



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

**FABIANO FAGUNDES MOSER DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS, ANTIVIRAIS E CITOLÍTICOS  
DE ANÁLOGOS DO PAM OCELATINA 4**

**BRASÍLIA**

**2018**

**FABIANO FAGUNDES MOSER DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS, ANTIVIRAIS E CITOLÍTICOS  
DE ANÁLOGOS DO PAM OCELATINA 4**

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.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana de Souza Castro

**BRASÍLIA**

**2018**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**FABIANO FAGUNDES MOSER DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS, ANTIVIRAIS E CITOLÍTICOS  
DE ANÁLOGOS DO PAM OCELATINA 4**

**Comissão Examinadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana S. Castro**

**Presidente**

**Departamento de Ciências Fisiológicas/IB**

**Universidade de Brasília**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Betania Ferraz Quirino**

**Membro Titular**

**Embrapa Agroenergia**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simoni Campos Dias**

**Membro Titular**

**Universidade Católica de Brasília**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza**

**Membro Suplente**

**Faculdade da Ceilândia**

**Universidade de Brasília**

“Não deixe que as pessoas te façam desistir daquilo que você mais quer na vida. Acredite. Lute. Conquiste. E acima de tudo, seja feliz!”

Autor desconhecido

E ainda se vier noites traiçoeiras  
Se a cruz pesada for, Cristo estará contigo  
O mundo pode até fazer você chorar  
Mas Deus te quer sorrindo

...

Noites traiçoeiras – Padre Marcelo Rossi



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a Nossa Senhora, por sempre abençoarem o meu caminho e o da minha família. Muito obrigado!

Agradeço à minha Família. Especialmente meus pais que sem eles nada seria possível, nunca me deixaram desistir, em diversas etapas da vida incentivavam os estudos mesmo que isso significasse abrir mão de algo, nunca deixaram faltar nada para que eu pudesse atingir a melhor versão de mim. Amo vocês, só tenho a agradecer. Muito obrigado!

Agradeço ao meu irmão por sempre ser um exemplo e uma referência como pessoa, como pai, como filho e como marido. Muito obrigado!

Agradeço aos meus padrinhos de batismo Francisco (*in memoriam*) e Maria que mesmo de longe sempre rezaram e torceram pelo meu sucesso desde que eu era um pequeno bebê. Amo vocês, muito obrigado!

Agradeço também à minha cunhada e minhas sobrinhas, porque sem vocês essa trajetória seria mais árdua do que foi, vocês sempre trouxeram muito amor e diversão para minha vida, bons momentos de relaxar e refletir. Muito obrigado!

Agradeço à minha madrinha de crisma por sempre acreditar em mim em todos os momentos, desde anos atrás nas lições de português, e por me colocar em suas orações, sempre senti as boas energias que você me enviava. Muito obrigado!

Agradeço aos meus mestres que sem eles não teria conseguido chegar até este momento, em especial à Prof<sup>a</sup>. MSc. Tania Andrade e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vinhaes, que sem elas em minha vida com certeza tudo seria diferente, uma me mostrou o lado da pesquisa e me fez ficar apaixonado por aprender coisas novas, mesmo quando ainda não possuía habilidade, e a seguinte sempre me desafiava sabendo que eu poderia ir mais longe do que eu conseguia enxergar. A vocês, muito obrigado!

Um agradecimento especial à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana S. Castro que me aceitou mesmo com minhas limitações de horários, sempre soube me ouvir, sempre disposta a ensinar, sempre com um brilho no olhar e carinho no coração, saiba que levarei o seu exemplo para minha vida, quero um dia poder ser tão bom quanto você. Meus sinceros sentimentos de admiração e muitíssimo obrigado!

A todos os colegas do LBQP que em suas particularidades me auxiliaram, ou me compreenderam nos momentos da realização dos experimentos, e me estimularam de ir mais longe. Muito obrigado!

Agradeço a todos os funcionários da UnB que sempre estavam dispostos a contribuir com o que fosse necessário, seja de um serviço básico, porém essencial até o mais alto cargo da instituição. Muito obrigado!

Agradeço ao Laboratório Sabin Medicina Diagnóstica por propiciar a realização deste sonho, ao auxílio com recursos para o desenvolvimento de parte do projeto e aos meus líderes e minha equipe que sempre compreenderam as dificuldades que tive e sem eles dando força para continuar ao longo dessa jornada, tudo teria sido mais difícil. Muito obrigado!

Agradeço a todos os professores da UnB que em alguma etapa dessa jornada contribuíram com uma palavra de incentivo, ou me auxiliaram e transmitiram conhecimentos durante os experimentos e disciplinas, para que corresse tudo bem, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Freitas e Dr<sup>a</sup>. Alice Álvares do Laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília que me guiaram no ensaio de difração circular. Muito obrigado!

Agradeço ao Dr. Lúcio Freitas Júnior do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) pelo auxílio nos experimentos com os vírus da dengue e de febre amarela. Muito obrigado!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pela oportunidade.

Aos “Gordos” por estarem comigo em várias etapas desse processo, sempre ouvindo minhas frustrações e comemorando os sucessos, sempre auxiliando na descontração e estimulando uns aos outros o crescimento pessoal, sem perder o ar natural da alegria e leveza de um GORDO. Muito obrigado!

Aos meus sogros e cunhado, que durante toda essa trajetória estiveram indiretamente ligados aos meus problemas e conquistas, mas sempre souberam me ouvir e estimular para ser uma pessoa melhor a cada dia que passa. Muito obrigado!

Agradeço por último, porém não menos importante, mas pelo contrário, minha esposa Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Moser, que sempre soube me ouvir, ensinar, estimular, compreender, estudou comigo diversas vezes temas e textos para o bom desenvolvimento deste trabalho, sendo a reta final a mais emocionante e desafiadora, pois com o princípio de terminar esta dissertação, a mesma me agraciou com a benção de poder ser pai do nosso primogênito Henrique Moser (8 meses quase chegando). A vocês não sei como agradecer sem ser com um sincero Eu Te Amo e muitíssimo obrigado!

## **APOIO FINANCEIRO**

A dissertação de mestrado intitulada “Avaliação dos efeitos antimicrobianos, antivirais e citolíticos de análogos do PAM ocelatina 4” desenvolvida por Fabiano Fagundes Moser da Silva 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 e “Explorando a interação Vírus/Vetor/Hospedeiro e o desenvolvimento de drogas antivirais como estratégias de controle de arboviroses e seu vetor *Aedes aegypti*), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

## ÍNDICE

1. Introdução .....	18
1.1. Estruturação das membranas citoplasmáticas .....	22
1.2 Características da célula bacteriana.....	22
1.3. Características da célula fúngica .....	24
1.4. Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	25
1.5. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos .....	27
1.5.1. Agregação.....	28
1.5.2. Poro toroidal.....	28
1.5.3. Barril.....	28
1.5.4. Tapete ( <i>carpet-like</i> ) .....	29
1.6. Atividade antibacteriana dos PAMs .....	32
1.7. Atividade antiparasitária dos PAMs .....	32
1.8. Atividade antifúngica dos PAMs .....	34
1.9. Atividade antiviral dos PAMs .....	34
1.10. Aplicações veterinárias dos PAMs.....	35
1.11. Mecanismos de resistência aos peptídeos antimicrobianos .....	36
1.12. Análogos da ocelatina 4 utilizados no presente estudo .....	38
2. Justificativa.....	44
3. Objetivos .....	45
3.1. Objetivo Geral.....	45
3.2. Objetivos Específicos .....	45
4. Materiais e Métodos .....	46
4.1. Reagentes químicos .....	46
4.2. Síntese química dos peptídeos.....	46
4.3. Linhagens microbianas utilizadas .....	46
4.4. Análises computacionais .....	46

4.5. Quantificação espectrofotométrica de peptídeos.....	47
4.6. Ensaio antimicrobianos sobre bactérias patogênicas .....	47
4.7. Ensaio antimicrobianos sobre fungos patogênicos .....	48
4.8. Ensaio de inibição sobre o vírus da dengue sorotipo 4 .....	49
4.9. Ensaio de inibição sobre o vírus da febre amarela .....	50
4.10. Avaliação da atividade citolítica sobre células sanguíneas (leucócitos e hemácias).....	51
4.11. Análises por dicroísmo circular .....	51
5. Resultados e Discussão.....	52
5.1. Efeitos antimicrobianos sobre bactérias e fungos patogênicos .....	52
5.1.1. Ensaio antibacterianos com linhagens de bactérias Gram-positivas.....	53
5.1.2. Ensaio antibacterianos com linhagens de bactérias Gram-negativas.....	53
5.1.3. Ensaio antibacterianos com linhagens multiressistentes .....	55
5.1.4. Ensaio antifúngico com <i>Candida albicans</i> .....	59
5.1.5. Avaliação dos efeitos antibacterianos de drogas comerciais .....	60
5.2. Ensaio antivirais.....	62
5.2.1. Ensaio de inibição sobre o vírus da dengue sorotipo 4 .....	62
5.2.2. Ensaio de inibição sobre o vírus da febre amarela .....	66
5.3. Efeitos citolíticos sobre leucócitos totais e hemácias .....	69
5.4. Análises por dicroísmo circular .....	71
6. Conclusões .....	73
7. Referências Bibliográficas.....	76
8. Anexos .....	95

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação conceitual dos possíveis caminhos de microrganismos multiresistentes ou genes de resistência em diferentes ecossistemas.....	19
<b>Figura 2.</b> Tríade do conceito de Saúde Única .....	20
<b>Figura 3.</b> Linha temporal do lançamento de novos antimicrobianos para uso clínico .....	21
<b>Figura 4.</b> Esquema ilustrativo da composição da parede de bactérias Gram-positivas .....	23
<b>Figura 5.</b> Esquema ilustrativo da composição da parede de bactérias Gram-negativas.....	24
<b>Figura 6.</b> Estrutura da parede celular do fungo <i>Candida albicans</i> .....	25
<b>Figura 7.</b> Modelos de ação dos peptídeos antimicrobianos.....	30
<b>Figura 8.</b> Esquema do modelo Shai-Matsuzaki-Huang .....	32
<b>Figura 9.</b> Principais alvos dos PAMs sobre protozoários.....	33
<b>Figura 10.</b> Principais mecanismos de resistência contra os PAMs. ....	37
<b>Figura 11.</b> Multi-alinhamento da ocelatina 4 e seus análogos.....	38
<b>Figura 12.</b> Projeção em roda helicoidal do peptídeo selvagem ocelatina 4.....	40
<b>Figura 13.</b> Projeção em roda helicoidal do análogo S5;K7;A10;N12.....	40
<b>Figura 14.</b> Projeção em roda helicoidal do análogo S5;K7;Ins-V10;A11;N13...	41
<b>Figura 15.</b> Projeção em roda helicoidal do análogo Del-2;S4;K6;A9;N11.....	41
<b>Figura 16.</b> Projeção em roda helicoidal do análogo Del-2;S4;K[6,17];A9;N11 .....	42
<b>Figura 17.</b> Projeção em roda helicoidal do análogo K[1,8,15];N[4,12].....	42
<b>Figura 18.</b> Projeção em roda helicoidal do análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20]...	43
<b>Figura 19.</b> Projeção em roda helicoidal do análogo K[1,8,15];R[4,12].....	43
<b>Figura 20.</b> Efeitos do Interferon $\alpha$ 2A (controle positivo), da ocelatina 4 e de seus análogos sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da dengue (linha preta).....	63
<b>Figura 21.</b> Efeitos do Interferon $\alpha$ 2A (controle positivo), da ocelatina 4 e de seus análogos sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e do vírus da febre amarela (linha preta).....	67

<b>Figura 22.</b> Efeitos citolíticos da ocelatina 4 e seus análogos na concentração de 128 µM sobre leucócitos humanos totais após 1 hora de incubação.....	70
<b>Figura 23.</b> Efeitos citolíticos da ocelatina 4 e seus análogos na concentração de 128 µM sobre hemácias humanas após 1 hora de incubação.....	70
<b>Figura 24.</b> Espectros dicróicos dos peptídeos a 50 µM em água Mili-Q (linha contínua) e em SDS 35 mM (linha tracejada).....	72
<b>Figura 25.</b> Identificação de <i>Candida albicans</i> por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França) .....	96
<b>Figura 26.</b> Identificação de <i>Enterococcus faecalis</i> por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França).....	97
<b>Figura 27.</b> Identificação de <i>Escherichia coli</i> por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França) .....	98
<b>Figura 28.</b> Identificação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França) .....	99
<b>Figura 29.</b> Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França).....	100
<b>Figura 30.</b> Identificação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França).....	101
<b>Figura 31.</b> Identificação de <i>Proteus mirabilis</i> ATCC25933 por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França) .....	102
<b>Figura 32.</b> Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França) .....	103
<b>Figura 33.</b> Perfil de susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomerieux, França).....	104
<b>Figura 34.</b> Perfil de susceptibilidade de <i>Enterococcus faecalis</i> determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomerieux, França).....	105
<b>Figura 35.</b> Perfil de susceptibilidade de <i>Escherichia coli</i> determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomerieux, França).....	106
<b>Figura 36.</b> Perfil de susceptibilidade de <i>Klebsiella pneumoniae</i> determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomerieux, França) .....	107
<b>Figura 37.</b> Perfil de susceptibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> resitenta a meticilina determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomerieux, França) .....	108

<b>Figura 38.</b> Perfil de susceptibilidade de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase do tipo metalo-beta-lactamase determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomerieux, França) .....	109
<b>Figura 39.</b> Perfil de susceptibilidade de <i>Proteus mirabilis</i> determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomerieux, França).....	110
<b>Figura 40.</b> Perfil de susceptibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomerieux, França) .....	111

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros físico-químicos da ocelatina 4 e seus análogos. ....	39
<b>Tabela 2.</b> Efeitos antimicrobianos (CIM em $\mu\text{M}$ ) da ocelatina 4 e seus análogos sobre bactérias patogênicas Gram-positivas.....	53
<b>Tabela 3.</b> Efeitos antimicrobianos (CIM em $\mu\text{M}$ ) da ocelatina 4 e seus análogos sobre bactérias patogênicas Gram-negativas .....	54
<b>Tabela 4.</b> Efeitos antimicrobianos (CIM em $\mu\text{M}$ ) da ocelatina 4 e seus análogos sobre a bactéria Gram-negativa multirresistente <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC.....	56
<b>Tabela 5.</b> Efeitos antimicrobianos (CIM em $\mu\text{M}$ ) da ocelatina 4 e seus análogos sobre a bactéria Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (MRSA).....	58
<b>Tabela 6.</b> Efeitos antimicrobianos (CIM em $\mu\text{M}$ ) da ocelatina 4 e seus análogos sobre a levedura <i>Candida albicans</i> ATCC 14053.....	59
<b>Tabela 7.</b> Efeitos antimicrobianos (CIM em $\mu\text{M}$ ) de agentes antimicrobianos de uso comercial sobre bactérias patogênicas .....	61
<b>Tabela 8.</b> Concentração citotóxica 50% ( $\mu\text{M}$ ), Concentração efetiva 50% ( $\mu\text{M}$ ) e índice de seletividade (IS) de seis análogos da ocelatina 4 sobre o vírus da dengue e células Huh7.....	62
<b>Tabela 9.</b> Concentração citotóxica 50% ( $\mu\text{M}$ ), concentração efetiva 50% ( $\mu\text{M}$ ) e índice de seletividade (IS) da ocelatina 4 e de seis dos seus análogos sobre o vírus da febre amarela e células Huh7.....	66
<b>Tabela 10.</b> Estimativa do conteúdo de $\alpha$ -hélice (%) da ocelatina 4 e seus análogos em água Milli-Q e em SDS 35 mM .....	73
<b>Tabela 11.</b> Resumo das atividades antimicrobianas e antivirais da ocelatina 4 e seus análogos .....	75

