



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

Avaliação das propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e citolíticas de análogos do peptídeo antimicrobiano pentadactilina

AUTOR:

Matheus Nishiyama Pedroca

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro

**BRASÍLIA
2018**



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

Avaliação das propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e citolíticas de análogos do peptídeo antimicrobiano pentadactilina

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

AUTOR:

Matheus Nishiyama Pedroca

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro

**BRASÍLIA
2018**



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília**

Matheus Nishiyama Pedroca

Avaliação das propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e citolíticas de análogos do peptídeo antimicrobiano pentadactilina

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro

Presidente

Departamento de Ciências Fisiológicas/IB

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha

Membro Titular

Departamento de Biologia Celular/IB

Universidade de Brasília

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Membro Titular

Departamento de Genética e Morfologia/IB

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Membro Suplente

Departamento de Genética e Morfologia/IB

Universidade de Brasília

Dedico esta dissertação aos meus pais Vicente e Márcia, minha irmã Natália e minha namorada Cecília por todo apoio, amparo e incentivo que me proporcionaram ao longo desta minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Mariana S. Castro por ter me concedido esta oportunidade de crescimento e por toda orientação, atenção e paciência durante todo este processo.

Aos meus pais Vicente e Márcia, e minha irmã Natália pelo apoio dentro e fora de casa, pelo carinho e pelas lições de sabedoria.

À minha namorada, Cecília, por todo companheirismo, paciência e amor que compartilhou comigo ao longo destes anos e que me ajudou a sempre perseverar.

Ao companheiro de projeto e de graduação, Diogo, por todo trabalho e cooperação ao longo destes anos de amizade e também aos amigos Lucas Castro e Victor Marques pela ajuda que nos proporcionaram.

Ao Prof. Dr. Osmindo Rodrigues Pires Júnior, e aos doutorandos MSc Carlos José Correia de Santana e Ana Carolina Martins Magalhães pelos valiosos ensinamentos e assistência, não só durante meu mestrado, mas também durante minha graduação.

A todos os colegas e amigos dos laboratórios de Bioquímica e Toxinologia do IB, em especial à Profa. Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, ao Dr. Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior e aos colegas Naywara, Tania, Andréia e Lucas pelos momentos de boa convivência e auxílio mútuo.

A todas as equipes dos outros laboratório que nos ajudaram a completar o projeto fornecendo metodologias, equipamentos, reagentes e principalmente tempo e atenção para a realização dos experimentos.

À Capes pela concessão de bolsa de estudo como apoio financeiro.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Avaliação das propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e citolíticas de análogos do peptídeo antimicrobiano pentadactilina” desenvolvida por Matheus Nishiyama Pedroca sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 311202/2015-2 - Produtividade em Pesquisa e no. 407801-2013 - Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processos no. 193.000.955/2015 e no. 0193.001736/2017), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

Os antibióticos convencionais estão se mostrando cada vez mais limitados para combater os diversos microrganismos patogênicos, bem como suas linhagens resistentes a diversos medicamentos, sendo necessário o urgente desenvolvimento de novos fármacos. Os peptídeos antimicrobianos possuem alto potencial terapêutico, destacando-se como promissores agentes antimicrobianos. O presente trabalho teve como objetivo estudar as propriedades antimicrobianas, antiparasitárias, antivirais e citolíticas de 10 novos análogos do PAM OcP1 (pentadactilina), um peptídeo antimicrobiano isolado da secreção cutânea de anuros do gênero *Leptodactylus*. Suas atividades antimicrobianas sobre bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e fungos (*C. albicans* e *C. neoformans*), inibitórias sobre a replicação de arbovírus (dengue e febre amarela) e antiparasitárias sobre o protozoário *T. cruzi* foram avaliadas. Também foram testadas suas propriedades citolíticas sobre eritrócitos e leucócitos humanos e sobre a linhagem celular de hepatoma humano Huh7. Os análogos OcP1-A3, A4, A6, A7 e A8 exibiram as maiores atividades antimicrobianas, principalmente sobre bactérias Gram-negativas, quando comparados com o peptídeo selvagem, o PAM OcP1. Tais peptídeos mostraram-se pouco ativos ou inativos em inibir a proliferação do parasita *T. cruzi*. A atividade antiviral dos análogos testados sobre o vírus da febre amarela, quando ativos, mostraram aumento na sua eficiência de maneira geral, enquanto que no ensaio contra dengue houve melhora no potencial antiviral apenas dos análogos OcP1-A3, A4 e A6. Quando testados com células sanguíneas, os análogos não apresentaram efeitos citolíticos relevantes sobre eritrócitos humanos, entretanto foi evidenciada a ação citolítica da pentadactilina e dos análogos OcP1-A1, A4 e A6 sobre leucócitos. Todos os análogos testados apresentaram conformação em α -hélice em ambiente membrana-mimético. Tais resultados demonstram o potencial terapêutico de análogos do PAM OcP1 como agentes antimicrobianos de largo espectro e antivirais.

Palavras-chave: Anuros, análogos sintéticos, pentadactilina, peptídeos antimicrobianos, propriedades inibitórias, bactérias, fungos, vírus

ABSTRACT

Conventional antibiotics are proving increasingly limited to combat the various pathogenic microorganisms, as well as their lineages resistant to several drugs, and the urgent development of new drugs is necessary. Antimicrobial peptides have high therapeutic potential as promising antimicrobial agents. The present study aimed to evaluate the antimicrobial, antiparasitic, antiviral and cytolytic properties of 10 new analogues of the already described AMP OcP1 (pendactylin), an antimicrobial peptide isolated from the cutaneous secretion of anurans of the genus *Leptodactylus*. Their antimicrobial activities on Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *S. epidermidis*), Gram-negative bacteria (*E. coli* and *K. pneumoniae*) and fungi (*C. albicans* and *C. neoformans*), inhibition of arboviruses replication (dengue and yellow fever virus) and antiparasitic properties against *T. cruzi* protozoa were evaluated. Their cytolytic properties were also assayed on human erythrocytes and leukocytes and on human hepatoma cell line Huh7. The OcP1-A3, A4, A6, A7 and A8 analogues exhibited the highest antimicrobial activity, especially on Gram-negative bacteria, when compared to the wild-type peptide, the AMP OcP1. Such peptides were shown to be poorly active or inactive in inhibiting *T. cruzi* proliferation. The antiviral activity of the tested analogues on the yellow fever virus, when active, showed an increase in its efficiency in general, whereas in the dengue trial there was improvement in the antiviral potential only related to the analogues OcP1-A3, A4 and A6. When tested against blood cells, the analogues did not present relevant cytolytic effects on human erythrocytes, however cytolytic effects of OcP1 and the analogues OcP1-A1, A4 and A6 on leukocytes were detected. All the tested analogues presented α -helix conformation in membrane-mimetic environment. These results demonstrate the therapeutic potential of analogues of the AMP OcP1 as broad spectrum antimicrobial and antiviral agents.

Key words: Anurans, synthetic analogues, pentadactilin, antimicrobial peptides, inhibitory properties, bacteria, fungi, virus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes modelos de ação descritos para os peptídeos antimicrobianos em membranas lipídicas.....	22
Figura 2. Indivíduo adulto de <i>Leptodactylus pentadactylus</i>	25
Figura 3. Indivíduo adulto de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	26
Figura 4. Esquema dos diferentes mecanismos de resistência bacteriana contra a ação dos PAMs	28
Figura 5. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após incubação por 96 horas com a pentadactilina (OcP1).....	44
Figura 6. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após incubação por 96 horas com: OcP1-A1(A), OcP1-A2(B), OcP1-A3(C), OcP1-A4(D), OcP1-A5(E), OcP1-A6(F), OcP1-A7(G), OcP1-A8(H), OcP1-A9(I), OcP1-A10 (J).....	46
Figura 7. Efeitos do Interferon α 2a (A, controle positivo) e da pentadactilina (B, OcP1) sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da dengue (linha preta).....	48
Figura 8. Efeitos dos análogos OcP1-A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 e A10 (A, B, C, D, F, G, H, I e J, respectivamente) sobre a proliferação das células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da dengue (linha preta).....	50
Figura 9. Efeitos do Interferon α 2a (A, controle positivo) e da pentadactilina (B, OcP1) sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da febre amarela (linha preta).....	51
Figura 10. Efeitos dos análogos OcP1-A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 e A10 (A, B, C, D, F, G, H, I e J, respectivamente) sobre a proliferação das células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da febre amarela (linha preta).....	53
Figura 11. Efeitos citolíticos da OcP1 e seus análogos na concentração de 128 μ M sobre eritrócitos humanos após 1 hora de incubação.....	54
Figura 12. Efeitos citolíticos da OcP1 e seus análogos na concentração de 128 μ M sobre leucócitos humanos totais após 1 hora de incubação.....	54

Figura 13. Espectros dicróicos dos peptídeos a 50 μM em água (linha vermelha) e em SDS 35 μM (linha preta). OcP1(A) e os análogos OcP1-A1(B), A2(C), A3(D), A4(E), A5(F), A6(G), A7(H), A8(I), A9(J), A10(K).....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da pentadactilina (OcP1) e seus análogos.....	38
Tabela 2. Efeitos antimicrobianos (CMI em μM) da pendactilina (OcP1) e seus análogos sobre bactérias patogênicas.....	41
Tabela 3. Efeitos antimicrobianos (CMI em μM) da pendactilina (OcP1) e seus análogos sobre fungos patogênicos.....	43
Tabela 4. Concentração efetiva 50% (μM), concentração citotóxica 50% (μM) e índice de seletividade da pentadactilina (OcP1) e seus análogos sobre o vírus da dengue e células Huh7.....	48
Tabela 5. Concentração efetiva 50% (μM), concentração citotóxica 50% (μM) e índice de seletividade da pentadactilina (OcP1) e seus análogos sobre o vírus da febre amarela e células Huh7.....	51
Tabela 6. Parâmetros físico-químicos da pentadactilina (OcP1) e seus análogos com seus respectivos efeitos antimicrobianos.....	65
Tabela 7. Parâmetros físico-químicos da pentadactilina (OcP1) e seus análogos com seus respectivos efeitos antivirais.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – *Adenosine triphosphate* - Adenosina trifosfato.

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole* - 4',6 – diamidino -2- fenilindol.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

DTN – Doenças tropicais negligenciadas.

CMI – Concentração mínima inibitória.

EC₅₀ – Concentração que promove metade (50%) do efeito máximo.

CC₅₀ – Concentração que causa 50% da citotoxicidade máxima.

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético.

IS – Índice de seletividade.

LIT – *Liver Infusion Tryptose*.

MALDI-TOF – *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz.

µg – Micrograma.

µL – Microlitro.

µm – Micrômetro.

µM. Micromolar.

mM – Milimolar.

µH – Momento hidrofóbico.

n.a. – Não ativo.

NADH - *Nicotinamide adenine dinucleotide* - Dinucleótido de nicotinamida e adenina, em sua forma reduzida.

nm – Nanômetro.

nM – Nanomolar.

PAM – Peptídeo antimicrobiano.

PBP – *Penicillin-binding protein* - proteína de ligação à penicilina.

PIA – *Polysaccharide intercellular adhesin* - Adesina intercelular de polissacarídeos.

PGA – *Poly-γ-glutamic acid* - Ácido poli-γ-glutâmico.

p/v – Peso/volume.

RPM – Rotações por minuto.

RND – *Resistance nodulation cell division*.

MRSA – *Methicillin-resistant S. aureus* - *S. aureus* resistente à meticilina.

SDS – *Sodium dodecyl sulfate* - Dodecil sulfato de sódio.

v/v – Volume/volume.

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES	12
1.2. DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS	12
1.3. BACTÉRIAS E FUNGOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA	13
1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	13
1.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.3.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
1.3.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	16
1.3.5. <i>Candida albicans</i>	16
1.3.6. <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
1.4. ARBOVIROSES	18
1.5. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	19
1.5.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DO GÊNERO <i>LEPTODACTYLUS</i>	23
1.6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS PAMs	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GERAL.....	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. SÍNTESE QUÍMICA E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE INTERESSE.....	31
4.2. DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS	31
4.3. ENSAIOS SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.....	31

4.4. ENSAIOS SOBRE FUNGOS PATOGÊNICOS	32
4.5. ENSAIOS SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	33
4.6 ENSAIOS ANTIVIRAIS.....	33
4.6.1. VÍRUS DA FEBRE AMARELA.....	33
4.6.2. VÍRUS DA DENGUE (SOROTIPO 4)	34
4.7. ENSAIO CITOLÍTICO SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS	35
4.8. ANÁLISES DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR DICROÍSMO CIRCULAR	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. ENSAIOS SOBRE BACTÉRIAS E FUNGOS PATOGÊNICOS.....	39
5.2. ENSAIOS SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	43
5.3. ENSAIOS ANTIVIRAIS.....	46
5.4. ENSAIO CITOLÍTICO SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS	53
5.5. ANÁLISES DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR DICROÍSMO CIRCULAR	55
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Os antibióticos são drogas anti-infecciosas amplamente usadas por todo o mundo e se mostraram eficazes no tratamento da maioria das doenças promovidas por diferentes tipos de microrganismos. Entretanto, a facilidade de acesso a estas drogas e seu uso indiscriminado promoveram a seleção de agentes patogênicos multiresistentes os quais representam hoje um desafio para a medicina. Os problemas gerados por esta seleção agravam casos de infecções hospitalares e se espalham para outras comunidades infectando pacientes anteriormente saudáveis (Spellberg *et al.*, 2004; Alanis, 2005; Ventola, 2015). Diante desse cenário, iniciou-se a busca por novos agentes antimicrobianos, sendo a secreção cutânea de anuros uma rica fonte de compostos farmacologicamente ativos, merecendo destaque os compostos com atividade antimicrobiana. Dentre eles, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) caracterizam-se por um notável grau de heterogeneidade molecular e podem representar uma opção terapêutica no tratamento de doenças infecciosas e parasitárias (Guimarães *et al.*, 2016; Dehghan Esmatabadi *et al.*, 2017).

1.2. DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

Doenças tropicais negligenciadas (DTN) são grupos de doenças infecciosas que afetam cerca de 149 países e territórios, eliminadas das partes mais desenvolvidas, mas ainda persistentes em áreas pobres como em comunidades marginalizadas sem acesso a condições sanitárias adequadas. Entre os anos de 2000 e 2011 foram registrados 850 novos produtos terapêuticos, mas apenas 37 foram indicados para as doenças negligenciadas e apenas 4 foram aprovados. (WHO, 2010; Pedrique *et al.*, 2013).

Mesmo havendo estratégias viáveis para o desenvolvimento de novos fármacos com retorno econômico para seus investidores ainda existem muitos problemas referentes ao investimento nesta área e que são causados normalmente pela displicência política em relação aos programas de saúde, agravando ainda mais o cenário sócio-econômico dessas regiões (Hotez *et al.*, 2009).

As DNTs são agrupadas em 17 doenças infecciosas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), algumas delas são classificadas como tripanossomíases causadas por protozoários com maior ocorrência em países da África Subsariana e na América Latina com grande importância clínica, tanto médica quanto veterinária, sendo a doença de Chagas ou

tripanosomíase americana e a leishmaniose duas das mais significativas no contexto brasileiro (Barret *et al.*, 2003).

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma doença tropical endêmica de 21 países, estima-se que na América Latina exista 5,7 milhões de pessoas infectadas, cerca de 70 milhões de pessoas no mundo com risco de contraí-la e cálculos estimam perdas anuais de 5,6 milhões de dólares por ano em absentismo operário no Brasil. A doença possui uma fase aguda assintomática, que dura até dois meses após a infecção, e uma fase crônica onde os parasitas se alojam no coração e no trato digestivo gerando lesões nos órgãos e tecidos adjacentes (DNDI, 2018; WHO, 2015).

O meio de transmissão mais comum da doença é pelo vetor triatomíneo contaminado, que ao se alimentar de um hospedeiro vertebrado elimina, pelas suas fezes e urina, o parasita em sua forma tripomastigota metacíclica, entrando no organismo através de mucosas ou feridas na pele. Ao infectar células do hospedeiro, o parasita toma a forma amastigota iniciando o processo de multiplicação por fissão binária, promovendo a ruptura da célula e sua disseminação na corrente sanguínea, novamente na forma tripomastigota capaz de infectar novas células. Caso o indivíduo contaminado seja picado pelo triatomíneo, o protozoário será ingerido e no intestino do vetor sofrerá alteração para a forma epimastigota, multiplicando-se e posteriormente será excretado pelo inseto em outro potencial hospedeiro para fechar o ciclo (Tyler e Engman, 2001; Barret *et al.*, 2003).

1.3. BACTÉRIAS E FUNGOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

1.3.1. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria Gram-negativa bacilar, anaeróbia facultativa não esporulada da família *Enterobacteriaceae* que ocupa o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, seu ambiente primário, podendo transitar para fora dos organismos e sobreviver em locais com água, ambiente secundário (Savageau, 1983; Berg, 1996). A maioria das cepas comensais mantém relações harmônicas com seus hospedeiros e normalmente não causam doenças, sendo esta espécie uma das primeiras a colonizar e formar a microbiota intestinal na fase da infância (Tenailon *et al.*, 2010).

Apesar da coexistência ser muitas vezes benéfica para ambos, algumas linhagens adquiriram atributos de virulência associados ao ganho, perda ou modificação de elementos no material genético bacteriano, tanto no plasmídeo quanto no cromossomo, e com o

mecanismo de transferência horizontal de genes estas regiões foram rapidamente propagadas (Shames *et al.*, 2009).

Há quatro doenças principais que podem ser causadas pelos clones de *E. coli*: doença entérica (diarréia), infecções no trato urinário, meningite e sepse. Entre as linhagens causadoras de enfermidades entéricas podem ser destacadas a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC). A *E. coli* uropatogênica (UPEC) é uma frequente causadora de infecção do trato urinário e a *E. coli* associada à meningite (MNEC) é responsável pela meningite e sepse. Alguns tipos de *E. coli* também podem causar patologias em animais através dos mesmos fatores de virulência utilizados em hospedeiros humanos e outros mecanismos próprios para infecção de outros animais não encontrados em linhagens humanas (Kaper *et al.*, 2004; Croxen e Finlay, 2010).

Esta bactéria também possui algumas linhagens resistentes a múltiplos fármacos, como é o caso da *Escherichia coli* sequência tipo 131 (ST131) disseminada mundialmente e responsável por causar infecções no trato urinário e na corrente sanguínea (Petty *et al.*, 2014).

1.3.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva que coloniza cerca de 30% da população humana, ocorrendo tanto na forma comensal quanto na forma patogênica. Apesar da coexistência pacífica de algumas cepas com seus hospedeiros, aquelas que são patogênicas são responsáveis por uma grande variedade de doenças, sendo elas a causa mais comum para bacteremia e endocardite infecciosa, bem como infecções de pele, tecidos moles, pleuropulmonar e osteoarticular (Lowy, 1998; Tong *et al.*, 2015).

A linhagem de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é atualmente a bactéria multirresistente a drogas mais comumente encontrada em hospitais em várias partes do mundo. Sua incidência continua crescendo, principalmente devido ao seu meio de transmissão através de superfícies contaminadas, dispersão pelo ar e contato entre pacientes e trabalhadores hospitalares colonizados pelas cepas. Além disso, contaminações pelas MRSA podem prolongar o tempo de internação e agravar quadros clínicos, levando à

morte nos piores casos, muitas vezes devido ao atraso de um tratamento apropriado (Cooper *et al.*, 2004; ECDC, 2014).

Os mecanismos básicos das linhagens MRSA para desenvolver resistência contra a meticilina e outros antibióticos beta-lactâmicos são basicamente dois: o uso de beta-lactamases responsáveis pela lise destas moléculas e a expressão de uma variante da proteína PBP (penicillin-binding protein) denominada de PBP2a ou 2'. As PBPs são as moléculas-alvo dos fármacos beta-lactâmicos, sendo necessária uma alta afinidade entre ambos para a droga ser efetiva. Mas a PBP2a possui baixa afinidade com esta classe de remédios, gerando uma resistência que varia de algumas células até grande parte de uma população bacteriana (Mulligan *et al.*, 1993; ECDC, 2014).

