de sensibilidade pode estar relacionada às propriedades de cada um dos peptídeos. Embora os dois peptídeos tenham apresentado inibição do crescimento bacteriano, destaca-se um melhor desempenho do peptídeo Pa-MAP 1.9 quando comparado ao seu análogo Pa-MAP 1.5.

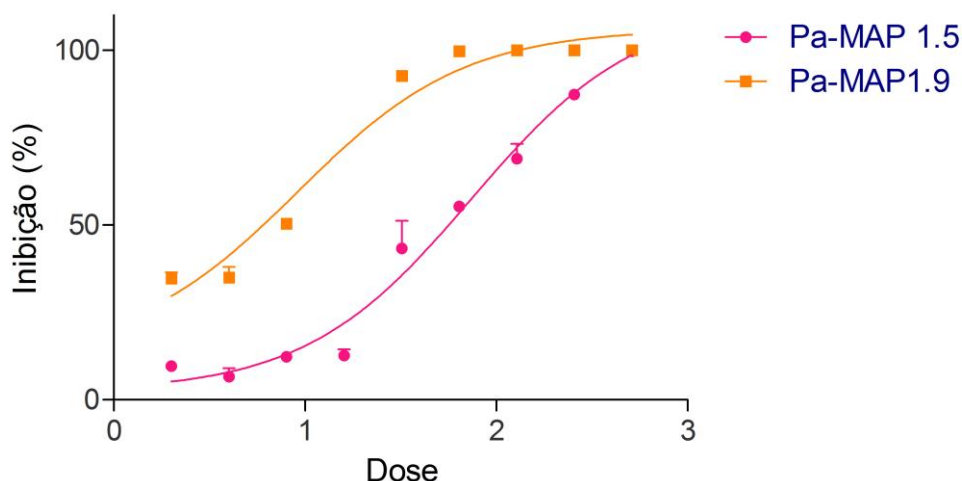


Figura 9. Porcentagem de inibição do crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* pelos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, utilizando concentrações de 512 a 2 μ g, as doses foram transformadas em logaritmos ($\text{Log}_{(x)}$). Foi utilizado cloranfenicol na concentração de 200 μ g/ml como controle negativo, como controle positivo (C+) foi empregada água Milli-Q autoclavada. As barras representam o desvio padrão.

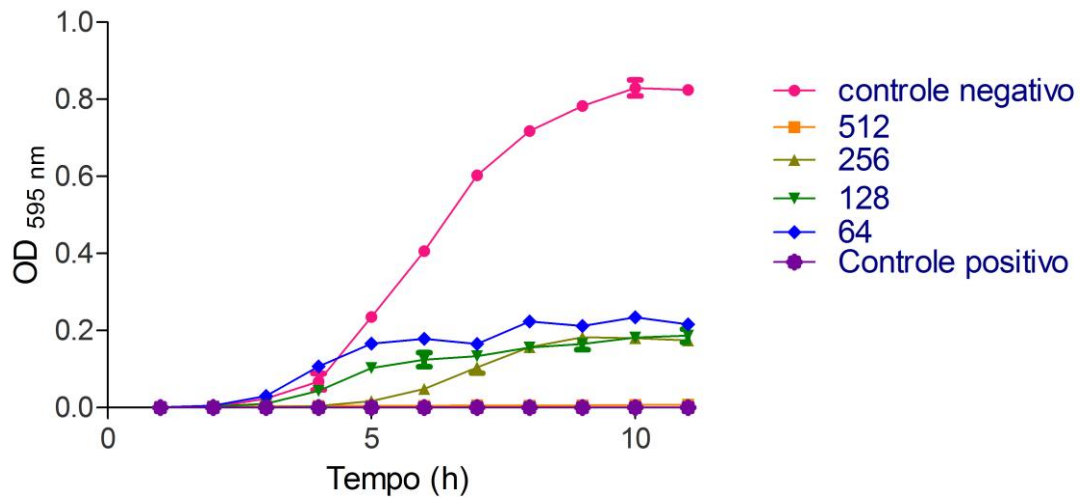


Figura 10: Cinética de crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* pelo peptídeo Pa-MAP 1.5 ao longo de onze horas, utilizando concentrações de 512 a 2µg. Foi utilizado cloranfenicol na concentração de 200 µg/ml como controle positivo (C+), como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q autoclavada. As barras representam o erro padrão.

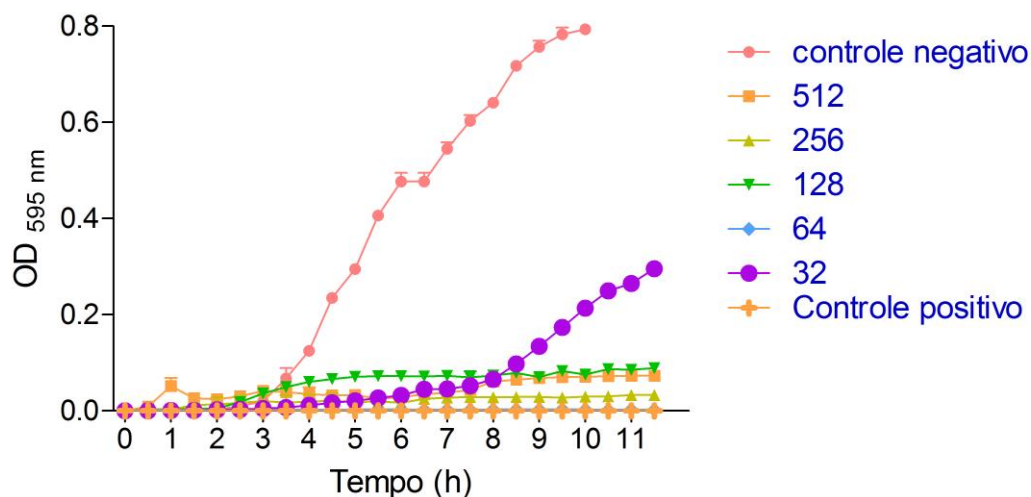


Figura 11: Cinética de crescimento da bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* pelo peptídeo Pa-MAP 1.9 ao longo de onze horas, utilizando concentrações de 512 a 2µg. Foi utilizado cloranfenicol na concentração de 200 µg/ml como controle positivo (C+), como controle negativo (C-) foi empregada água Milli-Q autoclavada. As barras representam o erro padrão

5.3 Avaliação do Efeito Antimicrobiano dos Peptídeos Combinados

Foram realizadas 30 diferentes combinações e na tabela 2 é possível visualizar todas as concentrações em que os peptídeos foram testados. Apenas 5 concentrações testadas obtiveram índice de inibição menor que

100% (ver tabela 2 em negrito). Mesmo nas concentrações abaixo de 4µg/mL a taxa de inibição foi de 50%. Para esse ensaio foram observados após o tempo de 6 horas de incubação a 37°C.

Os resultados obtidos quando os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 foram avaliados quanto a sua atividade antibacteriana em conjunto, revelam que os mesmos possuem efeito sinérgico, mesmo quando utilizados em baixas concentrações.

Os peptídeos testados isoladamente obtiveram CIM de 512µg/mL para Pa-MAP 1.5 e 64µg/mL para Pa-MAP 1.9. Quando testados em combinação ambos os peptídeos mostraram um CIM de 4µg/mL, quando calculado na fórmula do ICIF obtiveram um valor menor que 0,5 demonstrando, portanto, um efeito sinérgico em todas as combinações testadas. As interações sinérgicas que não apresentaram 100% de inibição, foram aquelas abaixo de 4µg/mL⁻¹ para ambos os peptídeos.

Os valores da Concentração inibitória fracionada (ICIF) encontrados nas tabelas 2 e 3 foram calculados de acordo com a fórmula, considerando um valor de CIM de 64µg/mL para o peptídeo Pa-MAP 1.9 e 512µg/mL para o peptídeo Pa-MAP 1.5.

O efeito inibitório observado quando os peptídeos foram testados separadamente foi notavelmente menor do que os resultados observados quando atuam conjuntamente. De fato, apesar de o efeito do peptídeo Pa-MAP 1.5 poder ser observado contra *K. pneumoniae*, a taxa de inibição foi inferior do que o observado com o peptídeo Pa-MAP 1.9, dado que foi necessária uma concentração oito vezes maior do primeiro peptídeo para impedir o crescimento das bactérias. Notavelmente quando colocados para atuar conjuntamente demonstraram efeito inibitório de 50% até mesmo nas menores concentrações testadas. Na tabela 3 é possível visualizar um comparativo entre a CIM dos peptídeos sozinhos e em combinação.

Tabela 2. Avaliação sinérgica da combinação entre Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9

Klebsiella pneumonia ATCC 13883

	Concentração	ICIF	Concentração	ICIF	Concentração	ICIF
	µg/mL		µg/mL		µg/mL	
Pa-MAP 1.5/Pa-MAP 1.9	1µg/64µg	0,1	2µg/4µg	0,03	8µg/16µg	0,1
	1µg/32µg	0,07	2µg/2µg	0,03	8µg/8µg	0,1
	1µg/16µg	0,04	4µg/64µg	0,1	8µg/4µg	0,1
	1µg/8µg	0,03	4µg/32µg	0,1	8µg/2µg	0,1
	1µg/4µg	0,02	4µg/16µg	0,09	16µg/64µg	0,3
	1µg/2µg	0,1	4µg/8µg	0,07	16µg/32µg	0,3
	2µg/64µg	0,1	4µg/4µg	0,07	16µg/16µg	0,2
	2µg/32µg	0,09	4µg/2µg	0,06	16µg/8µg	0,2
	2µg/16µg	0,06	8µg/64µg	0,2	16µg/4µg	0,2
	2µg/8µg	0,04	8µg/32µg	0,1	16µg/2µg	0,2

Tabela 3: Comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos peptídeos Pa-MAP 1.5 com Pa-MAP 1.9 contra *Klebsiella pneumoniae* quando separados e combinados.

Microrganismo	Peptídeo	CIM (µg/mL)		ICIF	Resultado
		Sozinho	Combinado		
<i>K. pneumoniae</i>	Pa-MAP 1.5	512	4	0,07	Sinérgico
	Pa-MAP 1.9	64	4		

CIM: Concentração Inibitória Mínima; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

5.4 Avaliação da Viabilidade Celular (MTT)

A figura 12 mostra a avaliação da viabilidade dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, frente às células RAW 264.7. Quando analisadas as concentrações mínimas inibitórias para cada peptídeo, ou seja, 512µg para o peptídeo Pa-MAP 1.5 e 64µg para o peptídeo Pa-MAP 1.9, aquele que se mostrou tóxico para as células foi o peptídeo Pa-MAP 1.9 que apresentou, após de 24 h de incubação na câmara de CO₂, uma viabilidade de apenas 7%.

O peptídeo Pa-MAP 1.5 no mesmo tempo, não apresentou uma diferença significativa em relação ao grupo controle, muito embora após 72h o mesmo peptídeo apresentou uma viabilidade celular média de aproximadamente 58%. A combinação sinérgica dos peptídeos (COM) não demonstrou diferença significativa em relação ao controle no tempo de 24 horas, bem como no tempo de 72 horas.

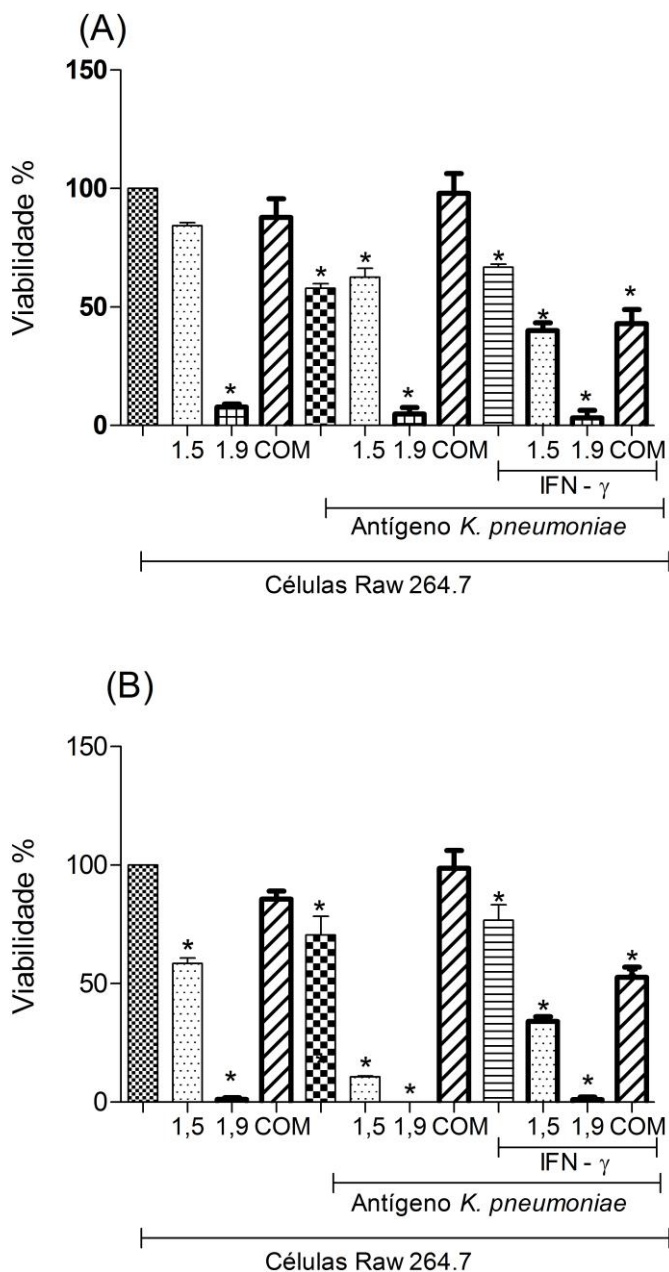


Figura 12. Porcentagem de células Raw 264.7 viáveis após 24 horas (A) e 72 horas (B) de incubação na presença de antígeno e de Interferon- γ . Resultados expressos como média + do percentual de células viáveis. As barras representam o erro padrão. *p<0,05 diferença

significativa quando comparado ao grupo de células RAW 264.7 sem tratamento. (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

Quando cada peptídeo foi avaliado na presença das células estimuladas com antígeno bacteriano de *K. pneumoniae*, apenas o grupo de combinação sinérgica não demonstrou diferença significativa em relação ao controle, demonstrando um aumento de viabilidade em relação ao grupo de células RAW 264.7+antígeno em ambos os tempos analisados. Os mesmos grupos quando estimulados com Interferon-gama (IFN- γ) não demonstraram diferença significativa quando comparados ao tratamento apenas com antígeno bacteriano.