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

**CIM** – Concentração inibitória mínima.

**EC<sub>50</sub>** – Concentração que promove metade (50%) do efeito máximo.

**CC<sub>50</sub>** – 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 desorção a laser assistida por matriz.

**µg** – Micrograma.

**µL** – Microlitro.

**µm** – Micrômetro.

**µM**. Micromolar.

**mM** – Milimolar.

**µH** – Momento hidrofóbico.

**n.a.** – Não ativo.

**nm** – Nanômetro.

**nM** – Nanomolar.

**PAM** – Peptídeo antimicrobiano.

**p/v** – Peso/volume.

**RPM** – Rotações por minuto.

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

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

**v/v** – Volume/volume.

## RESUMO

A emergência de linhagens multiressistentes de microrganismos levantou preocupações sobre uma era pós-antibiótico sem antimicrobianos como opções de tratamento. Diante desse cenário, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) constituem uma classe de moléculas que tem gerado interesse crescente voltado para o desenvolvimento de novas drogas anti-infecciosas para o tratamento de infecções promovidas por bactérias, fungos, protozoários e vírus. O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar os efeitos antimicrobianos e antivirais de sete análogos do PAM ocelatina 4 sobre diferentes microrganismos e vírus patogênicos (bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos leveduriformes e os vírus causadores da febre amarela e dengue), bem como seus efeitos citolíticos sobre células sanguíneas humanas de modo a se determinar seu potencial terapêutico. Com relação às propriedades antimicrobianas sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vários análogos exibiram ganho de potência em relação ao PAM selvagem, com CIMs nas faixas de aplicação terapêutica entre 2-16  $\mu\text{M}$ . Os análogos K[1,8,15];N[4,12] e K[1,8,15];R[4,12] exibiram o melhor desempenho frente à linhagem metilicina resistente de *S. aureus* (MRSA), com valores de CIMs iguais a 2 e 4  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Já para a linhagem de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo metalo-beta-lactamases, o análogo que se mostrou mais ativo foi o análogo K[1,8,15];N[4,12] com valor de CIM igual a 16  $\mu\text{M}$ . Os análogos S5;K7;A10;N12 e K[1,8,15];N[4,12] mostraram-se ativos sobre a levedura patogênica *C. albicans*, exibindo valores de CIM iguais a 16 e 8  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Ao se considerar a atividade antiviral, os análogos K[1,4,8,15];A[12,16,20] e S5;K7;Ins-V10;A11;N13 merecem destaque, em especial o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20] que demonstrou uma atividade citotóxica 50% na concentração de 38,52  $\mu\text{M}$  e uma concentração efetiva 50% sobre a atividade viral de 0,65  $\mu\text{M}$ , o que representou um índice de seletividade de 59,15 sobre o vírus da dengue. Observou-se que a ocelatina 4 e seus análogos S5;K7;Ins-V10;A11;N13, Del-2;S4;K6;A9;N11 e K[1,8,15];N[4,12] foram os mais ativos sobre leucócitos humanos, principalmente o análogo K[1,8,15];N[4,12] que apresentou completa destruição celular na concentração empregada de 128  $\mu\text{M}$ . No caso dos efeitos sobre eritrócitos humanos, apenas o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20] exibiu efeitos citolíticos. Todos os peptídeos avaliados apresentaram capacidade de formar  $\alpha$ -hélices em ambientes membrana-miméticos, sendo que os análogos S5;K7;A10;N12, Del-2;S4;K[6,17];A9;N11 e S5;K7;Ins-V10;A11;N13 foram os que apresentaram maiores níveis de formação de  $\alpha$ -hélice na presença de micelas de SDS. Ao se analisar o conjunto de atividades antimicrobianas, antivirais e citolíticas gerado para a ocelatina 4 e seus análogos, pode-se concluir que vários dos análogos produzidos exibiram ganho de potência em relação ao peptídeo selvagem, com especial destaque para os análogos S5;K7;A10;N12 e K[1,8,15];R[4,12] que exibiram atividades inibitórias em faixas baixas de concentração sem apresentarem efeitos citolíticos relevantes sobre as células sanguíneas humanas. O presente estudo comprovou o potencial de análogos de peptídeos antimicrobianos como possíveis agentes anti-infecciosos contra um leque bastante diversificado de alvos patogênicos.

**Palavras-chave:** Anuros; Peptídeos antimicrobianos; Ocelatina 4; Análogos sintéticos; Multirresistência;

## ABSTRACT

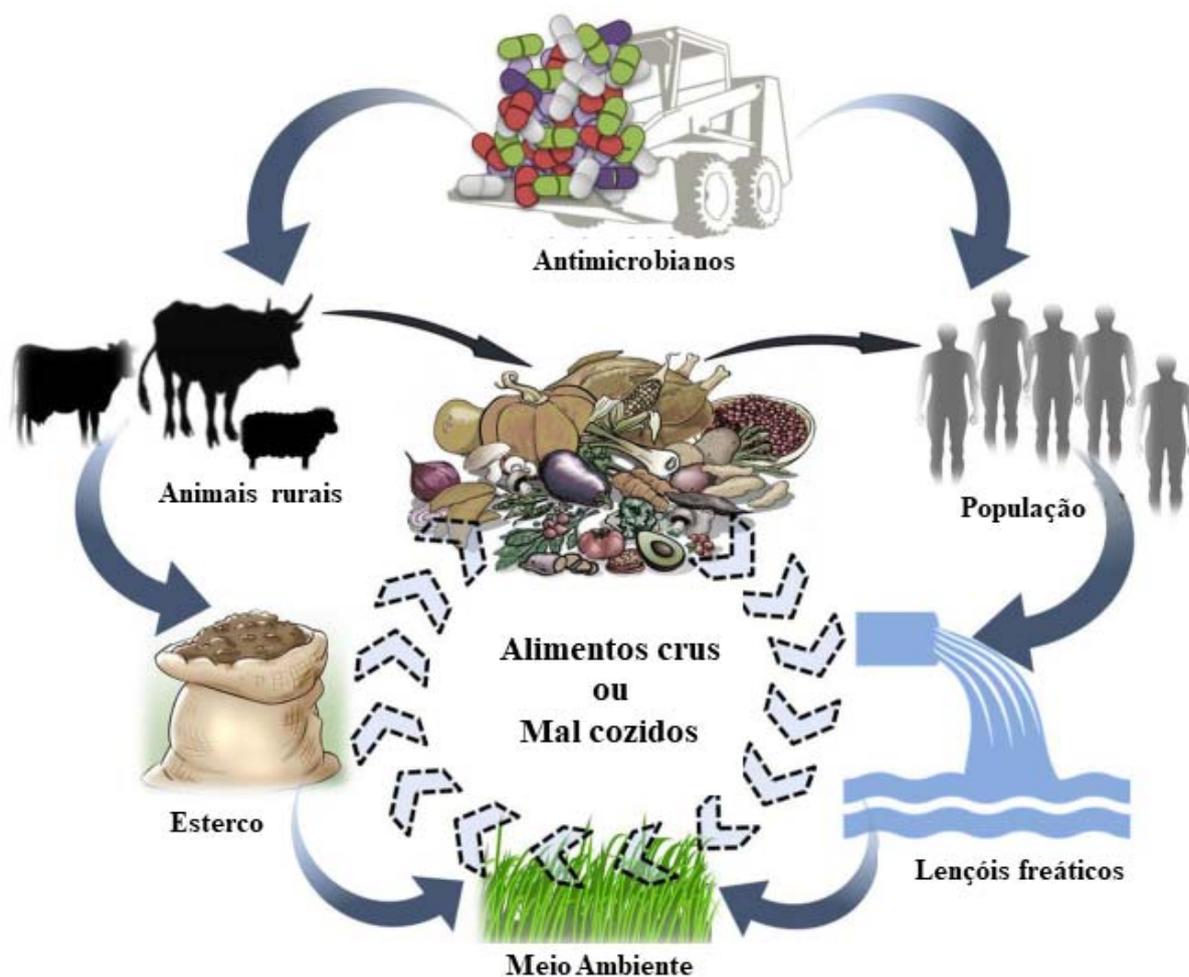
The emergence of multidrug resistant microorganisms raised concerns about a post-antibiotic era without antimicrobial agents as treatment options. In this scenario, antimicrobial peptides (AMPs) are a class of molecules that have generated growing interest for the development of new anti-infective drugs for the treatment of infections caused by bacteria, fungi, protozoa and viruses. The main objective of the present study was to evaluate the antimicrobial and antiviral effects of seven analogues of the AMP ocellatin 4 on different microorganisms and pathogenic viruses (Gram-negative and Gram-positive bacteria, yeast fungi and for yellow fever and dengue viruses) as their cytolytic effects on human blood cells in order to determine their therapeutic potential. Regarding the antimicrobial properties on Gram-positive and Gram-negative bacteria, several analogues exhibited a potency gain over the wild-type AMP with MICs in the therapeutic application ranges between 2-16  $\mu\text{M}$ . Analogues K[1,8,15];N[4,12] and K[1,8,15];R[4,12] exhibited the best performances against methicili-resistant *S. aureus* (MRSA), with MIC values equal to 2 and 4  $\mu\text{M}$ , respectively. For *K. pneumoniae* producing metallo-beta-lactamase carbapenemase isolate, the most active analogue was K[1,8,15];N[4,12] with a MIC value of 16  $\mu\text{M}$ . The analogues S5;K7;A10;N12 and K[1,8,15];N[4,12] were active on pathogenic yeast *C. albicans*, exhibiting MIC values of 16 and 8  $\mu\text{M}$ , respectively. When the antiviral activity is considered, the analogues K[1,4,8,15];A[12,16,20] and S5;K7;Ins-V10;A11;N13 deserve special mention, especially K[1,4,8,15];A[12,16,20] which demonstrated a cytotoxic activity 50% of 38.52  $\mu\text{M}$  and an effective concentration 50% on viral activity of 0.65  $\mu\text{M}$ , which represented an index of selectivity of 59.15 on dengue virus. It was also observed that ocellatin 4 and its analogues S5;K7;Ins-V10;A11;N13, Del-2;4;K6;A9;N11 and K[1,8,15];N[4,12] were the most active on human leukocytes, especially analogue K[1,8,15];N[4,12], which promoted complete cell destruction at the concentration of 128  $\mu\text{M}$ . In the case of human erythrocytes, only analogue K[1,4,8,15];A[12,16,20] exhibited cytolytic effects. All the evaluated peptides were able to form  $\alpha$ -helices in membrane-mimetic environments; and analogues S5;K7;A10;N12, Del-2;S4;K[6,17];A9;N11 and S5;K7;Ins-V10;A11;N13 were the ones with the highest levels of  $\alpha$ -helix formation in the presence of SDS micelles. When analyzing the set of antimicrobial, antiviral and cytolytic activities generated for ocellatin 4 and its analogues, several of the analogues exhibited a gain in potency in relation to the wild-type peptide, with special emphasis on analogues S5;A10;N12 and K[1,8,15];R[4,12] which exhibited inhibitory activities in low concentration ranges without presenting relevant cytolytic effects on human blood cells. The present study confirmed the potential of antimicrobial peptide analogues as possible anti-infective agents against a wide range of pathogenic targets.

**Keywords:** Anurans; Antimicrobial peptides; Ocellatin 4; Synthetic analogues; Multidrug resistance.

## 1. Introdução

Os microrganismos estão ao mesmo tempo entre os melhores amigos e piores inimigos do homem. O conhecimento sobre eles cresceu desde sua descoberta por Leeuwenhoek, reconhecendo-os como agentes de infecção (THAKUR *et al.*, 2016). A exploração de microrganismos e seus metabólitos para suas aplicações úteis em alimentos, rações, laticínios, fermentação, farmacêuticas e outras áreas é praticada há séculos (ADRIO *et al.*, 2014; TAMANG *et al.*, 2016). Para combater os microrganismos, várias medidas, especialmente a administração de antimicrobianos, são empregadas globalmente. A descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, retardou a prevalência de doenças infecciosas e salvou milhões de vidas, principalmente durante a Segunda Guerra Mundial. Após a descoberta da penicilina, Sir Alexander Fleming, afirmou que as bactérias poderiam desenvolver resistência contra terapias antibacterianas, e não demorou muito para que os casos de falha ao tratamento fossem relatados (ABRAHAM *et al.*, 1988; WHO, 2014). Atualmente tem sido observada a disseminação de microrganismos resistentes as mais diversas terapias disponíveis, desafiando a eficácia dos regimes terapêuticos modernos. A resistência aos antimicrobianos é definida como falta de resposta a doses padrão de drogas antimicrobianas clinicamente significativas (GANGULY *et al.*, 2011). Ainda assim, além de ter papéis benéficos, seu impacto como agente alarmante contra humanos, animais e vegetação persiste na forma de infecções em humanos e animais e deterioração de alimentos, adicionando considerável carga à economia individual e global (SHARMA *et al.*, 2018)

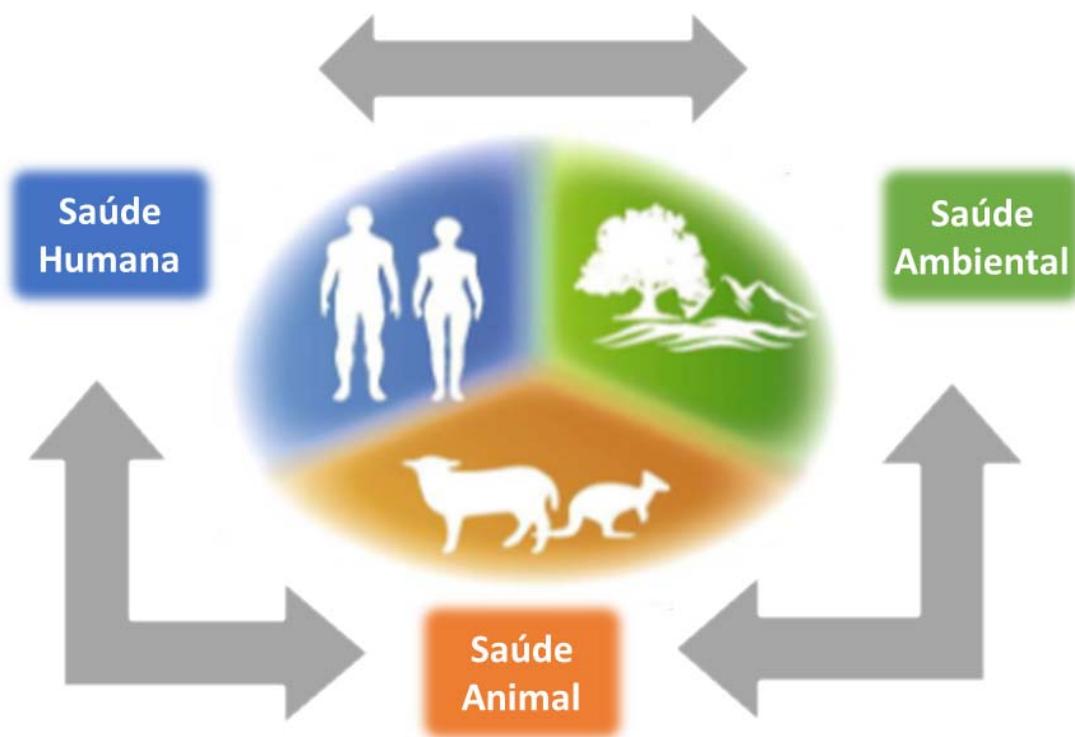
Além disso, os microrganismos multiresistentes não respeitam fronteiras geográficas e podem atravessar os países e continentes sendo transportados por humanos, animais e água (LITTMANN *et al.*, 2015). Em pleno século 21 com toda globalização e urbanização mundial, os tratamentos não conseguem confinar as linhagens resistentes aos ambientes de serviços de saúde, muitas doenças infecciosas tornam-se incontroláveis, cada vez mais cirurgias de grande porte estão em risco, e hoje em dia formas resistentes são disseminadas no meio ambiente através de diversos vetores que não exclusivamente os profissionais de saúde, mas também através da pecuária, agricultura e população em geral (HAWKEY *et al.*, 2009) (Figura 1).



**Figura 1.** Representação conceitual dos possíveis caminhos de microrganismos multiresistentes ou genes de resistência em diferentes ecossistemas (adaptado de SHARMA *et al.*, 2018).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão cada vez mais mostrando-se como novas possibilidades de tratamento para infecções microbianas. Enquanto na década de 1980 todos acreditavam que as infecções haviam sido contidas (SPELLBERG *et al.*, 2004, 2008), nos dias de hoje dispomos de assustadores dados sobre o aumento da resistência aos antibióticos disponíveis para tratamento. Pode-se observar que o seu uso excessivo e/ou uso indevido na medicina, indústria alimentícia e agricultura alavancam este fenômeno, relacionando-se com o conceito de Saúde Única - *One Health* (PFALZGRAFF *et al.*, 2018). A expressão surgiu após publicação do livro “*Veterinary Medicine and Human Health*” pelo autor Calvin W. Schwabe em 1984, aonde discutiu e reforçou a importância da união entre saúde humana, animal e ambiente. Inicialmente intitulava-se essa interação como “*One Medicine*”, a qual atualmente é conhecida como “*One Health*”. A expressão expõe a integração entre

saúde humana, saúde animal, ambiente e adoção de políticas públicas efetivas na prevenção e controle de doenças. O médico patologista alemão *Rudolf Virchow* já afirmava no século 19 que entre animais e medicina humana não há divisórias; e nem deveria haver, conforme representação da Figura 2.