1.3.3. *Klebsiella pneumoniae*

A *K. pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa, capsular que possui uma alta eficiência de colonização dos mais diversos ambientes como solos, superfícies aquáticas, efluentes industriais, vegetação e microbiota de mamíferos, onde, nestes indivíduos, ela pode se alojar no trato gastrointestinal, nasofaríngeo e na pele (Bagley, 1985). Este patógeno oportunista é causador de uma série de infecções, dentre elas, bacteremia, pneumonia, meningite, infecção no trato urinário e abscessos hepáticos (Paczosa e Mecsas, 2016).

Estes microrganismos apresentam mecanismos e estruturas que garantem sua permanência dentro do hospedeiro, como, por exemplo, a presença de uma cápsula de polissacarídeos, evitando que o patógeno seja fagocitado (Cortés *et al.*, 2002) e outras moléculas que garantem um funcionamento metabólico básico como o sideróforo, complexo molecular orgânico relacionado à aquisição de ferro que compete com as células do hospedeiro por este cofator (Glegg e Murphy, 2016).

As infecções causadas por esta bactéria ocorriam mais frequentemente em indivíduos hospitalizados ou imunocomprometidos, mas com o surgimento das cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) agora acometem também pessoas saudáveis com alta incidência, principalmente devido à eficiência na obtenção de ferro e pela maior produção de polissacarídeos capsulares, gerando uma hipermucoviscosidade (Shon *et al.*, 2013; Glegg e Murphy, 2016).

O número progressivo de cepas multi-resistentes de *K. pneumoniae* é uma preocupação crescente. A resistência destas linhagens aos beta-lactâmicos teve um impacto extremamente negativo no tratamento das infecções, as beta-lactamases de espectro estendido limitaram o tratamento para alguns fármacos como os carbapenêmicos e a colistina, por causa da baixa incidência de cepas resistentes a estas drogas (Lee *et al.*, 2017; Martin e Bachman, 2018).

1.3.4. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis é uma bactéria Gram-positiva classificada dentro do grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos, os quais são incapazes de produzir coagulase livre (Rogers *et al.*, 2009). Abundante no epitélio humano, predominantemente nas axilas, cabeça e narinas, também pode ser encontrado na pele e na membrana mucosa de outros mamíferos (Kloos e Musselwhite, 1975; Rogers *et al.*, 2009).

Mesmo fazendo parte da microbiota epitelial, esta bactéria é considerada atualmente como um patógeno oportunista, causando infecções em indivíduos imunologicamente comprometidos e é um dos principais patógenos relacionados a complicações com implantes médicos, como cateteres e próteses, sendo comumente necessário a remoção do dispositivo e o tratamento prolongado por meio de antibióticos (Uçkay *et al.*, 2009).

Os fatores de virulência do *S. epidermidis* são bem estudados quando comparados com os outros microrganismos dentro do grupo de *Staphylococcus* coagulase-negativos e podem ser destacados a produção de biofilmes, toxinas (enterotoxinas e modulinas fenol-solúveis) e exoenzimas, constituindo um grande acervo de mecanismos que garantem proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e uma maior eficiência no processo de infecção e permanência dentro destes indivíduos (Otto 2012).

Há também a ocorrência de linhagens resistentes a uma grande variedade de antibióticos como rifamicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, sulfonamidas e principalmente a meticilina, sendo rara a resistência contra estreptograminas, linezolid e tigeciclina (Otto 2009).

1.3.5. *Candida albicans*

O fungo *C. albicans* é um microrganismo comensal altamente polimórfico, em que sua forma celular varia dependendo das condições ambientais como pH, CO₂, temperatura,

disponibilidade de nutrientes, dentre outros (Noble *et al.*, 2017). Presente em mamíferos, colonizando regiões do trato gastrointestinal, boca, pele e trato reprodutor feminino (Findley *et al.*, 2013; Merenstein *et al.*, 2013). Quando o hospedeiro apresenta algum tipo de lesão epitelial, imunodeficiência ou disbiose microbiana, o fungo pode se tornar um patógeno, causando infecções persistentes e algumas vezes difíceis de serem tratadas (Perlroth *et al.*, 2007).

O primeiro passo para a defesa do organismo contra o patógeno fúngico é sua detecção por meio das células do sistema imune inato através de receptores que identificam padrões moleculares associados a patógenos. O reconhecimento da morfologia do fungo, variando entre levedura e hifa, é importante para desencadear o processo de defesa, sendo este também um fator de virulência associado ao fungo (Noble *et al.*, 2017). Após a detecção do patógeno, o organismo desencadeia mecanismos pró-inflamatórios e ativação de células do sistema imune inato pelas células do tecido epitelial e macrófagos associados e quando estes microrganismos patogênicos conseguem transpor esta barreira induzem respostas antifúngicas específicas de linfócitos através da apresentação de antígenos (Netea *et al.*, 2015).

Os antifúngicos azólicos e as equinocandinas são as classes de drogas mais utilizadas para tratar infecções de *C. albicans*, ambos inibem o crescimento fúngico interferindo na biossíntese de componentes da membrana e parede celular, especificamente nas enzimas conversoras que geram o ergosterol na membrana e o 1,3- β -D glucano na parede celular, respectivamente (Perlin, 2007; Kanafani e Perfect, 2008). Entretanto, mecanismos de resistência contra estes fármacos, como bombas de efluxo, vias de desvio e mutações em genes que codificam as enzimas conversoras já foram descritos e o número de casos envolvendo estas linhagens resistentes tem aumentado nos últimos anos, causando infecções mais invasivas e limitando as opções de tratamento (Pfaller, 2012).

1.3.6. *Cryptococcus neoformans*

O *C. neoformans* é um basidiomiceto que se apresenta na forma de levedura encapsulada, oportunista e obrigatoriamente aeróbio. É um fungo cosmopolita encontrado em substratos orgânicos, comumente associados a aves devido às excretas ricas em fontes de nitrogênio. A poeira doméstica dos ambientes domiciliares é um fator de crescimento positivo para estes microrganismos (Kon *et al.*, 2008).

As micoses geradas por este patógeno são denominadas de criptococoses e normalmente acometem indivíduos imunodeprimidos, principalmente pacientes HIV positivo. Ao inalar os microrganismos, as leveduras podem se alastrar pelos pulmões, disseminando pelo sangue e se alojando principalmente no cérebro, desenvolvendo as principais formas clínicas desta infecção: a criptococose pulmonar, quando sintomática apresenta sintomas como tosse, febre, suor noturno, fraqueza e derrame pleural, e a meningite criptocócica, causando dores de cabeça, febre, náuseas e vômitos, rigidez da nuca e fotofobia (Kon *et al.*, 2008; Severo *et al.*, 2009).

Este fungo possui fatores de virulência como a cápsula, as fosfolipases e as vesículas extracelulares que auxiliam na sobrevivência e na interação do patógeno com células do hospedeiro. O tratamento é feito normalmente com o uso de fármacos, em casos de menor gravidade o medicamento utilizado é o fluconazol e em casos mais graves a anfotericina B (Kon *et al.*, 2008; Alspaugh, 2016).

1.4. ARBOVIROSES

Os arbovírus (*Arthropod-borne virus*) se tornaram um foco de atenção para estudiosos brasileiros das áreas da saúde, pois o país possui clima tropical predominante na maior parte do seu território e uma grande variedade de fauna e flora. Estas características ambientais aliadas ao processo de desmatamento, crescimento urbano desordenado e migrações populacionais geraram diversas emergências de arboviroses ao longo das últimas décadas (Figueiredo, 2000; Gubler, 2002).

Além de serem transmitidos por artrópodes hematófagos para hospedeiros vertebrados, os arbovírus são denominados desta forma não só pelo seu tipo de vetor, mas também devido ao fato de que parte do ciclo replicativo dos vírus ocorre dentro destes artrópodes. As famílias virais de maior importância clínica são cinco: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Weaver e Reisen, 2010; Rust, 2012).

Apesar da grande plasticidade genética e de diversas mutações que proporcionaram adaptações para os mais diversos tipos de hospedeiros (Coffey *et al.*, 2013), esta classe de vírus possui algumas características clínicas em comum: um curto período de incubação variando de 3-10 dias; manifestações clínicas típicas como febre e sintomas semelhantes ao da gripe, encefalite e febre hemorrágica; e não possuem agentes antivirais específicos licenciados, sendo possível tratar apenas os sintomas das doenças (Weaver *et al.*, 2018).

Dados de Figueiredo (2015) registraram a circulação de, pelo menos, 9 arbovírus patogênicos causadores de doenças em seres humanos no Brasil. Destacando a presença da febre amarela, febre por zika e dengue, pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e do vírus mayaro e chikungunya, ambos da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, sendo que todos estes vírus podem ser transmitidos pelo mesmo vetor, *Aedes aegypti*, presente em aproximadamente 80% do território brasileiro (Messina *et al.*, 2014). No caso do zika vírus pode ser transmitido pelo *A. aegypti*, mas também por diversas outras espécies do gênero *Aedes*, já a febre amarela possui vetores secundários dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, os mais importantes na América Latina, que ocorrem no ciclo silvestre da doença e são estritamente silvestres, sendo o ser humano um hospedeiro acidental (McCrae e Kirya, 1982; Monath e Vasconcelos, 2015; Vogel, 2016).

Os desafios gerados pelas arboviroses são crescentes, além do seu potencial de dispersão e adaptação aos variados ambientes e hospedeiros, também há uma grande semelhança entre as manifestações clínicas entre os vírus da dengue, zika e chikungunya, como febre repentina e cansaço, seguidos por manchas vermelhas no corpo, dores de cabeça, nas musculaturas e nas articulações, desse modo, alguns diagnósticos são feitos de maneira equivocada, principalmente na ausência de exames laboratoriais que são fundamentais para a detecção específica do patógeno (Mota *et al.*, 2016). Outro grande problema é a microcefalia associada ao zika vírus que em 2016 foi responsável pela maioria dos 1.168 casos confirmados pelo Ministério da Saúde no Brasil (Ministério da Saúde, 2016).

A perspectiva para o desenvolvimento de vacinas para estas arboviroses ainda é desafiador para muitos pesquisadores, com exceção da febre amarela cujo uso de vacina como forma de prevenção a esta doença é preconizado pelo Ministério da Saúde. Ainda é necessário maior investimento na área da saúde para atuar nas suas responsabilidades de prevenção, diagnóstico e tratamento destas infecções (Donalisio *et al.*, 2017).

1.5. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Por vários séculos, as bactérias e os fungos evoluíram junto com os hospedeiros vertebrados vindo a apresentar diversos mecanismos de resistência para viabilizar o processo de infecção. Mesmo diante de todas as estratégias de defesas exibidas por esses microrganismos, os peptídeos antimicrobianos exibem potencial terapêutico no combate à disseminação de bactérias multirresistentes, além de apresentarem baixa probabilidade de

resistência devido à particularidade de suas interações com a membrana plasmática dos patógenos (Nizet, 2006).

Os peptídeos antimicrobianos isolados das secreções cutâneas de anuros, em geral, apresentam de 8 a 46 resíduos de aminoácidos, a maioria destas moléculas são catiônicas com suas cargas variando entre +2 e +6 em pH neutro e pelo menos metade de sua estrutura é composta de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Conlon, 2011; Conlon *et al.*, 2014; König *et al.*, 2015).

Os peptídeos antimicrobianos são um grupo diverso e os parâmetros para classificá-los variam de acordo com o tipo de estudo abordado. É possível classifica-los considerando algumas de suas características como extensão da cadeia peptídica, carga, estrutura primária, hidrofobicidade, anfipaticidade, conformação secundária e estrutura, dividindo-os em cinco subgrupos: 1) Peptídeos aniônicos; 2) Peptídeos catiônicos lineares em α -hélice; 3) peptídeos catiônicos ricos em determinados aminoácidos; 4) Peptídeos aniônicos e catiônicos com ligações dissulfeto provenientes de resíduos de cisteína; 5) Fragmentos de peptídeos aniônicos e catiônicos de proteínas maiores (Brogden, 2005). Existem outras classificações mais simples avaliando, por exemplo, apenas a estrutura secundária dos peptídeos, agrupando-os em quatro classes: folhas-beta, α -hélice, loop e cadeias estendidas (Hancock e Lehrer, 1998).

Diferente da ação de alguns antibióticos convencionais que atingem proteínas específicas, os PAMs possuem um mecanismo em comum: a interação eletrostática com as membranas plasmáticas de seus alvos, não possuindo receptores específicos nestas superfícies para o reconhecimento destes peptídeos. A carga negativa das moléculas presentes na superfície das membranas bacterianas apresentam uma forte atração pelos peptídeos antimicrobianos catiônicos, devido principalmente à presença de fosfolipídeos como fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e cardiolipina, de grupos fosfato nos lipopolissacarídeos e dos ácidos teicóicos, esta atração entre peptídeo-membrana promove um acúmulo destas moléculas peptídicas na interface hidrofílica da membrana, promovendo aberturas por onde passam várias moléculas, inclusive alguns PAMs (Hancock & Chapple, 1999; Hancock, 2001; Reddy *et al.*, 2004; Brogden, 2005; König *et al.*, 2015). Existem diferentes mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos podem agir, mas sabe-se que a permeação seguida pela ruptura e morte da célula alvo é o mais comum (Nicolas *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2003; König *et al.*, 2015).

Esse mecanismo previne que os organismos venham a exibir resistência aos peptídeos e oferecem a possibilidade de uma nova classe de agentes terapêuticos, que são complementares aos antibióticos existentes, já que grande parte dos PAMs têm como alvo a membrana celular dos microrganismos, o que gera a lise e morte celular, enquanto que antibióticos interagem com uma proteína alvo (Zaslhoff, 2002; Nascimento *et al.*, 2003; König *et al.*, 2015).

Há vários modelos mecanísticos propostos procurando explicar os efeitos desses peptídeos sobre diferentes microrganismos. O primeiro deles é o poro toroidal, onde os peptídeos se inserem perpendicularmente na membrana, associando as faces polares dos peptídeos às cabeças polares dos grupos lipídicos gerando uma tensão que induz a camada lipídica a se dobrar continuamente até formar um poro. Este processo tem influência mútua entre o peptídeo e o lipídio: enquanto o primeiro promove a curvatura da membrana, a organização do segundo modula a conformação do peptídeo. O segundo modelo é o tapete, nesse caso os peptídeos antimicrobianos se acumulam paralelamente à superfície da membrana microbiana pela interação eletrostática entre ambas, formando uma espécie de tapete e com o aumento das suas concentrações estes peptídeos se reorientam para o centro da membrana plasmática, mantendo ainda o contato de suas regiões hidrofóbicas com o interior da bicamada lipídica, mas durante o processo há a desestabilização da membrana, culminando no colapso da sua estrutura. O terceiro é o modelo formação de barril, os peptídeos que possuem uma conformação em hélice associam-se formando um canal transmembrana na forma de barril, onde as regiões hidrofóbicas dos peptídeos ficam em contato com a camada interna da membrana plasmática e as regiões hidrofílicas permanecem voltadas para o lúmen do barril. E o quarto é o modelo agregado, inicialmente ocorre a competição dos peptídeos pelos cátions Mg^{2+} e Ca^{2+} associados aos fosfolipídeos, desta forma, ganhando acesso às membranas internas e externas. A ruptura também ocorre por formação de micelas, mas sem um tipo de orientação específica. (Zaslhoff, 2002; Brogden, 2005; Jenssen, Hamill e Hancock, 2006; Li *et al.*, 2012; Mojsoska & Jenssen, 2015).

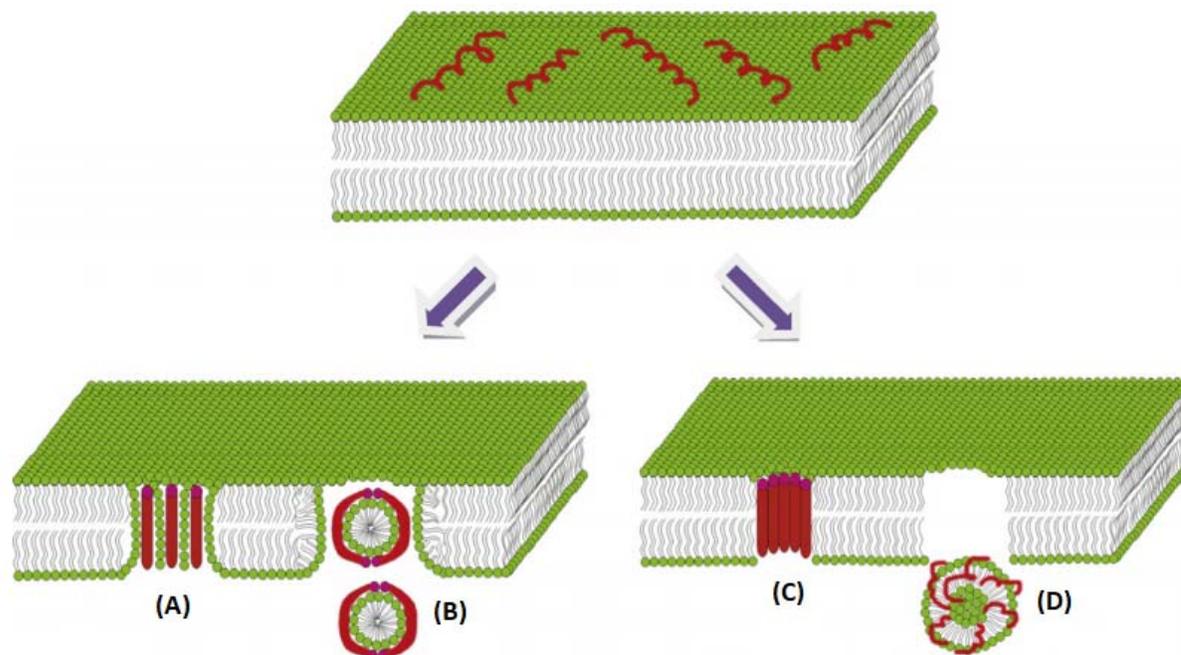


Figura 1. Diferentes modelos de ação descritos para os peptídeos antimicrobianos em membranas lipídicas: (A) poro toroidal, (B) tapete, (C) formação de barril e (D) modelo agregado (Li *et al.*, 2012).

Os PAMs podem agir tanto na membrana celular, pelos meios descritos acima, como por mecanismos intracelulares, inibindo ou bloqueando a síntese de DNA, promovendo danos nas mitocôndrias e, conseqüentemente, na respiração celular ou na ruptura de sua membrana, gerando efluxo de ATP e NADH, dentre outros efeitos. A capacidade que os PAMs tem de individualmente atingir vários alvos ou de múltiplos peptídeos interagirem com um mesmo alvo dificulta a seleção de mecanismos de resistência por parte das bactérias. (Zaslhoff, 2002; Peters *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Mojsoska & Jensen, 2015).

Apesar da maioria dos estudos proporem um modelo de ruptura de membrana como principal mecanismo de morte celular, estudos recentes mostraram que alguns peptídeos não são distribuídos ao longo da superfície celular, mas se alojam em locais restritos destas membranas, alterando ou deslocalizando domínios proteicos e lipídicos específicos associados à divisão celular, remodelagem da superfície celular, diferenciação celular ou na secreção e conseqüentemente gerando a morte do patógeno (Rashid *et al.*, 2016).

Existem alguns parâmetros estruturais que interferem na relação estrutura-função dos PAMs como carga, conformação, hidrofobicidade, anfipaticidade e ângulo polar, sendo

que a modificação de algum parâmetro normalmente gera um efeito compensatório simultâneo nos outros tornando esta modulação difícil de ser avaliada por uma variável isolada (Yeaman & Yount, 2003; Mojsoska & Jenssen, 2015).

A aplicabilidade antibiótica dos PAMs está sendo largamente ampliada, apresentando outros efeitos além dos mecanismos de ação descritos anteriormente, como sua ação inibitória e perturbadora sobre os biofilmes, desagregação e neutralização de endotoxinas, lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas responsáveis pelo processo infeccioso, sua ação sinérgica quando administrado junto com outros antibióticos e sua ação contra bactérias resistentes a múltiplas drogas (Mangoni *et al.*, 2008; Kaconis *et al.*, 2011; Zhou e Peng, 2013; Chung e Khanum, 2017).