5.5. Ensaio *in vivo*: Modelo Animal de Infecção Pulmonar

Visando a observação da atividade antimicrobiana individual e combinada dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 *in vivo*, o presente estudo avaliou a atividade destes peptídeos em modelos de infecção pulmonar induzidos por via intraperitoneal. As dosagens de peptídeo para o tratamento dos camundongos foram escolhidas baseadas nas concentrações inibitórias mínimas encontradas nos testes *in vitro*. Como no metabolismo do animal os peptídeos encontram várias barreiras não existentes quando se realiza os testes em placa, foi decidido que usaríamos uma dose acima do CIM, o valor encontrado de CIM e um valor abaixo, de modo que as doses escolhidas para Pa-MAP 1.5 foram de 1024 μ g (36mg.Kg⁻¹), 512 μ g (18mg.Kg⁻¹) e 256 μ g (9mg.Kg⁻¹); já para o peptídeo Pa-MAP 1.9 as doses utilizadas foram de 128 μ g (4mg.Kg⁻¹), 64 μ g (2mg.Kg⁻¹) e 32 μ g (1mg.Kg⁻¹). Como demonstrado na Figura 13, os dados obtidos demonstram que a carga bacteriana presente no sangue coletado após 24 horas do tratamento foi reduzida em 39% utilizando-se uma dose única de 1024 μ g do peptídeo Pa-MAP 1.5, já no pulmão essa carga bacteriana decresce proporcionalmente ao aumento da concentração do peptídeo, sendo possível observar 82% de inibição do crescimento bacteriano.

Já em relação a Pa-MAP 1.9 (Figura 14), foi possível observar que a carga bacteriana presente tanto no sangue como no pulmão coletados após 24 horas do tratamento a concentração do peptídeo é reduzida de forma proporcional, chegando a reduzir até 75% do crescimento bacteriano no

sangue utilizando-se 4mg.Kg^{-1} do peptídeo, e 85% da carga bacteriana presente no pulmão nesta mesma concentração.

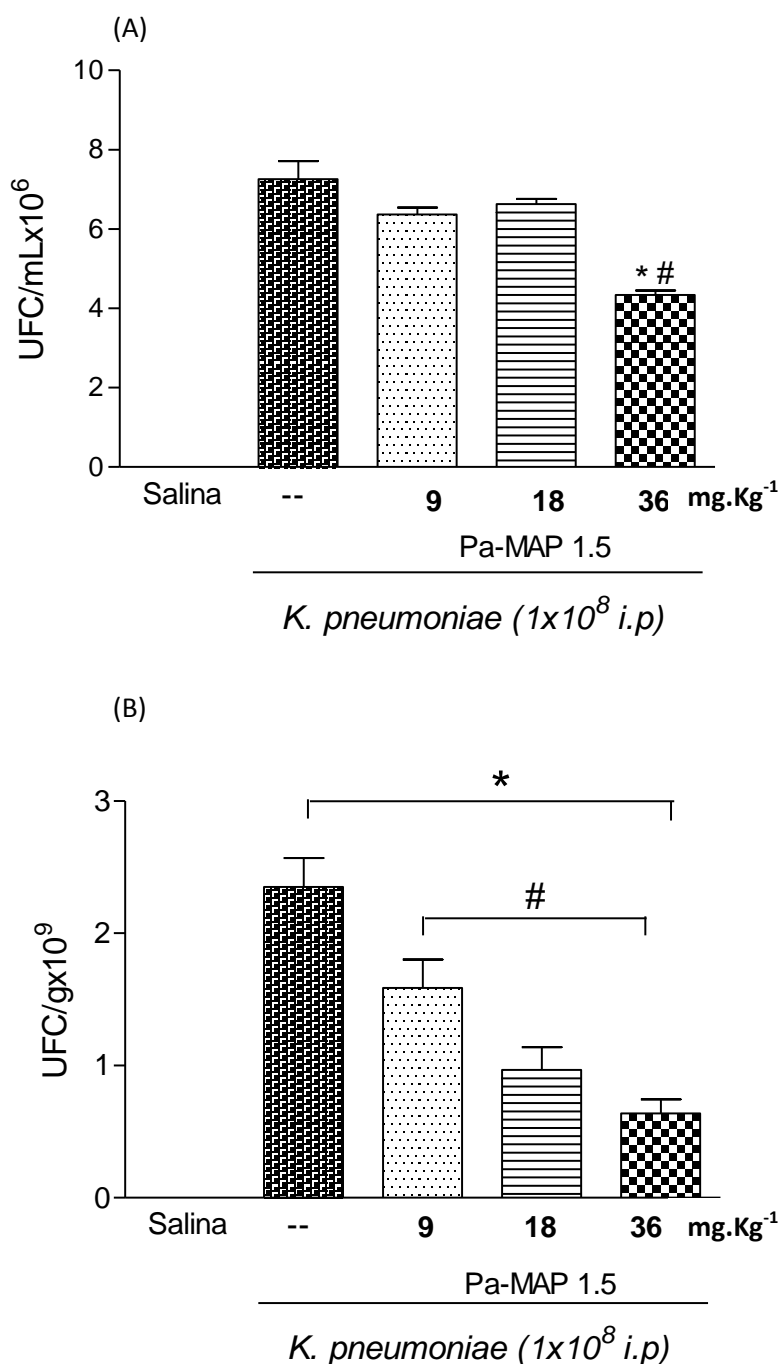


Figura 13. Efeito antimicrobiano do peptídeo Pa-MAP 1,5 em camundongos inoculados com *Klebsiella pneumoniae*. Para avaliar o efeito de diferentes doses (36 , 18 e 9mg.Kg^{-1} i.v) do peptídeo Pa-MAP 1.5 A carga bacteriana no sangue (Painel A) e pulmão (Painel B) foi avaliada 24 horas após o tratamento. * $p < 0,05$ diferença significativa quando comparado com o grupo não tratado; # $p < 0,05$ diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com a dose de 9mg.Kg^{-1} (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

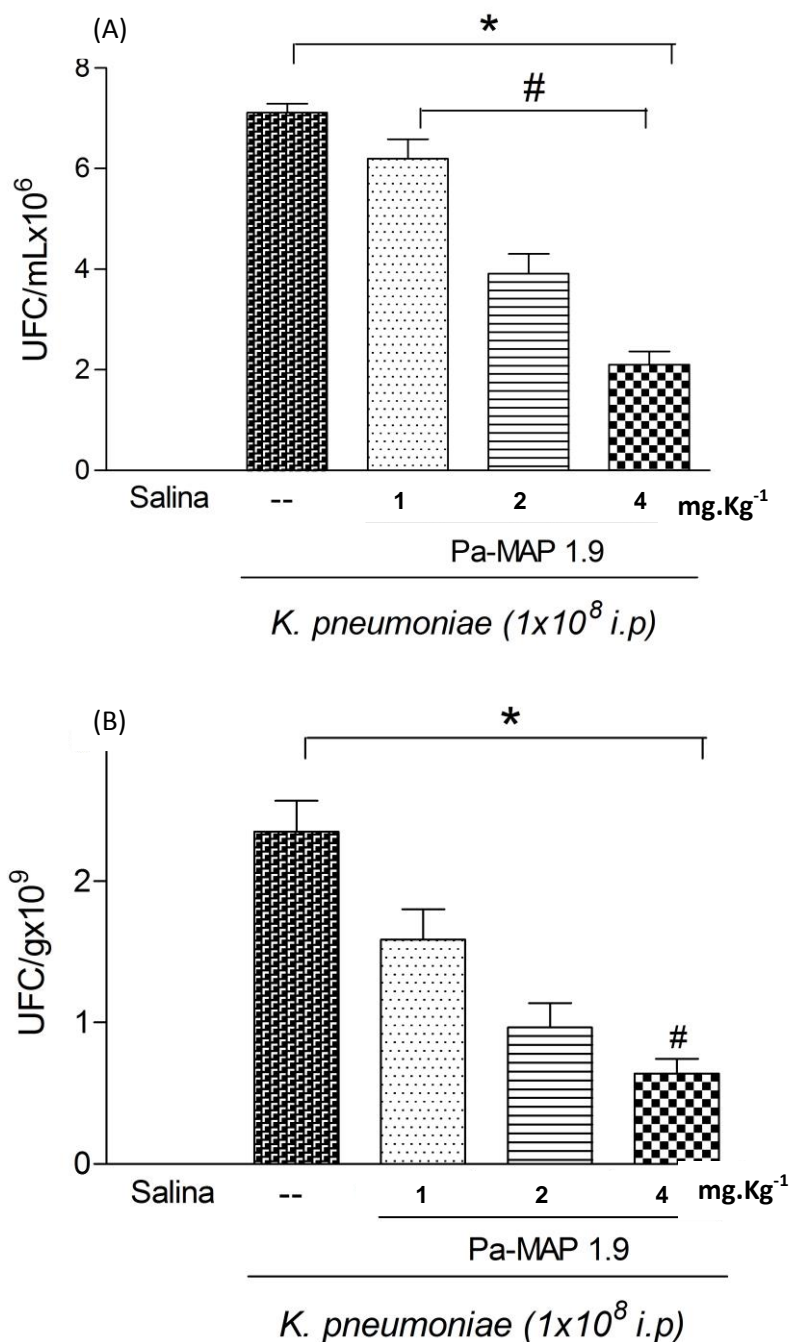


Figura 14. Efeito antimicrobiano do peptídeo Pa-MAP 1.9 em camundongos inoculados com *Klebsiella pneumoniae*. Para avaliar o efeito de diferentes doses (1, 2 e 4mg.Kg⁻¹ i.v) do peptídeo Pa-MAP 1.9 A carga bacteriana no sangue (Painel A) e pulmão (Painel B) foi avaliada 24 horas após o tratamento. * $p < 0,05$ diferença significativa quando comparado com o grupo não tratado; # $p < 0,05$ diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com a dose de 1mg.Kg⁻¹ (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

Para avaliar o efeito da associação dos peptídeos Pa-MAP 1.5/ Pa-MAP 1.9 foram utilizadas por animal as concentrações 36/4, 18/2, 9/1mg.Kg⁻¹, dos peptídeos Pa-MAP 1.5/ Pa-MAP 1.9, respectivamente. De

acordo com os dados obtidos, podemos observar que o efeito sinérgico avaliado primeiramente *in vitro* foi, similarmente, observado nos experimentos *in vivo* com um aumento na atividade antimicrobiana dos peptídeos quando combinados (Figura 15). Em relação ao sangue foi possível observar reduções de 89, 77 e 50% utilizando as concentrações 36/4, 18/2, 9/1mg.Kg⁻¹ dos peptídeos Pa-MAP 1.5/ Pa-MAP 1.9, respectivamente. Já em relação aos pulmões foi possível observar reduções de 100, 81 e 72% utilizando as mesmas concentrações dos peptídeos Pa-MAP 1.5/ Pa-MAP 1.9.