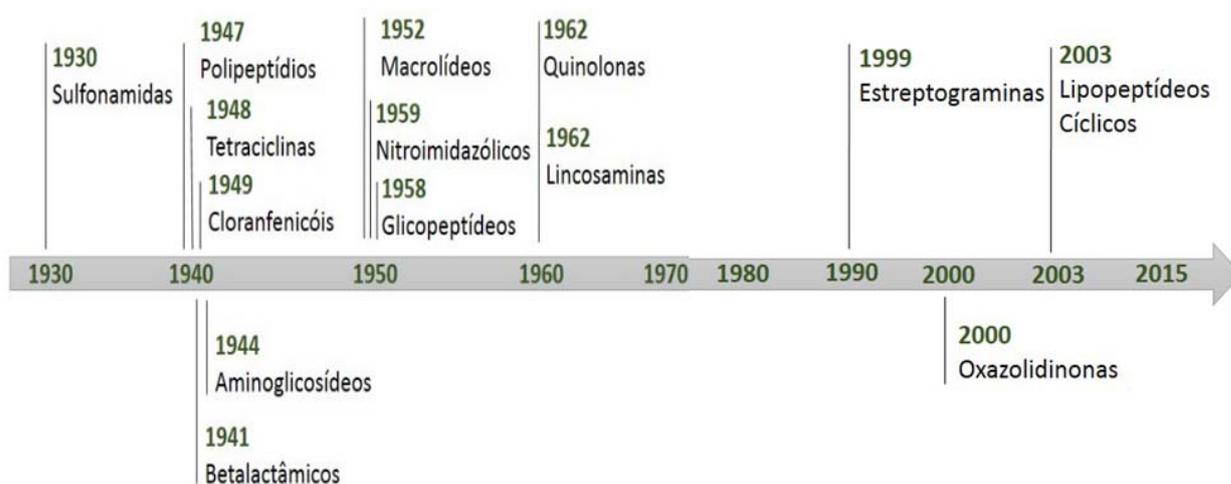
**Figura 2.** Tríade do conceito de Saúde Única.

Como resultado de uma extensa preocupação de saúde pública em relação ao uso dos promotores de crescimento na pecuária contendo antimicrobianos, a União Europeia proibiu progressivamente todos os usos de promotores de crescimento na indústria pecuária (BROWN *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2016). Portanto, há uma necessidade urgente de pesquisar e estudar a prevalência de resistência aos antimicrobianos na microbiota comensal e patogênica de animais, especialmente de valor econômico, ou seja, rebanhos ordenhadores, para compreender e desenvolver estratégias de tratamento natural com novos sítios-alvo (SHARMA *et al.*, 2018).

Com a atual escassez de novos antimicrobianos, a colistina voltou a ser utilizada como opção terapêutica para tratamento de linhagens multirresistentes, porém com a descoberta do gene de resistência *mcr-1* disseminado por plasmídeos a sua utilização já está restrita. Por essas razões, a Organização Mundial de Saúde (OMS) designou que alguns microrganismos são críticos e são um alvo prioritário para

o desenho de novos antimicrobianos e os PAMs são considerados candidatos plausíveis para o desenvolvimento de novas drogas (SRIJAN *et al.*, 2018; WHO, 2014; CHEN *et al.*, 2016).

A situação de resistência atual levanta preocupações sobre uma era pós-antibiótico sem antimicrobianos como opções de tratamento. Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de novas drogas anti-infecciosas está estagnando com apenas três novas classes de antibióticos publicadas durante as últimas décadas - todos eles exclusivamente dirigidos contra patógenos Gram-positivos (MARR *et al.*, 2006), de acordo com a representação apresentada na Figura 3.



**Figura 3.** Linha temporal do lançamento de novos antimicrobianos para uso clínico (adaptado de SOUZA, 2016).

Estimativas afirmam que até 2050 em todo o mundo 10 milhões de pessoas por ano morrerão de infecções causadas por bactérias multi-resistentes (CORDES *et al.*, 2014) e a OMS classifica o aparecimento de resistência aos antibióticos como uma das maiores ameaças à saúde humana (PFALZGRAFF *et al.*, 2018). Um exemplo são os patógenos do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*), que são resistentes a quase todos os antibióticos comuns e são as principais causas de hospitalização por infecções (SANTAJIT *et al.*, 2016). Infecções de pele como também dos tecidos e partes moles são causadas principalmente por *S. aureus*, com presença de linhagens MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) atingindo 50% de todas as infecções de partes moles, mas também agentes patogênicos Gram-negativos e Gram-positivos, como *P. aeruginosa* e

*Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) são cada vez mais isolados, especialmente de feridas crônicas (GUILLAMET *et al.*, 2016).

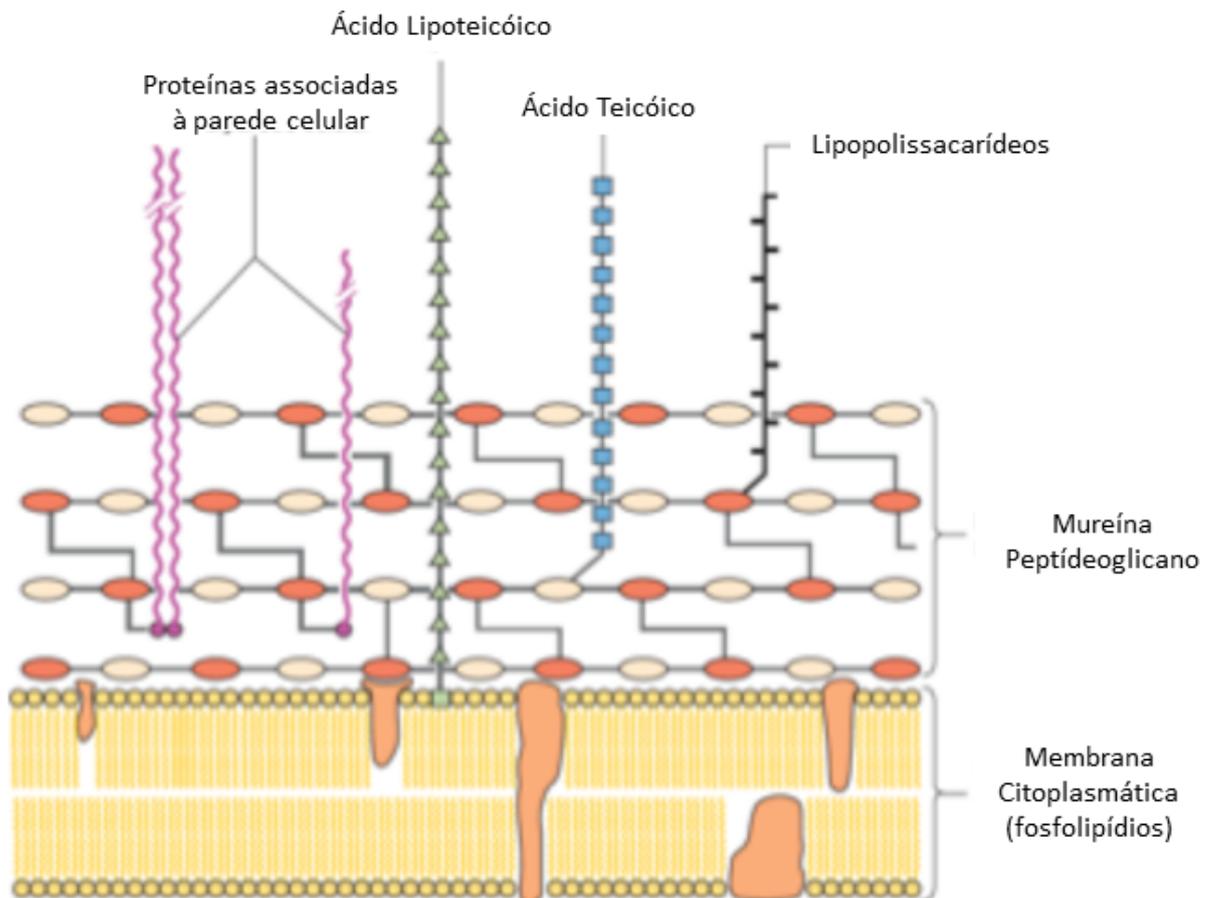
### **1.1. Estruturação das membranas citoplasmáticas**

As membranas citoplasmáticas funcionam com uma permeabilidade seletiva no transporte de moléculas, tanto para captação como para expulsão de substâncias. A integridade das membranas citoplasmáticas é primordial na sobrevivência dos microrganismos, portanto, a violação da membrana resulta na morte celular. Praticamente todas as biomembranas são compostas de proteínas e fosfolipídeos, dispostos em bicamadas de característica anfipática tendo ambos os domínios, hidrofílico e hidrofóbico. As membranas dos organismos eucariontes e procariontes apresentam diferenças significativas em termos de composição, estrutura e carga. A superfície da membrana eucariótica pode ser rica em colesterol e fosfolipídios eletricamente neutros (zwitteriônicos), enquanto a superfície das células bacterianas apresenta densidade de carga negativa devido à presença de fosfolipídios eletricamente negativos na face externa da bicamada lipídica (PASUPULETI *et al.*, 2012).

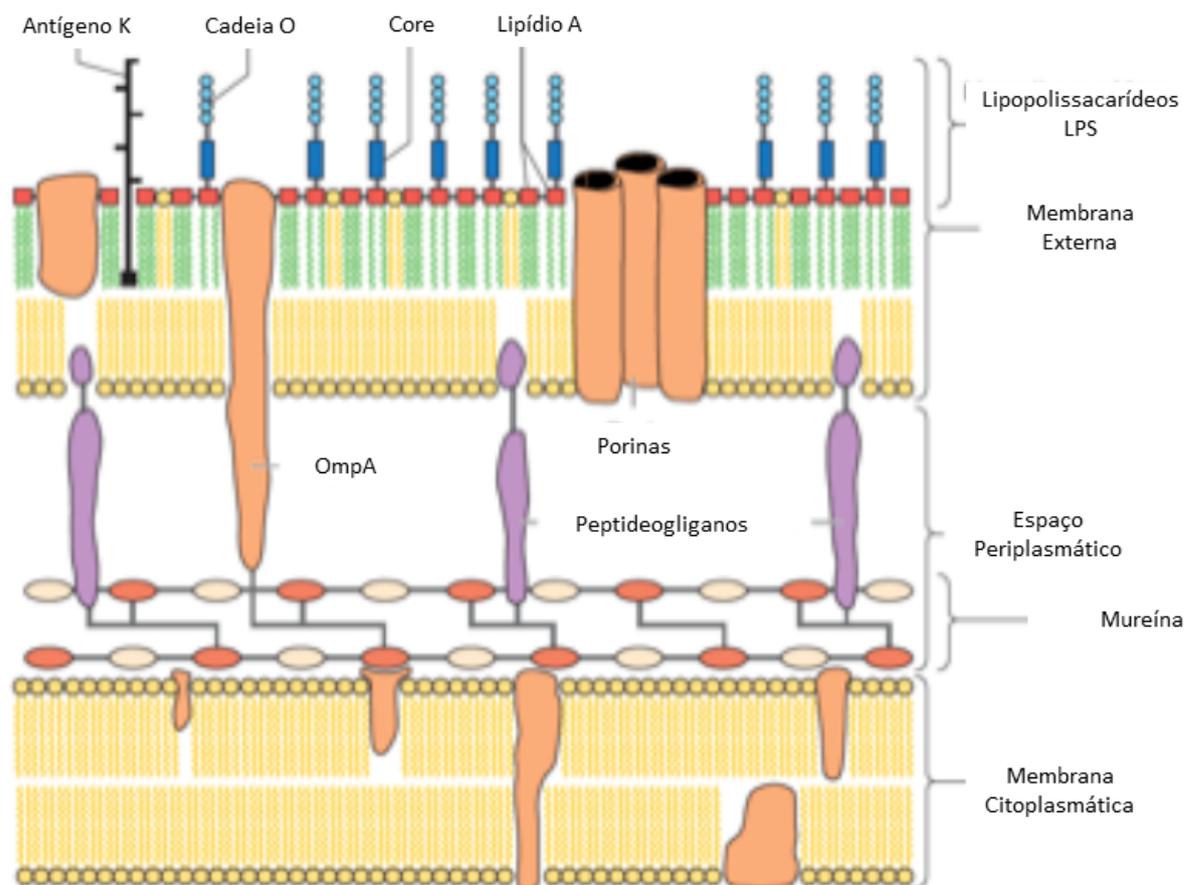
### **1.2 Características da célula bacteriana**

As membranas bacterianas são de uma complexidade ímpar, apresentando diferenças estruturais que permitem a sua divisão em duas categorias diferentes dependendo da coloração de Gram. Bactérias Gram-positivas apresentam composição singular na sua parede celular, baseada em mureína e peptidoglicanos, formando um arcabouço composto por uma alternância de N-acetil-glicosamina e ácido N-acetilmurâmico, no qual liga-se o ácido teicóico (Figura 4) (KAYSER *et al.*, 2005). Bactérias Gram-negativas são formadas por uma dupla camada de membranas, tratando-se uma membrana interna (MI) rica em fosfolipídios e uma externa (ME) rica em fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS). O espaço periplasmático que coexiste entre essas membranas contém peptidoglicanos (Figura 5). Vários grupos de proteínas podem estar associados a essas membranas e envolvidas em diferentes atividades como ligação a ATP, transporte de íons e de pequenas moléculas. Dentre essas proteínas observam-se as porinas e lipoproteínas, associadas a ME; as proteínas integrais, que atravessam a ME em várias regiões; as

periplasmáticas e as associadas à MI (CORDWELL, 2006). As bactérias Gram-negativas produzem uma variedade de polissacarídeos, como o LPS e os polissacarídeos capsulares, que podem ser particularmente importantes para a sua interação com o sistema imunológico do hospedeiro. O LPS atua como uma molécula de referência associada ao microrganismo, estimulando a resposta do hospedeiro, e os polissacarídeos capsulares podem formar barreiras físicas (biofilmes e estruturas capsulares), as quais favorecem a evasão da resposta imune (PASUPULETI *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Esquema ilustrativo da composição da parede de bactérias Gram-positivas (adaptado de KAYSER *et al.*, 2005).

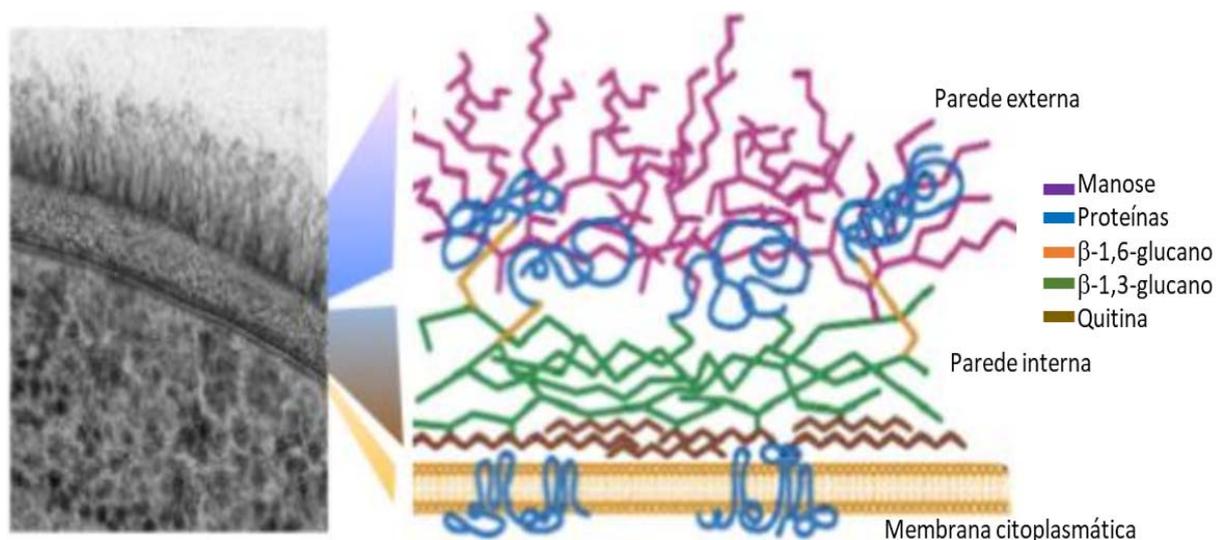


**Figura 5.** Esquema ilustrativo da composição da parede de bactérias Gram-negativas (adaptado de KAYSER *et al.*, 2005).

### 1.3. Características da célula fúngica

Os fungos são providos de uma parede celular com uma estrutura dinâmica e robusta mantendo as características estruturais das células e mediando a comunicação entre estas e o meio extracelular. A parede celular fúngica age como um limite que protege a célula das mudanças no meio extracelular, evitando danos físicos e osmóticos. No caso dos fungos patogênicos, as diferenças moleculares entre as superfícies das células humanas e fúngicas permitem que sejam reconhecidos pelo sistema imunológico inato do hospedeiro infectado. A composição da parede celular dos fungos possibilita a distinção de duas camadas principais sendo uma camada exterior, composta de glicoproteínas (polímeros de manose associados com proteínas) e uma camada interna que contém uma estrutura esquelética de polissacarídeos quitina e  $\beta$ -1,3-glucano que conferem resistência estrutural à célula (Figura 6). Devido a importância fundamental da superfície celular dos

microrganismos, muitos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica atuam interferindo a estabilidade dessa estrutura organizacional (GOW *et al.*, 2012).



**Figura 6.** Estrutura da parede celular do fungo *Candida albicans* (adaptado de GOW *et al.*, 2012).

#### 1.4. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os PAMs permaneceram potentes por milhões de anos, portanto constituem modelos úteis para o desenvolvimento de uma nova geração de antimicrobianos para atender à crescente problemática da resistência aos antimicrobianos em todo o mundo. Os PAMs são componentes-chave do sistema imunológico inato universalmente requerido para a sobrevivência de invertebrados e vertebrados. A lisozima, descoberta por Alexander Fleming em 1922, é reconhecida como a primeira proteína antimicrobiana (WANG, 2015) e assim deu início as descobertas que se seguiram, sendo que em 1939 obteve-se a extração de gramidina de *Bacillus brevis* seguida do isolamento de cecropinas e magaininas nos anos 80 (KANG *et al.*, 2017).