1.5.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DO GÊNERO *LEPTODACTYLUS*

A classe Amphibia possui uma ampla descrição de espécies dentro das suas três ordens: Gymnophiona, Caudata e Anura, sendo esta última a maior em número de representantes com a descrição de 6.961 espécies até o momento. Das 206 espécies descritas dentro da família Leptodactylidae, 74 delas se encontram incluídas dentro do gênero *Leptodactylus* distribuídas no Continente Americano e na Ásia (Frost, 2018).

Dentro deste gênero, foram isolados diversos peptídeos antimicrobianos das secreções cutâneas das espécies *L. ocellatus* (Nascimento *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2010), *L. pentadactylus* (King *et al.*, 2005), *L. fallax* (Rollins-Smith *et al.*, 2005), *L. laticeps* (Conlon *et al.*, 2006), *L. syphax* (Dourado *et al.*, 2007), *L. validus* (King *et al.*, 2008), *L. labyrinthicus* (Libério *et al.*, 2011; Gusmão *et al.*, 2017) e *L. pustulatus* (Marani *et al.*, 2015).

Os peptídeos produzidos por estas espécies foram inicialmente nomeados de acordo com o nome das respectivas espécies que os produzem (ocelatina, pentadactilina, fallaxina etc.), mas dentro desta proposta de nomenclatura não foram consideradas as relações evolutivas entre eles. Atualmente é adotada uma nomenclatura como proposto por Conlon (2008) que considera a proximidade evolutiva entre os PAMs.

Alguns peptídeos, membros da família das ocelatinas, apresentaram atividade antimicrobiana e citotóxica contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, contra fungos como *Candida albicans* e pouca atividade citolítica contra células sanguíneas. A composição dos seus aminoácidos pode variar sua efetividade antimicrobiana como

observado por Gusmão e colaboradores onde foi constatado que os três últimos aminoácidos da ocelatina-F1 possuem uma importância fundamental para a interação do peptídeo com a membrana de microrganismos e que o último resíduo extra (Asn-23) da ocelatina-LB2 diminuiu a força de interação entre o peptídeo e a membrana do patógeno (Gusmão *et al.*, 2017).

Dentre os diversos peptídeos isolados a partir da secreção de anuros do gênero *Leptodactylus*, pode-se destacar a ocelatina-P1, também conhecida como pentadactilina, um peptídeo antimicrobiano com potencial terapêutico.

Este peptídeo está presente na secreção cutânea de *L. pentadactylus*, conhecida também como rã-defumada-da-selva, e caracterizando-se como uma rã de grande porte, onde os machos medem em média cerca de 177 milímetro e as fêmeas 185, sendo amplamente distribuída na floresta amazônicas nas regiões do sul da Colômbia, leste do Equador, leste e oeste do Peru, norte da Bolívia e em grande porção da região central e algumas partes do norte do Brasil, com registros na Guiana Francesa. Possui olhos e tímpanos largos e se distinguem das outras espécies devido à presença de dobras dorsolaterais e glândulas lombares emparelhadas e pelo lábio superior manchado (Savage, 2002; Libério *et al.*, 2011).



Figura 2. Indivíduo adulto de *Leptodactylus pentadactylus* (Imagem disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/full/57154/0>).

Além de ter sido detectada na espécie *L. pentadactylus*, a pentadactilina também foi encontrada na secreção cutânea de *L. labyrinthicus*, conhecida como rã-pimenta. Abundante no cerrado e na caatinga do Brasil e presente em regiões do norte da Argentina e da Venezuela, leste do Paraguai, Bolívia e sul do Brasil. Ocupa áreas abertas e bosques tropicais capaz de colonizar áreas de assentamentos humanos e poças temporárias (Heyer *et al.*, 2008).

Em trabalhos anteriores, determinou-se sua atividade antimicrobiana em concentrações relativamente baixas (25-32 μM) sobre bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e praticamente ausência de efeitos inibitórios sobre a proliferação de bactérias Gram-positivas. Foi descrita atividades citotóxica contra linhagens tumorais MCF-7, HeLa e B16F10, mas a ocelatina-P1 se mostrou pouco seletiva, atingindo células hígidas de fibroblastos humanos. Mesmo não sendo descrito o modo de ação do OcP1, sugere-se que a morte das células de B16-F10 poderia ser por apoptose seguido de processo necrótico (Libério *et al.*, 2008; Libério *et al.*, 2011).



Figura 3. Indivíduo adulto de *Leptodactylus labyrinthicus* (Imagem disponível em: <https://www.flickr.com/photos/pedrohmartins/9402817415/sizes/k/in/photostream>).

1.6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS PAMs

Como os PAMs são amplamente distribuídos na natureza e fazem parte do sistema de imunidade inata de muitos indivíduos, sendo eles componentes cruciais da primeira linha de defesa, os microrganismos alvos expostos aos PAMs também exibem mecanismos de resposta contra estas moléculas, gerados em resposta a um processo de co-evolução entre hospedeiros e patógenos (Gruenheid e Le Moual, 2012).

Um dos primeiros sistemas microbianos a interagir com os PAMs são aqueles responsáveis por fazer a detecção destas moléculas. Nas bactérias Gram-positivas o mecanismo foi identificado primeiro em *S. epidermidis* denominado de *antimicrobial peptide sensor* (Aps), sendo formado de três constituintes: um sensor de PAM histidina quinase ligante de membrana (ApsS), um DNA ligante regulador de resposta (AspR) e um terceiro componente (ApsX) com função ainda desconhecida. Em bactérias Gram-negativas o sistema é denominado de PhoPQ e possui apenas dois componentes, mas seu funcionamento é semelhante: O DNA ligante regulador de resposta (PhoP) e o sensor

histidina quinase (PhoQ). Ambos os sistemas são responsáveis por detectar os peptídeos e regular a expressão de genes envolvidos na resposta aos PAMs (Joo e Otto, 2015).

As bactérias em geral possuem membranas carregadas negativamente, tornando-as alvos mais perceptíveis para os PAMs que em sua maioria são moléculas catiônicas. Um dos mecanismos de resistência utilizados por bactérias é tornar sua superfície de membrana mais positiva, ou menos negativa, diminuindo a afinidade com os peptídeos catiônicos e, conseqüentemente, aumentando sua virulência no processo de infecção, este sistema também é chamado de repulsão eletrostática (Bauer e Shafer, 2015). No caso das bactérias Gram-negativas, um exemplo comum para a diminuição de carga é adicionando 4-aminoarabinose (Ara4N) aos lipídeos de membrana. Nas bactérias Gram-positivas são incorporados resíduos de D-alanina na parede celular de ácidos teicóicos ou resíduos de lisina na região da membrana celular, moléculas de carga positiva que cumprem seu papel em diminuir a interação da membrana com os PAMs catiônicos (Andersson *et al.*, 2016).

Outro mecanismo de resistência aos PAMs é a degradação por proteases no meio extracelular, secretadas ou localizadas na superfície celular microbiana, ou por enzimas no meio intracelular. Algumas bactérias comensais localizadas em regiões epidérmicas de mamíferos como *Staphylococci* produzem algumas metaloproteases que degradam PAMs humanos como a catelicidina LL-37, também degradada por proteases de bactérias patogênicas como *Enterococcus faecalis* e *Proteus mirabilis* durante o processo de infecção (Joo e Otto, 2015; Joo *et al.*, 2016). A proteólise destas moléculas depende da sua estrutura, um peptídeo linear é mais facilmente degradado se comparado com outro que apresenta ligações dissulfeto e outras modificações pós-traducionais (Fleitas *et al.*, 2016; Joo *et al.*, 2016).

Para agir contra PAMs de ação intracelular algumas bactérias apresentam proteínas transmembrânicas que expulsam esses peptídeos para fora da célula por efluxo ativo, sendo que estas bombas podem também fazer a expulsão de moléculas de substrato derivadas do hospedeiro como sais biliares e ácidos graxos. Alguns tipos de bombas conferem resistência, como o RND (*resistance-nodulation-cell division*) presente em *Neisseria gonorrhoeae*, mas algumas proteínas, como o RND de *S. aureus*, são incapazes de garantir resistência microbiana (Rieg *et al.*, 2009; Fleitas *et al.*, 2016).

Em situações de estresse geradas pela ação de peptídeos antimicrobianos, algumas bactérias aumentam a produção, secreção e liberação de moléculas e vesículas que

neutralizam os PAMs se ligando a eles na superfície celular ou a nível extracelular (Frick *et al.*, 2003; Manning e Kuehn, 2011).

O arranjo das bactérias em populações propicia a formação de biofilmes, uma superfície de agregação formada por proteínas extracelulares, DNA extracelular e polisacarídeos. Além de fornecer unicidade para o conjunto de indivíduos, esta matriz garante proteção mecânica e eletrostática às bactérias contra produtos tóxicos do meio. O PIA (adesina intercelular de polissacarídeos) e o PGA (ácido poli- γ -glutâmico) são exopolímeros produzidos por algumas bactérias do gênero *Staphylococci* que as protegem tanto de peptídeos catiônicos quanto de peptídeos aniônicos (Joo e Otto, 2015; Joo *et al.*, 2016; Fleitas *et al.*, 2016).

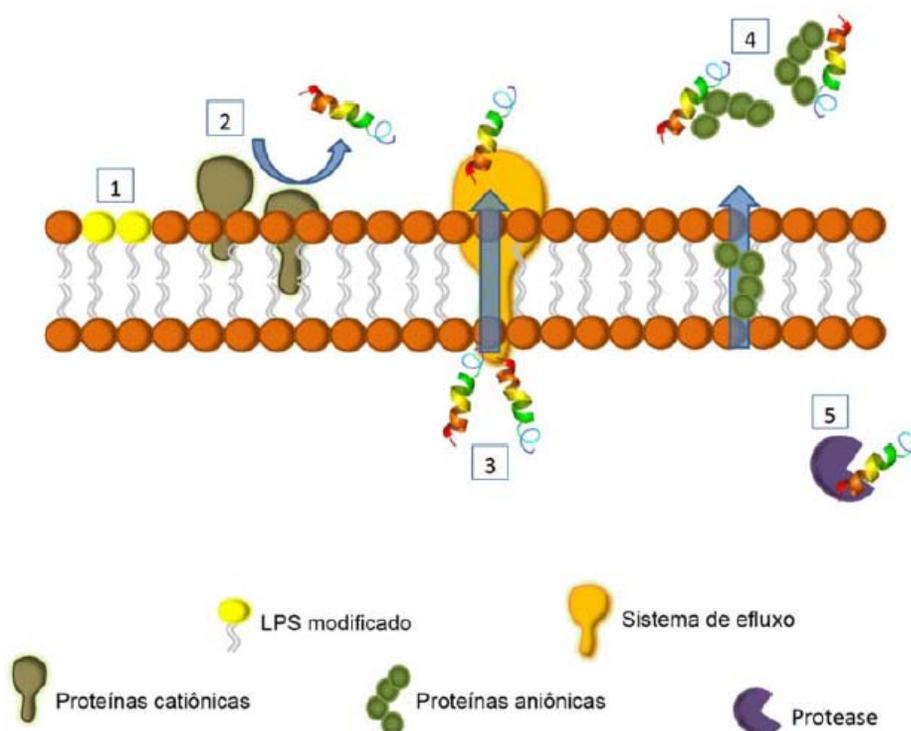


Figura 4. Esquema dos diferentes mecanismos de resistência bacteriana contra a ação dos PAMs: (1) modificações estruturais nos componentes da membrana, diminuindo a intensidade da atração entre os PAMs e a membrana; (2) proteínas catiônicas expressas na membrana que podem atuar repelindo os PAMs; (3) efluxo ativo dos PAMs por proteínas transmembrânicas; (4) secreção de moléculas aniônicas para o meio extracelular, neutralizando a ação de PAMs catiônicos e (5) degradação dos PAMs por proteases (Guimarães, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos fármacos é uma necessidade urgente. Além do crescente número de casos com bactérias resistentes a fármacos, ainda há problemas com relação às doenças virais, dados da subsecretaria de Vigilância e Saúde do DF publicados no informativo epidemiológico de vírus notificaram 641 casos prováveis de dengue em 2018 (SES-DF, 2018). Em 2017, a OMS lançou uma lista com a relação de bactérias na qual o desenvolvimento de antibióticos é urgente. Alguns destes gêneros de bactérias foram testados neste trabalho como a *Staphylococcus aureus* em que as linhagens resistentes a meticilina e vancomicina são classificadas como prioridade alta e *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, duas bactérias da família das *Enterobacteriaceae*, que possuem linhagens resistentes a carbapenêmicos classificadas como prioridade crítica (WHO, 2017).

Nos últimos anos, o grupo de "Tecnologia de Peptídeos Biologicamente Ativos" da Universidade de Brasília vem se dedicando à purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de anuros, assim como ao desenho racional e síntese química de análogos de PAMs como pode ser comprovado pela nossa produção científica dentro desse tema. Um exemplo de PAM isolado e caracterizado por nosso grupo é a ocelatina P1, ou pentadactilina, extraída das secreções de *Leptodactylus pentadactylus* e *L. labyrinthicus* apresentando moderada atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-negativas e uma baixa atividade citolítica sobre eritrócitos humanos, além de ser ativa sobre células de melanoma murino (King *et al.*, 2005; Libério *et al.*, 2011). Sendo assim, o presente projeto tem como justificativa o desenvolvimento de análogos do PAM pentadactilina e o estudo de suas atividades antimicrobianas e citotóxicas sobre diferentes microrganismos e vírus de modo a contribuir com formas alternativas ao tratamento de doenças infecciosas e parasitárias.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo geral avaliar os efeitos antimicrobianos, antiparasitários e antivirais de dez novos análogos do PAM pentadactilina sobre diferentes microrganismos e vírus patogênicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Determinar os efeitos antimicrobianos de dez novos análogos do PAM pentadactilina sobre bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas por meio da determinação das concentrações inibitórias mínimas;

3.2.2. Determinar os efeitos antimicrobianos de dez novos análogos do PAM pentadactilina sobre fungos leveduriformes patogênicos por meio da determinação das concentrações inibitórias mínimas;

3.2.3. Determinar os efeitos antiparasitários de dez novos análogos do PAM pentadactilina sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi*;

3.2.4. Determinar os efeitos antivirais de dez novos análogos do PAM pentadactilina sobre os vírus causadores da febre amarela e dengue empregando-se a técnica de HCA (*High Content Analysis*);

3.2.5. Determinar os efeitos citolíticos de dez novos análogos do PAM pentadactilina sobre células sanguíneas humanas (eritrócitos e leucócitos) empregando-se a técnica de citometria de fluxo.

3.2.6. Determinar a composição de elementos de estrutura secundária de dez novos análogos do PAM pentadactilina com o emprego da técnica de dicroísmo circular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. SÍNTESE QUÍMICA E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE INTERESSE

Os peptídeos empregados no presente projeto foram propostos pelo grupo de "Tecnologia de Peptídeos Biologicamente Ativos" da Universidade de Brasília, produzidos por síntese química em fase sólida automatizada e purificados por RP-HPLC pela empresa Genone mediante contrato de confidencialidade.

4.2. DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos foram dosados pelo método de determinação da concentração protéica por absorção ao UV (Aitken e Learmonth, 2002). O material foi quantificado por leitura espectrofotométrica realizada em equipamento Bel Photonics UV/Vis M51 e as leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 205, 215 e 225 nm. As fórmulas para estimar a concentração dos peptídeos (em µg/mL) estão descritas a seguir:

$$\text{Concentração}_{01} = 144 \times (A_{215} - A_{225})$$

$$\text{Concentração}_{02} = (A_{205} / 31) \times 1000$$

Para obter a concentração da alíquota analisada é necessário calcular a média dos resultados das concentrações 1 e 2 para cada amostra.

Após realizar as dosagens, cada peptídeo foi alíquotado para o volume de 1 mL em tubos tipo *ependorf* e, em seguida, secados em concentrador a vácuo.

4.3. ENSAIOS SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Alíquotas de 200 µL de suspensão da bactéria a ser testada (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) foram adicionadas a 7 mL de meio Mueller Hinton em um tubo plástico de 15 mL. O tubo, então, foi incubado entreaberto em um *shaker* a 37°C durante 16 horas, com agitação constante. Em seguida, foi avaliada a proliferação celular por meio de detecção no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) e as suspensões foram ajustadas para um valor próximo a 1 com a adição de meio Mueller Hinton. Após esse ajuste, foram preparados os inóculos (diluição 1:50 para as culturas de bactérias Gram-negativas e de 1:100 para as culturas de bactérias Gram-positivas).

As soluções-estoque dos peptídeos na concentração de 256 μM foram preparadas em água Milli-Q e filtradas em filtros Millex de 0,22 μm (Merck Millipore Corporation, Alemanha). Posteriormente foi realizada diluição seriada das amostras em água Milli-Q e adicionados 50 μL da suspensão bacteriana previamente diluída. Como controle negativo foi utilizada apenas água Milli-Q e como controle positivo foi empregado formaldeído 0,4% (v/v). Cada peptídeo foi testado em triplicata, assim como os controles. Os poços com formaldeído foram cobertos com Parafilm[®] para evitar interferência nos demais poços em virtude da sua evaporação. As placas foram incubadas a 37°C por 20-24 horas e a inibição da proliferação bacteriana foi avaliada por leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan[®] FC, Thermo Scientific, San Jose, CA). A concentração inibitória mínima (CIM) foi assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

4.4. ENSAIOS SOBRE FUNGOS PATOGÊNICOS

Alíquotas de 200 μL de suspensão dos fungos a serem testados (*Candida albicans* ATCC 14053 e *Cryptococcus neoformans* H99) foram adicionadas a 7 mL de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) em um tubo plástico de 15 mL. O tubo, então, foi incubado entreaberto em um *shaker* a 37°C durante 16 horas, com agitação constante. Em seguida, foi avaliada a proliferação celular por meio de detecção no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) e as suspensões foram ajustadas para um valor próximo a 1 com a adição de meio BHI. Após esse ajuste, foram preparados os inóculos (diluição 1:100 em meio BHI).

As soluções-estoque dos peptídeos na concentração de 256 μM foram preparadas em água Milli-Q e filtradas em filtros Millex de 0,22 μm (Merck Millipore Corporation, Alemanha). Posteriormente foi realizada diluição seriada das amostras em água Milli-Q e adicionados 50 μL da suspensão fúngica previamente diluída. Como controle negativo foi utilizada apenas água Milli-Q e como controle positivo foi empregado formaldeído 0,4% (v/v). Cada peptídeo foi testado em triplicata, assim como os controles. Os poços com formaldeído foram cobertos com Parafilm[®] para evitar interferência nos demais poços em virtude da sua evaporação. As placas foram incubadas a 37°C por 20-24 horas e a inibição da proliferação fúngica foi avaliada por leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 595 nm em

leitora de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, San Jose, CA). A concentração inibitória mínima (CIM) foi assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

4.5. ENSAIOS SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

As culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa CL-Brener) foram cultivadas a 28°C em estufa, em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*), contendo 10% de SFB (soro fetal bovino, que é a fração líquida do sangue coagulado do feto bovino, contendo grande quantidade de nutrientes celulares). Resumidamente, as culturas foram crescidas até que a densidade celular de 10^7 parasitos/mL fosse atingida. Cem microlitros da suspensão de parasita a 5×10^6 parasitas/mL foram incubados em microplacas de 96 poços para leitura de fluorescência com um volume igual dos peptídeos, diluídos em série (128 a $1,0 \mu\text{M}$) em meio LIT, por 96 horas, para avaliação da ação inibitória sobre o crescimento dos protozoários. Depois deste tempo, foram transferidos 100 μL de cada poço da placa transparente para uma placa branca e fosca e foram adicionados 20 μL de CellTiter-Blue® (Promega, EUA) para avaliação dos efeitos antiparasitários. A viabilidade parasitária foi determinada por fluorescência a 560 nm (excitação) e 590 nm (emissão), após 1 hora de incubação a 37°C, em uma leitora de microplacas (SpectraMax® M5 Microplate Reader, Molecular Devices, EUA). Como controle positivo, foi utilizado o composto Nifurtimox. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6 ENSAIOS ANTIVIRAIS

4.6.1. VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Os controles positivos (Interferon α 2A 1,3 nM), controles negativos (água ou DMSO 1%) e os peptídeos de interesse (na concentração inicial de $50 \mu\text{M}$, com diluição seriada até a concentração mínima de $1,56 \mu\text{M}$) foram adicionados aos poços da placa. Após a adição dos compostos, células Huh7 (hepatocarcinoma humano) e o vírus da febre amarela foram adicionados e as placas foram incubadas por 72 h. Antes da leitura, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% e reveladas com DAPI. A aquisição de imagens foi feita no equipamento Operetta High-Content Automated Imaging System (Perkin Elmer) e o software Harmony foi empregado na contagem total de células do hospedeiro, taxa de infecção e intensidade do sinal do vírus da febre amarela por célula infectada.