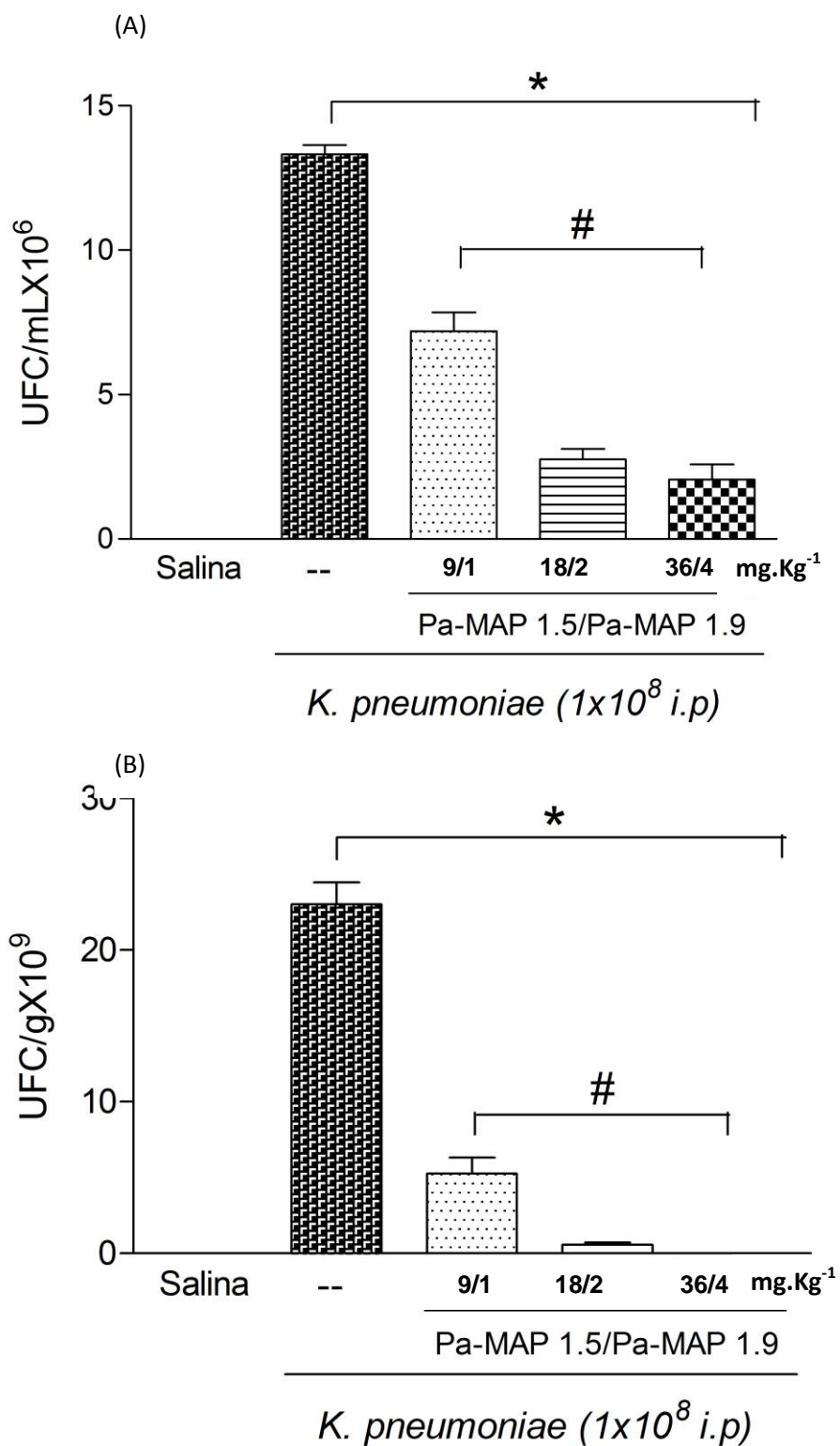
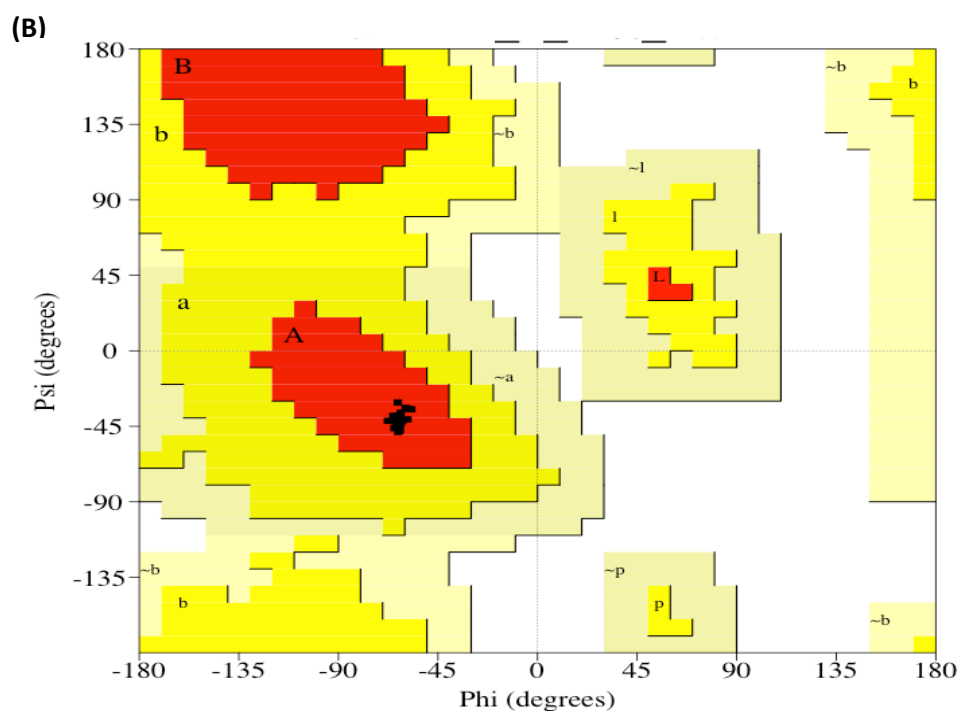
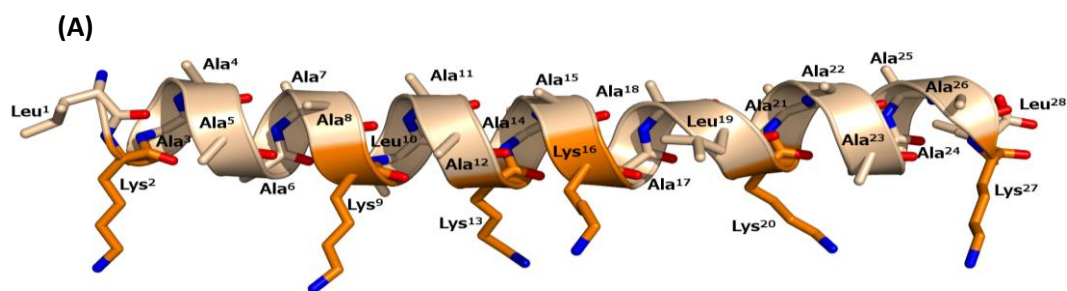


Figura 15. Efeito antimicrobiano da associação dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 em camundongos inoculados com *Klebsiella pneumoniae*. A carga bacteriana no sangue (Painel A) e pulmão (Painel B) foi avaliada 24 horas após o tratamento. * $p < 0,05$ diferença significativa quando comparado com o grupo não tratado; # $p < 0,05$ diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com a dose de 9/1mg.Kg⁻¹ (ANOVA, seguida do teste de Bonferroni).

5.6 Modelagem Molecular

Os modelos tridimensionais dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 foram construídos utilizando a estrutura tridimensional do peptídeo anticongelante tipo I com códigos pdb 1wfa, resolvido por difração de raios-X e encontrado em *Pleuronectes americanus* (Sicheri and Yang, 1995), que mostrou 66% de resíduos idênticos quando alinhados a sequência primária dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 (Figuras 16C e 17C). A validação dos modelos foi realizada por meio do programa Procheck, avaliando principalmente os mapas de Ramachandran (Figuras 16B e 17B). Os valores observados foram de 100% dos resíduos de aminoácidos situados na região mais favorável para a estruturação em α -hélice. As diferenças estruturais entre o molde e o modelo foram avaliadas pela sobreposição estrutural do $C\alpha$. Os valores de RMSD entre as estruturas experimentais e o modelo teórico foram de 1.140 Å e 0.567 Å para os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, respectivamente. O baixo valor de RMSD entre as estruturas refletem a conservação do domínio estrutural e enfatiza o dobramento desses padrões observados no peptídeo molde. Os modelos finais sugeriram uma conformação em α -hélice para ambos os peptídeos. Nas figuras 16A e 17A é possível visualizar a forma clássica em α -hélice, com a cadeia principal compactada e os grupos "R" expostos envolvendo por todos os lados a estrutura.



(C)

10 20 30

| | |

1wfa DTASDAAAAAALTAANAKAAAELTAANAAAAAATA

Pa-MAP 1.5 --LKAAAAAAKLAAKAAKAA--LKAAAAAAKL----

Figura 16: (A) Estrutura tridimensional predita para o peptídeo Pa-MAP 1.5. Em bege: resíduos apolares; em laranja: resíduos básicos (carregados positivamente). (B) Mapa de Ramachandran, usado como um dos critérios para a validação do modelo final de Pa-MAP 1.5. (C) Alinhamento múltiplo entre o molde e o peptídeo alvo em estudo.

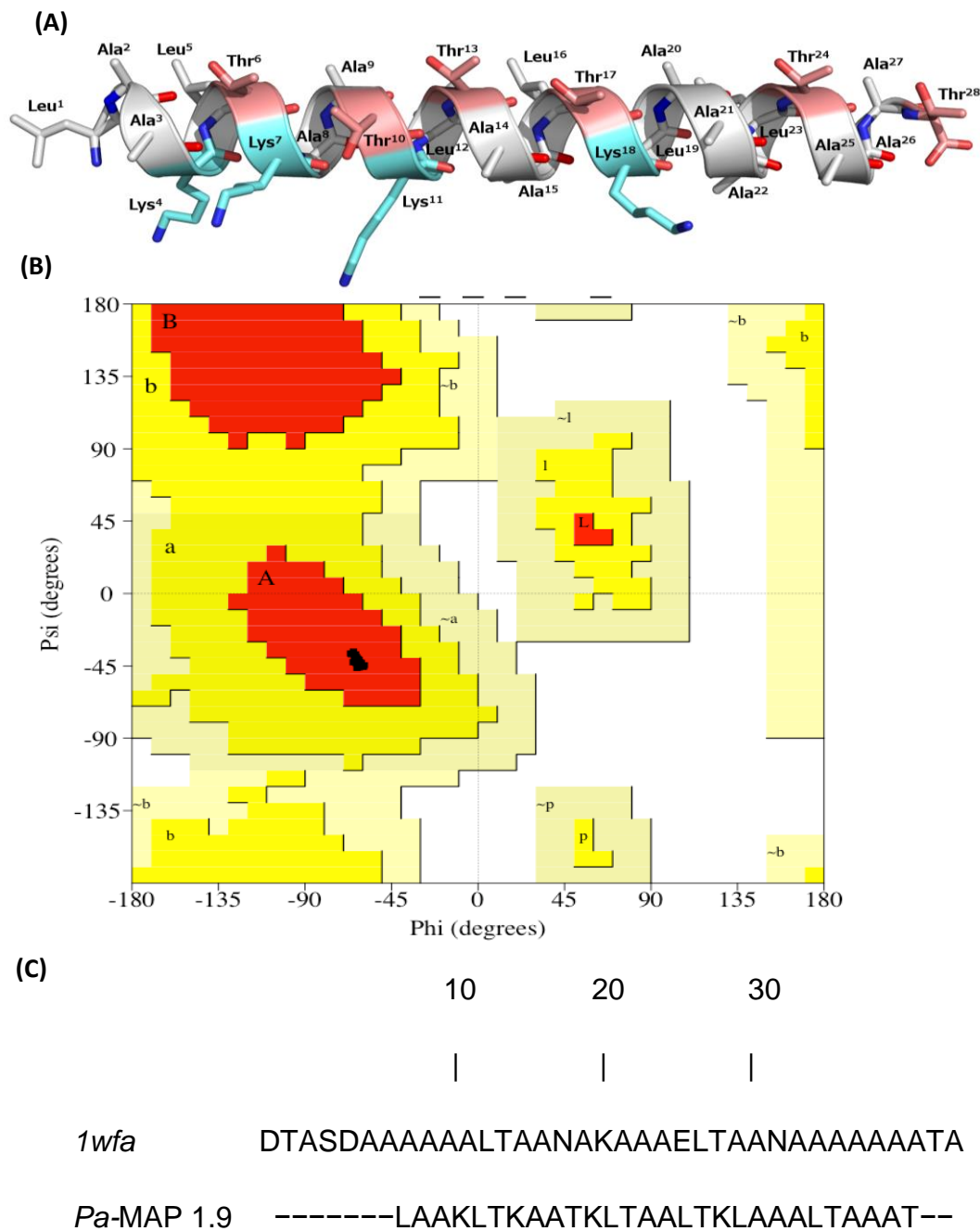


Figura 17: (A) Estrutura tridimensional predita para o peptídeo multifuncional Pa-MAP 1.9. Em branco: resíduos apolares; em rosa: resíduos polares neutros; em ciano: resíduos básicos (carregados positivamente). (B) Mapa de Ramachandran, usado como um dos critérios para a validação do modelo final de Pa-MAP 1.9. (C) Alinhamento múltiplo entre o molde e o peptídeo alvo em estudo.

5.7 Estudo de Acoplamento Molecular (*Docking* Molecular)

A interação dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 isoladamente, com membrana aniônica que mimetiza a membrana de bactérias Gram-negativas, já foram preditas por Migliolo e colaboradores, e Cardoso e colaboradores (Dados não publicados). A melhor afinidade apresentada foi de -3.5 e -3.9kcal.mol^{-1} para os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, respectivamente e evidenciaram um comportamento estrutural em α -hélice.

As análises de acoplamento molecular foram realizadas nesse estudo, afim de melhor compreender o comportamento do peptídeo Pa-MAP 1.5 em combinação com o peptídeo Pa-MAP 1.9, e posteriormente dos peptídeos combinados quando em contato com um modelo de membrana bacteriana do tipo Gram-positiva. O melhor valor de afinidade observada para a combinação de Pa-MAP 1.5 com Pa-MAP 1.9 foi de -4.9kcal.mol^{-1} (Figura 18).