Uma diversidade grande de espécimes da ordem *Anura* e *Hymenoptera*, produzem PAMs como parte do seu mecanismo de defesa de primeira linha (DENNISON *et al.*, 2005). Os PAMs da secreção de pele dos anuros apresentam em sua maioria cerca de 8-46 resíduos de aminoácidos, com carga positiva e uma porção hidrofóbica. A expressão dos peptídeos antimicrobianos pode ser constitutiva ou induzida por estímulos infecciosos ou inflamatórios, tais como citocinas pró-inflamatórias, bactérias, fungos ou moléculas patogênicas que estimulam a imunidade inata (LEMAITRE *et al.*, 1996; HANCOCK, 2001; CUNLIFFE *et al.*, 2004).

Os PAMs podem ser aniônicos (um pequeno grupo presente em ruminantes, principalmente ricos em aspartato e glutamato) ou catiônicos (um grande grupo presente na maioria dos animais). Peptídeos catiônicos podem ser lineares, helicoidais, ricos em prolina ou estabilizados por cisteínas. Normalmente eles exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias e fungos (SHARMA *et al.*, 2018).

Devido à sua ampla atividade de espectro e escopo limitado para desenvolver resistência, os PAMs são amplamente estudados como substitutos aos antimicrobianos convencionais que estão rapidamente tornando-se ineficazes contra diversas linhagens de microrganismos (CHUNG *et al.*, 2017). Atualmente, temos apenas alguns PAMs que foram testados em ensaios clínicos de fase III para o seu uso terapêutico. Algumas das razões para o seu fracasso são estabilidade, eficiência e toxicidade *in vivo*, devido a esses fatores os PAMs foram descontinuados dos ensaios clínicos (MAHLAPUU *et al.*, 2016). Respondendo a essa necessidade, houve um aumento na pesquisa com esforços focados no desenho racional e na previsão de PAMs (FJELL *et al.*, 2011; PORTO *et al.*, 2017). Diversos trabalhos empregam estratégias de desenho racional para gerar novos PAMS com melhorias de atividade e redução da toxicidade (PORTO *et al.*, 2017).

O novo método racional de configuração envolve identificação de padrões de sequência, resíduos cruciais, posições e frequências de aminoácidos de PAMs conhecidos. Estas informações são então usadas para desenvolver novos PAMs. Outra abordagem usada para projetar racionalmente novos PAMs é o método baseado em modelo onde substituições/truncamentos no peptídeo selvagem podem levar a desenhos de PAMs mais potentes com toxicidade reduzida. Esse exercício é, portanto, fortemente dependente de algoritmos altamente sensíveis que podem prever com precisão a mudança na atividade da membrana devido a pequenas variações de sequência (PORTO *et al.*, 2012).

Até o momento, mais de 2987 PAMs com propriedades antimicrobianas e antitumorais foram descobertos ou sintetizados (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>; *Antimicrobial Peptide Database - APD*) e têm sido agrupados com base no comprimento, na estrutura secundária e terciária, na presença ou ausência de ligações dissulfeto.

Os PAMs apresentam uma variedade de estruturas secundárias, permitindo a sua classificação em cinco grupos principais: (1) peptídeos que adotam conformação de folha- $\beta$  quando são estabilizados por duas ou três ligações dissulfeto; (2) peptídeos sem resíduos de cisteína que adotam estruturas de  $\alpha$ -hélice anfipáticas; (3) peptídeos aniônicos ricos em aspartato e glutamato; (4) peptídeos ricos em resíduos de triptofano, prolina e/ou histidina; e (5) peptídeos compostos de aminoácidos raros (HANCOCK *et al.*, 2002a; REDDY *et al.*, 2004).

### **1.5. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos**

A seletividade dos PAMs tem base nas diferentes composições lipídicas e nas cargas presentes nas membranas de células eucarióticas e procarióticas. A interação dos PAMs com a membrana celular do patógeno altera o potencial elétrico devido às interações entre os lipídeos de membrana e o peptídeo antimicrobiano (TEIXEIRA *et al.*, 2012). A camada externa da membrana celular de mamíferos e organismos eucariontes em geral, pode ser composta por lipídeos neutros que dificultam a interação eletrostática com os PAMs, protegendo-a assim da sua ação (YEAMAN *et al.*, 2003). Porém, as interações eletrostáticas entre os PAMs e as superfícies das células bacterianas, podem ser facilitadas pela presença de fosfolipídios carregados negativamente na face externa da bicamada lipídica e com isso ocorre uma interação hidrofóbica entre a bicamada lipídica e a face apolar do peptídeo, o que acaba resultando na alteração de permeabilidade da membrana da célula alvo (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Os PAMs são diversas moléculas biologicamente ativas do sistema imunológico inato aonde exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro e têm diversos alvos celulares (LOHNER, 2017) e isso dificulta que os microrganismos desenvolvam resistência contra eles em comparação com antimicrobianos já utilizados na prática clínica, os quais em sua grande maioria têm um único alvo. Além disso, eles também exercem inúmeras propriedades imunomoduladoras, como a modulação da expressão de citocinas e quimiocinas, ativação de leucócitos (SORENSEN *et al.*, 2008).

Ao se pensar em PAMs para uso farmacológico vêm à mente a toxicidade seletiva que ele deverá possuir para não danificar as células do hospedeiro. A ação dos PAMs ocasiona um desarranjo na membrana celular, visto que a molécula não se

liga a nenhum receptor específico, apesar da conformação da molécula, se for em  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$ , linear ou desorganizada o que auxilia no sítio alvo é a carga e a hidrofobicidade dos peptídeos (YEAMAN *et al.*, 2003). Vários modelos vêm sendo propostos envolvendo como mecanismo de ação a permeabilização da bicama lipídica, podem ser classificados como: agregação, poro toroidal, barril e tapete (*carpet-like*) (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

### **1.5.1. Agregação**

Alguns PAMs podem ocasionar a despolarização da membrana devido a formação de poros. Os PAMs ligam-se aos constituintes da membrana e agregam-se de forma desordenada, e com isso ocorre uma desestabilização da bicamada lipídica. Pode ocorrer uma associação destes agregados com moléculas de água, e com isso permitir o efluxo de íons e moléculas (BECHINGER *et al.*, 2006). Esse fato ocorre em um curto período e não causa uma despolarização de membrana, porém uma vez que estes PAMs conseguem alcançar o citoplasma celular ele passa a interagir com alvos intracelulares como ácidos nucleicos (DNA ou RNA) (SHAI, 2002; JENSSEN *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2012). (Figura 7A).

### **1.5.2. Poro toroidal**

Os PAMs inserem-se na membrana de forma concêntrica e ali permanecem ligados fortemente aos grupos polares lipídicos, e com isso gera uma aparência de um poro circular. Devido a esse arranjo pode ocasionar uma perda de equilíbrio de íons e outras moléculas do meio extra para o meio intracelular e com isso ocorre alteração na pressão osmótica (EPAND *et al.*, 1999; JENSSEN *et al.*, 2006) (Figura 7B).

### **1.5.3. Barril**

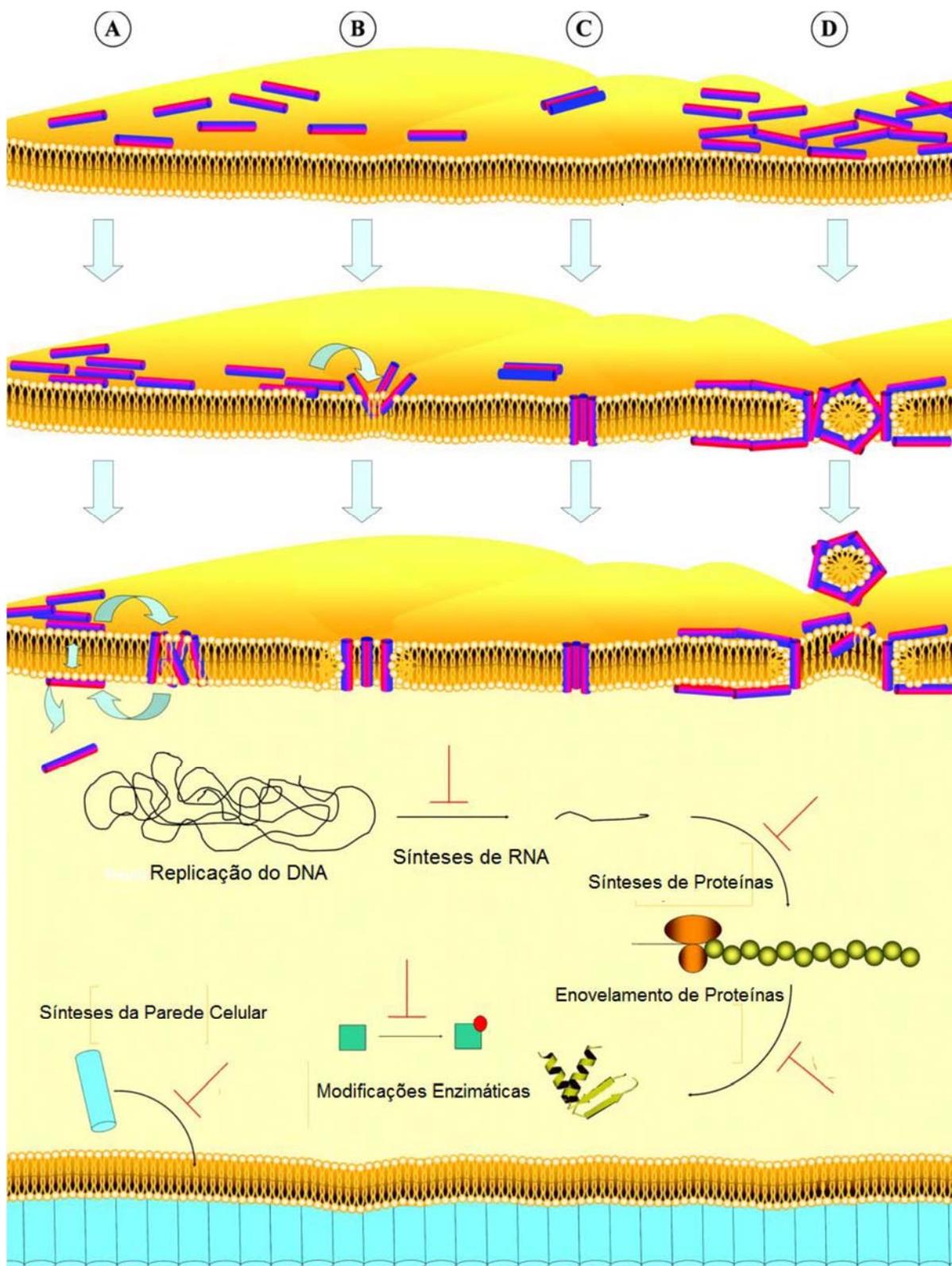
Neste modelo os PAMs aglomeram-se no lúmen central da membrana formando uma espécie de barril. Esse estilo de configuração é transmembranar e ocorre devido aos peptídeos serem muito hidrofóbicos (HUANG, 2006). As partes hidrofóbicas interagem com a parte interna da membrana enquanto a parte hidrofílica

adquire uma conformação de revestimento interior do poro (TEIXEIRA *et al.*, 2012) (Figura 7C).

#### **1.5.4. Tapete (*carpet-like*)**

Neste mecanismo ocorre um contato eletrostático entre a face carregada positivamente do PAM e os grupos aniônicos dos fosfolipídios, os quais desestabilizam a membrana celular. Quando ocorrer superdosagem acarretará em furos na membrana podendo ocasionar a desintegração através de formação de micelas, e sendo assim os PAMs não necessitam estar inseridos no centro hidrofóbico da membrana (Figura 7D) (JENSSEN *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

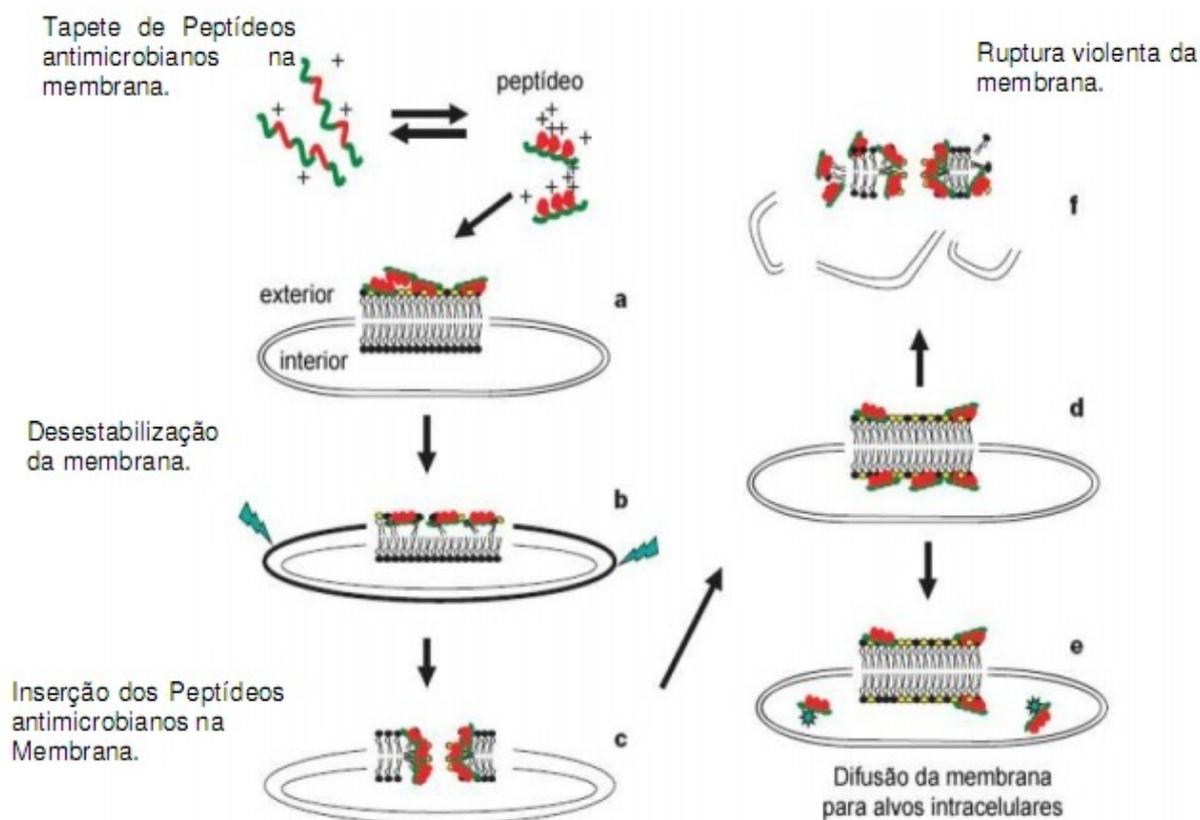
Quando o peptídeo consegue chegar ao citoplasma por qualquer um desses mecanismos ele pode ocasionar a morte celular. Eles conseguem alterar a integridade da membrana celular, podem bloquear a síntese proteica, propiciam a perda de ATP ou ocasionar o estresse oxidativo da célula (BROGDEN, 2005; JENSSEN *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Modelos de ação dos peptídeos antimicrobianos. A. Agregação; B. Poro toroidal; C. Barril; D. Tapete (Carpet-like). No interior da célula, marcadas com as linhas vermelhas, estão representadas as possíveis vias da ação dos PAMs (adaptado de JENSSEN et al., 2006).

Os mecanismos de ação apresentados pelos PAMs são dependentes de sua interação com a membrana celular, por exemplo, das bactérias (HANCOCK *et al.*, 2002b). O acoplamento inicial é produzido pela atração entre o peptídeo e a célula do microorganismo, por meio de interações eletrostáticas que podem ocorrer ao nível de fosfolipídios (BIGGIN *et al.*, 1999; BLONDELLE *et al.*, 1999), como os lipopolisacarídeos (LPS), presentes em bactérias Gram-negativas, ou ácidos lipoteicóicos em bactérias Gram-positivas (JENSSEN *et al.*, 2006). Semelhantemente ligam-se à moléculas de ácido siálico na superfície das hemácias (BLONDELLE *et al.*, 1999).

No modelo unificador de Shai-Matsuzaki-Huang, inicialmente os peptídeos catiônicos interagem com as cabeças polares negativamente carregadas dos fosfolipídeos de membrana. Em seguida, começam a se inserir na bicamada lipídica, causando seu estreitamento formando poros transitórios, por meio dos quais peptídeos e lipídios podem se deslocar para o interior da célula e atingir alvos intracelulares. Pode ocorrer também ruptura da membrana devido a desestabilização induzida pela associação e inserção dos peptídeos na membrana (ZASLOFF, 2002) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema do modelo Shai-Matsuzaki-Huang. a) Formação de um tapete de peptídeos na camada da membrana exterior. b) Integração do peptídeo à membrana. c) Formação de poros transitórios. d) Transporte de lipídios e peptídeos para a camada interior. e) Difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos). f) Ruptura da membrana em fragmentos. (adaptado de ZASLOFF, 2002).