No presente ensaio foi empregada a forma recombinante do vírus da febre amarela (eYFP) que é capaz de expressar mais intensamente a proteína fluorescente amarela (“yellow fluorescent protein”) (Pilger *et al.*, 2017).

A taxa de infecção (IR) é a razão entre (i) o número total de células infectadas em todas as imagens do poço e (ii) o número total de células em todas as imagens do mesmo poço. A IR foi normalizada em função dos controles negativo (células infectadas na presença de DMSO 1%) e positivo (células não-infectadas) para determinar a atividade normalizada (NA): $NA = [1 - (Av. CRT - Av. CRP)/(Av. CRN - Av. CRP)] \times 100$. A razão celular foi definida como sendo a razão entre o número total de células no poço com a presença da substância a ser testada e a média do número total de células nos poços do controle negativo. A razão celular é uma estimativa da atividade do composto testado sobre as células hospedeiras Huh7 é determinada para estimar a seletividade do composto para o vírus da febre amarela.

Av. CRT: média da razão celular do composto testado

Av. CRP: média da razão celular do controle positivo (Interferon α 2A 5,2 nM)

Av. CRN: média da razão celular do controle negativo.

4.6.2. VÍRUS DA DENGUE (SOROTIPO 4)

Os controles positivos (Interferon α 2A 1,3 nM), controles negativos (água ou DMSO 1%) e os peptídeos de interesse (na concentração inicial de 50 μ M, com diluição seriada até a concentração mínima de 1,56 μ M) foram adicionados aos poços da placa. Após a adição dos compostos, células Huh7 (hepatocarcinoma humano) e o vírus da dengue sorotipo 4 foram adicionados e as placas foram incubadas por 72 horas. Antes da leitura, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 4%, tratadas com Triton X-100 0,25% por 5 minutos, marcadas com o anticorpo primário para a proteína flaviviral e com o anticorpo secundário de cabra contra camundongo marcado com AlexaFluor488 e DAPI. A aquisição de imagens foi feita no equipamento Operetta High-Content Automated Imaging System (Perkin Elmer) e o software Harmony foi empregado na contagem total de células do hospedeiro, taxa de infecção e intensidade do sinal de AlexaFluor488 por célula infectada.

A taxa de infecção (IR) é a razão entre (i) o número total de células infectadas em todas as imagens do poço e (ii) o número total de células em todas as imagens do mesmo poço. A IR foi normalizada em função dos controles negativo (células infectadas na presença de DMSO 1%) e positivo (células não-infectadas) para determinar a atividade normalizada (NA): $NA = [1 - (Av. CRT - Av. CRP)/(Av. CRN - Av. CRP)] \times 100$. A razão celular foi definida como sendo a razão entre o número total de células no poço com a presença da substância a ser testada e a média do número total de células nos poços do controle negativo. A razão celular é uma estimativa da atividade do composto testado sobre as células hospedeiras Huh7 é determinada para estimar a seletividade do composto para o vírus DENV4.

Av. CRT: média da razão celular do composto testado

Av. CRP: média da razão celular do controle positivo (Interferon α 2A 5,2 nM)

Av. CRN: média da razão celular do controle negativo.

4.7. ENSAIO CITOLÍTICO SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS

Para este ensaio foram utilizados quatro tubos de EDTA com 8 mL de sangue tipo O⁺ de doador voluntário após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Após o sangue ter sua fase plasmática removida, o volume foi completado com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Este processo de lavagem foi repetido três vezes. A fase plasmática foi retirada para que as proteínas do plasma sanguíneo (principalmente a albumina) não interferissem com a leitura dos resultados e nem com a interação entre os peptídeos e as células. Para os experimentos, foram separadas alíquotas de 800 μ L de cada peptídeo na concentração de 256 μ M em água Milli-Q e secadas em concentrador a vácuo (SC 100, Thermo Scientific, EUA). Depois da secagem, cada tubo com material foi ressuscitado em 200 μ L de solução de NaCl 0,9% (p/v) obtendo-se a concentração final desejada de 1.024 μ M.

Foram preparados 3 tubos tipo *ependorf* por amostra, cada um com volume de 600 μ L (438 μ L de sangue total e 62 μ L do peptídeo na concentração inicial de 1.024 μ M para obter uma concentração peptídica final igual a 128 μ M).

O controle negativo foi feito incubando-se a alíquota de sangue com uma solução de NaCl 0,9% (p/v) e o controle positivo com Triton X-100 a 10% (v/v) de concentração final.

A leitura foi feita 60 minutos após a adição dos peptídeos (ou soluções controle) ao sangue, com a remoção de uma alíquota de 88 μ L de cada réplica para análise no

equipamento Sysmex XN-9000 TM (Analisador Hematológico Automatizado, Sysmex, Japão). Os gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software).

4.8. ANÁLISES DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR DICROÍSMO CIRCULAR

Para realizar as análises de dicróismo circular foi utilizado o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão) e cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 0,1 cm. Os espectros UV foram analisados a temperatura constante de 25°C nos comprimentos de onda entre 190 e 260 nm com o resultado calculado a partir da média de cinco leituras em sequência de cada amostra.

Os espectros dicróicos foram gerados a partir das 11 soluções peptídicas a 50 µM em água e a 50 µM em SDS (dodecilsulfato de sódio) na concentração de 35 µM. A elipticidade molar foi calculada a partir da conversão das elipticidades observadas através da equação abaixo:

$$[\theta] = \frac{(\theta \times 100 \times M)}{(C \times l \times n)}$$

Onde $[\theta]$ é a elipticidade molar média dada em grau.cm².dmol⁻¹. θ é a elipticidade em graus, M é a massa molecular, C é a concentração em mg/mL, l é o caminho óptico em cm e n número de resíduos.

Os percentuais de helicidade foram calculados tendo como base as elipticidades molares a 208 nm.

$$f_H = \frac{[\theta]_{208} - 4000}{33\,000 - 4000}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os análogos utilizados neste trabalho foram propostos baseados na análise da estrutura primária do peptídeo selvagem OcP1, a pentadactilina, após extensa revisão bibliográfica do tema e determinação de parâmetros físico-químicos como anfipaticidade e hidrofobicidade procurando-se obter análogos com atividade antimicrobiana/citotóxica e seletividade otimizadas.

Tais análogos, aqui designados pelas abreviações OcP1-A1, OcP1-A2, OcP1-A3, OcP1-A4, OcP1-A5, OcP1-A6, OcP1-A7, OcP1-A8, OcP1-A9 e OcP1-A10, bem como a ocelatina OcP1, foram produzidos por síntese química em sintetizador automático de peptídeos, empregando-se a química Fmoc. Em seguida, os análogos sintetizados foram purificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C₁₈ e seu grau de homogeneidade e a correção do processo de síntese foram avaliados por espectrometria de massas pela empresa Genone, especializada na área de síntese de peptídeos, mediante contrato de confidencialidade. As estruturas primárias dos dez análogos empregados no presente estudo não serão divulgadas por questões de proteção da propriedade intelectual.

Uma vez concluída a etapa inicial de síntese química dos peptídeos e de posse das versões sintéticas dos análogos propostos e do peptídeo selvagem foram realizados ensaios de microdiluição *in vitro* para avaliar seus efeitos antimicrobianos sobre bactérias patogênicas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*), sobre os fungos patogênicos leveduriformes *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, sobre *Trypanosoma cruzi*, protozoário responsável pela Doença de Chagas, e sobre os vírus causadores da febre amarela e da dengue. Também foram feitos ensaios citolíticos para avaliar os efeitos citolíticos dos peptídeos sobre eritrócitos e leucócitos humanos de modo a avaliar seu potencial terapêutico. Finalmente, foram conduzidas análises de dicróismo circular visando se determinar os componentes de estrutura secundária presentes em tais peptídeos procurando-se correlacionar os efeitos biológicos observados com sua propensão à formação de alfa-hélices em ambientes membrana-miméticos.

Parâmetros físico-químicos, como a carga, a hidrofobicidade média e o momento hidrofóbico, foram determinados para a OcP1 e seus análogos e estão detalhados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da pentadactilina (OcP1) e seus análogos.

Peptídeos	Carga	Hidrofobicidade Média (%)	Momento hidrofóbico (μH)
OcP1	+3	48	0,324
OcP1-A1	+3	48	0,329
OcP1-A2	+3	47,62	0,514
OcP1-A3	+6	48	0,398
OcP1-A4	+6	47,62	0,596
OcP1-A5	+4	42	0,547
OcP1-A6	+5	52	0,479
OcP1-A7	+5	56	0,272
OcP1-A8	+4	60	0,433
OcP1-A9	+2	47,37	0,473
OcP1-A10	+3	47,37	0,438

Os parâmetros apresentados na Tabela 1 foram escolhidos devido a correlação que possuem com a atividade biológica, não só contra microrganismos, mas também contra células humanas.

A carga, ou cationicidade, corresponde à distribuição de resíduos de aminoácidos com carga positiva ao longo da estrutura peptídica primária (Yeaman e Yount, 2003). A amidação do domínio carboxi-terminal também gera um aumento da carga, sendo esta mudança pós-traducional comumente encontrada em peptídeos de anuros (Nascimento *et al.*, 2003) e está presente na estrutura da pentadactilina e todos os seus análogos.

Analisando-se este parâmetro para as moléculas em foco foi evidenciado que os análogos OcP1-A1, OcP1-A2 e OcP1-A10 mantiveram a mesma carga que a pentadactilina (+3), no análogo OcP1-A9 foi observada a diminuição do seu valor para +2, enquanto que os peptídeos OcP1-A5 e OcP1-A8 tiveram aumento de carga para +4 e os

peptídeos OcP1-A6 e OcP1-A7 para +5. O ganho de carga mais expressivo foi observado nos análogos OcP1-A3 e OcP1-A4 com carga +6.

A hidrofobicidade e a anfipaticidade são parâmetros de fundamental importância para a interação entre os PAMs e as membranas biológicas. A hidrofobicidade é a porcentagem de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na estrutura do peptídeo, sendo que esta característica está relacionada com a capacidade de permeabilização de membranas plasmáticas. Já a anfipaticidade, medida pelo momento hidrofóbico, está relacionada com a periodicidade da disposição dos resíduos hidrofóbicos ao longo da estrutura primária e da conformação adotada pela molécula (Zelezetsky e Tossi, 2006; Kumar *et al.*, 2018).

Para a característica da hidrofobicidade média (%), os peptídeos OcP1-A1 e OcP1-A3 mantiveram a mesma porcentagem em relação à pentadactilina (48%). Os valores diminuíram para os análogos OcP1-A2 (47,62%), OcP1-A4 (47,62%), OcP1-A5 (42%), OcP1-A9 (47,37%) e OcP1-A10 (47,37%), e aumentaram para os peptídeos OcP1-A6 (52%), OcP1-A7 (56%) e OcP1-A8 (60%). Os valores para o momento hidrofóbico variaram entre 0,272 e 0,596.

5.1. ENSAIOS SOBRE BACTÉRIAS E FUNGOS PATOGÊNICOS

Os efeitos antimicrobianos da pentadactilina já foram avaliados em trabalhos anteriores (King *et al.*, 2005; Libério, 2008) contra as mesmas bactérias aqui testadas e os dados obtidos mostraram uma certa equivalência entre estes estudos, sendo que as diferenças observadas podem ser atribuídas a diferenças nos métodos de quantificação dos peptídeos empregados.

Contra bactérias Gram-positivas, a OcP1 se mostrou inativa em relação a *S. aureus* e teve uma baixa atividade antimicrobiana sobre *S. epidermidis*, exibindo valores de concentração mínima inibitória (CMI) de 128 μM , já com as Gram-negativas mostrou atividade considerável, CMI = 8 μM tanto para *E. coli* quanto para *K. pneumoniae* (Tabela 2).

De maneira geral, a maioria dos análogos apresentaram efeitos antimicrobianos sobre a maior parte dos patógenos testados. Os análogos OcP1-A1 e OcP1-A2 mostraram resultados semelhantes ao peptídeo selvagem, tendo um pequeno aumento na eficiência contra *E. coli*, ambos os análogos com concentração mínima inibitória (CMI) de 4 μM ,

entretanto, o OcP1-A2 mostrou uma atividade mais significativa contra *S. epidermidis* (CMI igual a 16 μM) (Tabela 2).

Em outro trabalho desenvolvido por Márquez (2012) com um análogo da pentadactilina, o G16OCP1, que apresenta apenas a substituição de serina por glicina na posição 16 em relação à pentadactilina, exibiu atividade seletiva similar a estes peptídeos, exibindo efeitos antimicrobianos sobre as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* com CMI de 32 μM , mostrando-se inativo contra *S. aureus* e com pequena atividade inibitória sobre *S. epidermidis*.

Os análogos OcP1-A5, OcP1-A9 e OcP1-A10 foram praticamente inativos contra todas as bactérias testadas neste estudo, tendo uma eficiência bem inferior comparado à pentadactilina (Tabela 2).

No caso dos análogos OcP1-A3, OcP1-A4, OcP1-A6, OcP1-A7 e OcP1-A8 pode-se observar que exibiram maior atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias patogênicas testadas comparando com o peptídeo OcP1. Observa-se que, nos casos dos análogos OcP1-A3 e OcP1-A4, a eficiência antibacteriana foi muito superior, sendo que, para estes análogos, alguns valores de concentração mínima inibitória foram inferiores a 1 μM (Tabela 2).

A eficácia na ação de um peptídeo antimicrobiano geralmente depende da interação com a membrana do patógeno. Entretanto, as bactérias possuem estratégias próprias para se defender contra diversas ameaças, incluindo estes peptídeos. Como a maioria dos PAMs de anuros são catiônicos, devido ao grande número de resíduos de lisina e pelo menos 50% dos resíduos de sua estrutura serem hidrofóbicos, a afinidade pelas estruturas aniônicas das membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é alta (Conlon, 2011), este é um ponto estratégico para o mecanismo de resistência bacteriano, onde há a modificação de componentes na membrana para torná-la mais positiva ou menos negativa (Bauer e Shafer, 2015).

Alguns fármacos antimicrobianos possuem especificações quanto às suas CMIs, a ampicilina quando testada contra *E. coli* apresentou CMI de 32 μM e 128 μM contra *K. pneumoniae*. Já a Vancomicina foi testada contra *S. aureus* e apresentou potente ação antibacteriana com CMI de 1 μM . Alguns dos peptídeos aqui testados apresentaram CMIs similares e alguns até mais eficazes do que estes agentes comercialmente usados.

Tabela 2. Efeitos antimicrobianos (CMI em μM) da pendactilina (OcP1) e seus análogos sobre bactérias patogênicas.

Peptídeo	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228
OcP1	8	8	Inativo	128
OcP1-A1	4	8	Inativo	128
OcP1-A2	4	8	128	16
OcP1-A3	<1	<1	16	2
OcP1-A4	<1	<1	8	<1
OcP1-A5	128	>128	Inativo	Inativo
OcP1-A6	8	2	8	2
OcP1-A7	2	2	64	4
OcP1-A8	2	4	8	2
OcP1-A9	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
OcP1-A10	128	Inativo	Inativo	Inativo

Ainda há algumas diferenças entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas que podem interferir nas suas resistências aos agentes antimicrobianos. Pensava-se que a espessura mais acentuada das membranas de bactérias Gram-positivas fosse o principal fator que promoveria uma ação mais efetiva dos PAMs sobre este tipo de microrganismo, mas a mudança dos seus componentes estruturais, junto com a produção de proteases, sistemas de efluxo e um rápido e apurado sistema gênico de detecção de peptídeos antimicrobianos tornam-as indivíduos difíceis de se combater, mecanismos estes presentes em algumas Gram-negativas, mas principalmente em bactérias do gênero *Staphylococcus* (Joo e Otto, 2015; Maria-Neto *et al.*, 2015; Joo *et al.*, 2016).

Estudos feitos com o análogo da magainina 2 aumentando a carga das moléculas de +3 para +5 e mantendo os demais parâmetros constantes geraram melhorias na eficiência microbicida quando testadas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Dathe *et al.*, 2001), corroborando com o trabalho de Nascimento (2007) em que foi observado indícios

de que a carga líquida pode ser um parâmetro determinante principalmente em relação à atividade antimicrobiana, sendo evidenciado um aumento da atividade biológica com o aumento da carga.

Esta hipótese pode explicar alguns pontos, como a semelhança entre as atividades dos análogos OcP1-A1 e A2 em relação ao peptídeo selvagem, devido à mesma carga líquida (+3) entre eles; a acentuada atividade dos análogos OcP1-A6 (+5), A7(+5) e A8 (+4) e o aumento expressivo do efeito antibacteriano dos análogos OcP1-A3 e A4, ambos com os maiores valores de cationicidade (+6) e atividade antimicrobiana.

Outro parâmetro importante para a interação de peptídeos com membranas biológicas é a extensão da cadeia peptídica. Os PAMs isolados de anuros podem ser reduzidos até uma forma mínima sem perder sua atividade biológica, tendo a possibilidade de desenvolver peptídeos menores com maior seletividade (Savoia *et al.*, 2008). Uma provável explicação para a inatividade ou baixa atividade dos análogos OcP1-A5, A9 e A10 foi a retirada de 6 aminoácidos da sua estrutura, o que pode ter interferido nos efeitos antimicrobianos. Foram retirados 4 resíduos de aminoácidos de dois dos análogos desenhados, OcP1-A2 e OcP1-A6, não tendo interferência considerável em suas atividades.

O fungo *C. albicans* se mostrou mais resistente contra boa parte dos peptídeos testados. Os análogos OcP1-A3 e A4 demonstraram atividade antimicrobiana mais expressiva em comparação aos demais peptídeos com CMI igual a 8 μM e a 4 μM , respectivamente, destacando também a atividade do análogo OcP1-A7 que obteve atividade significativa (CMI = 16 μM). Os demais apresentaram atividades relativamente baixas, variando de 32 μM a 128 μM , ou não apresentando qualquer inibição (Tabela 3).

Para o fungo *C. neoformans*, os peptídeos se mostraram mais efetivos, incluindo a pentadactilina (com CMI = 8 μM). Entretanto, os análogos OcP1-A5, OcP1-A9 e OcP1-A10 se mostraram relativamente ineficientes para inibir o crescimento do fungo, comparandos com o peptídeo selvagem, com valores igual ou superiores a 32 μM . Os análogos OcP1-A3, OcP1-A4, OcP1-A6 e OcP1-A7 foram os que apresentaram atividade antimicrobiana mais expressiva com valores igual ou inferiores a 2 μM (Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos antimicrobianos (CMI em μM) da pendactilina (OcP1) e seus análogos sobre fungos patogênicos.

Peptídeo	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. neoformans</i> H99
OcP1	64	8
OcP1-A1	32	8
OcP1-A2	32	4
OcP1-A3	8	<1
OcP1-A4	4	<1
OcP1-A5	128	32
OcP1-A6	Inativo	<1
OcP1-A7	16	2
OcP1-A8	32	4
OcP1-A9	Inativo	Inativo
OcP1-A10	Inativo	64

Esta resistência apresentada pela *C. albicans* contra os peptídeos pode estar relacionada com a “estratégia de evasão de três fases” que este microrganismo possui. Este mecanismo consiste na secreção de proteínas que inibem a ação do PAM por degradação ou ligação desta molécula, bombas de efluxo que fazem a expulsão dos peptídeos que adentraram no fungo e vias de resposta ao estresse fúngico que induzem modificações na própria estrutura do patógeno e que previnem sua morte. Enquanto que a suscetibilidade do *C. neoformans* pode ser possivelmente explicada pela cápsula polissacarídica carregada negativamente (Swidergall e Ernst, 2014).