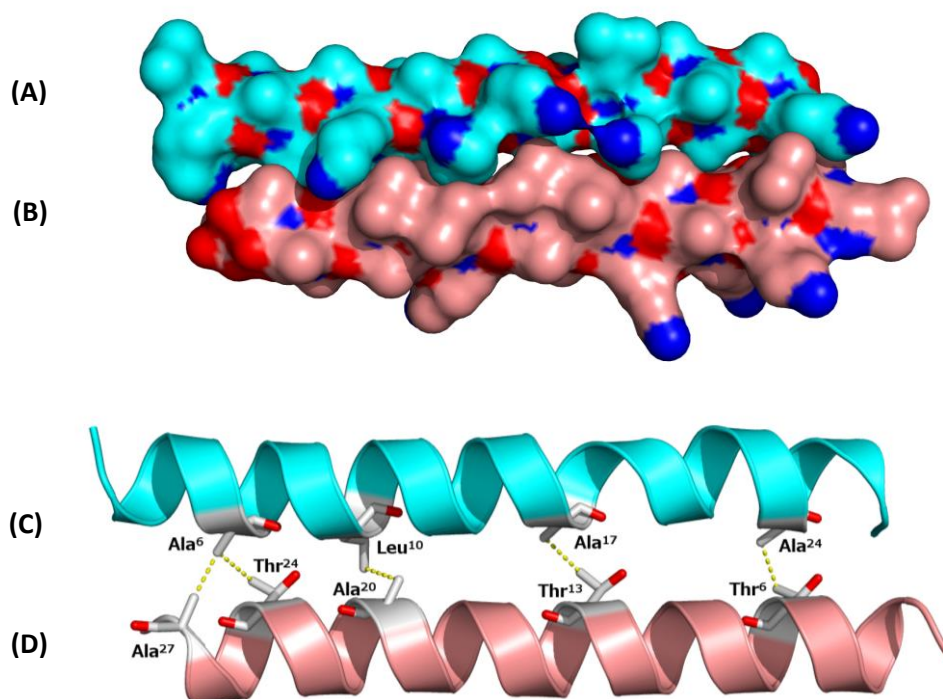


Figura 18: Visualização da superfície dos peptídeos. (A) Peptídeo multifuncional Pa-MAP 1.5. Em azul claro: resíduos apolares; em azul escuro: resíduos básicos (carregados positivamente). (B) Peptídeo multifuncional Pa-MAP 1.9. Em rosa: resíduos polares neutros; em azul: resíduos básicos (carregados positivamente). em destaque os resíduos envolvidos em interações, respeitando a distância máxima de 3,6 Å. (C) Peptídeo multifuncional Pa-MAP 1.5. (D) Peptídeo multifuncional Pa-MAP 1.9.

Posteriormente novas análises com os peptídeos acoplados foram observadas em relação à membrana mimética de bactéria Gram-negativa (Figura 19), com o intuito de melhor compreender o comportamento sinérgico dos peptídeos nessa situação. Nesse contexto, uma membrana aniônica composta por lipídeos DPPE e DPPG foi construída, conforme descrito anteriormente na metodologia.

O melhor valor de afinidade observada para a combinação dos peptídeos acoplados (Pa-MAP 1.5 com Pa-MAP 1.9) com a membrana de bactéria Gram-negativa foi de $-12.8\text{kcal.mol}^{-1}$. O acoplamento molecular da interação entre os dois peptídeos e a membrana mimética também revelou que os fosfolipídios DPPE da membrana estão envolvidos em interação do tipo ponte de hidrogênio com peptídeo Pa-MAP 1.5, pelos resíduos alanina e leucina (Figura 19A).

O peptídeo Pa-MAP 1.9, por sua vez, também parece estabelecer ligações do tipo Ponte de Hidrogênio através dos resíduos de aminoácido treonina e lisina, com os fosfolipídios DPPG e DPPE da membrana mimética (Figura 19B).

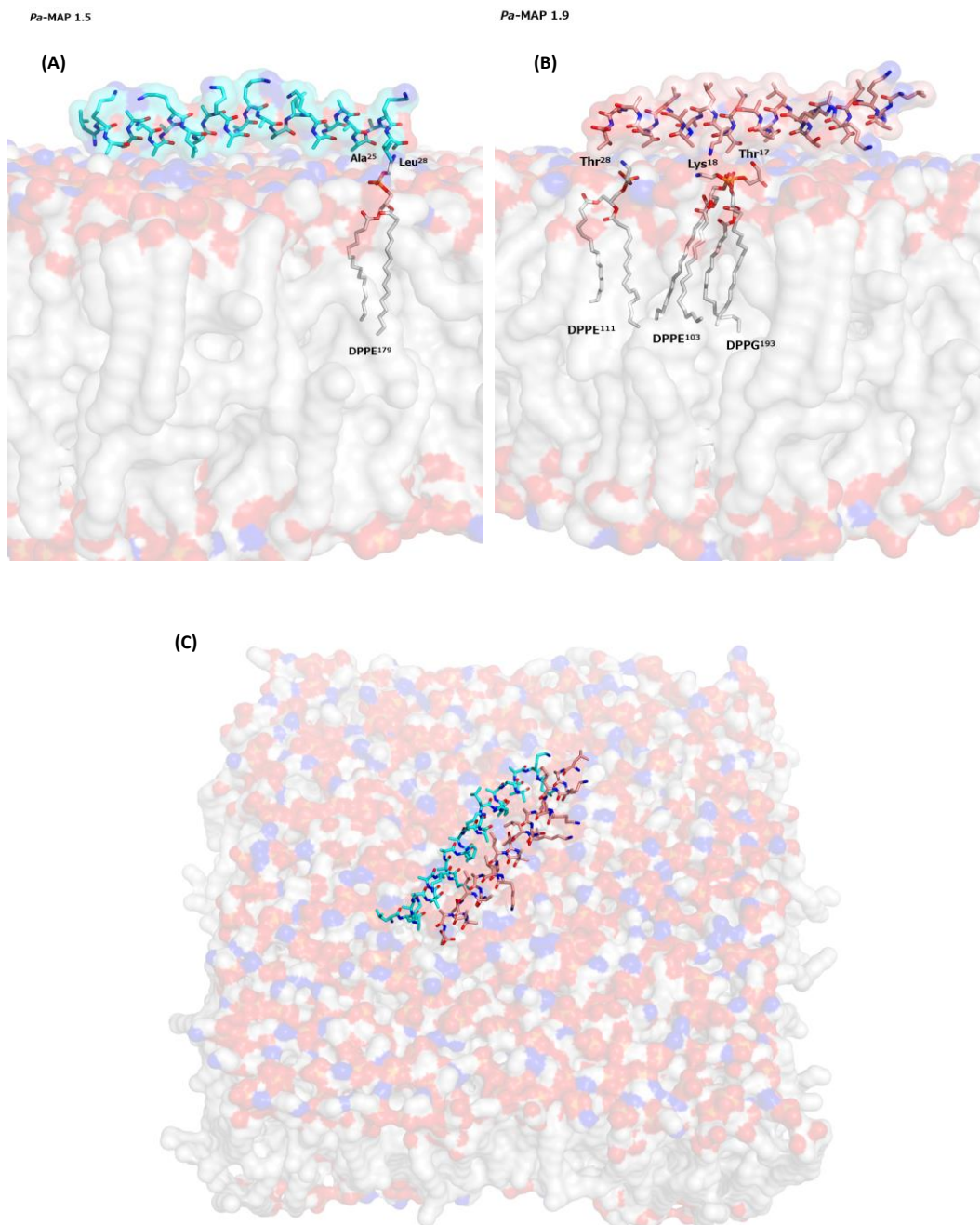


Figura 19: Modelo teórico tridimensional da interação entre os peptídeos e a membrana mimética. (A) Pa-MAP 1.5, em destaque as principais interações entre os resíduos de aminoácido Ala²⁵ e Leu²⁸ com o fosfolipídio DPPE¹⁷⁹. (B) Pa-MAP 1.9, em destaque as principais interações entre os resíduos de aminoácido Thr²⁸ com o fosfolipídio DPPE¹¹¹, Lys¹⁸ com o fosfolipídio DPPE¹⁰³ e Thr¹⁷ com o fosfolipídio DPPG¹⁹³. (C) Modelo teórico tridimensional da sobreposição dos peptídeos Pa-MAP 1.5 (azul) e Pa-MAP 1.9 (rosa) sobre a membrana mimética. As figuras foram geradas utilizando-se o programa PyMOL.

6. DISCUSSÃO

A resistência microbiana é reconhecidamente um dos maiores problemas para a saúde humana ao redor do mundo (Walker et al., 2009). Quase 2 milhões de americanos desenvolvem infecções adquiridas após a admissão em hospitais, conhecidas como infecção hospitalar (IH), resultando em 99.000 mortes por ano (Klevens et al., 2007).

Em países da América Latina, a frequência das infecções de *K. pneumoniae* é maior quando comparada a dos países desenvolvidos, particularmente quanto de bacilos Gram-negativos (Gales et al., 2012). Em 2011, *Klebsiella* spp. foi o patógeno mais frequentemente isolado de pacientes com infecções de corrente sanguínea nos hospitais brasileiros (Marra et al., 2011). Algumas bactérias do gênero *Klebsiella* mostraram-se altamente resistentes aos antibióticos. Quando as bactérias, tais como *K. pneumoniae* são capazes de produzir uma enzima conhecida como uma carbapenemase a classe de antibióticos chamados carbapenemas não funciona para matar as bactérias e tratar a infecção. O gênero *Klebsiella* é apenas um exemplo de uma *Enterobacteriaceae*, uma parte normal das bactérias do intestino humano, que podem tornar-se resistentes ao carbapenem.

Devido a todos esses fatos é iminente a necessidade de se criar novas possibilidades de combate aos microrganismos resistentes. O passo limitante no desenvolvimento de novos antibióticos não é propriamente a identificação de novos antimicrobianos, como por exemplo, peptídeos ou compostos secundários, pois grande número de moléculas antibióticas em potencial é conhecido. O fator limitante é a identificação de novas moléculas antibióticas que sejam eficientes contra os microrganismos e permaneçam não-tóxicas para o paciente. Novas técnicas de triagem e tecnologias são criticamente necessárias para facilitar a descoberta dessas moléculas. Tais tecnologias podem incluir o uso de tecnologia de ponta em bioinformática, o melhoramento de imagem em espectroscopia e técnicas moleculares para identificar de forma mais apurada e rápida, o modo específico com que cada componente interage com as membranas de microrganismos.

Nesse contexto, peptídeos com múltiplas funções vêm sendo classificados como bastante atraentes para o controle eficiente dos episódios de resistência de microrganismos, principalmente porque, de um modo geral, eles mostram baixos efeitos tóxicos em células de mamíferos (Hilpert et al., 2005). No presente trabalho, avaliou-se o efeito antimicrobiano de dois peptídeos ricos em alanina, desenhados a partir de um peptídeo denominado AFP, isolado do peixe polar *P. americanus* (Holmberg et al., 1994). De acordo com o esperado, os resultados demonstraram que tais peptídeos possuem atividade inibitória sobre o crescimento de *K. pneumoniae*.

O Peptídeo Pa-MAP 1.9 apresentou uma inibição de 100% da atividade microbiana a uma concentração de 64 μ g, enquanto o outro o peptídeo Pa-MAP 1.5 respondeu de uma forma mais discreta, necessitando de doses consideravelmente maiores que seu análogo, com uma concentração mínima inibitória de 512 μ g. O que chama atenção aqui não é o valor da CIM encontrada, mas sim o fato desses peptídeos inibirem o crescimento de forma diferenciada dos antibióticos convencionais, pois é capaz de inibir uma cepa bacteriana que possui o seu mecanismo de resistência ligada ao plasmídeo, logo cada vez mais bactérias podem vir a adquirir tal mecanismo de resistência (Kumar et al., 2011).

Ludovico e colaboradores (2012) caracterizaram, estrutural e funcionalmente o primeiro peptídeo análogo polialanina, nomeado Pa-MAP, derivado de *P.americanus*. Análises *in silico* evidenciaram que este peptídeo adotava uma conformação parcial em α -hélice quando em meio aquoso, e uma conformação total também em α -hélice, na presença de TFE e SDS. Pa-MAP demonstrou atividade contra diversos alvos, como células tumorais, bactérias, vírus e fungos. Complementarmente, Pa-MAP não demonstrou citotoxicidade contra células de mamíferos, despontando como um candidato em potencial contra microrganismos patogênicos, e apontando um caminho para o desenho racional de fármacos com estabilidade estrutural e atividade contra diversos patógenos.

De modo semelhante aos peptídeos trabalhados aqui, sintéticos, desenhados a partir de outro peptídeo, com carga catiônica Bartlett e

colaboradores avaliaram um peptídeo catiônico análogo sintetizado a partir da sequência do peptídeo catelecidinas de mamíferos. Este também foi testado contra *K. pneumoniae* ATCC 43816 e foi observado CIM de 6,25µg/mL (Bartlett et al., 2003). Outro trabalho muito interessante, mostrou 7 peptídeos catiônicos e sintéticos que consistiam exclusivamente de arginina e triptofano, com alta atividade antimicrobiana contra bactérias multirresistentes. Nesse estudo, a região do peptídeo que interage com a membrana do hospedeiro, chamada de unidade básica Lítica (LBU), dos peptídeos catiônicos sintéticos foi previamente caracterizada, de 12 a 48 resíduos, demonstrando uma máxima seletividade pela membrana bacteriana. Posteriormente, inserções de triptofano na sequência de LBU aumentaram a atividade contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A partir de então, foram desenvolvidos 7 peptídeos análogos, compostos apenas por arginina e triptofano, arranjada de forma a otimizar as hélices anfipáticas. A mudança maximizou a atividade antimicrobiana desses peptídeos contra as bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Deslouches et al., 2013).

No caso dos peptídeos aqui estudados, o primeiro análogo desenhado, intitulado Pa-MAP, demonstrou atividade contra *E.coli* a uma concentração de 30µM, provando que após as modificações sofridas na segunda geração desses peptídeos, houve uma melhora significativa de atividade antimicrobiana, aumentando ainda mais com os peptídeos de segunda geração Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 que demonstraram atividade de 3,2µM e 6µM, respectivamente contra a mesma bactéria.