### 1.6. Atividade antibacteriana dos PAMs

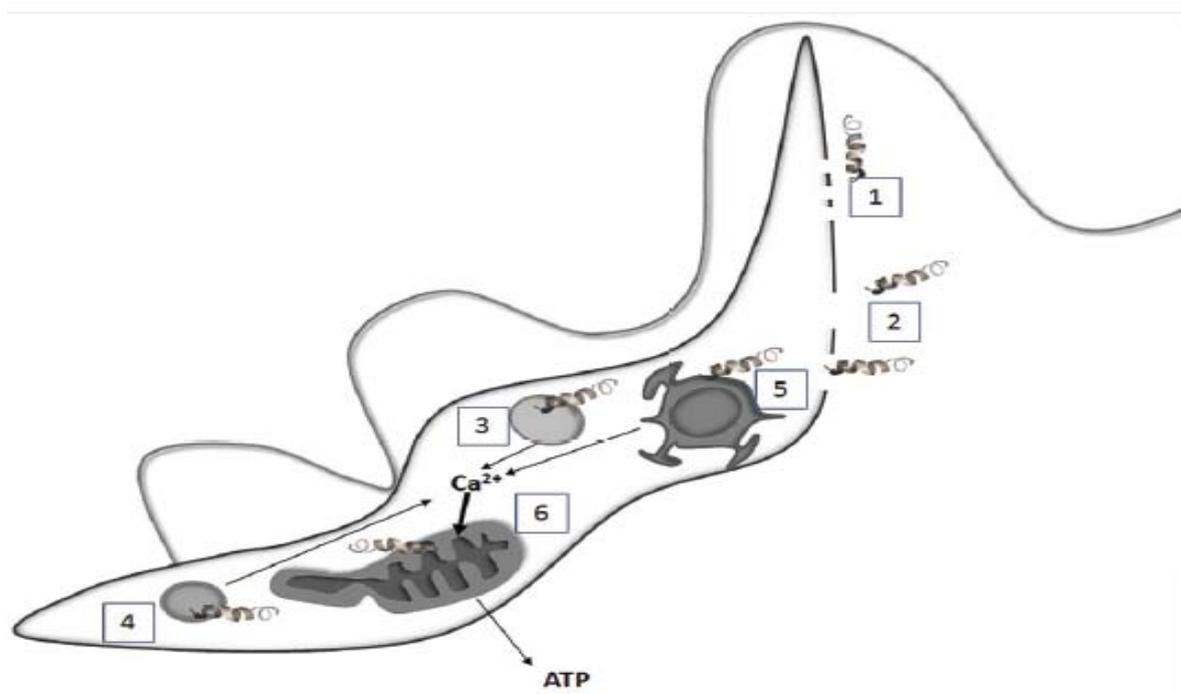
São descritos na literatura PAMs com um grande espectro antibacteriano ou com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) comparáveis com antibacterianos já utilizados para tratamento clínico. Um exemplo é a dermaseptina S4 que alcança uma CIM de 1  $\mu\text{M}$  contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* (NAVON-VENEZIA *et al.*, 2002). Existem alguns peptídeos atualmente em fase de estudos para uso tópico como as cecropinas D2A21, D4E1 e a gramicidina S, utilizados para combater estirpes de *Pseudomonas sp* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (MARR *et al.*, 2006; LUCA *et al.*, 2013).

### 1.7. Atividade antiparasitária dos PAMs

Embora sejam pouco conhecidos os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos atuam como antiparasitários, acredita-se que sua atividade inibitória

seja mediada por mecanismos semelhantes aos observados em bactérias e fungos (JENSSEN *et al.*, 2006).

A atividade antiparasitária vem sendo descrita para PAMs que tenham uma propensão de provocar a homeostase dos protozoários por interrupção das membranas celulares, bem como interferir nos processos metabólicos do parasita. Os PAMs demonstram um certo tropismo por protozoários, devido à carga aniônica da membrana externa bem peculiar de alguns espécimes eucariontes (RINALDI, 2002). Esta variedade de PAMs utiliza a estrutura helicoidal anfipática em meios hidrofóbicos e com isso consegue a vantagem para permeabilizar a membrana do organismo, porém é a carga catiônica do peptídeo que determina a interação com os fosfolípidos encontrados na membrana do parasito (FRIEDRICH *et al.*, 1999; RIVAS *et al.*, 2009). Há ainda formas diferentes para obter uma ação antiparasitária diretamente no citoplasma, mediando as vias de morte celular e ocasionar um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio, um exemplo são os peptídeos Dermaseptin-S1 e H-3 (RIVAS *et al.*, 2009). A Figura 9 ilustra alguns dos alvos dos PAMs sobre protozoários.



**Figura 9.** Principais alvos dos PAMs sobre protozoários. A ação dos PAMs é diretamente na membrana do parasito resultando em pequenos poros (1) ou grandes poros (2). Os alvos intracelulares dos PAMs são os acidocalissomos (3) os glicosossomos (4), o retículo endoplasmático (5) e a mitocôndria (6) (adaptado de GUIMARÃES *et al.*, 2016).

### 1.8. Atividade antifúngica dos PAMs

Os peptídeos antifúngicos variam substancialmente em termos de similaridade estrutural e sua atividade poderia estar correlacionada com sua habilidade para formar complexos lipídicos (LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 2004; JENSSEN *et al.*, 2006). Entre os principais mecanismos propostos encontram-se: 1) a quebra da estrutura da membrana celular (LEE *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2004; JANG *et al.*, 2006), 2) a danificação da parede celular (LEE *et al.*, 2003), 3) a interação com mitocôndrias (KAVANAGH *et al.*, 2004), e 4) a despolarização do citoesqueleto por despolimerização das fibras de actina (KOO *et al.*, 2004).

Grande parte dos PAMs com características antifúngicas atuam comumente na parede celular ou em compostos intracelulares (NARAYANA *et al.*, 2015). A parede celular dos fungos é rica em quitina e muitos PAMs são capazes de se ligarem a esta molécula, por exemplo a defensina 1 murina (mBD1) e a histatina 5, ambos mostram uma eficiente ação sobre linhagens de *Candida albicans* (HELMERHORST *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2014). Há também peptídeos com ação contra fungos filamentosos como *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*, um exemplo é a iturina A que é eficaz contra dermatomicoses, tendo um amplo espectro de propriedades antifúngicas e poucas reações alérgicas, isso em ensaios clínicos com seres humanos e animais, porém o peptídeo apresenta atividade hemolítica (LATOUD *et al.*, 1986).

### 1.9. Atividade antiviral dos PAMs

A comunidade científica enfrenta novos desafios com relação à vigilância, tratamento e prevenção de viroses emergentes como é o caso das infecções pelos vírus zika, chikungunya e dengue, que vêm causando alerta, principalmente nas Américas (BRASIL 2015; HEUKELBACH *et al.*, 2016, KANTOR 2016). Embora a atividade antibacteriana dos peptídeos com características catiônicas seja a mais estudada, pouco se sabe sobre a capacidade que possuem para atuar como agentes antivirais. Além disso, o mecanismo de ação desses peptídeos que exibem atividade antiviral ainda é pouco compreendido (MATANIC *et al.*, 2004).

A atividade antiviral de um grupo de peptídeos catiônicos de folha- $\beta$ , contra vírus envelopados foram atribuídos à inativação direta de partículas virais, um exemplo são os vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1), estomatite vesicular vírus (VSV), influenzavírus e

citomegalovírus (DAHER *et al.*, 1986). No entanto, se relata que os peptídeos  $\alpha$ -helicoidais podem atuar como agentes virucidas ou como inibidores da multiplicação do vírus. As magaininas I e II são peptídeos  $\alpha$ -helicoidais contendo 23 resíduos de aminoácidos, previamente isolados da pele do sapo *Xenopus laevis*, que diferem por substituições nas posições 10 e 22 (NICOLAS *et al.*, 1995; NISSEN *et al.*, 1997; MARCOCCI *et al.*, 2018) e tem sido relatado que análogos sintéticos de magaininas exibem ação virucida contra HSV-1 (MARCOCCI *et al.*, 2018).

### 1.10. Aplicações veterinárias dos PAMs

A mastite bovina é causada por patógenos bacterianos, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Tais linhagens são capazes de promover uma inflamação da glândula mamária, que afeta tanto a produção quanto a qualidade do leite, sendo uma das causas mais significativas de perdas econômicas na indústria de laticínios. Os sinais da infecção variam de acordo com o animal e a capacidade invasora do patógeno, podendo resultar em mastite clínica ou subclínica (na qual o hospedeiro não apresenta sintomas evidentes da doença). Essa associação provoca visíveis alterações no leite, além de dor e inchaço no úbere do animal (LI *et al.*, 2017).

O tratamento convencional de gado bovino com mastite culmina no uso de antibióticos como cefalosporinas, lincosamidas, macrolídeos e, principalmente, penicilinas (WANG *et al.*, 2016). Os antibióticos podem ser administrados através da sua aplicação intramamária ou ainda através de injeções intramusculares. Mesmo durante o período seco, quando o animal não está produzindo leite, ele continua susceptível a infecções intramamárias. A administração de antibióticos neste período, como medida profilática, tem se mostrado benéfica, levando a uma redução de até 82% do aparecimento de novos casos. Tem sido verificado que o uso de antibióticos, como medida profilática ou terapêutica, sem prescrição técnica e sem teste para a identificação do patógeno, tem contribuído para o aumento da resistência dos microrganismos envolvidos (WANG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017).

A fim de limitar a presença de bactérias multirresistentes na mastite bovina, alternativas para o tratamento com antibióticos são urgentemente necessárias e os peptídeos antimicrobianos são uma nova estratégia potencial contra infecções bacterianas (MELISSA *et al.*, 2017). Os peptídeos antimicrobianos são uma nova classe de agentes antimicrobianos com um novo modo de ação e aparecem como um

dos medicamentos antimicrobianos mais promissores. Plectasina com 40 resíduos de aminoácidos é um PAM catiônico isolado do fungo *Pseudo-plectania nigrella* e tem uma atividade potente contra bactérias Gram-positivas. Acredita-se que a maioria dos PAMs tenha como alvo a membrana celular bacteriana. Curiosamente, a plectasina pode interferir na síntese da parede celular, ligando-se especificamente ao precursor da parede celular bacteriana (SCHNEIDER *et al.*, 2010; MOOSAZADEH *et al.*, 2015).

### 1.11. Mecanismos de resistência aos peptídeos antimicrobianos

Os microrganismos patogênicos têm desenvolvido diversos mecanismos que limitam os efeitos dos PAMs. Esses mecanismos podem ser intrínsecos, sendo expressos, tanto na presença, quanto na ausência de estímulo, ou adaptativo, manifestando-se em resposta à presença do peptídeo ou às reações que ele provoca na célula-alvo (YOUNT *et al.*, 2005).

A resistência pode ser atingida ao modificar lipídios e lipopolissacarídeos que normalmente seriam alvos extracelulares dos PAMs, assim como componentes da parede celular, de modo a diminuir a carga líquida negativa e conseguindo assim repelir os PAMs positivamente carregados (GUO *et al.*, 1998; ERNST *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 1999; JOO *et al.*, 2016).

Algumas bactérias e fungos teriam a capacidade de ejetar os PAMs do seu interior, de maneira dependente de energia, através da indução de genes que codificam proteínas formadoras de canais (SHAFER *et al.*, 1998; BENGOCHEA *et al.*, 2000). Outro mecanismo consiste na modificação de proteínas-alvo intracelulares (DEL CASTILLO *et al.*, 2001). Alguns patógenos, aliás, podem afetar os sistemas de defesa induzíveis ao interferirem com cascatas de sinalização indutivas (ISLAM *et al.*, 2001).

A resistência bacteriana contra PAMs já foram relatadas (OUHARA *et al.*, 2008; ANDERSSON *et al.*, 2016; OMARDIEN *et al.*, 2016) e isso ocasiona o risco de que as bactérias que apresentam resistência aos PAMs possam desenvolver resistência cruzada as células do hospedeiro (DOBSON *et al.*, 2014; KUBICEK-SUTHERLAND *et al.*, 2017), como *S. aureus* que desenvolveu resistência a HNP-1 após tratamento com pexiganan (CONLON, 2015). No entanto, peptídeos sintéticos poderiam superar o obstáculo da resistência em relação aos peptídeos naturais de defesa do hospedeiro (NIJNIK, 2009). Pode-se aumentar a atividade biológica dos peptídeos

antimicrobianos, propondo-se algumas alterações em relação ao peptídeo selvagem, e com isso pode-se potencializar os efeitos frente as linhagens microbianas, visando sempre diminuir as possíveis interações com as células dos seres humanos e com isso os PAMs mostram-se como uma opção viável para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (PFALZGRAFF *et al.*, 2018).

A Figura 10 ilustra os principais mecanismos de resistência bacteriana contra os PAMs.



**Figura 10.** Principais mecanismos de resistência contra os PAMs (adaptada de PFALZGRAFF *et al.*, 2018).

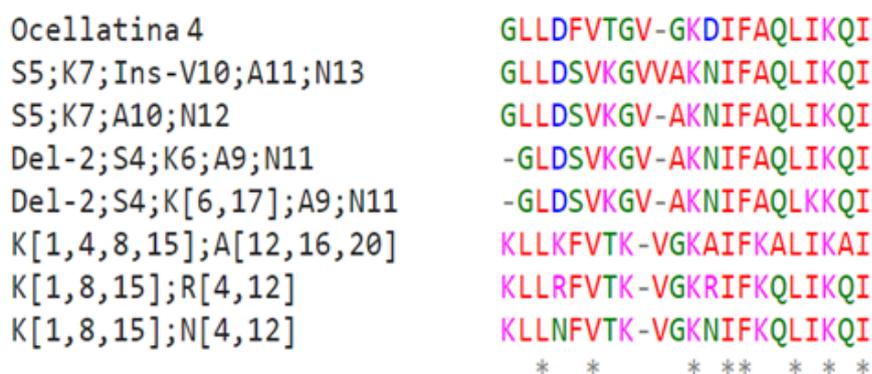
Resistência bacteriana aos PAMs pode-se desenvolver devido à mudança de carga de superfície, enquanto que a modificação seria em LPS nos Gram-negativos e ácido lipoteicoico em Gram-positivas, com isso há um aumento das cargas positivas, reduzindo assim a atração de PAMs (JOO *et al.*, 2016).

Modificações da composição fosfolipídica bacteriana e, assim, alteração da estrutura da membrana citoplasmática tais como aminoacilação de grupos de cabeça de fosfatidilglicerol, que mascara fosfatos aniônicos com aminas primárias catiônicas, diminui a atração de PAMs e a inserção deles na membrana. Além disso bombas de efluxo presentes em bactérias Gram-negativas podem contribuir para a resistência

aos PAMs. Os mecanismos de resistência que contribuem para a virulência *in vivo* são modificações estruturais da superfície celular e bombas de efluxo (BAUER, 2015).

### 1.12. Análogos da ocelatina 4 utilizados no presente estudo

No presente trabalho, foram avaliadas as propriedades antimicrobianas, antivirais e citolíticas de sete análogos derivados do PAM ocelatina 4, previamente propostos na tese de doutoramento de NASCIMENTO (2007). Tais análogos foram denominados pelas respectivas modificações que sofreram, sendo os análogos K[1,4,8,15];A[12,16,20], K[1,8,15];R[4,12], K[1,8,15];N[4,12], fortemente catiônicos, cujo desenho visou eliminar as cargas negativas, presentes na estrutura primária da ocelatina 4 na forma de resíduos de aspartato (D) e pela substituição das glicinas (G), fracamente hidrofílica e com potencial desestabilizador de hélices, por lisinas (K), as quais são positivamente carregadas, fortes hidrofílicas e propiciadoras de hélices (EISENBERG *et al.*, 1982; KYTE & DOOLITTLE, 1982; ROLLINS-SMITH *et al.*, 2005). Os demais análogos S5;K7;Ins-V10;A11;N13, Del-2;S4;K6;A9;N11 e Del-2;S4;K[6,17];A9;N11 foram idealizados com base na projeção helicoidal 1-18 do peptídeo S5;K7;A10;N12 o qual, por sua vez, foi proposto com base nos PAMs pentadactilina (isolado de *L. pentadactylus*) e ranatuerina 2B (de *Rana berlandieri*), além do modelo representado pela ocelatina 4. A Figura 11 apresenta as estruturas primárias da ocelatina 4 e seus sete análogos. Tanto a ocelatina 4 quanto seus análogos apresentam amidiação na porção C-terminal, modificação pós-traducional comum em PAMs de anuros.



**Figura 11.** Multi-alinhamento da ocelatina 4 e seus análogos. As cores dos resíduos de aminoácidos representam suas propriedades físico-químicas: Vermelho = aminoácidos pequenos, hidrofóbicos, aromáticos e apolares; Azul = aminoácidos ácidos; Verde = aminoácidos hidroxil, amino, amido, polar sem carga; rosa = aminoácidos básicos. Aminoácidos idênticos entre as estruturas primárias estão assinalados com (\*).