5.2. ENSAIOS SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Os mecanismos de ação dos PAMs contra parasitas são similares aos encontrados contra bactérias e fungos. Comumente estes peptídeos se ligam à membrana citoplasmática causando sua lise, mas há descrições de alguns peptídeos que entram no ambiente

intracelular, sem causar dano a bicamada lipídica, e atingem organelas prejudicando o funcionamento do protozoário (Torrent *et al.*, 2012).

Vários estudos demonstraram a ação antiparasitária de PAMs contra o protozoário *T. cruzi*, sendo que muitos destes peptídeos são isolados da secreção cutânea de anuros, como a magainina 2 e alguns de seus análogos encontrados em *Xenopus laevis*, a temporina (T-SHd) isolada de *P. sahari*, e as dermaseptinas e filosseptinas presentes nas secreções de algumas espécies dentro do gênero *Phyllomedusa*. As dermaseptinas e a magainina 2, bem como alguns de seus análogos, foram testadas também contra a forma epimastigota de *T. cruzi* (Brand *et al.*, 2013; Lewies *et al.*, 2015).

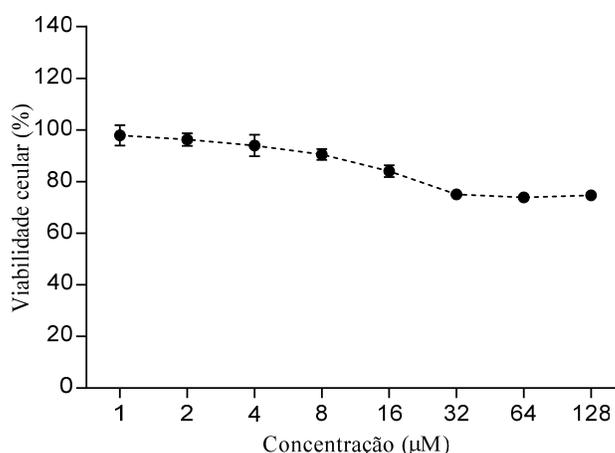
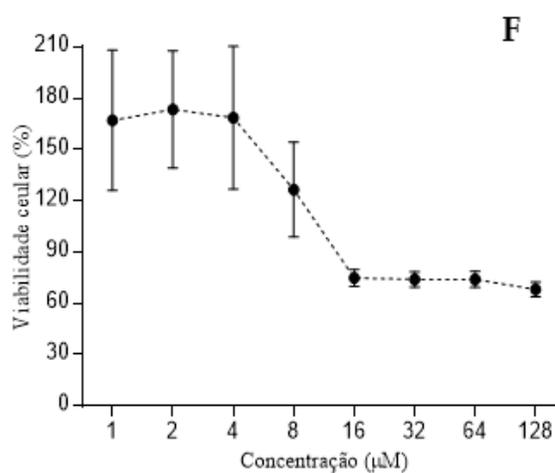
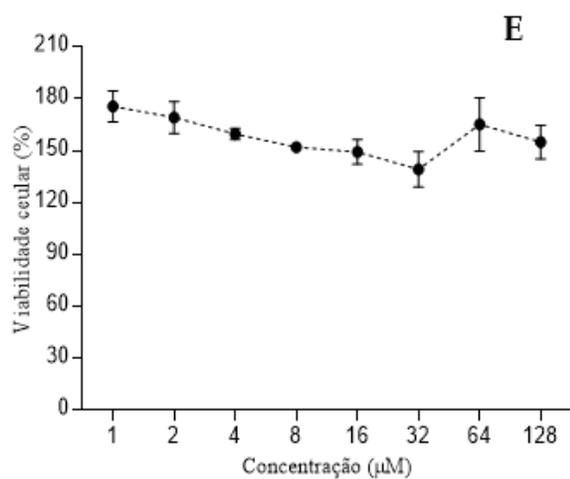
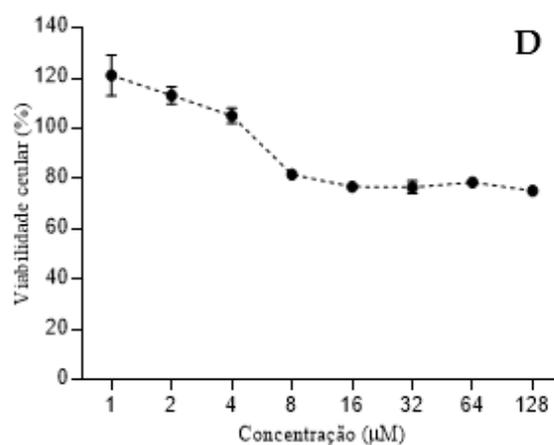
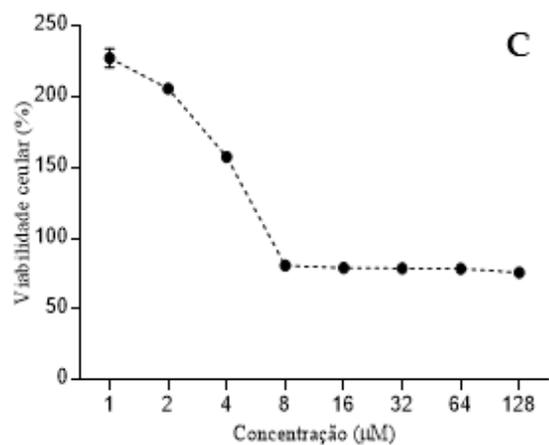
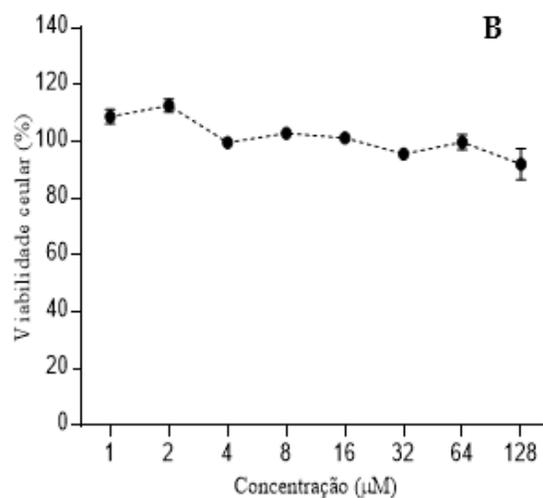
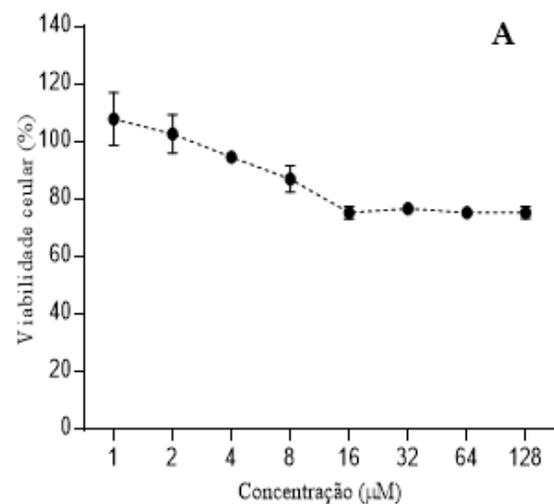


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* após incubação por 96 horas com a pentadactilina (OcP1). Os pontos no eixo X foram renomeados para facilitar a leitura do gráfico, mas estão em escala logarítmica.

A pentadactilina (OcP1) somente foi capaz de inibir completamente o crescimento do parasita na concentração máxima empregada (128 µM), sendo que, ao se analisar o comportamento da curva (viabilidade celular em função da concentração da pentadactilina que variou de 128 a 1 µM), os valores de viabilidade celular ficaram entre 100 e 70% aproximadamente (Figura 5). Os análogos OcP1-A1, A3, A5, A6, A7 e A8 apresentaram atividades antiparasitárias parciais, entretanto, nenhum dos peptídeos testados resultou em inibição de 50% do crescimento populacional do parasita (Figura 6). Tal ensaio precisa ser repetido, uma vez que os resultados obtidos para a pentadactilina (OcP1) estão em

desacordo com o observado por Guimarães (2015) que estimou o valor da LC_{50} contra a forma epimastigota do parasita *T. cruzi* como sendo igual a 30,34 μM .



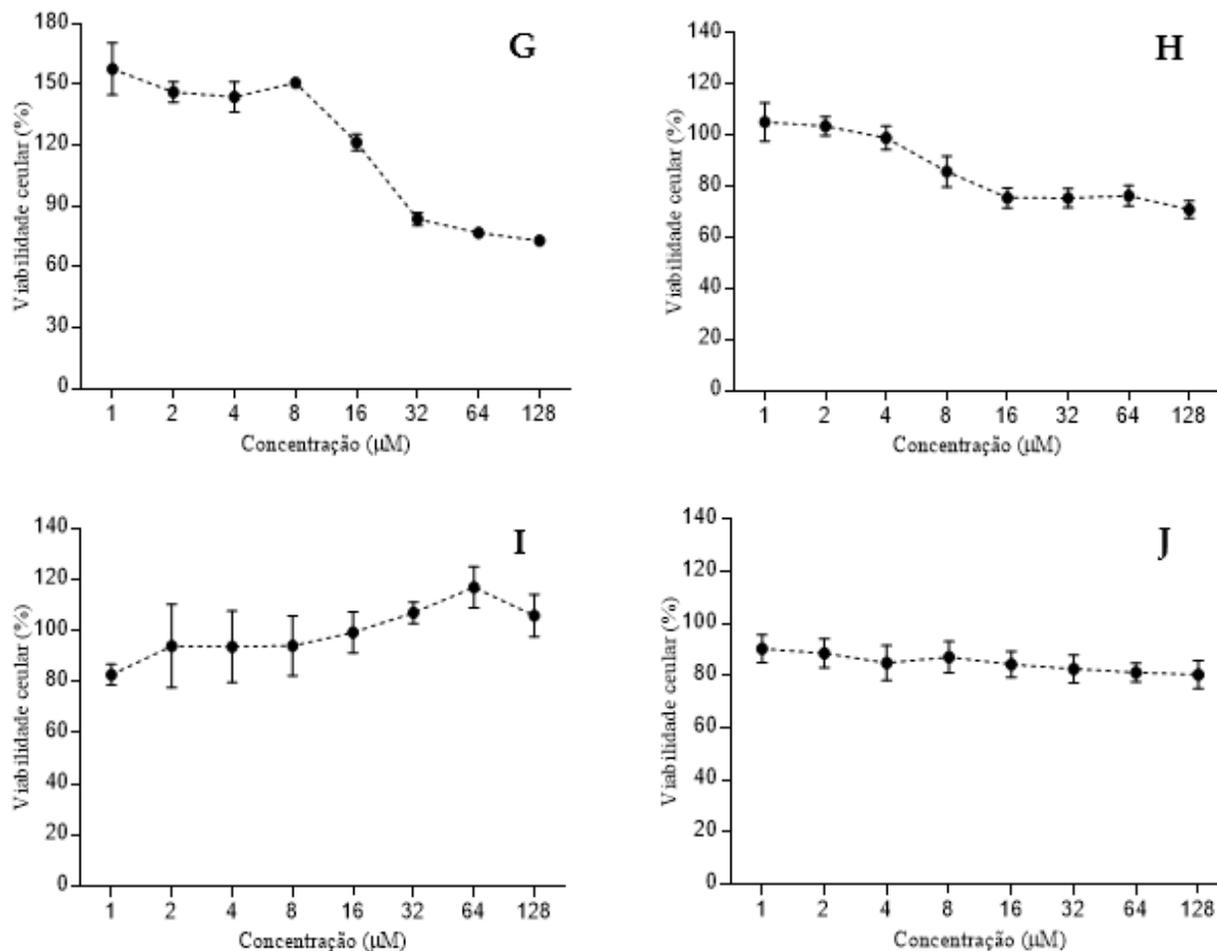


Figura 6. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* após incubação por 96 horas com: OcP1-A1(A), OcP1-A2(B), OcP1-A3(C), OcP1-A4(D), OcP1-A5(E), OcP1-A6(F), OcP1-A7(G), OcP1-A8(H), OcP1-A9(I), OcP1-A10 (J). Os pontos no eixo X foram renomeados para facilitar a leitura do gráfico, mas estão em escala logarítmica.

5.3. ENSAIOS ANTIVIRAIS

Muitos peptídeos antimicrobianos isolados das secreções cutâneas de anuros são promissores agentes antivirais, sendo que a maioria destas moléculas já estudadas pertencem à superfamília das dermaseptinas. Os mecanismos de ação variam de acordo com o vírus e os peptídeos, as caerinas, por exemplo, inibem os vírus envelopados, como o HIV, rompendo seu envoltório viral antes mesmo que o patógeno pudesse entrar em

contato com células T, já a esculentina-2P e a ranatuerina-2P inativam os vírus diretamente ao invés de inibir a replicação em células infectadas (Xu e Lai, 2015).

No trabalho de Cunha Neto (2015), a ocelatina-F1, um peptídeo antimicrobiano isolado da secreção cutânea de *Leptodactylus labyrinthicus*, quando é testada juntamente com a bufotenina, um tipo de alcalóide extraído da secreção cutânea da mesma espécie, demonstrou atividade antiviral contra o vírus envelopado da raiva. A ocelatina, ao ser testada sem a bufotenina, não apresentou atividade antiviral, mostrando a importância deste efeito sinérgico nesta propriedade.

O vírus da herpes, também do tipo envelopado, é um problema de saúde global e ocorre tanto em países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento. A dermaseptina-S4 e alguns análogos apresentaram atividades antivirais potentes contra este vírus, sendo o análogo K4K20S4 o que apresentou o melhor índice de seletividade quando incubadas com células epiteliais de rim (Bergaoui *et al.*, 2013).

Os dois vírus aqui testados são da família *Flaviviridae*, ambos envelopados. Esta membrana lipídica externa ao capsídeo é um possível alvo para a ação dos PAMs, podendo agir de forma semelhante aos mecanismos propostos contra bactérias e fungos.

A pentadactilina apresentou bons resultados quando testada contra o vírus da dengue. O IS, ou índice de seletividade (a razão entre a concentração citotóxica 50% e a concentração efetiva 50%) dos análogos OcP1-A1, A2, A7 e A8 foram bem similares ao do peptídeo selvagem, variando entre 2,17 e 2,41, com destaque para o análogo OcP1-A2 que não gerou morte celular mesmo com uma atividade antiviral um pouco mais fraca (20,84 μM). Os análogos OcP1-A5, A9 e A10 não apresentaram atividade citotóxica e antiviral, provavelmente devido a retirada de 6 resíduos de aminoácidos, hipótese também atribuída à ausência de atividade nos ensaios antibacterianos e antifúngicos (Tabela 4).

Os melhores desempenhos considerando-se os valores de IS foram obtidos com os análogos OcP1-A3 (9,65), A4 (4,61) e A6 (6,99), com inibição da atividade viral com valores de EC_{50} entre 6,23 e 2,94 μM (Tabela 4). Uma provável hipótese é de que a cationicidade seja uma característica favorável para a atividade antiviral, visto que estes são os peptídeos com cargas líquidas mais positivas. Entretanto este não é um fator linear pois o análogo A7 possui carga +5 e não apresentou valores similares em relação a inibição viral.

Tabela 4. Concentração efetiva 50% (μM), concentração citotóxica 50% (μM) e índice de seletividade da pentadactilina (OcP1) e seus análogos sobre o vírus da dengue e células Huh7.

Peptídeo	EC ₅₀	CC ₅₀	IS
OcP1	13,42	33,37	2,49
OcP1-A1	21,47	53,56	2,41
OcP1-A2	20,84	n.a.	>2,40
OcP1-A3	2,94	28,38	9,65
OcP1-A4	6,23	28,72	4,61
OcP1-A5	n.a.	n.a.	n.a.
OcP1-A6	4,24	29,62	6,99
OcP1-A7	25,89	60,35	2,33
OcP1-A8	22,99	49,93	2,17
OcP1-A9	n.a.	n.a.	n.a.
OcP1-A10	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. – não ativo

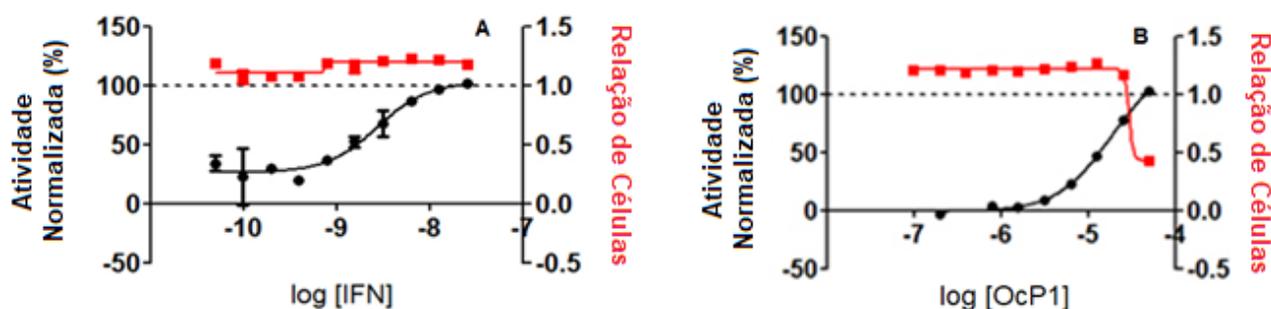
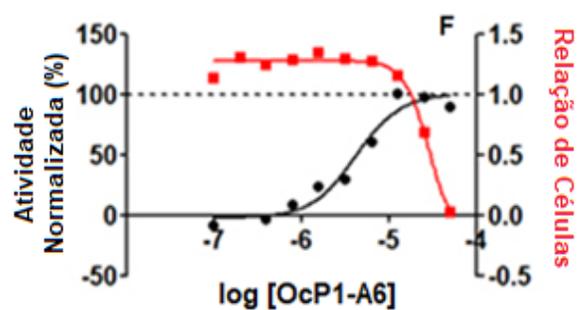
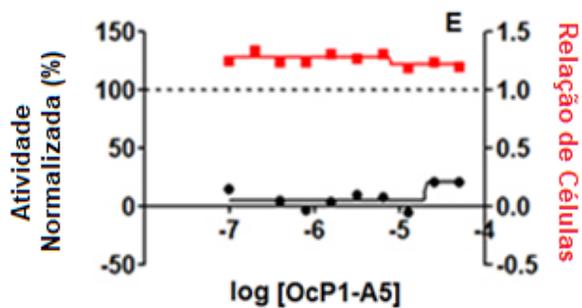
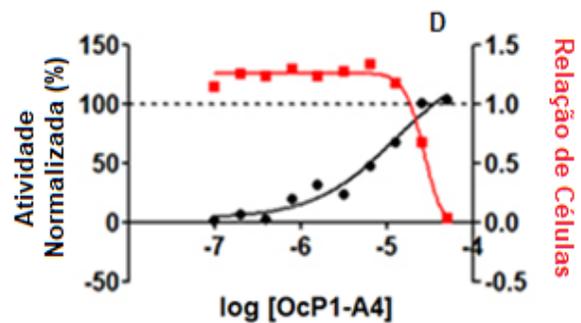
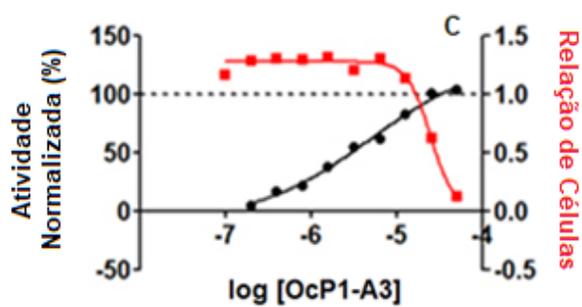
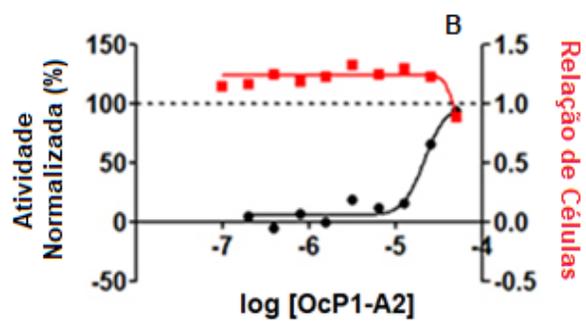
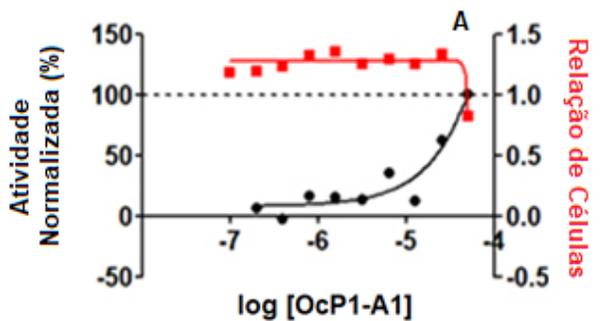


Figura 7. Efeitos do Interferon α 2a (A, controle positivo) e da pentadactilina (B, OcP1) sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da dengue (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.