A maioria dos PAMs é catiônica, hidrofóbica e atuam na membrana plasmática, lizando as células-alvo, e levando-as conseqüentemente à morte. Entretanto alguns desses peptídeos possuem outros mecanismos de ação, como promover a hidrólise da parede celular das bactérias (Lemeshko, 2014). A anfipaticidade reflete tanto a abundância quanto a 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 et al., 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 (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 caso de Pa-MAP1,5 e 1,9 características da sequência (presença de muitos resíduos de alaninas), estrutura em α -hélice, ter em sua composição resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como leucina e treonina, os transforma em peptídeos anfipáticos, tendo como potencial a interação com vários tipos de membranas.

Uma considerável parcela de estudos tem sido feito com base nas propriedades disruptivas dos peptídeos catiônicos e anfipáticos nas membranas celulares (Gottler and Ramamoorthy, 2009; Oeemig et al., 2012; Romo et al., 2011), porém é importante destacar que existem vários peptídeos que possuem mecanismos de ação alternativos, que requerem o acesso ao meio intracelular, para que uma vez lá, eles interfiram nos processos metabólicos (Brogden, 2005; Hale and Hancock, 2007), Um desses peptídeos é a buforina II derivado de um sapo asiático *Bufo gargarizans*, que é capaz de penetrar na célula, inibindo suas funções celulares (Park et al., 1998).

Um estudo comparou um análogo da buforina II, que não possui seu mecanismo de ação de interação peptídeo-ácido nucléico bem resolvido, com um análogo de magainina 2, um peptídeo anfipático catiônico com sua propriedade disruptiva de membrana bem caracterizada. O objetivo do trabalho era saber qual seria a diferença de conformação que tais análogos adotariam quando na presença de uma membrana lipídica aniônica. Os resultados demonstraram que os dois peptídeos modificados, se comportam de forma muito diferente frente à membrana citoplasmática aniônica, o análogo de magainina 2, a conformação adotada pelo análogo de buforina II não é predominantemente em α -hélice, o que o torna um candidato fraco à penetração na membrana plasmática, mas uma vez dentro da célula, possui uma interação melhor com o ácido-nucléico devido a sua conformação, enquanto o análogo de magainina 2 possui sua conformação predominantemente em α -hélice, o

que o torna um excelente disruptor de membranas, provocando a lise da célula (Lan et al., 2010). Similarmente aos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, ambos os peptídeos após as modificações estruturais aumentaram sua atividade em relação ao peptídeo original.

A capacidade antimicrobiana, bem como a atividade citolítica dos peptídeos são determinadas pela complexa interação entre todos os seus parâmetros estruturais (figura 5), tais como cationicidade, hidrofobicidade, capacidade de adotar a forma de α -hélice anfipática e etc. (Yeaman and Yount, 2003). A comparação e a compreensão desses parâmetros podem auxiliar no desenho de novos antibióticos, suprimindo a urgente necessidade de novos fármacos para combater cepas de microrganismos resistentes.

Uma das grandes dificuldades em se utilizar um peptídeo como antimicrobiano comercial é sua toxicidade frente às células de mamíferos (Hilpert and Hancock, 2007). No presente estudo, foi realizado um teste de viabilidade de células de mamífero RAW 264.7. Este estudo revelou um alto grau de citotoxicidade dos peptídeos separados, porém não foi observada diferença significativa na citotoxicidade celular entre o grupo de peptídeos combinados em relação ao controle positivo em 24 e 72h, o que evidencia seletividade frente a células de mamíferos, e preferência destes peptídeos em combinação a membrana aniônica da bactéria Gram-negativa. Estes resultados sugerem que o uso sinérgico dos peptídeos em baixa concentração, mantendo a atividade antimicrobiana, e com baixa atividade citotóxica frente à célula de mamíferos, poderão ser potenciais candidatos para o uso como um modelo para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos ativos contra microrganismos patogênicos.

Essa citotoxicidade pode ser explicada pelo alto grau de helicidade e/ou anfipaticidade dos peptídeos, que geram um domínio hidrofóbico bem segregado, e está diretamente relacionado a um aumento da toxicidade frente às células compostas por fosfolipídios neutros (Dathe and Wieprecht, 1999; Yeaman and Yount, 2003). Porém, outros estudos de mecanismo de ação são necessários para se compreender melhor os motivos da diferença entre a citotoxicidade dos peptídeos isolados em relação à ação combinada.

Uma vez constatadas as concentrações mínimas inibitórias para ambos os peptídeos, foi realizada a avaliação do efeito combinado dos peptídeos, utilizando a técnica do tabuleiro de xadrez, a fim de verificar a condição sinérgica de duas moléculas combinadas. Esta metodologia, na maior parte dos casos pode revelar resultados muito promissores, que podem ser utilizados para fins farmacológicos, ou para ajudar na compreensão dos mecanismos de associação dos peptídeos (Beckloff et al., 2007; Fiamegos et al., 2011; Giacometti et al., 2006; Schmelcher et al., 2012; Wei et al., 2007).

Nossos resultados (tabela 2), demonstraram efeito sinérgico em todas as 30 combinações testadas, e apenas 5 dessas combinações apresentaram valor de inibição inferior a 100% contra *K. pneumoniae*. Vale destacar também que a concentração inibitória mínima dos peptídeos combinados diminuiu substancialmente quando comparado ao valor da CIM dos peptídeos isolados, chegando a um valor 16 vezes menor quando comparado ao peptídeo Pa-MAP 1.9, e 128 vezes menor quando comparado ao peptídeo Pa-MAP 1.5 testado isoladamente. As razões para que exista uma diferença tão gritante entre os peptídeos testados isoladamente e em combinação podem ser muitas. Uma pequena variação na conformação pode modificar a estrutura, ou qualquer outro parâmetro estrutural, e fazer com que um peptídeo tenha uma interação otimizada com a membrana da bactéria.

A possibilidade de uma ação sinérgica entre os PAMs é uma expressão induzida pelo contato com determinados patógenos, possibilitando uma defesa mais eficaz contra um número maior desses organismos (Mor et al., 1994). Certamente, sinergismo entre diferentes antimicrobianos produzidos pelo mesmo organismo deve ocorrer na natureza, e existem alguns estudos de sinergismo ocorrendo entre proteínas co-expressadas em alguns peixes ou invertebrados. Em invertebrados, por exemplo, Gueguen e colaboradores (2011), utilizaram o método “tabuleiro de xadrez” para verificar a ação combinada entre defensinas recombinantes e fragmentos sintéticos de um PAM de 61 resíduos poliprolina, derivado da ostra, *C. gigas*. A combinação desses agentes aumentou a atividade contra *E. coli*. Também foi reportado o sinergismo entre tachycitina e defensina, dois PAMs convencionais, derivados de amebócitos do caranguejo-ferradura, *Tachypleus tridentatus*. Com uma

concentração de apenas $0,9\mu\text{g.mL}^{-1}$ a tachycitina reduziu o IC_{50} da defensina de $0,9\mu\text{g.mL}^{-1}$ para $0,015\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Kawabata et al., 1996).

Outro exemplo de sinergismo entre dois peptídeos é entre a magainina 2 e PGLa, um dos primeiro peptídeos isolados da pele de anfíbios. Como ambos apresentam o mesmo mecanismo de ação, que é de perturbação da membrana plasmática, quando em combinação a ação se torna mais rápida e mais intensa, levando a lise das células bacterianas em pouco tempo. A atividade, porém, mostrou-se menor quando MAG2 amidado (um análogo da magainina 2) foi colocado em combinação com PGLa (Ueno et al., 2010). Interações sinérgicas foram demonstradas também em liberação induzida do controle respiratório e redução da motilidade em hamsters (de Waal et al., 1991), permeabilização de membrana (Vaz Gomes et al., 1993), permeabilização de lipossomas, efeitos tóxicos em células tumorais, dissipação do potencial de membrana e atividade antimicrobiana (Westerhoff et al., 1995).

Yan e Hancock (2001) demonstraram o efeito sinérgico em quatro peptídeos diferentes encontrados em mamíferos (protegrina 1, LL-37, bactenecina e indolecidina) contra quatro diferentes patógenos, sendo eles *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) e *Enterococcus faecalis*, além disto, os autores demonstraram a atividade sinérgica entre estes peptídeos e a proteína de defesa inata, lisozima. Os autores observaram atividade sinérgica em varias combinações dos peptídeos avaliados. Para *P. aeruginosa* três das seis combinações apresentaram efeito sinérgico, enquanto para *E. coli* quatro das seis combinações apresentaram tal efeito, e no caso de *E. faecalis* apenas duas tiveram êxito sendo por fim determinado que nenhuma combinação demonstrou atividade sinérgica para MRSA. Em relação à lisozima os autores observaram que há aumento da atividade antimicrobiana quando este peptídeo é utilizado de forma sinérgica com os peptídeos testados. Os autores concluíram que os dados desse trabalho refletem que há uma tendência a uma interação cooperativa dos peptídeos quando em um ambiente similar ao da membrana de bactérias Gram-negativas e/ou uma interação cooperativa dos peptídeos com os lipídios da bicamada em geral.

Vários outros autores tem apresentado resultados com moléculas em combinação, como a combinação do antibiótico enrofloxacin com quatro diferentes PAMs contra *Mycoplasma pulmonis*, conseguindo diminuir a CIM em todas as combinações, na mais bem sucedida houve uma diminuição de 16 vezes o valor original de CIM (Cirioni et al., 2008); ou o estudo que demonstrou *in vitro e in vivo* a ação combinada sinérgica entre o peptídeo criptidina 2 e o antibiótico Ampicilina contra *Salmonella sp.* No teste *in vitro*, foi observado um decréscimo na contagem de UFC/mL, e também uma diminuição no tempo de ação para a morte da bactéria, no ensaio *in vivo*, após a necropsia observou-se também uma diminuição em todos os órgãos dos camundongos infectados com a bactéria (Rishi et al., 2011).

Um estudo apresentou uma proposta diferente, pois ao invés de usar peptídeos combinados utilizou PAM α -helicoidal – cecropina, e rifampicina contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Como os PAM em geral têm influência sobre a permeabilidade da membrana, a tentativa de obter sinergismo com um antimicrobiano convencional, que tenha um sítio específico internamente a esta membrana, pode alcançar resultados promissores. O referido estudo abriu precedente para uma série de testes de combinações sinérgicas entre PAM e antimicrobianos convencionais (Cirioni et al., 2008).

Desta forma, o uso de peptídeos com atividades sinérgicas torna-se uma importante ferramenta no desenvolvimento de fármacos. O efeito sinérgico em peptídeos é relacionado a diversos fatos, dentre eles a expressão aumentada de alguns peptídeos em circunstâncias chave, a presença de peptídeos com espectros de atividades que podem agir “cobrindo” as falhas de outros peptídeos e a observação de peptídeos com atividades complementares para redução do desenvolvimento microbiano (Yan e Hancock, 2001).

O uso de peptídeos tem se mostrado uma excelente estratégia para o desenvolvimento de fármacos biocidas devido a sua alta e múltipla atividade antimicrobiana. Um dos maiores problemas enfrentados no desenvolvimento de fármacos a partir de peptídeos antimicrobianos é a instabilidade destas moléculas ao entrar em contato com o metabolismo humano, diminui consideravelmente sua atividade *in vivo* (Chongsirawatana, 2011). No entanto,

peptídeos antimicrobianos apresentam mecanismos de ação diferenciados e muitas vezes complementares que podem atuar no sentido de inibir o desenvolvimento microbiano e evitar os mecanismos de resistência de diversos patógenos (Yeman e Yount, 2003).

Em virtude da complexidade das células animais e da interação entre diversos agentes que atuam sobre o corpo humano, o uso de modelos animais não pode hoje ser substituído por qualquer outro recurso biotecnológico e é extremamente necessário na busca do desenvolvimento de novos tratamentos para diversas doenças, dentre elas, aquelas causadas por microrganismos. Os testes *in vivo*, reforçam ou invalidam os testes realizados *in vitro*, porém desde a descoberta das sulfonamidas ficou provado que alguns agentes, mesmo não apresentando atividade *in vitro* pode se apresentar como um eficaz antibiótico *in vivo* (Northey et al., 1948).

Os resultados do estudo *in vivo* no presente trabalho também indicaram uma melhor atividade quando na ação combinada dos peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, com uma diminuição no número de unidades formadoras de colônia, tanto no sangue quanto no pulmão, quando comparados com os efeitos dos peptídeos utilizados isoladamente. Através deste estudo foi possível constatar que o uso combinado dos peptídeos não só potencializa o efeito, como também reduziu o número de UFCs no pulmão, em mais de 50% na dosagem mais baixa ($9/1\text{mg.Kg}^{-1}$ de Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, respectivamente) e em mais de 80% nas dosagens mais altas, quando analisamos o sangue essa diminuição é ainda mais preponderante.