Peptídeos que demonstram atividade antimicrobiana sem apresentar atividade hemolítica normalmente contêm diversos resíduos de aminoácidos carregados positivamente, sendo então classificados como catiônicos (EPAND & VOGEL, 1999): a maior parte apresenta carga líquida +2, podendo chegar a +3, quando ocorrer amidação no C-terminal. Contrariamente a estes peptídeos, os que apresentam menores valores de carga da cadeia peptídica mostram-se mais hemolíticos (SHAI, 1999), sendo o caso do peptídeo modelo, a ocelatina 4. Peptídeos com anfipacidade alta podem causar intensas tendências de agregação entre as moléculas em solução aquosa (CHEN *et al.*, 2005).

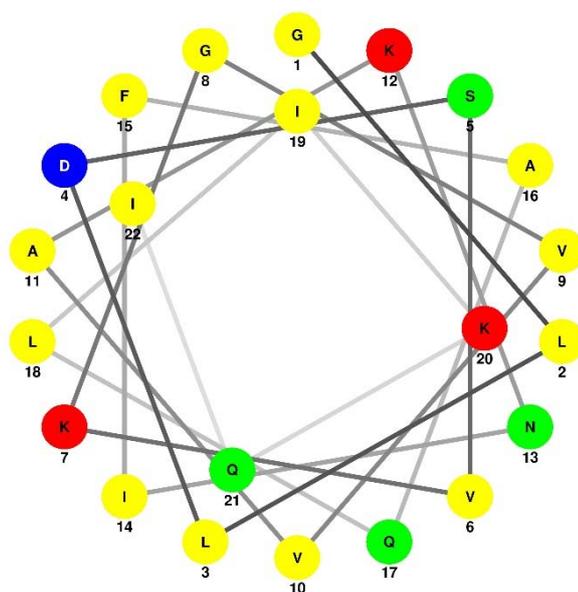
Os peptídeos agregados têm sua potência diminuída frente às bactérias, nas quais a parede celular impede o acesso imediato à membrana citoplasmática. Contudo, em oposição às células que possuem a membrana citoplasmática acessível (ex.: hemácias), os peptídeos agregados tornam-se mais eficientes, pois, logo ao primeiro contato, encontram-se em uma concentração capaz de permeabilizá-las (GHOSH *et al.*, 1997; KRUGLIAK *et al.*, 2000; FEDER *et al.*, 2000).

Parâmetros físico-químicos, tais como carga líquida (Q), massa molecular (MM), hidrofobicidade média e momento hidrofóbico médio, foram determinados para cada um dos peptídeos testados e estão apresentados na Tabela 1.

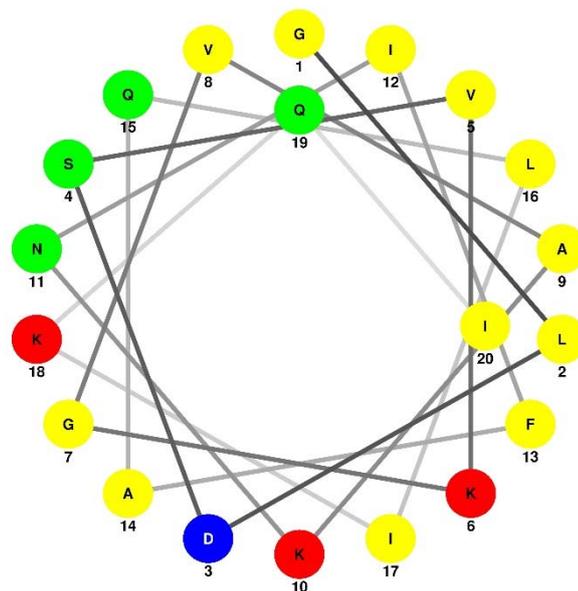
**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos da ocelatina 4 e seus análogos (modificado de NASCIMENTO, 2007), MM = Massa molecular; Q = carga (em pH = 7,0); H Eisen = Hidrofobicidade média, escala de EISENBERG (1982); H Kyte = Hidrofobicidade média, escala de KYTE e DOOLITTLE (1982); <H> = Hidrofobicidade média (FAUCHÈRE e PLISKA, 1983); <μH> = Momento hidrofóbico médio (EISENBERG, WEISS e TERWILLIGER, 1982).

Peptídeo	MM (Da)	Q	H Eisen.	H Kyte	<H>	<μH>
Ocelatina 4	2274.30	+1	0,01	0,40	0.625	0.473
S5;K7;A10;N12	2254.34	+3	-0,10	0,15	0.501	0.515
S5;K7;Ins-V10;A11;N13	2353.41	+3	-0,07	0,17	0.534	0.140
Del-2;S4;K6;A9;N11	2141.26	+3	-0,13	-0,02	0.442	0.506
Del-2;S4;K[6,17];A9;N11;	2156.27	+4	-0,25	-0,47	0.302	0.524
K[1,8,15];N[4,12]	2471.54	+6	-0,26	-0,28	0.485	0.611
K[1,4,8,15];A[12,16,20]	2328.54	+7	-0,19	0,40	0.560	0.607
K[1,8,15];R[4,12]	2555.65	+8	-0,37	-0,38	0.446	0.641



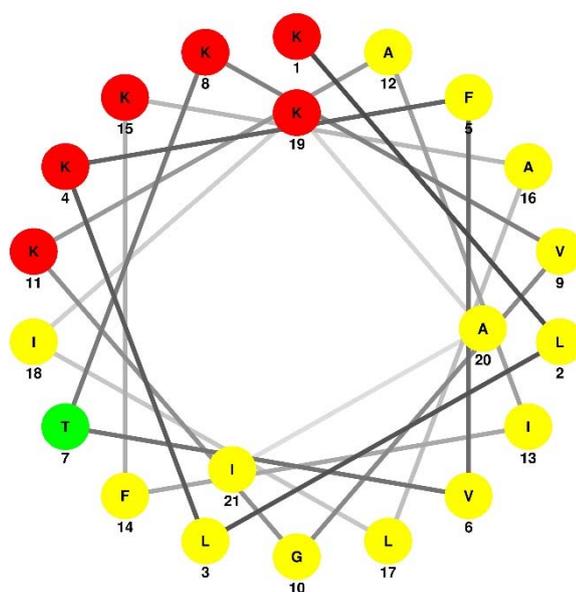


**Figura 14.** Projeção em roda helicoidal do análogo S5;K7;Ins-V10;A11;N13. Em amarelo os resíduos não polares; em verde, os resíduos polares não carregados; em azul os resíduos polares ácidos; em vermelho os resíduos polares básicos.

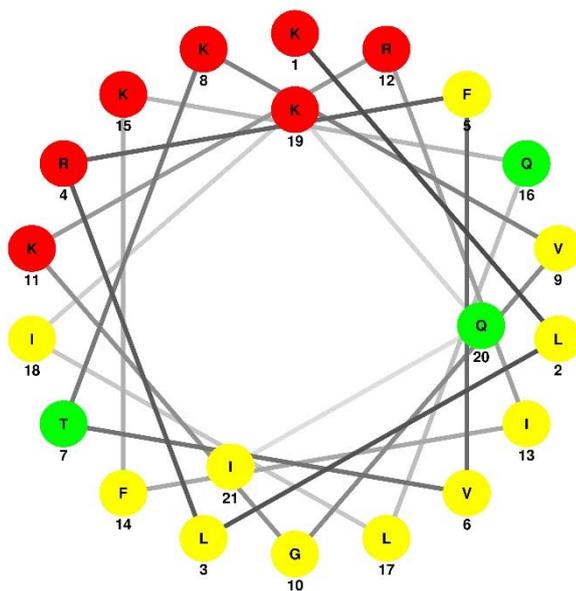


**Figura 15.** Projeção em roda helicoidal do análogo Del-2;S4;K6;A9;N11. Em amarelo os resíduos não polares; em verde, os resíduos polares não carregados; em azul os resíduos polares ácidos; em vermelho os resíduos polares básicos.





**Figura 18.** Projeção em roda helicoidal do análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20]. Em amarelo os resíduos não polares; em verde, os resíduos polares não carregados; em vermelho os resíduos polares básicos.



**Figura 19.** Projeção em roda helicoidal do análogo K[1,8,15];R[4,12]. Em amarelo os resíduos não polares; em verde, os resíduos polares não carregados; em vermelho os resíduos polares básicos.

De maneira geral, os análogos da ocelatina 4 foram propostos com vistas a aumentar suas características anfipáticas, com algumas diferenças perceptíveis na

extensão das faces polar e apolar da hélice, como pode-se observar nos análogos Del-2;S4;K6;A9;N11 e K[1,4,8,15];A[12,16,20] (Figuras 16 e 18).

As características anfipáticas conferidas aos PAMs auxiliam na adsorção sobre a superfície da membrana ou da inserção na membrana com um conjunto de porções helicoidais. A maioria dos peptídeos anfipáticos helicoidais são catiônicos e apresentam toxicidade seletiva para os microrganismos (ZHAO *et al.*, 2002). Há também peptídeos helicoidais hidrofóbicos ou ligeiramente aniônicos, por exemplo alameticina (KIKUKAWA e ARALSO, 2002). A maioria das atividades aparenta estar relacionada à interação peptídeo-lipídeo, e provavelmente são moduladas por fatores tais como: carga elétrica líquida, hidrofobicidade média, propensão em formar estrutura helicoidal e o ângulo de face polar (DATHE *et al.*, 2002).

## 2. Justificativa

A descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, permitiu que milhões de vidas fossem salvas, particularmente durante a Segunda Guerra Mundial. No entanto, o fácil acesso aos antibióticos e seu uso indiscriminado, promoveu a seleção de linhagens microbianas multirresistentes. Linhagens multirresistentes adicionam uma perda de eficácia de pelo menos três classes dos antimicrobianos; tornando o tratamento complicado, demorado e dispendioso (WHO, 2014).

A secreção cutânea de anuros (rãs, sapos e pererecas) concentram um arsenal variado de peptídeos bioativos. Uma classe abundante desses peptídeos é representada pelos PAMs, peptídeos que, devido às suas características anfipáticas, são capazes de atuar eliminando vários microrganismos (RAAYMAKERS *et al.*, 2017). Peptídeos antimicrobianos prestam-se como potenciais drogas para o tratamento de infecções bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias, assim, como uma possível nova classe de antimicrobianos clínicos. Eles compartilham um conjunto comum de características biofísicas que são cruciais para a sua atividade antimicrobiana (ETZERODT, 2011).

Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos atraíram muita atenção devido às suas propriedades favoráveis, entre elas, a ação rápida, atividade de amplo espectro antimicrobiano e a falha em desencadear mecanismos de resistência em comparação com antimicrobianos convencionais. Além disso, estudos têm revelado que peptídeos antimicrobianos combinados com antimicrobianos utilizados

cl clinicamente poderiam ser alternativas para auxiliar o combate do problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais (LIN *et al.*, 2012).

Devido ao relevante aumento da resistência bacteriana, observa-se que as doenças infecciosas e os custos aumentam de acordo com o transcorrer da infecção, e com isso há uma necessidade de controle sobre os antimicrobianos utilizados e com a alta demanda de uso ocorre uma rápida adaptação do microrganismo frente aos mais novos antimicrobianos utilizados na prática clínica (MARTIN, 2018).

Os PAMs podem ter sua atividade biológica original potencializada quando realizadas algumas alterações pontuais para agregar alguns benefícios. O desenho de moléculas permite diminuir as possíveis interações com as células dos seres humanos, pode-se aumentar a atividade biológica frente as linhagens microbianas, e com isso os PAMs mostram-se como uma saída real para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (GUSMÃO *et al.*, 2017; TRIANA-VIDAL, 2017).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Este projeto teve como objetivo geral avaliar os efeitos antimicrobianos e antivirais do PAM ocelatina 4 e de seus sete análogos sobre diferentes microrganismos e vírus patogênicos (bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos leveduriformes e os vírus causadores da febre amarela e dengue), bem como seus efeitos citolíticos sobre células sanguíneas humanas.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

**3.2.1.** Determinar os efeitos antimicrobianos do PAM ocelatina 4 e de seus sete análogos sobre bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive sobre linhagens multirresistentes;

**3.2.2.** Determinar os efeitos antimicrobianos do PAM ocelatina 4 e de seus sete análogos sobre o fungo leveduriforme patogênico *Candida albicans*;

**3.2.3.** Determinar os efeitos antivirais do PAM ocelatina 4 e de seus sete análogos sobre os vírus causadores da febre amarela e da dengue;

**3.2.4.** Determinar os efeitos citolíticos do PAM ocelatina 4 e de seus sete análogos sobre células sanguíneas humanas (eritrócitos e leucócitos);

**3.2.5** Determinar a composição de elementos de estrutura secundária do PAM ocelatina 4 e de seus sete análogos com o emprego da técnica de difração circular.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Reagentes químicos**

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

### **4.2. Síntese química dos peptídeos**

Os análogos empregados no presente estudo foram idealizados previamente e sua caracterização básica foi realizada por Nascimento, A.C.C. (2007) em sua tese de doutoramento. Tais peptídeos foram produzidos por síntese química em fase sólida automatizada e purificados por RP-HPLC pela empresa Genone, especialista em síntese de peptídeos.

### **4.3. Linhagens microbianas utilizadas**

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília, foram utilizadas no presente trabalho: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (ATCC 14053). As linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* (KPC) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ATCC700603) foram obtidas do Banco de Culturas do Setor de Microbiologia do Laboratório Sabin Medicina Diagnóstica, compatíveis com as identificações e perfis de susceptibilidade ilustrados nos anexos.

### **4.4. Análises computacionais**

A massa monoisotópica teórica foi calculada a partir das estruturas primárias com a ferramenta *Compute pI/Mw* (GASTEIGER *et al.*, 2005) disponível em [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/). O Clustal Omega (SIEVERS *et al.*, 2011) foi empregado para alinhamento múltiplo de sequências peptídicas, disponível em

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Utilizou-se a ferramenta NetWheels disponível em <http://lbqp.unb.br/NetWheels/> para analisar a distribuição e interação de resíduos em  $\alpha$ -hélice, de acordo com os métodos de SCHIFFER e EDMUNDSON (1967) e DUNNILL (1968). Por último foi empregado o servidor web HeliQuest (GAUTIER *et al.*, 2008) disponível em <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/> para o cálculo dos parâmetros de Hidrofobicidade Média  $\langle H \rangle$  (FAUCHÈRE e PLISKA, 1983) e Momento Hidrofóbico Médio  $\langle \mu H \rangle$  (EISENBERG, WEISS e TERWILLIGER, 1982).

#### 4.5. Quantificação espectrofotométrica de peptídeos

Os peptídeos sintéticos foram dosados pelo método de determinação da concentração protéica por absorção ao UV (MURPHY, 1960).

O material foi quantificado por leitura espectrofotométrica realizada em equipamento Bel Photonics modelo 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  $\mu\text{g/mL}$ ) estão descritas a seguir:

$$\text{Concentração}_1 = 144 \times (A_{215} - A_{225})$$

$$\text{Concentração}_2 = (A_{205} / 31) \times 1000$$

Para obter a concentração da alíquota analisada foi calculada a média dos resultados das concentrações 1 e 2 para cada amostra (AITKEN e LEARMONTH, 2002)

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

#### 4.6. Ensaios antimicrobianos sobre bactérias patogênicas

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília e linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* (KPC) e *Klebsiella pneumoniae* (ESBL) obtidas do Banco de Culturas do Setor de Microbiologia do Laboratório Sabin Medicina Diagnóstica, foram cultivadas em placas contendo meios de cultura apropriados para cada linhagem bacteriana pelo período de 18-24h, a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após este período, foram executadas identificação automatizada VITEK® MS

(MALDI-TOF MS, Biomérieux) e antibiograma automatizado VITEK® 2 XL (Biomérieux) de todas as linhagens. As bactérias, em fase logarítmica, foram diluídas no meio de cultura Mueller-Hinton caldo nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas.

Alíquotas de 50 µL de diluições seriadas (128 – 1 µM) de cada peptídeo puro, ressuspendidas em água Milli-Q estéril, foram feitas a partir de uma solução-estoque de 256 µM esterilizada por filtração em filtro Millex GV 0,22 µm, foram incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo aproximadamente de 2 a 7 x 10<sup>5</sup> UFC e incubadas por 18-24 horas a 35±2°C em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato), sem agitação. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões bacterianas. 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. 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.