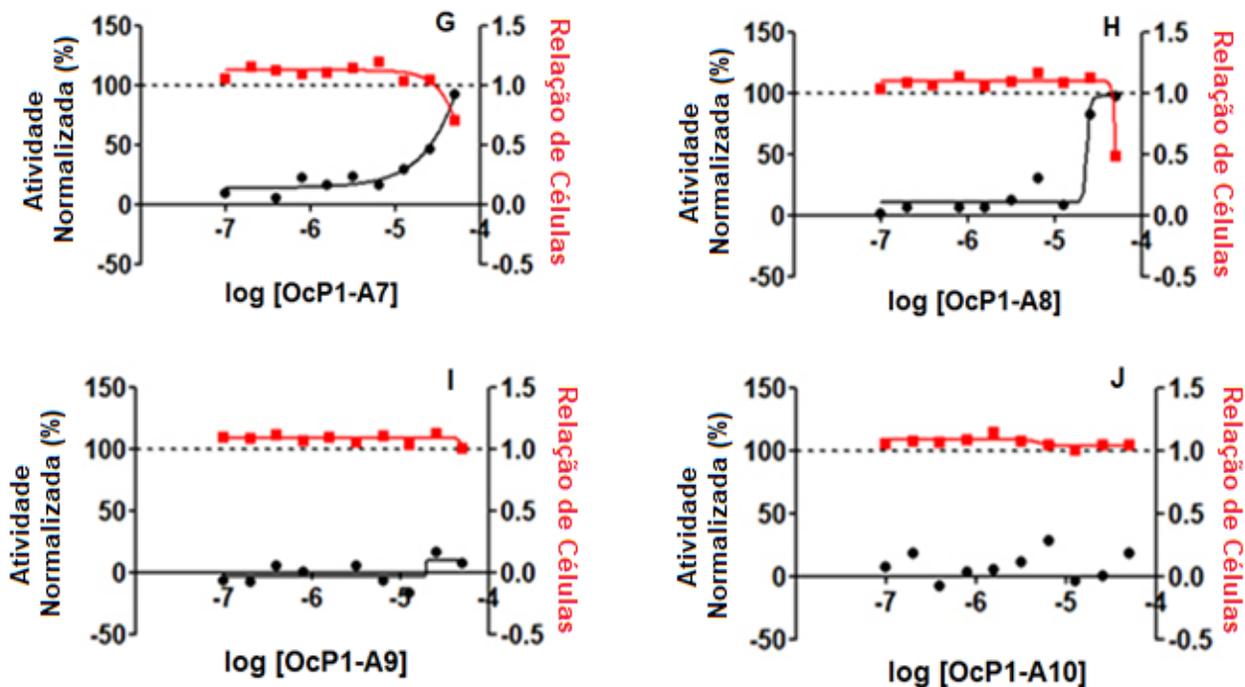


Figura 8. Efeitos dos análogos OcP1-A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 e A10 (A, B, C, D, F, G, H, I e J, respectivamente) sobre a proliferação das células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da dengue (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.

Quando testados contra o vírus da febre amarela, os valores de IS foram levemente inferiores se comparados contra os do vírus da dengue de maneira geral. Neste ensaio, além dos peptídeos OcP1-A5, A9 e A10, o análogo OcP1-A1 também não mostrou atividade antiviral e citotóxica (Tabela 5).

Os análogos que resultaram em índices de seletividade melhores foram os OcP1-A2 (3,95), A6 (3,46), A7 (3,07), A8 (3,77), destacando a atividade antiviral dos análogos A6 (7,58 μM) e A8 (6,54 μM). Neste caso não houve um padrão visível entre as atividades antivirais dos peptídeos e seus parâmetros (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração efetiva 50% (μM), concentração citotóxica 50% (μM) e índice de seletividade da pentadactilina (OcP1) e seus análogos sobre o vírus da febre amarela e células Huh7.

Peptídeo	EC ₅₀	CC ₅₀	IS
OcP1	33,97	50,32	1,48
OcP1-A1	n.a.	n.a.	n.a.
OcP1-A2	12,67	n.a.	>3,95
OcP1-A3	15,60	29,40	1,88
OcP1-A4	19,79	29,60	1,50
OcP1-A5	n.a.	n.a.	n.a.
OcP1-A6	7,58	26,21	3,46
OcP1-A7	22,40	68,74	3,07
OcP1-A8	6,54	24,67	3,77
OcP1-A9	n.a.	n.a.	n.a.
OcP1-A10	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. – não ativo

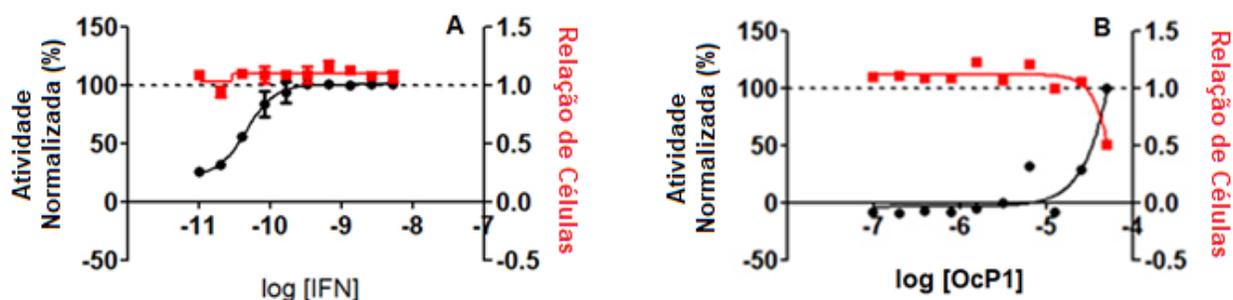
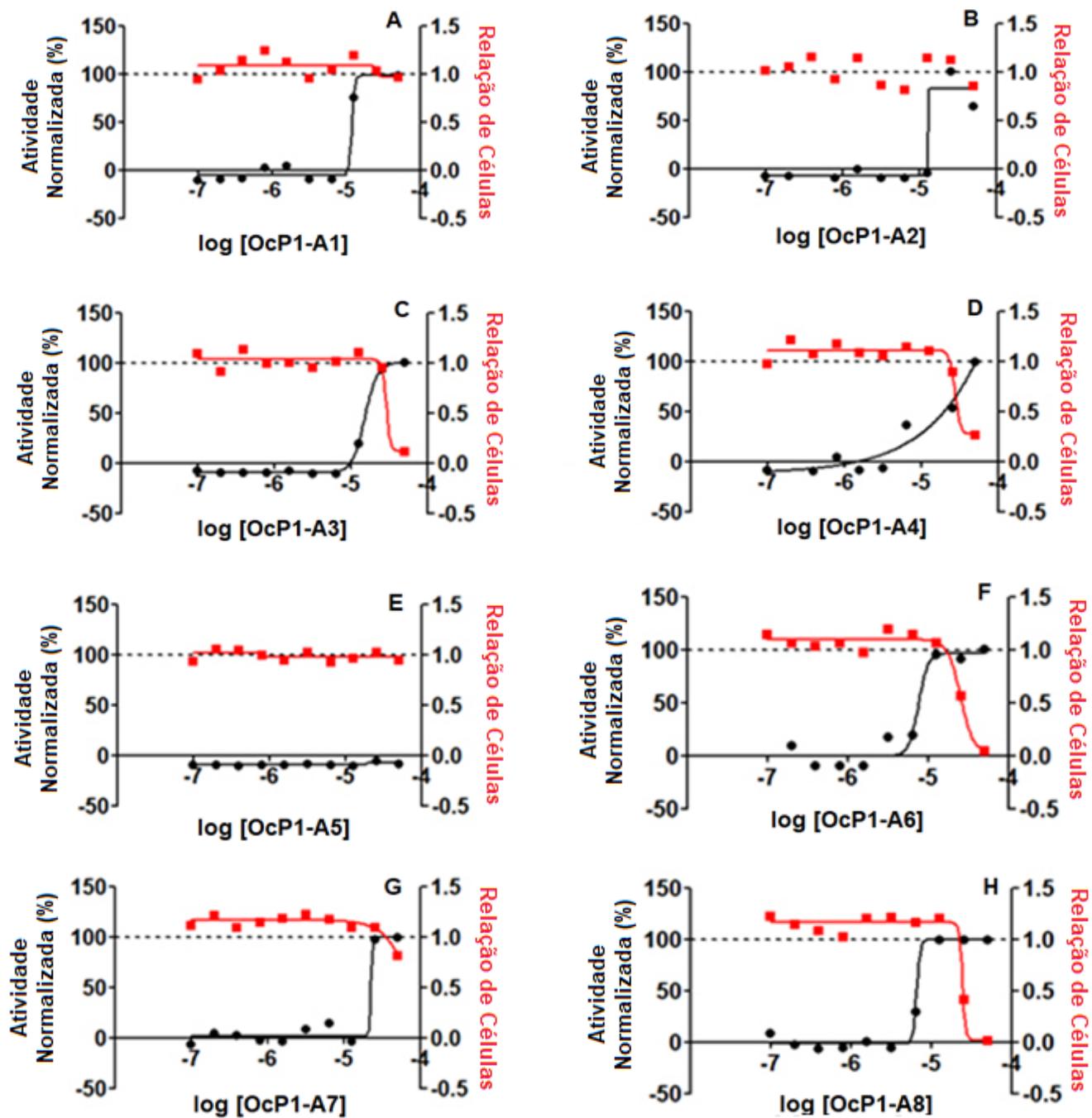


Figura 9. Efeitos do Interferon α 2a (A, controle positivo) e da pentadactilina (B, OcP1) sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da febre amarela (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.



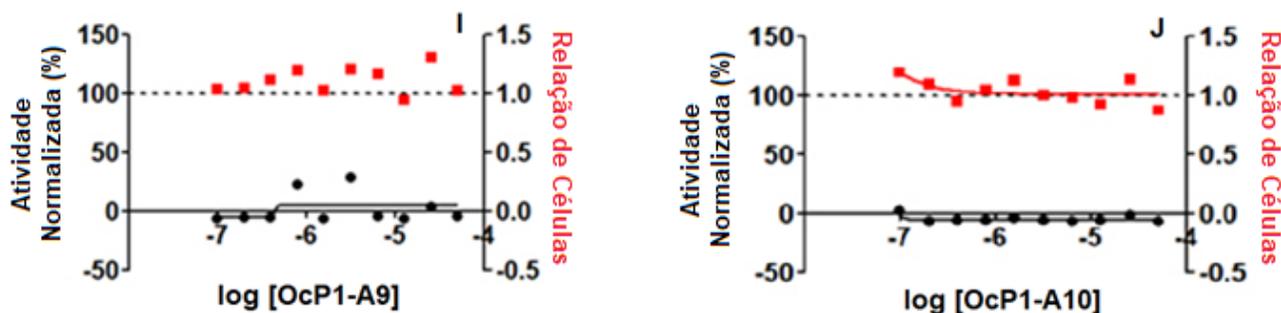


Figura 10. Efeitos dos análogos OcP1-A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 e A10 (A, B, C, D, F, G, H, I e J, respectivamente) sobre a proliferação das células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da febre amarela (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.

5.4. ENSAIO CITOLÍTICO SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS

A interação entre os PAMs e as membranas celulares, tanto de microrganismos como de células humanas, depende diretamente de alguns fatores físico-químicos como sua cationicidade e hidrofobicidade, mas nem sempre esta relação é linear. Estudos demonstraram que, em geral, o aumento tanto na carga quanto na hidrofobicidade estão correlacionados com um aumento da capacidade citolítica da molécula contra células sanguíneas (Ruiz *et al.*, 2014).

A pentadactilina (OcP1) e seus análogos foram testados contra glóbulos vermelhos e pode-se notar que todos os peptídeos apresentaram resultados semelhantes ao controle negativo, demonstrando taxas de citólise praticamente inexistentes contra a série de células vermelhas do sangue humano (figura 11). Estes dados corroboram com análises feitas anteriormente com a pentadactilina demonstrando sua baixa atividade citolítica sobre células sanguíneas (King *et al.*, 2005; Libério, 2008; Márquez, 2012).

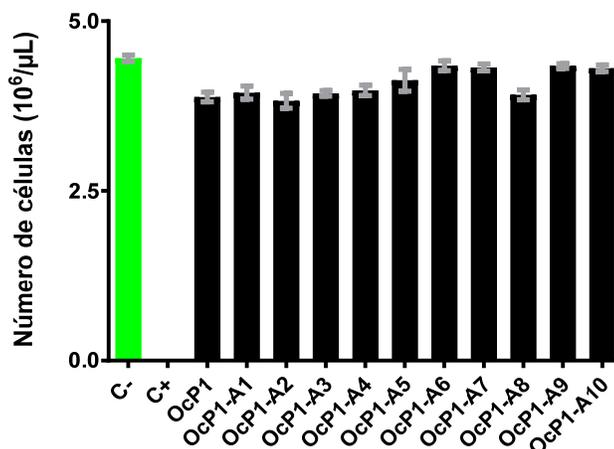


Figura 11. Efeitos citolíticos da OcP1 e seus análogos na concentração de 128 μM sobre eritrócitos humanos após 1 hora de incubação. Controle negativo (C-): solução de NaCl 0,9% (p/v) e controle positivo (C+): Triton X-100 a 10% (v/v).

No gráfico da figura 12 os resultados mostraram alta taxa de atividade citolítica da OcP1 e dos análogos OcP1-A1, OcP1-A4 e OcP1-A6 contra a série leucocitária, com valores próximos do controle positivo empregado, o detergente Triton X-100. Entretanto, os demais análogos tiveram resultados promissores, similares ao controle negativo, não demonstrando taxas de citólise relevantes contra esse conjunto de células.

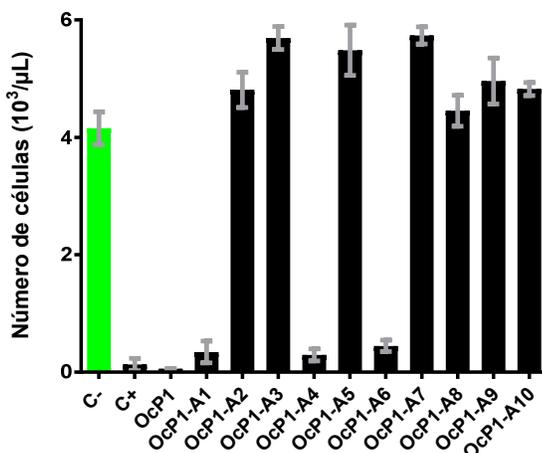


Figura 12. Efeitos citolíticos da OcP1 e seus análogos na concentração de 128 μM sobre leucócitos humanos totais após 1 hora de incubação. Controle negativo (C-): solução de NaCl 0,9% (p/v) e controle positivo (C+): Triton X-100 a 10% (v/v).

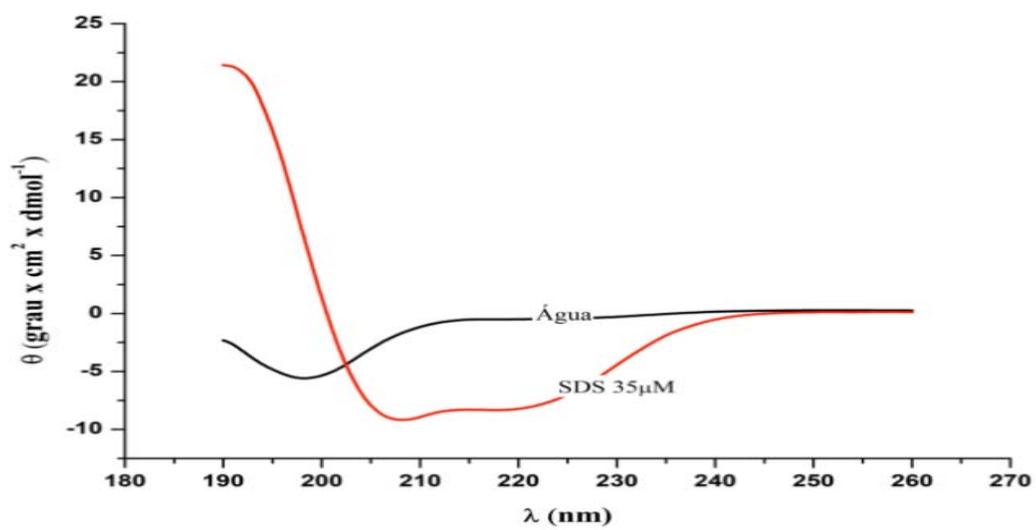
Uma provável explicação para esta diferença de susceptibilidade entre os tipos celulares é a composição de suas membranas celulares e a interação dos PAMs com uma determinada molécula desta membrana, provavelmente um fosfolípido devido ao tipo de interação, que no caso destes peptídeos é eletrostática.

Os fosfolípidos mais abundantes nestas células são a fosfatidilcolina, glicero fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomiéline e a cardiolipina. Apesar da distribuição assimétrica dos fosfolípidos nas faces intra e extracelular da membrana bilipídica, a proporção entre estas membranas diferem principalmente quanto a quantidade de fosfatidilcolina, que em eritrócitos é de 29,2% e em leucócitos é de 39,4% em relação ao total de fosfolípidos, e esfingomiéline, que nos eritrócitos é de 26% e nos leucócitos é de 12,2% em relação ao total de fosfolípidos, nas demais moléculas estas proporções são bem similares (Gottfried, 1967; Schwartz *et al.*, 1985). Esta diferença na abundância de fosfolípidos pode ter correlação com a ação mais citolítica dos peptídeos sobre os leucócitos.

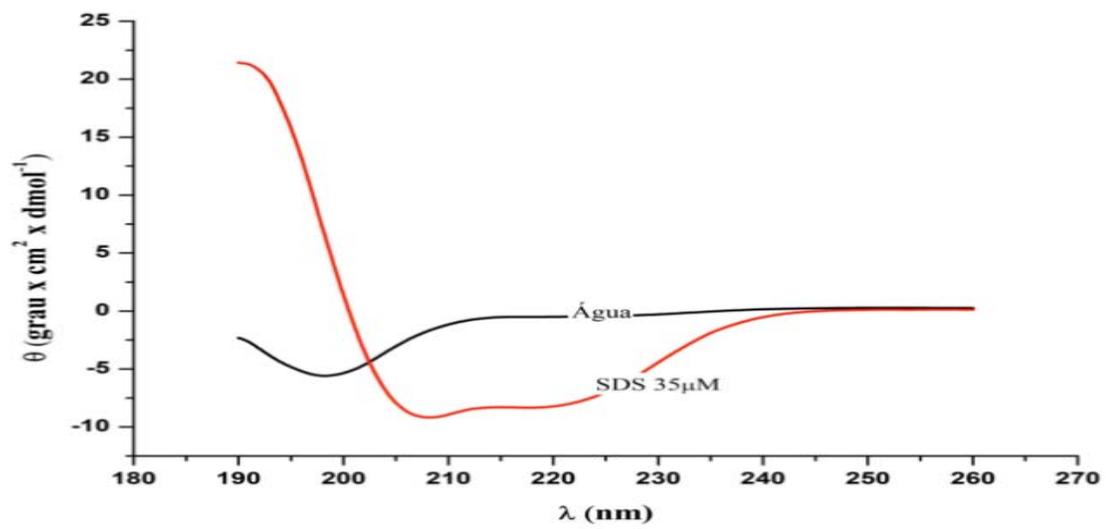
5.5. ANÁLISES DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR DICROÍSMO CIRCULAR

Os ensaios de dicróismo circular demonstraram que a conformação em α -hélice é obtida quando os peptídeos entram em contato com as micelas de SDS, produzindo bandas dicróicas negativas próximas aos comprimentos de onda a 208 nm e 222 nm. Na presença de água, foi evidenciado nos espectros um mínimo de 198 nm, esta característica mostra que as moléculas apresentaram estrutura randômica, sem preferências conformacionais.