Ainda nesse estudo, a concentração maior utilizada em combinação foi capaz de eliminar completamente as colônias de bactérias presentes no sangue, enquanto que na análise de sangue do peptídeo isolado Pa-MAP 1.5, utilizando a mesma concentração, não foi observado diferença significativa no número de UFC de bactérias no sangue em relação ao controle de camundongos não tratados. A eficiência terapêutica dos peptídeos combinados também pode ser associada à sua estratégia de penetração nas barreiras da membrana fosfolipídica, que podem apresentar muitos modos de ação distintos (Yeaman and Yount, 2003; Zasloff, 2002). Não obstante, eles compartilham

várias características, como seu pequeno tamanho e a sua cationicidade, possuem uma forte interação com membranas lipídicas e carga que normalmente são de 4+ ou 5+ (Hancock, 1997). Esses valores podem ser explicados devido à alta taxa de resíduos de aminoácidos como alanina e lisina, que contribuem para um aumento das taxas de interações eletrostáticas, demonstrado nos peptídeos com cargas de +6 e +4 e a taxa de hidrofobicidade, em torno de 70% para ambos os peptídeos (Migliolo et al., 2012).

Muitos mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos já foram propostos até hoje, porém a maioria dos peptídeos utiliza a ruptura da membrana como principal modo de ação e passam por uma sequência de eventos envolvendo: (i) atração eletrostática das cargas positivas do peptídeo com as cargas negativas da membrana do microrganismo; (ii) desestabilização e desorganização da bicamada fosfolipídica negativamente carregada para a ruptura da integridade da membrana microbiana; (iii) subsequente permeabilização da membrana e (iv) morte da célula por hemólise (Powers and Hancock, 2003).

Atualmente, o planejamento racional baseado em estrutura é a metodologia mais eficiente e menos dispendiosa para o desenvolvimento de novos fármacos, capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos, sua otimização (com melhoramento da afinidade, especificidade, eficácia e efeitos colaterais), até a elaboração de compostos candidatos à testes clínicos (Reddy and Zhang, 2013). Informações estruturais dos bioreceptores de membrana e ligantes (peptídeo-membrana), permitem um direcionamento da síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação, os quais podem vir a se tornar potentes fármacos. Essa abordagem, em sua essência, caracteriza o planejamento racional de fármacos baseado em estrutura (Cavasotto and Phatak, 2009).

Para os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 foram propostos modelos tridimensionais teóricos por meio de modelagem molecular, para ambos os peptídeos os resultados mostraram uma estrutura secundária em α -hélice rica

em alanina, com resíduos hidrofóbicos Ala⁶ e Leu¹⁰ (Pa-MAP 1.5), Ala²⁷ e Thr²⁴ (Pa-MAP 1.9), e catiônicos distribuídos por toda a estrutura dos peptídeos, tornando-os moléculas anfipáticas e capazes de interagirem entre si, bem como com a membrana fosfolipídica de bactérias Gram-negativas. Um estudo similar mostrou a análise, por modelagem molecular, de um peptídeo antimicrobiano Cm-p1 assumindo uma conformação em α -hélice, causada pela exposição dos resíduos catiônicos de arginina e histidina, que provavelmente favoreceram uma interação peptídeo-membrana (Lopez-Abarrategui et al., 2012).

Entre os métodos mais empregados em bioinformática, encontra-se o *docking* molecular. Com essa metodologia são investigadas as possíveis interações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante de um bioreceptor, ou simplesmente entre duas moléculas, tal como é o caso da interação sinérgica entre dois peptídeos ou a interação peptídeo-membrana alvo. O principal foco do *docking* molecular é simular computacionalmente o processo de reconhecimento molecular. O objetivo do *docking* é atingir uma orientação e uma conformação otimizada tanto para o ligante e a proteína tal que a energia do complexo seja a mínima (Kitchen et al., 2004).

Em modelagem molecular, “*docking*” é o método que define a orientação preferencial de uma molécula com respeito à outra na formação de complexos estáveis, por exemplo enzima-inibidor ou proteína-ligante. O conhecimento da orientação preferencial, por sua vez, pode ser utilizado para prever a afinidade de ligação entre duas moléculas (Lengauer et al., 2004). O *docking* é frequentemente usado para prever o modo de ligação de compostos a proteínas-alvo, validando suas afinidades relativas. O *docking* desempenha um papel importante no planejamento racional de fármacos baseado em estrutura (Kitchen et al., 2004).

Uma das características mais valiosas dos métodos de *docking* é a sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, funcionando até como uma forma de validação dos mesmos (Verdonk et al., 2003).

O acoplamento molecular, ou *docking*, revelou que os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 fazem interação hidrofóbica com afinidade de -4.9kcal.mol^{-1} , e a docagem do complexo Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9 interagem com a membrana aniônica por ligação do tipo ponte de hidrogênio, e apresenta uma taxa de afinidade de $-12.8\text{kcal.mol}^{-1}$. É interessante destacar que a afinidade encontrada com os peptídeos combinados é muito superior à afinidade dos peptídeos quando isolados, o que demonstra que esses peptídeos possuem uma tendência melhorada de interação com a membrana quando se encontram em sinergismo. Estes dados corroboram com os resultados apresentados *in vitro* e *in vivo*, onde as melhores taxas de inibição ocorrem quando os peptídeos estão combinados, e ainda aponta uma preferência frente à membrana aniônica, uma vez que apresentam alta afinidade com esta, e um nível de citotoxicidade baixo quando colocados em presença da célula RAW 264.7.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O presente estudo revelou que os dois peptídeos análogos, Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, possuem atividade antimicrobiana *in vitro* contra a bactéria Gram negativa *K. pneumoniae*, com concentrações inibitórias mínimas de 512 μ g e 64 μ g, respectivamente.
- Os peptídeos em questão possuem ação sinérgica em todas as concentrações testadas, e apresentam uma inibição de 100% de inibição bacteriana, quando combinados a uma concentração de 4/4 μ g.mL⁻¹.
- Os peptídeos combinados demonstraram uma inibição de 100% e 89% do crescimento bacteriano medido no pulmão e sangue dos camundongos, demonstrando, portanto, *in vivo* um maior efeito antimicrobiano dos peptídeos combinados em comparação com a atividade dos peptídeos testados isoladamente.
- Possuem atividade citotóxica relativamente alta quando testadas isoladamente contra células Raw 264.7, porém não apresentam citotoxicidade relevante quando testadas em sinergismo na concentração inibitória mínima.
- O modelo molecular tridimensional prediz uma estrutura em α -hélice catiônica e anfipática.
- O acoplamento molecular demonstrou uma alta afinidade dos peptídeos combinados, em relação à membrana aniônica Gram-negativa, o que corrobora com os resultados experimentais *in vitro* e *in vivo*.
- Como perspectiva futura será feito o ensaio de citocinas, para a avaliação de uma possível atividade imunomodulatória; experimentos *in silico* de dicroísmo circular e DLS, a fim de validar as estruturas preditas nesse estudo; estudos sobre os mecanismos de ação dos peptídeos isolados e em combinação.

- Em resumo, os dados apresentados neste estudo apontam que há atividade sinérgica entre os peptídeos Pa-MAP 1.5 e Pa-MAP 1.9, e que esta por sua vez aumenta substancialmente a atividade antimicrobiana dos peptídeos, seja *in vitro* ou *in vivo*. Podemos afirmar ainda que os peptídeos combinados apresentam alta afinidade com membrana aniônica. Porém estudos complementares de imunomodulação e estruturais se fazem necessários, para que se possa caracterizar de forma mais completa tais peptídeos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <IFPMA_A_Industria_Farmaceutica_e_a_Saude_Global_2011.pdf>.
- Ahmad, Z., Okafor, F., Azim, S., and Laughlin, T.F. (2013). ATP synthase: a molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides. *Current medicinal chemistry* 20, 1956-1973.
- Al-Mariri, A., and Safi, M. (2014). In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *Iranian journal of medical sciences* 39, 36-43.
- Alba, A., Lopez-Abarrategui, C., and Otero-Gonzalez, A.J. (2012). Host defense peptides: an alternative as antiinfective and immunomodulatory therapeutics. *Biopolymers* 98, 251-267.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Andreu, D., Merrifield, R.B., Steiner, H., and Boman, H.G. (1985). N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. *Biochemistry* 24, 1683-1688.
- Augustyniak, D., Nowak, J., and Lundy, F.T. (2012). Direct and Indirect Antimicrobial Activities of Neuropeptides and their Therapeutic Potential. *Current Protein & Peptide Science* 13, 723-738.
- Ausbacher, D., Svineng, G., Hansen, T., and Strom, M.B. (2012). Anticancer mechanisms of action of two small amphipathic beta(2,2)-amino acid derivatives derived from antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1818, 2917-2925.
- Azevedo Calderon, L., Silva Ade, A., Ciancaglini, P., and Stabeli, R.G. (2011). Antimicrobial peptides from Phyllomedusa frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino acids* 40, 29-49.
- B, C.D., Meena, D.K., Behera, B.K., Das, P., Das Mohapatra, P.K., and Sharma, A.P. (2014). Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish physiology and biochemistry*. 1764, 2378-2384.
- Ball, M.M., Gomez, W., Magallanes, X., Rosales, R., Melfo, A., and Yarzabal, L.A. (2013). Bacteria recovered from a high-altitude, tropical glacier in Venezuelan Andes. *World journal of microbiology & biotechnology*. 43, 1767-1776.
- Bartlett, K.H., McCray, P.B., and Thorne, P.S. (2003). Novispirin G10-Induced Lung Toxicity in a Klebsiella pneumoniae Infection Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 3901-3906.
- Baysari, M.T., Oliver, K., Egan, B., Li, L., Richardson, K., Sandaradura, I., Westbrook, J.I., and Day, R.O. (2013). Audit and Feedback of Antibiotic Use: Utilising electronic prescription data. *Applied clinical informatics* 4, 583-595.
- Bechinger, B. (2001). Membrane insertion and orientation of polyalanine peptides: a ¹⁵N solid-state NMR spectroscopy investigation. *Biophysical journal* 81, 2251-2256.
- Becker, K., Kriegeskorte, A., Sunderkotter, C., Loffler, B., and von Eiff, C. (2014). Persistent and recurrent skin and soft tissue infections by Staphylococcus aureus : Impact of the small colony-variant (SCV) phenotype and of Pantón-Valentine leukocidin (PVL)-positive S. aureus isolates. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 65, 15-25.
- Beckloff, N., Laube, D., Castro, T., Furgang, D., Park, S., Perlin, D., Clements, D., Tang, H., Scott, R.W., Tew, G.N., et al. (2007). Activity of an Antimicrobial Peptide Mimetic against Planktonic and Biofilm Cultures of Oral Pathogens[†]. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 4125-4132.
- Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of antibiotics* 65, 385-395.

- Berglund, B., Khan, G.A., Weisner, S.E., Ehde, P.M., Fick, J., and Lindgren, P.E. (2014). Efficient removal of antibiotics in surface-flow constructed wetlands, with no observed impact on antibiotic resistance genes. *The Science of the total environment* **476-477C**, 29-37.
- Bourque, c. (2009). Nossa capa: Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **45**, I-I.
- Boyton, R.J., and Openshaw, P.J. (2002). Pulmonary defences to acute respiratory infection. *Br Med Bull* **61**, 1-12.
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., and Grimont, P. (2009). Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *PLoS one* **4**.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews Microbiology* **3**, 238-250.
- Brogden, N.K., and Brogden, K.A. (2011). Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International journal of antimicrobial agents* **8**, 765-780.
- Broug-Holub, E., Toews, G.B., van Iwaarden, J.F., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Paine, R., 3rd, and Standiford, T.J. (1997). Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect Immun* **65**, 1139-1146.
- Brown, A.N., Smith, K., Samuels, T.A., Lu, J., Obare, S.O., and Scott, M.E. (2012). Nanoparticles Functionalized with Ampicillin Destroy Multiple-Antibiotic-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology* **78**, 2768-2774.
- Caffrey, M., Li, D., and Dukkupati, A. (2012). Membrane protein structure determination using crystallography and lipidic mesophases: recent advances and successes. *Biochemistry* **51**, 6266-6288.
- Carvalho, F.C., Sousa, O.V., Carvalho, E.M., Hofer, E., and Vieira, R.H. (2013). Antibiotic Resistance of *Salmonella* spp. Isolated from Shrimp Farming Freshwater Environment in Northeast Region of Brazil. *Journal of pathogens* **2013**, 685193.
- Cassone, M., and Otvos, L., Jr. (2010). Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**, 703-716.
- Cavasotto, C.N., and Phatak, S.S. (2009). Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug discovery today* **14**, 676-683.
- Chen, H.C., Brown, J.H., Morell, J.L., and Huang, C.M. (1988). Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS letters* **236**, 462-466.
- Chen, Y., Mant, C.T., Farmer, S.W., Hancock, R.E., Vasil, M.L., and Hodges, R.S. (2005). Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *The Journal of biological chemistry* **280**, 12316-12329.
- Cherkasov, A., Hilpert, K., Jenssen, H., Fjell, C.D., Waldbrook, M., Mullaly, S.C., Volkmer, R., and Hancock, R.E. (2009). Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. *ACS Chem Biol* **4**, 65-74.
- Christensen, B. (1988). Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Biophysics* **85**, 5072-5076.
- Cirioni, O., Silvestri, C., Ghiselli, R., Orlando, F., Riva, A., Mocchegiani, F., Chiodi, L., Castelletti, S., Gabrielli, E., Saba, V., *et al.* (2008). Protective effects of the combination of alpha-helical antimicrobial peptides and rifampicin in three rat models of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **62**, 1332-1338.
- Claud, E.C., Keegan, K.P., Brulc, J.M., Lu, L., Bartels, D., Glass, E., Chang, E.B., Meyer, F., and Antonopoulos, D.A. (2013). Bacterial community structure and functional contributions to emergence of health or necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome* **1**, 20.