#### **4.7. Ensaios antimicrobianos sobre fungos patogênicos**

Linhagem ATCC de *Candida albicans* (ATCC 14053), obtido do Banco de Culturas do Setor de Microbiologia do Laboratório Sabin Medicina Diagnóstica, foi cultivada em ágar Sabouraud dextrose, após este período foi executada identificação automatizada VITEK® MS (MALDI-TOF MS, Biomérieux) e antifungigrama automatizado VITEK® 2 XL (Biomérieux). O inóculo foi preparado a partir de colônias frescas de *C. albicans* crescidas em meio Mueller-Hinton caldo após 24 horas em 37±2°C. As leveduras, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção 1:100. Uma alíquota de 50 µL desta suspensão de levedura a 1:100 (contendo aproximadamente 2 x 10<sup>3</sup> UFC) foi incubada a 37±2°C por 24 horas com 50 µL de cada análogo ressuspendido em água Milli-Q estéril, em placas de microtitulação estéreis (96 poços, fundo chato). A partir de uma solução de peptídeo a 256 µM foi realizada a diluição seriada, nas concentrações de 128 – 1µM. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram,

respectivamente, formaldeído 0,8% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões da levedura. Os poços com formaldeído foram cobertos com Parafilm® para evitar interferência nos demais poços em virtude da sua evaporação. Após o período de incubação de 24 horas sem agitação, 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.

#### **4.8. Ensaio de inibição sobre o vírus da dengue sorotipo 4**

Os controles positivos (Interferon  $\alpha$  2A 1,3 nM), controles negativos (água ou DMSO 1%) e os peptídeos de interesse (na concentração inicial de 50  $\mu$ M, com diluição seriada até a concentração mínima de 1,56  $\mu$ 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  $\alpha$  2A 5,2 nM)

Av. CRN: média da razão celular do controle negativo

#### **4.9. Ensaio de inibição sobre o vírus da febre amarela**

Os controles positivos (Interferon  $\alpha$  2A 1,3 nM), controles negativos (água ou DMSO 1%) e os peptídeos de interesse (na concentração inicial de 50  $\mu$ M, com diluição seriada até a concentração mínima de 1,56  $\mu$ 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  $\alpha$  2A 5,2 nM)

Av. CRN: média da razão celular do controle negativo

#### **4.10. Avaliação da atividade citolítica sobre células sanguíneas (leucócitos e hemácias)**

As análises das alterações provocadas pelos análogos produzidos sobre as células brancas do sangue (leucócitos) e células vermelhas (hemácias) foram realizadas em contador hematológico automatizado. Um volume de 8 mL de sangue tipo O<sup>+</sup> (de doador voluntário após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido) foi colhido em tubo com EDTA. Este sangue passou por três lavagens sucessivas com solução salina 0,9% (p/v), sendo que após cada lavagem foi realizada uma centrifugação a 3.024 g por 5 min. Ao término de cada etapa de lavagem e centrifugação, a fase plasmática foi removida e o volume final completado com solução salina 0,9%, de modo que ao final das três lavagens fosse mantido o volume inicial de 8 mL. 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 µL de cada peptídeo na concentração de 256 µM 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 µL de solução de NaCl 0,9% (p/v) obtendo-se a concentração final desejada de 1.024 µM.

Foram preparados 3 tubos tipo *ependorf* por amostra, cada um com volume de 500 µL (438 µL de sangue total e 62 µL do peptídeo na concentração inicial de 1.024 µM para obter uma concentração peptídica final igual a 128 µM).

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, sendo que durante todo o tempo os tubos ficaram sob agitação constante, com a remoção de uma alíquota de 88 µL de cada réplica para análise no equipamento Sysmex XN-9000™ (Analisador Hematológico Automatizado, Sysmex, Japão).

#### **4.11. Análises por dicroísmo circular**

As análises por dicroísmo circular foram realizadas no espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão), na temperatura constante de 25°C e utilizando-se cubeta de quartzo de caminho óptico igual a 0,1 cm.

Os espectros UV foram analisados nos comprimentos de onda entre 190 nm e 260 nm, resultando da média de cinco medidas consecutivas.

A partir de soluções peptídicas a 50 µM em água e a 50 µM em dodecilsulfato de sódio (SDS, Amershan Biosciences) a 35 mM, foram gerados os espectros dicróicos em água e em SDS dos 8 peptídeos analisados. As elipticidades observadas foram convertidas em elipticidade molar utilizando a seguinte equação:

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

Onde  $\theta$  é a elipticidade em graus,  $\ell$  é o comprimento do caminho óptico em cm,  $C$  é a concentração em mg/mL,  $M$  é a massa molecular e  $n$  é o número de resíduos existentes na proteína. A elipticidade molar média  $[\theta]$  é dada em grau.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>.

Os percentuais de helicidade foram calculados a partir das elipticidades molares a 208 nm.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Efeitos antimicrobianos sobre bactérias e fungos patogênicos

As propriedades antimicrobianas dos análogos sintéticos, assim como do peptídeo selvagem, a ocelatina 4, foram avaliadas sobre microrganismos patogênicos, a saber: bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC25933), levedura (*Candida albicans* ATCC 14053) e bactérias multiressistentes (*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina – MRSA e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase - KPC) por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para cada microrganismo avaliado.

Os resultados dos testes de sensibilidade evidenciaram um comportamento diversificado dos microrganismos frente aos peptídeos testados. Esta diferença de susceptibilidade pode estar relacionada às propriedades de cada um dos peptídeos, bem como com as diferenças na composição das membranas dos microrganismos testados.

### 5.1.1. Ensaio antibacterianos com linhagens de bactérias Gram-positivas

De maneira geral, os análogos S5;K7;A10;N12, K[1,8,15];N[4,12], K[1,4,8,15];A[12,16,20], K[1,8,15];R[4,12] exibiram ganho de potência sobre os microrganismos Gram-positivos testados em relação à ocelatina 4 (Tabela 2). No caso, a ocelatina 4 exibiu valores de CIM >128 para *S. aureus* e de 64 µM para *E. faecalis*, enquanto os análogos citados exibiram valores de CIM na faixa de 2-16 µM para *S. aureus* e de 8-32 µM para *E. faecalis*.

Embora os resultados frente a linhagem de *Enterococcus faecalis* ATCC29212 não tenha obtido um desempenho de inibição tão considerável comparado com o frente a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC25923, ainda assim obteve-se nos análogos K[1,8,15];N[4,12] e K[1,8,15];R[4,12], as melhores respostas para inibição frente ao patógeno testado.

**Tabela 2.** Efeitos antimicrobianos (CIM em µM) da ocelatina 4 e seus análogos sobre bactérias patogênicas Gram-positivas.

Peptídeo	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
	ATCC 25923	ATCC 29212
<b>Ocelatina 4</b>	>128	64
<b>S5;K7;A10;N12</b>	16	16
<b>S5;K7;Ins-V10;A11;N13</b>	128	>128
<b>Del-2;S4;K6;A9;N11</b>	>128	>128
<b>Del-2;S4;K[6,17];A9;N11</b>	>128	>128
<b>K[1,8,15];N[4,12]</b>	2	8
<b>K[1,4,8,15];A[12,16,20]</b>	4	32
<b>K[1,8,15];R[4,12]</b>	2	8

### 5.1.2 Ensaio antibacterianos com linhagens de bactérias Gram-negativas

Frente as bactérias Gram-negativas testadas, com exceção de *Proteus mirabilis* que se mostrou resistente a todos os peptídeos avaliados, novamente os análogos S5;K7;A10;N12, K[1,8,15];N[4,12], K[1,4,8,15];A[12,16,20], K[1,8,15];R[4,12] apresentaram atividade antimicrobiana superior á exibida pela ocelatina 4 que apresentou efeito antimicrobiano muito discreto sobre as bactérias (Tabela 3).

Dentre os quatro análogos ativos, o análogo K[1,8,15];N[4,12] foi o que obteve o melhor desempenho, com valor de CIM igual a 4  $\mu\text{M}$ , tanto para *E. coli* como para *K. pneumoniae*.

**Tabela 3.** Efeitos antimicrobianos (CIM em  $\mu\text{M}$ ) da ocelatina 4 e seus análogos sobre bactérias patogênicas Gram-negativas.

<b>Peptídeo</b>	<b><i>E. coli</i> ATCC 25922</b>	<b><i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603</b>	<b><i>P. mirabilis</i> ATCC 25933</b>
<b>Ocelatina 4</b>	>128	>128	>128
<b>S5;K7;A10;N12</b>	8	32	>128
<b>S5;K7;Ins-V10;A11;N13</b>	16	>128	>128
<b>Del-2;S4;K6;A9;N11</b>	32	>128	>128
<b>Del-2;S4;K[6,17];A9;N11</b>	128	>128	>128
<b>K[1,8,15];N[4,12]</b>	4	4	>128
<b>K[1,4,8,15];A[12,16,20]</b>	32	16	>128
<b>K[1,8,15];R[4,12]</b>	8	4	>128

Cabe ressaltar que os análogos S5;K7;Ins-V10;A11;N13 e Del-2;S4;K6;A9;N11 que exibiram baixa atividade sobre as bactérias Gram-positivas, exibiram efeito antimicrobiano considerável sobre a bactéria Gram-negativa *E. coli* com valores de CIM de 16 e 32  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Os efeitos antimicrobianos sobre a bactéria *K. pneumoniae* também merecem destaque com valores de CIM que variaram de 4-32  $\mu\text{M}$ , uma vez que a linhagem empregada no presente estudo, a ATCC 700603, apresenta produção de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), exibindo um alto grau de resistência a diversos antibacterianos utilizados na rotina clínica.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são os antimicrobianos mais frequentemente utilizados, representando aproximadamente 65% do uso de antibacterianos em todo o mundo (PALZKILL, 2018). Os  $\beta$ -lactâmicos atuam inibindo a biossíntese da parede celular bacteriana. Especificamente, eles são inibidores covalentes de enzimas transpeptidase, comumente referidos como proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Essas enzimas catalisam uma reação de reticulação de pentapeptídeos presentes na

camada de peptidoglicano da parede celular (LOVERING *et al.*, 2012). O mecanismo mais comum de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é a produção bacteriana de  $\beta$ -lactamases, estas podem ser distribuídas em quatro classes (A, B, C e D) com base na homologia da sequência primária de aminoácidos (AMBLER, 1980; FISHER *et al.*, 2005). As classes A, C e D são serina-hidrolases que funcionam de maneira similar às serina-proteases clássicas, como a quimotripsina. As  $\beta$ -lactamases de classe B são metalo-enzimas de zinco que contêm um ou dois íons de zinco (PALZKILL, 2013).

As  $\beta$ -lactamases de classe A são muitas vezes codificadas em plasmídeos que podem se mover por conjugação e, como resultado, essas enzimas são fontes disseminadas de resistência (BUSH e FISHER, 2011). A introdução e o uso subsequente de agentes antibacterianos, entretanto, colocou pressão seletiva sobre as bactérias, resultando na evolução de variantes de enzimas de classe A que ganharam a capacidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas ou evitar a ação de inibidores de  $\beta$ -lactamase (PALZKILL, 2018). O desenvolvimento de drogas alternativas para inibir a resistência antimicrobiana no tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamases requer urgentemente novas opções de tratamento.

Linhagens produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) que são enzimas produzidas com fins de conferir resistência baseado em plasmídeos, os quais fazem parte do genoma acessório. A bactéria *K. pneumoniae* produtora de ESBL foi identificada pela primeira vez na Europa em 1983 e nos Estados Unidos em 1989. As ESBLs são capazes de hidrolisar as oximino-cefalosporinas, como as cefalosporinas de terceira geração e o aztreonam (MARTIN, 2018).

### **5.1.3. Ensaio antibacteriano com linhagens multiresistentes**

#### **5.1.3.1. *Klebsiella pneumoniae* KPC**

Dentre os peptídeos analisados, quatro mostraram-se capazes de inibir a proliferação de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo metalo-beta-lactamases, estão apresentados na Tabela 4: análogos S5;K7;A10;N12 (CIM = 64  $\mu$ M), K[1,8,15];N[4,12] (CIM = 16  $\mu$ M), K[1,4,8,15];A[12,16,20] (CIM = 32  $\mu$ M) e K[1,8,15];R[4,12] (CIM = 32  $\mu$ M), merecendo destaque o análogo K[1,8,15];N[4,12] que exibiu propriedades antimicrobianas terapeuticamente relevantes sobre todos os microrganismos testados com valores de CIM que variaram de 2-16  $\mu$ M.

**Tabela 4.** Efeitos antimicrobianos (CIM em  $\mu\text{M}$ ) da ocelatina 4 e seus análogos sobre a bactéria Gram-negativa multirresistente *Klebsiella pneumoniae* KPC.

Peptídeo	<i>K. pneumoniae</i> (KPC)
<b>Ocelatina 4</b>	>128
<b>S5;K7;A10;N12</b>	64
<b>S5;K7;Ins-V10;A11;N13</b>	128
<b>Del-2;S4;K6;A9;N11</b>	128
<b>Del-2;S4;K[6,17];A9;N11</b>	>128
<b>K[1,8,15];N[4,12]</b>	16
<b>K[1,4,8,15];A[12,16,20]</b>	32
<b>K[1,8,15];R[4,12]</b>	32

KPC = *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi descrita pela primeira vez por Carl Friedlander em 1882 como uma bactéria isolada pulmões de pacientes que morreram de pneumonia (MARTIN, 2018). A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria patogênica Gram-negativa. Em meios de cultura semi-sólidos, apresenta fenótipo mucoide que é conferido pela cápsula polissacarídica ligada a membrana exterior bacteriana e é fermentadora da lactose.

*K. pneumoniae* faz parte da família *Enterobacteriaceae*, que é composta por outras famílias de patógenos. *K. pneumoniae* é uma das principais causas de infecções hospitalares nos Estados Unidos (MAGILL *et al.*, 2014) e é uma das principais bactérias que exibiram aumento dramático na resistência a antibióticos nas últimas décadas. Vários mecanismos de resistência a antibióticos são encontrados em *K. pneumoniae*, com resistência aos  $\beta$ -lactâmicos tendo o maior impacto no tratamento efetivo. Em *K. pneumoniae*, a resistência a alguns  $\beta$ -lactâmicos é intrínseca, uma vez que a enzima está codificada no genoma central da espécie. Por

exemplo, o gene SHV é consistentemente encontrado no cromossomo, e a resistência correspondente à ampicilina é uma característica da espécie (MARTIN, 2018).

Talvez devido à pressão seletiva do tratamento de infecções por ESBL com carbapenêmicos, a resistência aos carbapenêmicos evoluiu e *K. pneumoniae* é a *Enterobacteriaceae* mais comum resistente a carbapenêmicos. A resistência aos carbapenens é impulsionada principalmente pelo genoma acessório, algumas vezes em combinação com mutações no genoma central. A resistência aos carbapenens em *K. pneumoniae* pode ser mediada em parte pela regulação positiva das bombas de efluxo (FILGONA *et al.*, 2015) e alteração das porinas da membrana externa no núcleo do genoma (KACZMAREK *et al.*, 2006) e hiperprodução de enzimas ESBL ou  $\beta$ -lactamases AmpC no genoma acessório (BUSH e JACOBY, 2010).

A New Delhi metalo- $\beta$ -lactamase (NDM) é uma metalo- $\beta$ -lactamase de classe B codificada por plasmídeo (MBL). As MBLs são caracterizadas por uma exigência de zinco em seu local ativo e infecções por cepas produtoras de MBL são frequentemente associadas a viagens e hospitalização em regiões endêmicas (VAN DER BIJ e PITOUT, 2012).

A administração concomitante de múltiplos agentes antibióticos pode aumentar a atividade de morte farmacodinâmica e potencialmente suprimir ou retardar a emergência de resistência, ampliando o espectro de atividades e explorando diferentes mecanismos de ação (JACOBS *et al.*, 2017). Como as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para muitos antibióticos continuam a subir e com relatos recentes de resistência à polimixina, o tratamento de infecções causadas por produtores de carbapenemase é cada vez mais desafiador e pode necessitar de terapia combinada de três ou mais antibióticos no futuro (ROJAS *et al.*, 2017).

### **5.1.3.2. *Staphylococcus aureus* MRSA**

Os efeitos antimicrobianos da ocelatina 4 e seus análogos sobre a linhagem de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) estão apresentados na Tabela 5 e novamente os análogos que se mostraram mais ativos foram S5;K7;A10;N12 (CIM = 16  $\mu$ M), K[1,8,15];N[4,12] (CIM = 2  $\mu$ M), K[1,4,8,15];A[12,16,20] (CIM = 8  $\mu$ M) e K[1,8,15];R[4,12] (CIM = 4  $\mu$ M), merecendo destaque novamente o análogo K[1,8,15];N[4,12].

**Tabela 5.** Efeitos antimicrobianos (CIM em  $\mu\text{M}$ ) da ocelatina 4 e seus análogos sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA)

Peptídeo	<i>S. aureus</i> (MRSA)
<b>Ocelatina 4</b>	>128
<b>S5;K7;A10;N12</b>	16
<b>S5;K7;Ins-V10;A11;N13</b>	>128
<b>Del-2;S4;K6;A9;N11</b>	>128
<b>Del-2;S4;K[6,17];A9;N11</b>	>128
<b>K[1,8,15];N[4,12]</b>	2
<b>K[1,4,8,15];A[12,16,20]</b>	8
<b>K[1,8,15];R[4,12]</b>	4

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais causadores de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, representando um grande problema de saúde em todo o mundo, por causar uma variedade de condições diferentes, incluindo infecções de feridas, osteomielite, intoxicação alimentar, endocardite, bem como doenças mais letais, como pneumonia e bacteremia (GOUDARZI *et al.*, 2016).