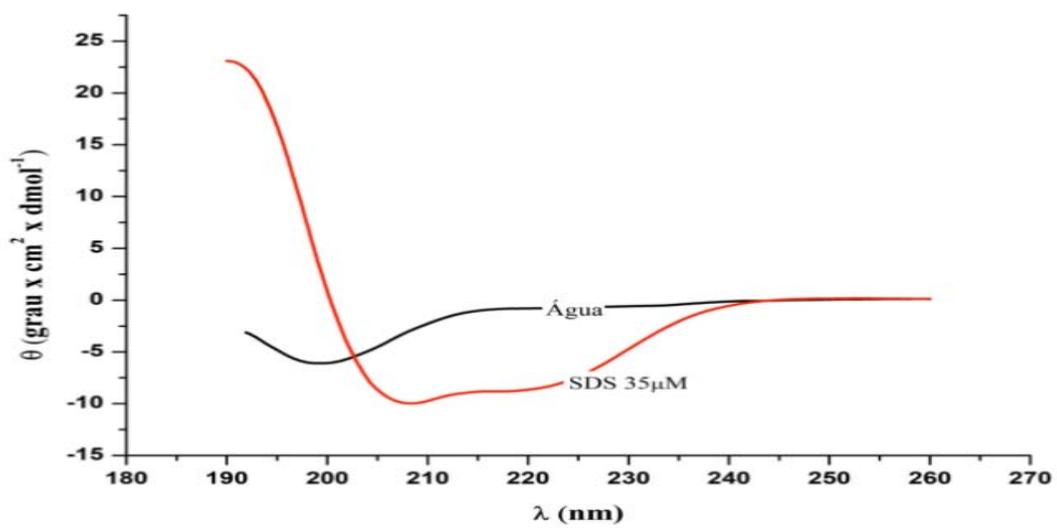
A



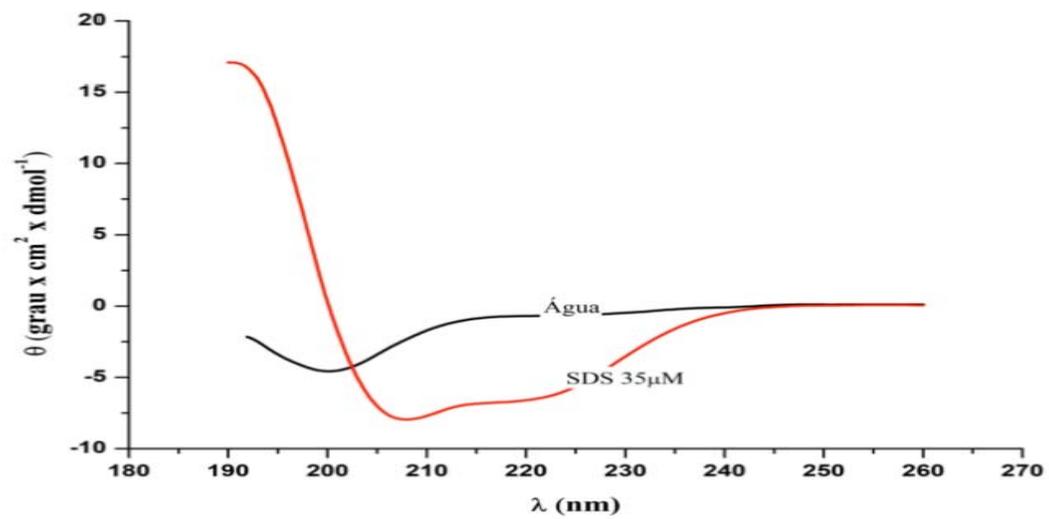
B



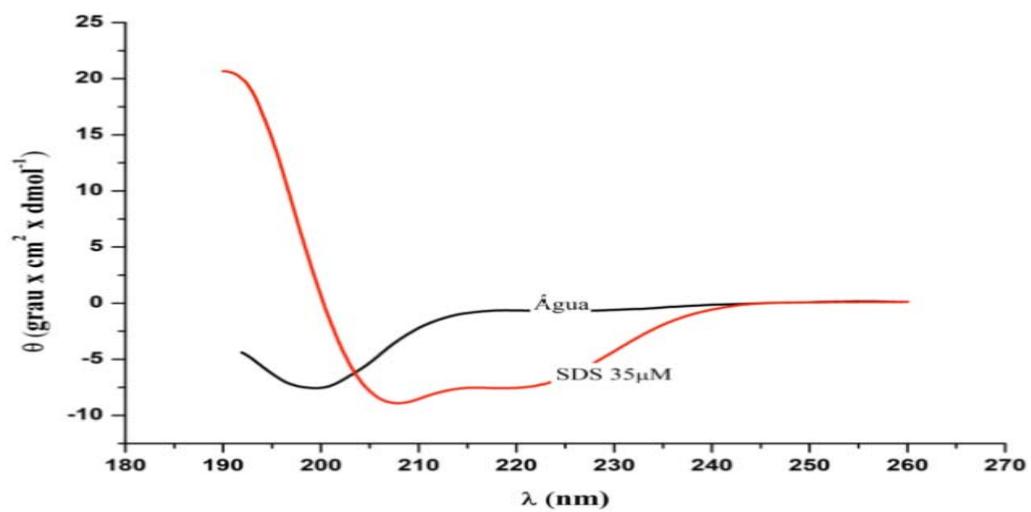
C



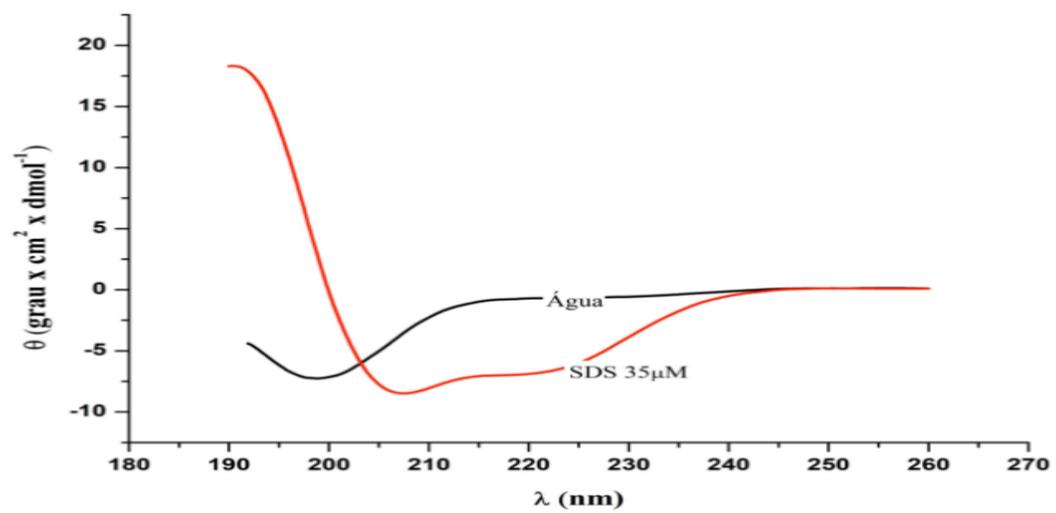
D



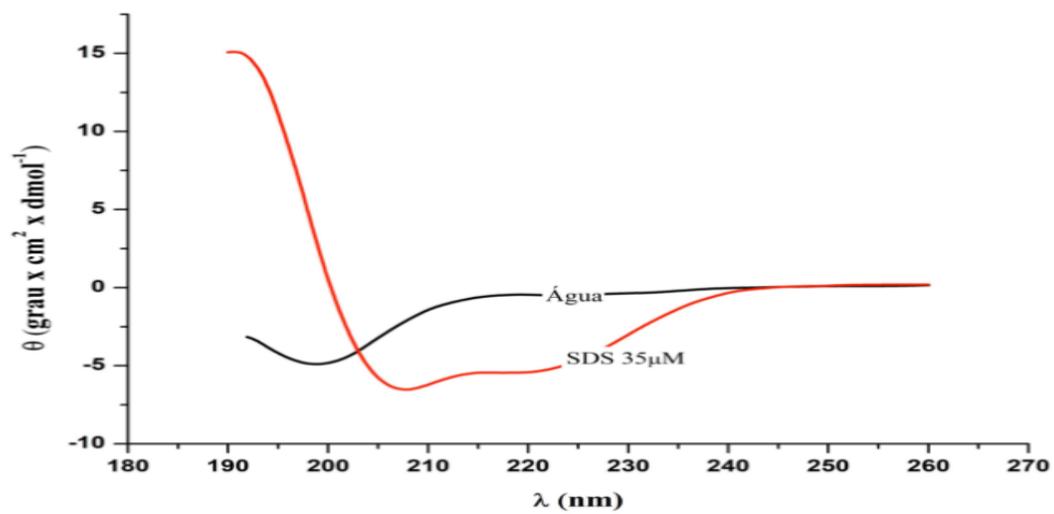
E



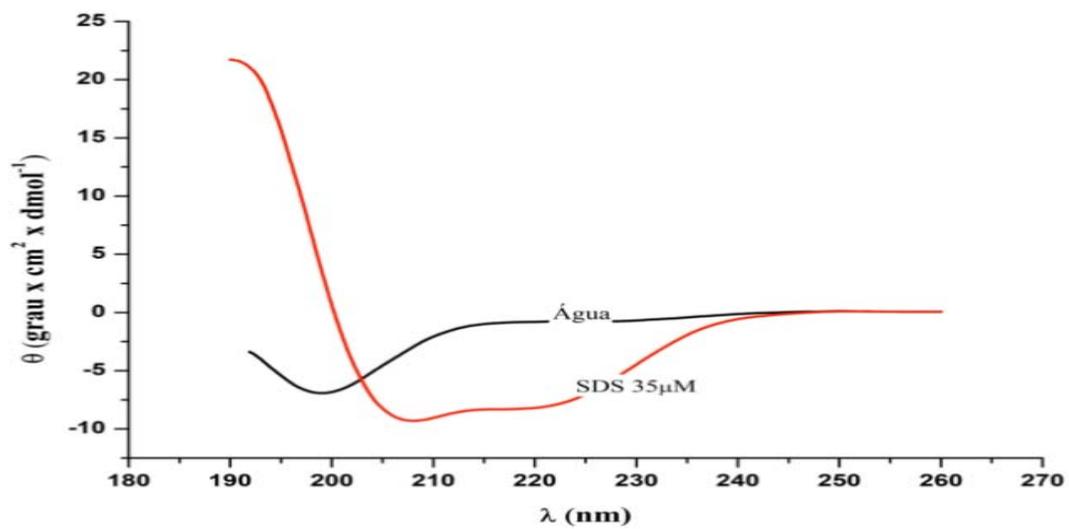
F



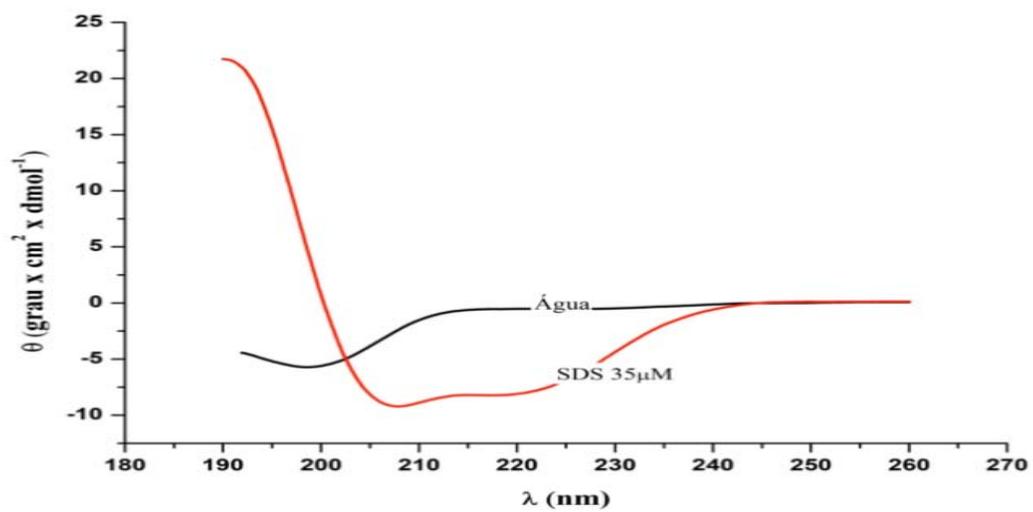
G



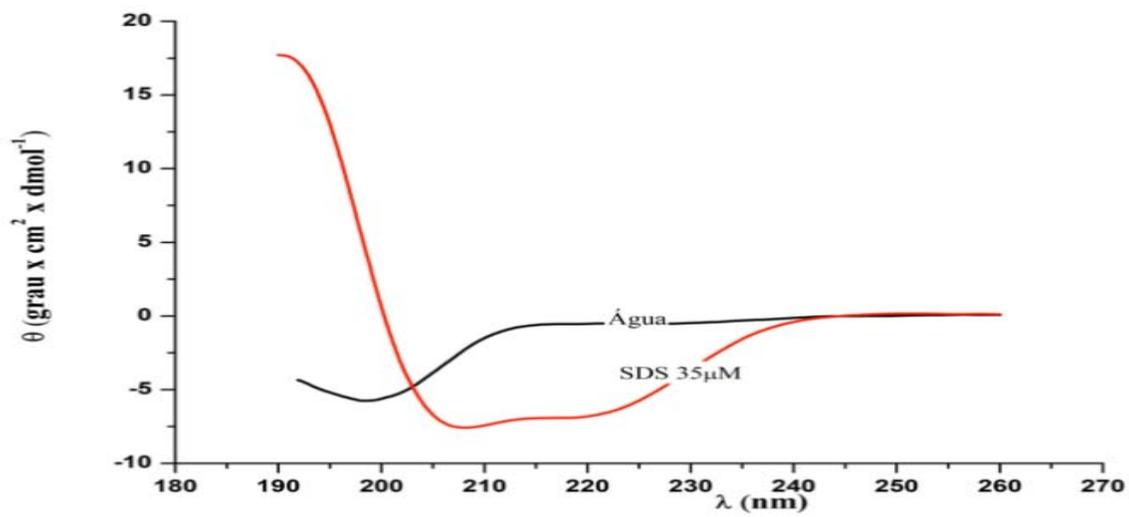
H



I



J



K

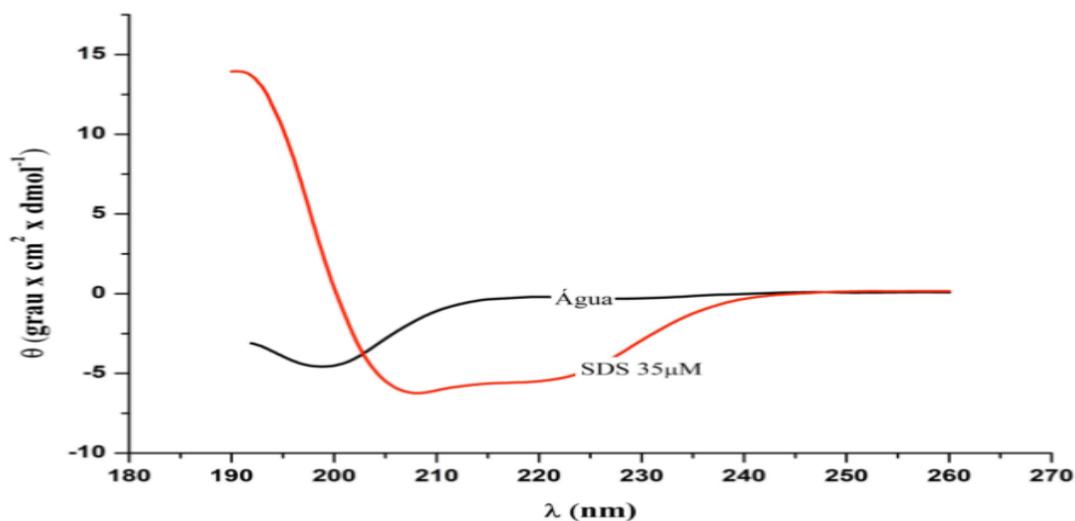


Figura 13. Espectros dicróicos dos peptídeos a 50 μM em água (linha vermelha) e em SDS 35 μM (linha preta). OcP1 (**A**) e os análogos OcP1-A 1(**B**), A2 (**C**), A3 (**D**), A4 (**E**), A5 (**F**), A6 (**G**), A7 (**H**), A8 (**I**), A9 (**J**), A10 (**K**).

Pelas análises dos espectros dicróicos pode se observar que os peptídeos só formam α -hélice quando em contato com o SDS, que no caso é um solvente que mimetiza as condições de membranas celulares. Esta mudança conformacional previne que uma ação citotóxica, por parte do peptídeo, seja exercida antes de entrar em contato com o alvo, sendo este um padrão comum para muitos dos peptídeos antimicrobianos (Conlon, 2007; Gusmão *et al.*, 2017). Quando em contato com o SDS, os análogos A6, A7, A8, A9 e A10 apresentaram conformação em α -hélice com maiores intensidade se comparado com a pentadactilina (OcP1, 48,6%), já os análogos de A1 a A5 apresentaram esta conformação em menor intensidade. Os resultados também estão em consonância com o que foi obtido no trabalho de Márquez (2012) também com a pentadactilina e seu análogo, evidenciando a similaridade conformacional entre o peptídeo selvagem e seus correspondentes análogos.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo estudar as propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e antivirais de 10 novos análogos do PAM OcP1 (pentadactilina), um peptídeo antimicrobiano isolado da secreção cutânea de anuros do gênero *Leptodactylus*.

Suas atividades inibitórias sobre bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*), fungos (*C. albicans* e *C. neoformans*), arbovírus (dengue e febre amarela) e sobre o protozoário *T. cruzi* foram avaliadas.

Também foram testadas suas propriedades citolíticas sobre eritrócitos e leucócitos humanos e sobre a linhagem celular de hepatoma humano Huh7.

Dos 10 análogos sintetizados e testados, apenas 3 deles se mostraram pouco efetivos ou completamente inativos contra a maioria dos patógenos aqui testados, os análogos OcP1-A5, OcP1-A9 e OcP1-A10, sendo necessária uma avaliação mais minuciosa dos motivos para esta ineficiência. Uma hipótese já citada ao longo do trabalho é de que a retirada de 6 resíduos de aminoácidos de suas estruturas primárias em relação ao peptídeo selvagem, o PAM OcP1, uma característica em comum entre eles e possivelmente uma das causas para esta diminuição em suas atividades biológicas.

Os análogos OcP1-A3, A4, A6, A7 e A8 exibiram as maiores atividades antimicrobianas, principalmente sobre bactérias Gram-negativas, quando comparados com o peptídeo selvagem com CMI's variando entre valores <1 e 8 μM . Tais peptídeos mostraram-se pouco ativos ou inativos em inibir a proliferação de *T. cruzi*. A atividade antiviral dos análogos testados sobre o vírus da febre amarela, quando ativos, mostraram aumento na sua eficiência de maneira geral, enquanto que no ensaio contra dengue houve melhora no potencial antiviral apenas dos análogos OcP1-A3, A4 e A6 para os quais os valores de IS obtidos foram iguais a 9,65; 4,61 e 6,99, respectivamente, com inibição da atividade viral com valores de EC_{50} entre 6,23 e 2,94 μM .

Quando testados com células sanguíneas, os análogos não apresentaram efeitos citolíticos relevantes sobre eritrócitos humanos, entretanto foi evidenciada a ação citolítica da pentadactilina e dos análogos OcP1-A1, A4 e A6 sobre leucócitos.