- Conlon, J.M. (2011). Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 2303-2315.
- Conlon, J.M., Al-Ghaferi, N., Abraham, B., and Leprince, J. (2007). Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods . Microbiome* 42, 349-357.
- Cui, R., and Zhou, L. (2014). *Helicobacter pylori* infection: an overview in 2013, focus on therapy. *Chinese medical journal* 127, 568-573.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., and Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *Federation of European Biochemical Societies letters* 501, 146-150.
- Dathe, M., and Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et biophysica acta* 1462, 71-87.
- de Tejada, G.M., Sanchez-Gomez, S., Kowalski, I., Kaconis, Y., Andra, J., Schurholz, T., Hornef, M., Dupont, A., Garidel, P., Gutschmann, T., *et al.* (2012). Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines. *Current drug targets* 13, 1121-1130.
- de Waal, A., Vaz Gomes, A., Mensink, A., Grootegoed, J.A., and Westerhoff, H.V. (1991). Magainins affect respiratory control, membrane potential and motility of hamster spermatozoa. *Federation of European Biochemical Societies letters* 293, 219-223.
- Deslouches, B., Steckbeck, J.D., Craigo, J.K., Doi, Y., Mietzner, T.A., and Montelaro, R.C. (2013). Rational Design of Engineered Cationic Antimicrobial Peptides Consisting Exclusively of Arginine and Tryptophan, and Their Activity against Multidrug-Resistant Pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57, 2511-2521.
- Dezfuli, B.S., Pironi, F., Giari, L., and Noga, E.J. (2010). Immunocytochemical localization of piscidin in mast cells of infected seabass gill. *Fish & shellfish immunology* 28, 476-482.
- Dzeja, P., and Terzic, A. (2009). Adenylate Kinase and AMP Signaling Networks: Metabolic Monitoring, Signal Communication and Body Energy Sensing. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 1729-1772.
- Eisele, N.A., and Anderson, D.M. (2011). Host Defense and the Airway Epithelium: Frontline Responses That Protect against Bacterial Invasion and Pneumonia. *Journal of Pathology* 2011, 249802.
- Eisenberg, D., Weiss, R.M., and Terwilliger, T.C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 140-144.
- Elgar, D. (2006). Cysteine-free peptides in scorpion venom: geographical distribution, structure-function relationship and mode of action. *African Journal of Biotechnology* 5, 2495-2502.
- Engelman, D.M., Steitz, T.A., and Goldman, A. (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 15, 321-353.
- Fadli, M., Chevalier, J., Hassani, L., Mezrioui, N.E., and Pages, J.M. (2014). Natural extracts stimulate membrane-associated mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria. *Letters in applied microbiology* 27, 765-789.
- Falco, A., Brocal, I., Perez, L., Coll, J.M., Estepa, A., and Tafalla, C. (2008). In vivo modulation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response by the human alpha defensin 1, HNP1. *Fish & shellfish immunology* 24, 102-112.
- Fernandez, L., Arroyo, R., Espinosa, I., Marin, M., Jimenez, E., and Rodriguez, J.M. (2014). Probiotics for human lactational mastitis. *Beneficial microbes* 7, 1-15.
- Fiamegos, Y.C., Kastiris, P.L., Exarchou, V., Han, H., Bonvin, A., Vervoort, J., Lewis, K., Hamblin, M.R., and Tegos, G.P. (2011). Antimicrobial and Efflux Pump Inhibitory Activity of

Caffeoylquinic Acids from *Artemisia absinthium* against Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *PloS one* 6.

Furuya, E.Y., and Lowy, F.D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature reviews Microbiology* 4, 36-45.

Gales, A.C., Castanheira, M., Jones, R.N., and Sader, H.S. (2012). Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic microbiology and infectious disease* 73, 354-360.

Gaspar, D., Veiga, A.S., and Castanho, M.A. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in microbiology* 4, 294.

Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G., and Shai, Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34, 11479-11488.

Gee, M.L., Burton, M., Grevis-James, A., Hossain, M.A., McArthur, S., Palombo, E.A., Wade, J.D., and Clayton, A.H. (2013). Imaging the action of antimicrobial peptides on living bacterial cells. *Scientific reports* 3, 1557.

Giacometti, A., Cirioni, O., Ghiselli, R., Mocchegiani, F., Orlando, F., Silvestri, C., Bozzi, A., Di Giulio, A., Luzi, C., Mangoni, M.L., *et al.* (2006). Interaction of Antimicrobial Peptide Temporin L with Lipopolysaccharide In Vitro and in Experimental Rat Models of Septic Shock Caused by Gram-Negative Bacteria†. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 2478-2486.

Giamarellou, H., Galani, L., Baziaka, F., and Karaiskos, I. (2013). Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57, 2388-2390.

Gordon, Y.J. (2005). A review of Antimicrobial Peptides and Their therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs<gordon 2005.pdf>. *National Institute of Health* 30, 505-515.

Gottler, L.M., and Ramamoorthy, A. (2009). Structure, Membrane Orientation, Mechanism, and Function of Pexiganan - A Highly Potent Antimicrobial Peptide Designed From Magainin. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 1680-1686.

Hale, J.D., and Hancock, R.E. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert review of anti-infective therapy* 5, 951-959.

Hancock, R. (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 1317-1323.

Hancock, R.E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet* 349, 418-422.

Hancock, R.E., and Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 16, 82-88.

Hancock, R.E., and Sahl, H.G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* 24, 1551-1557.

Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase--an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development* 25, 1895-1908.

Hilpert, K., and Hancock, R.E. (2007). Use of luminescent bacteria for rapid screening and characterization of short cationic antimicrobial peptides synthesized on cellulose using peptide array technology. *Nature protocols* 2, 1652-1660.

Hilpert, K., Volkmer-Engert, R., Walter, T., and Hancock, R.E. (2005). High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nature biotechnology* 23, 1008-1012.

Holmberg, N., Lilius, G., and Bulow, L. (1994). Artificial antifreeze proteins can improve NaCl tolerance when expressed in *E. coli*. *Federation of European Biochemical Societies letters* 349, 354-358.

Jang, S.A., Kim, H., Lee, J.Y., Shin, J.R., Kim da, J., Cho, J.H., and Kim, S.C. (2012). Mechanism of action and specificity of antimicrobial peptides designed based on buforin IIb. *Peptides* 34, 283-289.

Jiang, W., Zhou, Z., Zhang, K., and Yu, Y. (2013). Epidemiological investigation of community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Genetics and molecular research* : 12, 6923-6930.

- Kagan, B.L., Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1994). Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* **87**, 131-149.
- Kelly, L., Pieper, U., Eswar, N., Hays, F.A., Li, M., Roe-Zurz, Z., Kroetz, D.L., Giacomini, K.M., Stroud, R.M., and Sali, A. (2009). A survey of integral alpha-helical membrane proteins. *Journal of structural and functional genomics* **10**, 269-280.
- Kim, Y.S., and Cha, H.J. (2010). Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. *Biotechnology and bioengineering* **107**, 216-223.
- Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., and Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery* **3**, 935-949.
- Klevens, R.M., Edwards, J.R., Richards, C.L., Jr., Horan, T.C., Gaynes, R.P., Pollock, D.A., and Cardo, D.M. (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public health reports (Washington, DC : 1974)* **122**, 160-166.
- Korting, H.C., Schollmann, C., Stauss-Grabo, M., and Schafer-Korting, M. (2012). Antimicrobial peptides and skin: a paradigm of translational medicine. *Skin pharmacology and physiology* **25**, 323-334.
- Kruse, T., and Kristensen, H.H. (2008). Using antimicrobial host defense peptides as anti-infective and immunomodulatory agents. *Expert review of anti-infective therapy* **6**, 887-895.
- Kumar, V., Sun, P., Vamathevan, J., Li, Y., Ingraham, K., Palmer, L., Huang, J., and Brown, J.R. (2011). Comparative Genomics of *Klebsiella pneumoniae* Strains with Different Antibiotic Resistance Profiles[†]. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 4267-4276.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* **157**, 105-132.
- Lan, Y., Ye, Y., Kozłowska, J., Lam, J.K., Drake, A.F., and Mason, A.J. (2010). Structural contributions to the intracellular targeting strategies of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1798**, 1934-1943.
- Laskowski, R.A., Rullmann, J.A.C., MacArthur, M.W., Kaptein, R., and Thornton, J.M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular* **8**, 477-486.
- Lavigne, J.P., Cuzon, G., Combescure, C., Bourg, G., Sotto, A., and Nordmann, P. (2013). Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla KPC-2 carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. *PloS one* **8**, e67847.
- Lemeshko, V.V. (2014). Competitive interactions of amphipathic polycationic peptides and cationic fluorescent probes with lipid membrane: Experimental approaches and computational model. *Archives of biochemistry and biophysics*.
- Lengauer, T., Lemmen, C., Rarey, M., and Zimmermann, M. (2004). Novel technologies for virtual screening. *Drug discovery today* **9**, 27-34.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery* **12**, 371-387.
- Lin, Y., Li, Y., Zhu, N., Han, Y., Jiang, W., Wang, Y., Si, S., and Jiang, J. (2014). The anti-tuberculosis antibiotic capreomycin inhibits protein synthesis through disrupting interaction between ribosomal proteins L12 and L10. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.
- Lindsay, J.A. (2013). *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *International journal of medical microbiology* . **13**, 372-388.
- Liu, L., Fang, Y., and Wu, J. (2013). Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1828**, 2479-2486.
- Liu, L.P., and Deber, C.M. (1998). Uncoupling hydrophobicity and helicity in transmembrane segments. Alpha-helical propensities of the amino acids in non-polar environments. *The Journal of biological chemistry* **273**, 23645-23648.

- Liu, Y., Yang, Y., Zhao, F., Fan, X., Zhong, W., Qiao, D., and Cao, Y. (2013b). Multi-drug resistant gram-negative enteric bacteria isolated from flies at Chengdu Airport, China. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* *44*, 988-996.
- Lohner, K., Sevcsik, E., and Pabst, G. (2008). Liposome-Based Biomembrane Mimetic Systems: Implications for Lipid-Peptide Interactions. In *Advances in Planar Bilayers and Liposomes*, Federation of European Biochemical Societies letters *8*, 103-137.
- Lomize, A.L., Pogozheva, I.D., and Mosberg, H.I. (2011). Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes. *Journal of chemical information and modeling* *51*, 930-946.
- Lopez-Abarrategui, C., Alba, A., Silva, O.N., Reyes-Acosta, O., Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T., Migliolo, L., Costa, M.P., Costa, C.R., Silva, M.R., *et al.* (2012). Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimistry* *94*, 968-974.
- Lorin, A., Noel, M., Provencher, M.E., Turcotte, V., Cardinal, S., Lague, P., Voyer, N., and Auger, M. (2012). Determining the mode of action involved in the antimicrobial activity of synthetic peptides: a solid-state NMR and FTIR study. *Biophysical journal* *103*, 1470-1479.
- Mangoni, M.L. (2006). Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cellular and molecular life sciences* *63*, 1060-1069.
- Marahiel, H.D.M.a.M.A. (1997). The Tyrocidine Biosynthesis Operon of *Bacillus brevis*: Complete Nucleotide Sequence and Biochemical Characterization of Functional Internal Adenylation Domains. *Journal of Bacteriology* *179*, 6843-6850.
- March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Perez-Gutierrez, C., Tomas, J.M., Suarez, T., Garmendia, J., and Bengoechea, J.A. (2013). Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. *PloS one* *8*, 765-786.
- Marr, A.K., Gooderham, W.J., and Hancock, R.E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol* *6*, 468-472.
- Marra, A.R., Camargo, L.F., Pignatari, A.C., Sukiennik, T., Behar, P.R., Medeiros, E.A., Ribeiro, J., Girao, E., Correa, L., Guerra, C., *et al.* (2011). Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of clinical microbiology* *49*, 1866-1871.
- Martinez, M., Blondeau, J., Cerniglia, C.E., Fink-Gremmels, J., Guenther, S., Hunter, R.P., Li, X.Z., Papich, M., Silley, P., Soback, S., *et al.* (2014). Workshop report: The 2012 Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine: exploring the consequences of antimicrobial drug use: a 3-D approach. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* *37*, e1-e16.
- Maseda, E., Mensa, J., Valia, J.C., Gomez-Herrerias, J.I., Ramasco, F., Samsó, E., Chiveli, M.A., Pereira, J., Gonzalez, R., Aguilar, G., *et al.* (2013). Bugs, hosts and ICU environment: Countering pan-resistance in nosocomial microbiota and treating bacterial infections in the critical care setting. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia* *26*, 312-331.
- McCormick, T.S., and Weinberg, A. (2010). Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontology 2000* *54*, 195-206.
- Migliolo, L., Silva, O.N., Silva, P.A., Costa, M.P., Costa, C.R., Nolasco, D.O., Barbosa, J.A., Silva, M.R., Bemquerer, M.P., Lima, L.M., *et al.* (2012). Structural and functional characterization of a multifunctional alanine-rich peptide analogue from *Pleuronectes americanus*. *PloS one* *7*, 470-479.
- Mor, A., Hani, K., and Nicolas, P. (1994). The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *The Journal of biological chemistry* *269*, 31635-31641.
- Morton, C.O., Dos Santos, S.C., and Coote, P. (2007). An amphibian-derived, cationic, alpha-helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. *Molecular microbiology* *65*, 494-507.

- Mosca, A., Miragliotta, L., Del Prete, R., Tzakis, G., Dalfino, L., Bruno, F., Pagani, L., Migliavacca, R., Piazza, A., and Miragliotta, G. (2013). Rapid and sensitive detection of gene in clinical isolates of by a molecular real-time assay. *SpringerPlus* 2, 31.
- Najafian, L., and Babji, A.S. (2012). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides* 33, 178-185.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F., and Vogel, H.J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology* 29, 464-472.
- Ngwuluka, N.C., Pillay, V., Choonara, Y.E., Modi, G., Naidoo, D., du Toit, L.C., Kumar, P., Ndesendo, V.M., and Khan, R.A. (2011). Fabrication, Modeling and Characterization of Multi-Crosslinked Methacrylate Copolymeric Nanoparticles for Oral Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 6194-6225.
- Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S., and Dessen, A. (2013). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*.1, 1-20.
- Noga, E.J., Ullal, A.J., Corrales, J., and Fernandes, J.M. (2011). Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation responses. *Comparative biochemistry and physiology Part D, Genomics & proteomics* 6, 44-54.
- Oeemig, J.S., Lynggaard, C., Knudsen, D.H., Hansen, F.T., KD, N.r., Schneider, T., Vad, B.S., Sandvang, D.H., Nielsen, L.A., Neve, S., *et al.* (2012). Eurocin, a New Fungal Defensin: structure, lipid binding, and its mode of action. *The Journal of biological chemistry* 287, 42361-42372.
- Oglesby-Sherrouse, A.G., Djapgne, L., Nguyen, A.T., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2014). The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens and disease* 12, 6194-6225.
- Okorochenkova, S.A., Zheltukhina, G.A., and Nebol'sin, V.E. (2012). [Antimicrobial peptides: mode of action and perspectives of practical application]. *Biomeditsinskaia khimiia* 58, 131-143.
- Oma, Y., Kino, Y., Toriumi, K., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2007). Interactions between homopolymeric amino acids (HPAAs). *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 16, 2195-2204.
- Ondeyka, J., Buevich, A.V., Williamson, R.T., Zink, D.L., Polishook, J.D., Occi, J., Vicente, F., Basilio, A., Bills, G.F., Donald, R.G., *et al.* (2014). Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of Altersolanol P Using *Staphylococcus aureus* Fitness Test Based Genome-Wide Screening. *Journal of natural products* 12, 6194-6225.
- Otto, A., van Dijk, J.M., Hecker, M., and Becher, D. (2013). The *Staphylococcus aureus* proteome. *International journal of medical microbiology* 12, 6194-6225.
- Pan, C.Y., Chen, J.Y., Lin, T.L., and Lin, C.H. (2009). In vitro activities of three synthetic peptides derived from epinecidin-1 and an anti-lipopolysaccharide factor against *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*, and *Trichomonas vaginalis*. *Peptides* 30, 1058-1068.
- Park, C.B., Kim, H.S., and Kim, S.C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications* 244, 253-257.
- Patel, S.R., Smith, K., Letley, D.P., Cook, K.W., Memon, A.A., Ingram, R.J., Staples, E., Backert, S., Zaitoun, A.M., Atherton, J.C., *et al.* (2013). *Helicobacter pylori* downregulates expression of human beta-defensin 1 in the gastric mucosa in a type IV secretion-dependent fashion. *Cellular microbiology* 15, 2080-2092.
- Paulsen, V.S., Blencke, H.M., Benincasa, M., Haug, T., Eksteen, J.J., Styrvold, O.B., Scocchi, M., and Stensvag, K. (2013). Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide arasin 1 - and mode of action studies of the N-terminal, proline-rich region. *PloS one* 8, 533-539.

- Pontikis, K., Karaiskos, I., Bastani, S., Dimopoulos, G., Kalogirou, M., Katsiari, M., Oikonomou, A., Poulakou, G., Roilides, E., and Giamarellou, H. (2013). Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents* *12*, 6194-6225.
- Powers, J.P., and Hancock, R.E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* *24*, 1681-1691.
- Pukala, T.L., Bowie, J.H., Maselli, V.M., Musgrave, I.F., and Tyler, M.J. (2006). Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Natural product reports* *23*, 368-393.
- Rajanbabu, V., and Chen, J.Y. (2011). Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides* *32*, 415-420.
- Ramachandran, G.N., and Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Advanced Protein Chemistry* *23*, 283-438.
- Reddy, A.S., and Zhang, S. (2013). Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert review of clinical pharmacology* *6*, 41-47.
- Rishi, P., Preet, S., Bharrhan, S., and Verma, I. (2011). In Vitro and In Vivo Synergistic Effects of Cryptdin 2 and Ampicillin against *Salmonella* φ . *Antimicrobial agents and chemotherapy* *55*, 4176-4182.
- Robinson, M.W., Donnelly, S., Hutchinson, A.T., To, J., Taylor, N.L., Norton, R.S., Perugini, M.A., and Dalton, J.P. (2011). A Family of Helminth Molecules that Modulate Innate Cell Responses via Molecular Mimicry of Host Antimicrobial Peptides. *PLoS* *7*, 6194-6225.
- Romo, T.D., Bradney, L.A., Greathouse, D.V., and Grossfield, A. (2011). Membrane binding of an acyl-lactoferricin B antimicrobial peptide from solid-state NMR experiments and molecular dynamics simulations. *Biochimica et biophysica acta* *1808*, 2019-2030.
- Salwiczek, M., Qu, Y., Gardiner, J., Strugnell, R.A., Lithgow, T., McLean, K.M., and Thissen, H. (2013). Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends in biotechnology* *12*, 6194-6225.
- Schmelcher, M., Donovan, D.M., and Loessner, M.J. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future microbiology* *7*, 1147-1171.
- Shah, A. (2013). Tackling the crisis of antibiotic resistance. *South Asian journal of cancer* *2*, 3-4.
- Shon, A.S., Bajwa, R.P., and Russo, T.A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence* *4*, 107-118.
- Shu, Y., Cinier, M., Shu, D., and Guo, P. (2011). Assembly of Multifunctional Phi29 pRNA Nanoparticles for Specific Delivery of siRNA and other Therapeutics to Targeted Cells. *Methods Natural product reports* *54*, 204-214.
- Sicheri, F., and Yang, D.S. (1995). Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature* *375*, 427-431.
- Solanas, C., de la Torre, B.G., Fernandez-Reyes, M., Santiveri, C.M., Jimenez, M.A., Rivas, L., Jimenez, A.I., Andreu, D., and Cativiela, C. (2010). Sequence inversion and phenylalanine surrogates at the beta-turn enhance the antibiotic activity of gramicidin S. *Journal of medicinal chemistry* *53*, 4119-4129.
- Song, Y.M., Yang, S.T., Lim, S.S., Kim, Y., Hahm, K.S., Kim, J.I., and Shin, S.Y. (2004). Effects of L- or D-Pro incorporation into hydrophobic or hydrophilic helix face of amphipathic alpha-helical model peptide on structure and cell selectivity. *Biochemical and biophysical research communications* *314*, 615-621.
- Soraas, A., Sundsfjord, A., Jorgensen, S.B., Liestol, K., and Jenum, P.A. (2014). High Rate of Per Oral Mecillinam Treatment Failure in Community-Acquired Urinary Tract Infections Caused by ESBL-Producing *Escherichia coli*. *PLoS one* *9*, 858-890.
- Srivastava, R.A.K., Pinkosky, S.L., Filippov, S., Hanselman, J.C., Cramer, C.T., and Newton, R.S. (2012). AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in

- lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases: Thematic Review Series: New Lipid and Lipoprotein Targets for the Treatment of Cardiometabolic Diseases. *Journal of Lipid Research* **53**, 2490-2514.
- Steel, H.C., Cockeran, R., Anderson, R., and Feldman, C. (2013). Overview of Community-Acquired Pneumonia and the Role of Inflammatory Mechanisms in the Immunopathogenesis of Severe Pneumococcal Disease. *Mediators of inflammation PloS one* **2013**, 490346.
- Steinberg, D.A. (1997). Protegrin-1: a Broad-Spectrum, Rapidly Microbicidal. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**, 1738-1742.
- Sumathi, K., Ananthalakshmi, P., Roshan, M.N., and Sekar, K. (2006). 3dSS: 3D structural superposition. *Nucleic Acids Res PloS one* **34**, W128-132.
- Takahashi, D., Shukla, S.K., Prakash, O., and Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie* **92**, 1236-1241.
- Tavanez, J.P., Bengoechea, R., Berciano, M.T., Lafarga, M., Carmo-Fonseca, M., and Enguita, F.J. (2009). Hsp70 Chaperones and Type I PRMTs Are Sequestered at Intranuclear Inclusions Caused by Polyalanine Expansions in PABPN1. *PloS one* **412**, 6194-6225.
- Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Leuven, F.V., Vanderleyden, J., *et al.* (1995). Small Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Radish: Their Role in Host Defense. *Plant Cell* **7**, 573-588.
- Thacker, J.D., Balin, B.J., Appelt, D.M., Sassi-Gaha, S., Purohit, M., Rest, R.F., and Artlett, C.M. (2012). NLRP3 Inflammasome Is a Target for Development of Broad-Spectrum Anti-Infective Drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 1921-1930.
- Tigen, E.T., Dogru, A., Koltka, E.N., Unlu, C., and Gura, M. (2014). Device-associated nosocomial infection rates and distribution of antimicrobial resistance in a medical-surgical intensive care unit in Turkey. *Japanese journal of infectious diseases* **67**, 5-8.
- Uematsu, N., and Matsuzaki, K. (2000). Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophysical journal* **79**, 2075-2083.
- Ueno, S., Kusaka, K., Tamada, Y., Zhang, H., Minaba, M., and Kato, Y. (2010). An enhancer peptide for membrane-disrupting antimicrobial peptides. *BMC Microbiology* **10**, 46.
- Vaz Gomes, A., de Waal, A., Berden, J.A., and Westerhoff, H.V. (1993). Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. *Biochemistry* **32**, 5365-5372.
- Veen, M.V. (1995). Circular-dichroism and fluorescence studies on melittin: effects of C-terminal modifications on tetramer formation and binding to phospholipid vesicles<Veen 1995.pdf>. *Biochem J* **305**, 785-790.
- Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W., and Taylor, R.D. (2003). Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* **52**, 609-623.
- Vermeer, L.S., Lan, Y., Abbate, V., Ruh, E., Bui, T.T., Wilkinson, L.J., Kanno, T., Jumagulova, E., Kozłowska, J., Patel, J., *et al.* (2012). Conformational flexibility determines selectivity and antibacterial, antiplasmodial, and anticancer potency of cationic alpha-helical peptides. *The Journal of biological chemistry* **287**, 34120-34133.
- von Heijne, G. (1981). Membrane proteins: the amino acid composition of membrane-penetrating segments. *European journal of biochemistry / FEBS* **120**, 275-278.
- Walker, B., Barrett, S., Polasky, S., Galaz, V., Folke, C., Engstrom, G., Ackerman, F., Arrow, K., Carpenter, S., Chopra, K., *et al.* (2009). Environment. Looming global-scale failures and missing institutions. *Science (New York, NY)* **325**, 1345-1346.
- Wang, H., and Monteiro, M.J. (2007). Ubiquilin overexpression reduces GFP-polyalanine-induced protein aggregates and toxicity. *Experimental cell research* **313**, 2810-2820.
- Wang, S., Song, P., and Zou, M.H. (2012). AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clinical Science (London, England : 1979)* **122**, 555-573.

- Wei, G.X., Campagna, A.N., and Bobek, L.A. (2007). Factors affecting antimicrobial activity of MUC7 12-mer, a human salivary mucin-derived peptide. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 6, 14-27.
- Westerhoff, H.V., Zasloff, M., Rosner, J.L., Hendler, R.W., De Waal, A., Vaz Gomes, A., Jongsma, P.M., Riethorst, A., and Juretic, D. (1995). Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *European journal of biochemistry / Federation of European Biochemical Societies* 228, 257-264.
- Wieczorek, M., Jensen, H., Kindrachuk, J., Scott, W.R., Elliott, M., Hilpert, K., Cheng, J.T., Hancock, R.E., and Straus, S.K. (2010). Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chemical Biology* 17, 970-980.
- Yang, S.T., Lee, J.Y., Kim, H.J., Eu, Y.J., Shin, S.Y., Hahm, K.S., and Kim, J.I. (2006). Contribution of a central proline in model amphipathic alpha-helical peptides to self-association, interaction with phospholipids, and antimicrobial mode of action. *The Federation of European Biochemical Societies journal* 273, 4040-4054.
- Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews* 55, 27-55.
- Yin, L.M., Edwards, M.A., Li, J., Yip, C.M., and Deber, C.M. (2012). Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *The Journal of biological chemistry* 287, 7738-7745.
- Yoshinari, M., Kato, T., Matsuzaka, K., Hayakawa, T., Inoue, T., Oda, Y., Okuda, K., and Shimono, M. (2006). Adsorption behavior of antimicrobial peptide histatin 5 on PMMA. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 77, 47-54.
- Yount, N.Y., and Yeaman, M.R. (2013). Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Ann N Y Academy of Science* 1277, 127-138.
- Yue, M., and Schifferli, D.M. (2014). Allelic variation in : an underappreciated driver of adaptation and virulence. *Frontiers in microbiology* 4, 419.
- Zasloff (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Microbiology*, 17, 5449 - 5453.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zhang, L., Benz, R., and Hancock, R.E. (1999). Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry* 38, 8102-8111.
- Zhang, L., Li, W., and He, Z.G. (2013). DarR, a TetR-like Transcriptional Factor, Is a Cyclic Di-AMP-responsive Repressor in *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of biological chemistry* 288, 3085-3096.
- Zhao (2001). Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophysical journal* 18, 2979-2991.
- Zhou, Y., and Peng, Y. (2013). Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Experimental and therapeutic medicine* 6, 1000-1004.