Todos os análogos testados apresentaram conformação em α -hélice em ambiente membrana-mimético.

Com base nos resultados obtidos, pode-se evidenciar que os análogos, de maneira geral, apresentaram potencial terapêutico no tratamento de infecções provocadas por bactérias, fungos e vírus. Mais estudos devem ser conduzidos com o objetivo de otimizar tais análogos de modo a torná-los bons candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos anti-infecciosos.

Os principais dados obtidos no presente estudo foram compilados nas tabelas 6 e 7 juntamente com os parâmetros físico-químicos dos respectivos peptídeos de modo a facilitar a visualização de suas propriedades antimicrobianas e antivirais.

Ressaltando as propriedades inibitórias exibidas por alguns análogos é possível destacar o análogo OcP1-A4 pelo seu amplo espectro de atividades antimicrobianas, tendo uma melhora acentuada contra os microrganismos e vírus aqui testados, se comparado com a pentadactilina, entretanto apresentou atividade citolítica contra leucócitos, este é um ponto que pode ser melhorado em estudos posteriores para aumentar seu potencial terapêutico. O análogo OcP1-A2 é um interessante candidato para estudos antivirais mais aprofundados, mesmo não apresentando concentrações inibitórias tão eficientes quanto a de outros análogos, não foi evidenciada atividade citolítica nas maiores concentrações contra células de hepatoma infectadas com ambos os vírus, sendo que o melhor IS para os ensaios com o vírus da febre amarela foi o desta molécula ($>3,95$). Além disso, o análogo não apresentou atividade citolítica contra hemácias e leucócitos.

O análogo que apresentou o melhor potencial terapêutico foi o OcP1-A3, no caso deste peptídeo houve expressiva melhora nas suas atividades inibitórias sobre a replicação dos vírus da dengue e da febre amarela, sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas e negativas, e não apresentou atividade citolítica contra glóbulos vermelhos e brancos, o que o torna um candidato melhor do que o análogo OcP1-A4 que apresentou valores antimicrobianos e antivirais semelhantes nos testes, mas que apresentou atividade citolítica contra leucócitos.

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos da pentadactilina (OcP1) e seus análogos com seus respectivos efeitos antimicrobianos.

Peptídeo	Carga	Hidrofobicidade Média (%)	Momento Hidrofóbico (μH)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. neoformans</i> H99
OcP1	+3	48	0,324	8	8	Inativo	128	64	8
OcP1-A1	+3	48	0,329	4	8	Inativo	128	32	8
OcP1-A2	+3	47,62	0,514	4	8	128	16	32	4
OcP1-A3	+6	48	0,398	<1	<1	16	2	8	<1
OcP1-A4	+6	47,62	0,596	<1	<1	8	<1	4	<1
OcP1-A5	+4	42	0,547	128	>128	Inativo	Inativo	128	32
OcP1-A6	+5	52	0,479	8	2	8	2	Inativo	<1
OcP1-A7	+5	56	0,272	2	2	64	4	16	2
OcP1-A8	+4	60	0,433	2	4	8	2	32	4
OcP1-A9	+2	47,37	0,473	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
OcP1-A10	+3	47,37	0,438	128	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo	64

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, M.; GALANTH, C. Protein Determination by UV Absorption. *The Protein Protocols Handbook*. 2a ed, Humana Press, 2002.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*. 2005; 36: 697-705.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*. 2015; 78: 55-58.

BAGLEY, S. T. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control*. 1985; 6: 52-58.

BARRET, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiases. *The Lancet*. 2003; 362: 1469-1480.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*. 1996; 4(11): 430-435.

BERGAOUI, I.; ZAIRI, A.; TANGY, F.; AUINI, M.; SELMI, B.; HANI, H. In vitro antiviral activity of dermaseptin S4 and derivatives from amphibian skin against herpes simplex virus type 2. *Journal of Medical Virology*. 2013; 85: 272-281.

BRAND, G. D. SANTOS, R. C.; ARAKE, L. M.; SILVA, V. G.; VERAS, L. M.; COSTA, V.; COSTA, C. H.; KUCKELHAUS, S. S.; ALEXANDRE, J. G.; FEIO, M. J.; LEITE, J. R. The skin secretion of the amphibian *Phyllomedusa nordestina*: a source of antimicrobial and antiprotozoal peptides. *Molecules*. 2013; 18: 7058-7070.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro*. 2005; 3: 238-250.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) - EUA, 2013. Disponível em <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acessado em 02/01/2018.

CHUNG, P. Y.; KHANUM, R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2017; 50: 405-410.

COFFEY, L. L.; FORRESTER, N.; TSETSARKIN, K.; VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol*. 2013; 8(2): 155-76.

CONLON, J. M.; AL-GHAFFERI, N.; ABRAHAM, B.; SONNEVEND, A.; KING, J.D.; NIELSEN, P.F. Purification and properties of laticceptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the South American frog *Leptodactylus laticeps*. *Protein Pept Lett.* 2006; 13(4): 411-5.

CONLON, J. M. A proposed nomenclature for antimicrobial peptides from frogs of the genus *Leptodactylus*. *Peptides.* 2008; 29: 1631–1632.

CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68: 2303-15.

COOPER, B. S.; STONE, S. P.; KIBBLER, C. C.; ROBERTS, J. A.; MEDLEY, G. F.; DUCKWORTH, G.; LAI, R.; EBRAHIM, S. Isolation measures in the hospital management of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the literature. *BMJ.* 2004; 329: 533.

CORTÉS, G.; BORRELL, N.; de ASTORZA, B.; GÓMEZ, C.; SAULEDA, J.; ALBERTÍ, S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun.* 2002; 70(5): 2583-2590.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology.* 2010; 8: 26-38.

DATHE, M.; NIKOLENKO, H.; MEYER, J.; BEYERMANN, M.; BIENERTT, M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* 2001; 501: 146-150.

DEHGHAN ESMATABADI, M. J.; BOZORGMEHR, A.; HAJJARI, S. N.; SADAT SOMBOLESTANI, A.; MALEKSHAHI, Z. V.; SADEGHIZADEH, M. Review of new insights into antimicrobial agents. *Cell Mol Biol.* 2017; 63(2): 40-48.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Revista de Saúde Pública.* 2017; 51: 30.

DOURADO, F. S.; LEITE, J. R.; SILVA, L. P.; MELO, J. A.; BLOCH, C. JR.; SCHWARTZ, E. F. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. *Toxicon.* 2007; 50(4): 572-80.

Drugs for Neglected Diseases Initiative. Doenças e Projetos - Doença de Chagas. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>>. Acessado em 02/01/2018.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASES PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net): Antimicrobial resistance surveillance in Europe. 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection*. 2000; 2: 1643-1649.

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015; 48(3): 233-234.

FINDLEY, K.; OH, J.; YANG, J.; CONLAN, S.; DEMING, C.; MEYER, J. A.; SCHOENFELD, D.; NOMICOS, E.; NIH Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program; PARK, M.; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*. 2013; 498: 367–370.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology, and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009; 155: 1749-1757.

FRANZ, C. M.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. *Enterococci* at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol*. 1999; 47: 1-24.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2018.

FURTADO, G. H. C.; MARTINS, S. T.; COUTINHO, A. P.; SOARES, G. M. M.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2005; 39(1): 41-46.

GLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr*. 2016; 4(1): UTI-0005-2012.

GLUBER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research*. 2002; 33: 330-342.

GOTTFRIED, E. L. Lipids of human leukocytes: relation to cell type. *Journal of Lipid Research*. 1967; 8(4): 321-327.

GUIMARÃES, A. B. Síntese química e avaliação das propriedades antibacterianas e antiparasitárias de análogos de peptídeos antimicrobianos de anuros. 143 p., Tese (Doutorado em Biologia Molecular). 2015; Universidade de Brasília, Brasília.

GUIMARÃES, A. B.; COSTA, F. J.; PIRES Jr., O. R.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. The amazing world of peptide engineering: the example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein Pept Lett.* 2016; 23(8): 722-37.

GUSMÃO, K. A. G.; SANTOS, D. M.; SANTOS, V. M.; CORTÉS, M. E.; REIS, P. V. M.; SANTOS, V. L.; PILÓ-VELOSO, D.; VERLY, R. M.; LIMA, M. E.; RESENDE, J. M. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2017; 23: 4.

HANCOCK, R. E. W.; Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 1998; 16: 82-88.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptides antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(6): 1317-323.

HANCOCK, R. E. W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet.* 2001; 1: 156–64.

HEYER, R.; MIJARES, A.; BALDO, D. 2008. *Leptodactylus labyrinthicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T57137A11589949. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T57137A11589949.en>. Acessado em 14/07/2018.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; MOLYNEUX, D. H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *The Lancet.* 2009; 373: 1570–1575.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 2006; 19(3): 491-511.

KACMAZ, B.; AKSOY, A. Antimicrobial resistance of *Enterococci* in Turkey. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25(6): 535-538.

KACONIS, Y.; KOWALSKI, I.; HOWE, J.; BRAUSER, A.; RITCHER, W.; RAZQUIN-OLAZARÁN, I.; IÑIGO-PESTAÑA, M.; GARIDEL, P.; RÖSSLE, M.; MARTINEZ DE TEJADA, G.; GUTSMANN, T.; BRANDENBURG, K. Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides. *Biophys J.* 2011; 100: 2652-2661.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 120-128.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2: 123–140.

KING, J.D.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; CONLON, J.M. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the Caribbean frog, *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae). *Peptides*. 2008; 29(8): 1287-92.

KING, J.D.; AL-GHAFFER, N.; ABRAHAM, B.; SONNEVEND, A.; LEPRINCE, J.; NIELSEN, P.F.; CONLON, J.M. Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. *Comp Biochem Physiol C: Pharmacology*. 2005; 141: 393-97.

KLOOS, W. E.; MUSSELWHITE, M. S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol*. 1975; 30: 381-385.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUENER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*. 2004; 22: 822-830.

KON, A. S.; GRUMACH, A. S.; COLOMBO, A. L.; PENALVA, A. C. O.; WANKE, B.; TELLES, F. Q.; SEVERO, L. C.; ARANHA, L. F.; LAZÉRA, M. S.; RESENDE, M. R. Consenso em Criptococose - 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41(5): 524-544.

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

LEE, C-R.; LEE, J. H.; PARK, K. S.; JEON, J. H.; KIM, Y. B.; CHA, C. J.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 483.

LEITE, J. M. JR.; SILVA, L. P.; SILVA-LEITE, R. R.; FERRARI, A. S.; NORONHA, S. E.; SILVA, H. R.; BLOCH, C. JR.; LEITE, J. R. *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia): mechanism of defense in the skin and molecular phylogenetic relationships. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 2010; 313(1): 1-82010.

LEWIES, A.; WENTZEL, J. F.; JACOBS, G.; DU PLEISSIS, L. H. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases. *Molecules*. 2015; 20(8): 15392-15433.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SE, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012; 37(2): 207-215.

LIBÉRIO, M. S. Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases. 128 p., Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). 2008; Universidade de Brasília, Brasília.

LIBÉRIO, M. S.; JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; CILLI, E. M.; ZANOTTA, L. C.; Sousa, M. V.; Pires Júnior, O. R.; Fontes, W.; Castro, M. S. Antiproliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino acids*. 2011; 40: 51-9.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med*. 1998; 339(8): 520-532.

MANGONI, M. L.; MAISETTA, G.; DI LUCA, M.; GADDI, L. M.; ESIN, S.; FLORIO, W.; BRANCATISANO, F. L.; BARRA, D.; CAMPA, M.; BATONI, G. Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 85-91.

MANGONI, M. L.; LUCA, V.; McDERMOTT, A. M. Fighting microbial infections: a lesson from amphibian skin-derived esculentin-1 peptides. *Peptides*. 2015; 71: 286-95.

MARANI, M. M.; DOURADO, F. S.; QUELEMES, P. V.; DE ARAÚJO, A. R.; PERFEITO, M. L.; BARBOSA, E. A.; VÉRAS, L. M.; COELHO, A. L.; ANDRADE, E. B.; EATON, P.; LONGO, J. P.; AZEVEDO, R. B.; DELERUE-MATOS, C.; LEITE, J.R. Characterization and biological activities of Ocellatin peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. *J Nat Prod*. 2015; 78(7): 1495-504.

MARIA-NETO, S.; DE ALMEIDA, K. C.; MACEDO, M. L.; FRANCO, O. L. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015; 1848(11 Pt B): 3078-88.

MÁRQUES, C. A. P. Purificação e caracterização de um análogo da Ocellatina P1 isolado da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*. 73 p., Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). 2012; Universidade de Brasília, Brasília.

MÁRQUES, C. A. P. Atividade antitumoral da secreção cutânea de *Hypsiboas crepitans* e de peptídeos derivados da pele dos anuros *Hypsiboas crepitans* e *Leptodactylus labyrinthicus*. 117 p., Tese (Doutorado em Biologia Animal). 2016; Universidade de Brasília, Brasília.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8: 4.

McCRAE, A. W.; KIRYA, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982; 76(4): 552–562.

MERENSTEIN, D.; HU, H.; WANG, C.; HAMILTON, P.; BLACKMON, M.; CHEN, H.; CALDERONE, R.; LI, D. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and noninfected women. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013; 29: 30–34.

MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; SCOTT, T. W.; ZOU, C.; PIGOTT, D. M.; DUDA, K. A.; BHATT, S.; KATZELNICK, L.; HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; SIMMONS, C. P.; HAY, S. I. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*. 2014; 22(3): 138–146.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. “Saúde confirma 1.168 casos de microcefalia do Brasil.” 2016. Disponível em: <http://combateaedes.saude.gov.br/pt/noticias/595-microcefalia-1-168-casos-foram-confirmados-em-todo-o-pais-2>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. Febre amarela. Disponível em: <http://portalsms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>.

MOJSOSKA, B.; JENSSEN, H. Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015; 8(3): 366-415.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. *Journal of Clinical Virology*. 2015; 64: 160-173.

MOTA, M. T. O.; TERZIAN, A. C.; SILVA, M. L. C. R.; ESTOFOLETE, C.; NOGUEIRA, M. L. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016; 47(1): 38-50.

MULLIGAN, M. E.; MURRAY-LEISURE, K. A.; RIBNER, B. S.; STANDIFORD, H. C.; JOHN, J. F.; KORVICK, J. A.; KAUFFMAN, C. A.; YU, V. L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *The American Journal of Medicine*. 1993; 94(3): 313-328.

MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. *Enterococci*: New aspects of an old organism. *Proceedings of the Association of American Physicians*. 1999; 111(4): 328–334.

NASCIMENTO, A. C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept Lett*. 2003; 10(3): 227-38.

NASCIMENTO, A. C.; ZANOTTA, L. C.; KYAW, C. M.; SCHWARTZ, E. N.; SCHWARTZ, C. A.; SEBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Protein J*. 2004; 23(8): 501-8.

NASCIMENTO, A.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; SEBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. *Toxicon*. 2007; 50(8): 1095-104.

NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A. B.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J.; VAN DE VEERDONK, F. L. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature Reviews Immunology*. 2015; 15(10): 630-642.

NETO, R. S. C.; VIGERELLI, H.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; CHAVES, L. B.; SILVA, A. C. R.; MELO, R. L.; SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C. Synergic effects between ocellatin-F1 and bufotenine on the inhibition of BHK-21 cellular infection by the rabies virus. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2015; 21: 50.

NIZET, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol*. 2006; 8: 11.

NOBLE, S. M.; GIANETTI, B. A.; WITCHLEY, J. N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*. 2017; 15(2): 96-108.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(8): 555-567.

OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol.* 2012; 34(2): 201-214.

PACZOSA, M. K.; MECASAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80(3): 629-661.

PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIGARO, P.; TROUILLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J.-H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. *The Lancet.* 2013; 1(6): 371–379.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat.* 2007; 10: 121-130.

PERLROTH, J., CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007; 45: 321–346.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens.* 2010; 6(10): e1001067.

PETTY, N. K.; ZAKOUR, N. L. B.; STANTON-COOK, M.; SKIPPINGTON, E.; TOTSIKA, M.; FORDE, B. M.; PHAN, M.-D.; MORIEL, D. G.; PETERS, K. M.; DAVIES, M.; ROGERS, B. A.; DOUGAN, G.; RODRIGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A.; PITOUT, J. D. D.; UPTON M.; PATERSON, D. L.; WALSH, T. R.; SCHEMBRI, M. A.; BEATSON, S. A. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *PNAS.* 2014; 111(15): 5694-5699.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine.* 2012; 125(1 Suppl): S3-13.

PILGER, D.R.B.; MORAES, C.B.; GIL, L.; FREITAS-JUNIOR, L. Drug repurposing for yellow fever using high content screening. bioRxiv 225656; doi: <https://doi.org/10.1101/225656>.

RASHID, R.; VELEBA, M.; KLINE, K. A. Focal targeting of the bacterial envelope by antimicrobial peptides. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4: 55.

REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24(6): 536-47.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2009; 23(1): 73-81.

ROLLINS-SMITH, L. A., KING, J. D., NIELSEN, P. F., SONNEVEND, A., CONLON, J. M. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). *Regul Pept.* 2005; 124(1-3): 173-8.

RUIZ, J.; CALDERON, J.; RONDÓN-VILLARREAL, P.; TORRES, R. Analysis of structure and hemolytic activity relationships of antimicrobial peptides (AMPs). *Advances in Computational Biology*. 2014; 232: 253-258.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. *Semin Pediatr Neurol*. 2012; 19(3): 130-51.

SAVAGE, J. M. *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica*. University of Chicago Press. 2002; Chicago and London.

SAVAGEAU, M. A. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *The American Naturalist*. 1983; 122: 732-744.

SAVOIA, D.; GUERRINI, R.; MARZOLA, E.; SAVADORI, S. Synthesis and antimicrobial activity of dermaseptin S1 analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008; 16(17): 8205–8209.

SCHWARTZ, R. S.; CHIU, D. T, LUBIN, B. Plasma membrane phospholipid organization in human erythrocytes. *Curr Top Hematol*. 1985; 5: 63-112.

Secretaria de Estado e Saúde do Distrito Federal. Subsecretaria de Vigilância à Saúde: Informativo Epidemiológico. 2018. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/04/Informativo-n-14_2018.pdf.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Criptococose pulmonar. *J. Bras. Pneumol*, 2009; 35(11): 1136-1144.

SHAMES, S. R., AUWETER, S. D; FINLAY, B. B. Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2009; 41: 380–389.

SHON, A. S.; BAJWA, R. P.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013; 4(2): 107-118.

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS, J. E. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(9): 1279-86.

SWIDERGALL, M.; ERNST, J. F. Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryot Cell*. 2014; 13(8): 950-957.

TENAILLON, O; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8: 207-217.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T.; FOWLER Jr, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(3): 603-661.

TORRENT, M.; PULIDO, D.; RIVAS, L.; ANDREU, D. Antimicrobial peptide action on parasites. *Curr Drug Targets.* 2012; 13(9): 1138-1147.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology.* 2001; 31: 472-481.

UÇKAY, I.; PITTET, D.; VAUDAUX, P.; SAX, H.; LEW, D.; WALDVOGEL, F. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of Medicine.* 2009; 41: 109-119.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *PT.* 2015; 40(4): 277-83.

VOGEL, G. Top mosquito suspect found infected with Zika; 2016. <http://www.sciencemag.org/news/2016/05/top-mosquitosuspect-found-infected-zika>. Acessado em 07/05/2018.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010; 85(2): 328-45.

WEAVER, S. C.; CHARLIER, C.; VASILAKIS, N.; LECUIT, M. Zika, Chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. *Annu Rev Med.* 2018; 69: 395-408.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em 08/01/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. Genva. 2017. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf

XU, X.; LAI, R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chem. Rev.* 2015; 115(4): 1760–1846.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, 2003; 55: 27–55.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002; 415: 389-95.

ZELEZETSKY, I.; TOSSI, A. Alpha-helical antimicrobial peptides using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1758(9): 1436–1449.

ZHOU, Y.; PENG, Y. Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Exp Ther Med*. 2013; 6: 1000-1004.