Desde a introdução da penicilina na terapia médica no início da década de 1940, a resistência contra beta-lactâmicos começou a se evidenciar entre isolados de *Staphylococcus* sp. Para superar este problema, uma penicilina semi-sintética de espectro estreito (meticilina) foi introduzida. No entanto, logo após seu primeiro uso em 1961, foi identificada a primeira cepa de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) (TURLEJ *et al.*, 2011).

A resistência à metilina é causada pelo produto do gene *mecA*, uma forma modificada da proteína de ligação à penicilina (PBP), chamada PBP2a ou PBP2', que tem uma menor afinidade por todos os antibióticos beta-lactâmicos (HANSSEN e ERICSON SOLLID, 2006). O principal sítio de ligação da proteína A é a região Fc das imunoglobulinas mamíferas, principalmente as IgGs, que tornam a bactéria inacessível às opsoninas, prejudicando a fagocitose pelo ataque do sistema imunológico (GRAILLE *et al.*, 2000).

Durante décadas, as infecções por *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) resistentes à metilina associadas ao hospital apresentaram um grande problema para os sistemas de saúde pública em todo o mundo, causando significativa

morbidade, mortalidade e custos. Mais recentemente, surgiram cepas altamente virulentas de MRSA que podem infectar pessoas saudáveis fora do ambiente hospitalar (MRSA associado à comunidade, CA-MRSA) (DELEO *et al.*, 2010; ASADOLLAHI *et al.*, 2018). Como estas novas linhagens evoluíram para combinar extraordinária virulência com resistência à metilicina tem permanecido largamente desconhecida (OTTO, 2010; HE *et al.*, 2018)

#### 5.1.4. Ensaio antifúngico com *Candida albicans*

O ensaio com a linhagem de *Candida albicans* ATCC 14053 demonstrou que a maioria dos análogos exibiu efeito inibitório sobre *C. albicans*, sendo que o peptídeo selvagem, a ocelatina 4 mostrou-se praticamente inativo com CIM > 128 µM (Tabela 6). Com relação ao potencial terapêutico dos análogos analisados, merecem destaque, com relação à atividade inibitória sobre *C. albicans*, os análogos K[1,8,15];N[4,12] e S5;K7;A10;N12, com valores de CIM iguais a 8 e 16 µM, respectivamente.

**Tabela 6.** Efeitos antimicrobianos (CIM em µM) da ocelatina 4 e seus análogos sobre a levedura *Candida albicans* ATCC 14053

Peptídeo	<i>C. albicans</i> ATCC14053
Ocelatina 4	>128
S5;K7;A10;N12	16
S5;K7;Ins-V10;A11;N13	64
Del-2;S4;K6;A9;N11	64
Del-2;S4;K[6,17];A9;N11	128
K[1,8,15];N[4,12]	8
K[1,4,8,15];A[12,16,20]	128
K[1,8,15];R[4,12]	>128

Os fungos têm sido cada vez mais reconhecidos como importantes agentes de infecções nosocomiais na medicina contemporânea, com ênfase em *Candida* sp.,

responsável pela maioria das infecções fúngicas invasivas associadas nas unidades de saúde. De fato, além de ser altamente prevalente nos países da América Latina, a candidemia está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes gravemente enfermos (DA MATTA *et al.*, 2017).

O reconhecimento da importância das infecções por *Candida* levou a um aumento significativo no uso de agentes antifúngicos em regimes de profilaxia e terapia empírica, resultando no surgimento de isolados clínicos resistentes, particularmente contra triazóis e equinocandinas (GONCALVES *et al.*, 2016). As leveduras são agentes emergentes de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, locais ou disseminadas, particularmente em doentes imunocomprometidos (unidade de cuidados intensivos, câncer, doentes neutropênicos) e a sua incidência aumentou grandemente nos últimos anos.

Até recentemente, poucas espécies patogênicas de *Candida* eram conhecidas. No entanto, nos últimos anos, houve um aumento no número de espécies responsáveis por infecções em humanos (SCAPATICCI *et al.*, 2018). *C. albicans* representa atualmente as espécies mais comumente isoladas, enquanto outras espécies que causam infecções superficiais e/ou invasivas diversificam em *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* e a multirresistente emergente *Candida auris* (BEN-AMI *et al.*, 2017).

#### **5.1.5. Avaliação dos efeitos antibacterianos de drogas comerciais**

Ensaio empregando drogas comumente utilizadas para combater algumas das linhagens utilizadas no presente trabalho foram realizados como forma de controle e também para fins de comparação entre as potências dos peptídeos aqui testados e das drogas comercialmente disponíveis. Tais resultados estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Efeitos antimicrobianos (CIM em  $\mu\text{M}$ ) de agentes antimicrobianos de uso comercial sobre bactérias patogênicas.

<b>Agente</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>K. pneumoniae</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>E. faecalis</i></b>
<b>Antibacteriano</b>	<b>ATCC 25922</b>	<b>ATCC 700603</b>	<b>ATCC 25923</b>	<b>ATCC 29212</b>
<b>Ampicilina</b>	32	128	NT	16
<b>Vancomicina</b>	NT	NT	1	1

NT= não testado.

Para fins de validação dos valores encontrados nos presentes ensaios, tais valores foram comparados com aqueles disponíveis no manual do CLSI, 2018, sendo que no manual os valores são disponibilizados na unidade de  $\mu\text{g/mL}$ , efetuou-se a conversão dos valores obtidos na tabela que são expressos em  $\mu\text{M}$ .

No caso da linhagem de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, os valores determinados no presente estudo ficaram fora dos previstos para a determinação da CIM, para vancomicina que é entre 1-4  $\mu\text{g/mL}$ , e para ampicilina a faixa aceitável é entre 0,5-2  $\mu\text{g/mL}$ . O valor encontrado para vancomicina foi de 0,00148  $\mu\text{g/mL}$  sendo um valor muito abaixo da concentração padronizada, em relação à ampicilina o valor encontrado foi de 5,58  $\mu\text{g/mL}$ , também fora do preconizado, porém nesse caso superior à maior CIM.

No caso da linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o valor determinado no presente estudo ficou fora dos previstos para a determinação da CIM para vancomicina que é entre 0,5-2  $\mu\text{g/mL}$ . O valor encontrado para vancomicina foi de 0,00148  $\mu\text{g/mL}$  sendo um valor muito abaixo da concentração padronizada.

No caso da linhagem de *Escherichia coli* ATCC25922, o valor determinado no presente estudo ficou fora dos previstos para a determinação da CIM, para ampicilina que é entre 2-8  $\mu\text{g/mL}$ . O valor encontrado para ampicilina foi de 11,17  $\mu\text{g/mL}$  sendo um valor muito acima da concentração padronizada pelo referido comitê.

No caso da linhagem de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, o valor determinado no presente estudo para a determinação da CIM para ampicilina foi de 44,7  $\mu\text{g/mL}$  sabe-se que todas as espécies de *Klebsiella pneumoniae* são resistentes intrinsecamente à ampicilina, pois todas as linhagens possuem o gene SHV constituindo o seu DNA cromossomal (MARTIN, 2018), por isso não há padronização para interpretação desse antibacteriano pelo documento do CLSI, 2018.

Os ensaios antibacterianos realizados no presente estudo apresentam algumas modificações em relação ao protocolos estabelecidos na determinação de tais valores de referência, o que pode justificar os valores de CIMs obtidos para os antibióticos comerciais empregados no presente estudo.

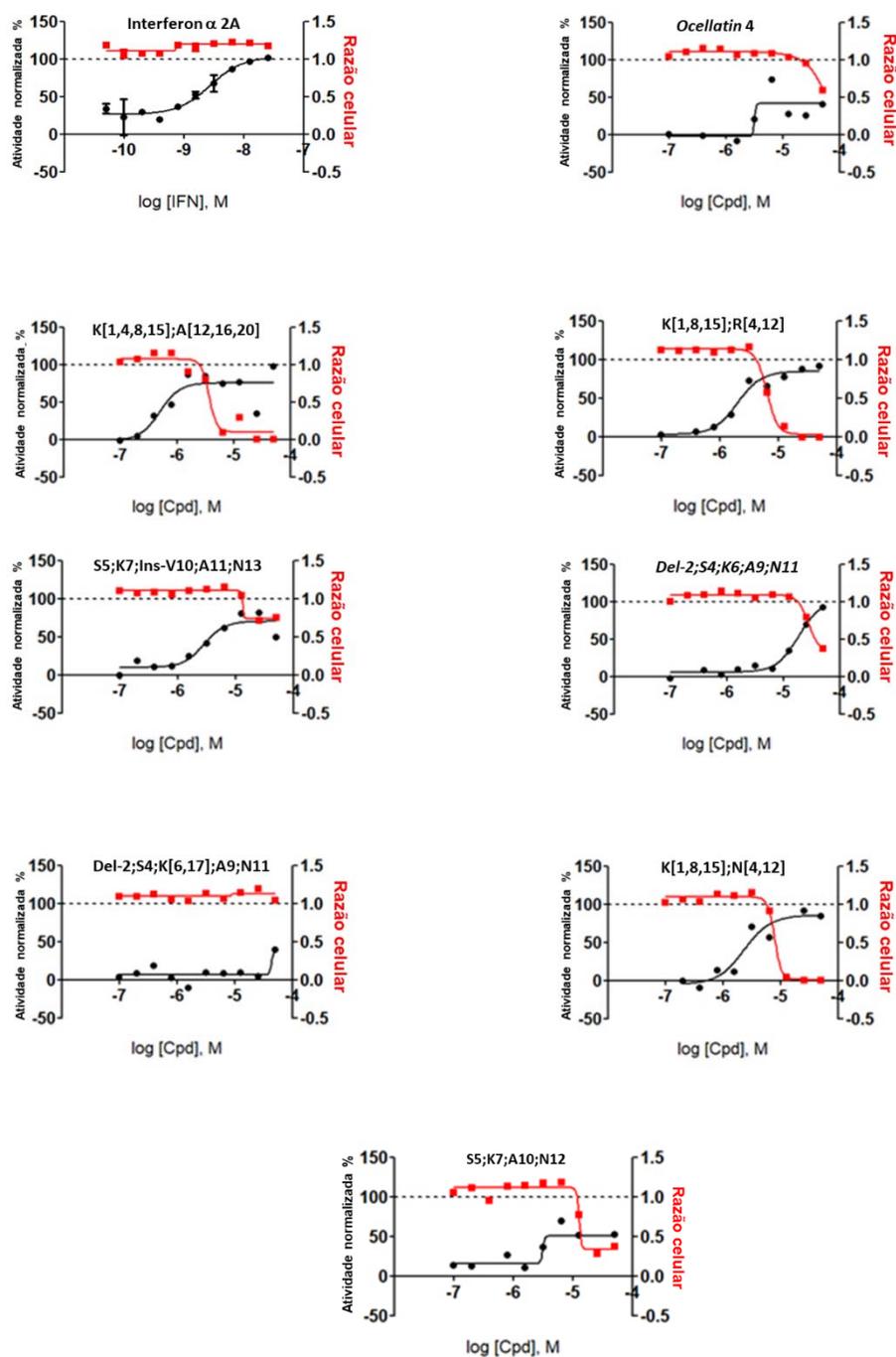
## 5.2. Ensaios antivirais

### 5.2.1. Ensaio de inibição sobre o vírus da dengue sorotipo 4

A atividade antiviral da ocelatina 4 e de seus análogos sobre o vírus da dengue sorotipo 4 foi avaliada por meio da determinação dos seguintes parâmetros: grau de citotoxicidade do composto sobre células de hepatocarcinoma humano Huh7 (CC<sub>50</sub>), concentração efetiva do composto capaz de inibir a proliferação viral na metade do efeito máximo (EC<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) que é a razão entre CC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub> (Tabela 8 e Figura 20).

**Tabela 8.** Concentração citotóxica 50% ( $\mu\text{M}$ ), Concentração efetiva 50% ( $\mu\text{M}$ ) e índice de seletividade (IS) de seis análogos da ocelatina 4 sobre o vírus da dengue e células Huh7.

Peptídeo	CC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	IS
<b>K[1,4,8,15];A[12,16,20]</b>	38,52	0,65	59,15
<b>K[1,8,15];R[4,12]</b>	6,76	2,29	2,95
<b>S5;K7;Ins-V10;A11;N13</b>	50,03	3,69	13,56
<b>Del-2;S4;K6;A9;N11</b>	36,52	17,9	2,12
<b>K[1,8,15];N[4,12]</b>	8,08	2,9	2,79
<b>S5;K7;A10;N12</b>	13,46	3,63	3,70



**Figura 20.** Efeitos do Interferon  $\alpha$  2A (controle positivo), da ocellatina 4 e de seus análogos 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.

O interferon  $\alpha$  2A manteve a viabilidade celular e inibiu as partículas virais em 50% na dose de 1,63 pM.

A ocelatina 4 não apresentou atividade inibitória, sendo capaz de promover inibição de 40,8% da proliferação viral na máxima concentração empregada (50 µM), assim como o análogo Del-2;S4;K[6,17];A9;N11 cuja atividade inibitória máxima foi de 39,5%.

Os análogos K[1,8,15];R[4,12] com IS = 2,95; Del-2;S4;K6;A9;N11 com IS = 2,12; S5;K7;A10;N12 com IS = 3,70 e K[1,8,15];N[4,12] com IS = 2,79 não exibiram boas seletividade, sendo capazes de comprometer a viabilidade celular em doses relativamente baixas.

Já o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20] demonstrou uma concentração citotóxica 50% de 38,52 µM e uma concentração efetiva 50% de 0,65 µM, o que representou um índice de seletividade de 59,15 e o análogo S5;K7;Ins-V10;A11;N13 demonstrou uma concentração citotóxica 50% de 50 µM e uma concentração efetiva 50% de 3,69 µM, o que representou um índice de seletividade maior ou igual a 13,56. Os valores obtidos para esses parâmetros indicam que esses dois análogos podem efetivamente vir a atuar como drogas antivirais, mas estudos adicionais precisam ser realizados para avaliar seu real potencial terapêutico.

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda causada por um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*. O vírus da dengue apresenta quatro sorotipos, em geral, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Esses também são classificados como arbovírus. No Brasil os vírus da dengue são transmitidos pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti* e podem causar tanto a manifestação clássica da doença quanto à forma considerada hemorrágica. A doença no Brasil apresenta ciclos endêmicos e epidêmicos, com epidemias explosivas ocorrendo a cada 4 ou 5 anos. Desde a introdução do vírus no país (1981) mais de sete milhões de casos já foram notificados. Nos últimos dez anos, têm-se observado, além do elevado número de casos, o aumento da gravidade da doença e, conseqüentemente, de hospitalizações (MUSTAFA *et al.*, 2014).

A doença pode ser assintomática ou pode evoluir até quadros mais graves, como hemorragia e choque. Na chamada dengue clássica, que deve ser notificada, a primeira manifestação é febre alta (39° a 40°C) e de início abrupto, usualmente seguida de dor de cabeça ou nos olhos, cansaço ou dores musculares e ósseas, falta de apetite, náuseas, vômitos e erupções na pele (semelhantes à rubéola). A doença tem duração de cinco a sete dias (máximo de 10), mas o período de convalescença

pode ser acompanhado de grande debilidade física, e prolongar-se por várias semanas. No que se refere à forma mais grave da enfermidade, conhecida como febre hemorrágica da dengue, os sintomas iniciais são semelhantes, porém há um agravamento do quadro no terceiro ou quarto dia de evolução, com aparecimento de manifestações hemorrágicas e colapso circulatório. Nos casos graves, o choque geralmente ocorre entre o terceiro e o sétimo dia de doença, geralmente precedido por dor abdominal (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Com relação à imunidade ao vírus, quando uma pessoa é infectada por um dos quatro sorotipos, torna-se imune a todos os sorotipos de vírus durante alguns meses e posteriormente mantém-se imune, pelo resto da vida, ao tipo pelo qual foi infectado. Caso volte a ter dengue, dessa vez um dos outros três tipos do vírus que ainda não teria contraído, poderá apresentar ou não uma forma mais grave. A maioria dos casos de dengue hemorrágica ocorrem em pessoas anteriormente infectadas por um dos quatro tipos de vírus (KANTOR *et al.*, 2016).

Até o momento, não há um remédio eficaz contra o vírus da dengue, o tratamento é realizado a base de analgésicos e antitérmicos, hidratação oral com aumento da ingestão de água, sucos, chás, soros caseiros. Não devem ser usados medicamentos com ou derivados do ácido acetilsalicílico (AAS) e anti-inflamatórios derivados (como a dipirona) (BRASIL, 2015).

As variações do vírus têm relação com a espécie, mas a estrutura básica normalmente apresenta um capsídeo externo formado por proteínas que envolvem os ácidos nucleicos (que podem ser fita de DNA ou RNA), no caso do DENV-4 é fita de RNA a qual contém as informações necessárias para codificar as proteínas do vírus. Alguns vírus possuem uma espécie de membrana lipídica externa, chamada cápsula ou envelope viral, formada por glicoproteínas e fosfolipídios derivados das células hospedeira (GRANOFF e AWEBTER, 1999).

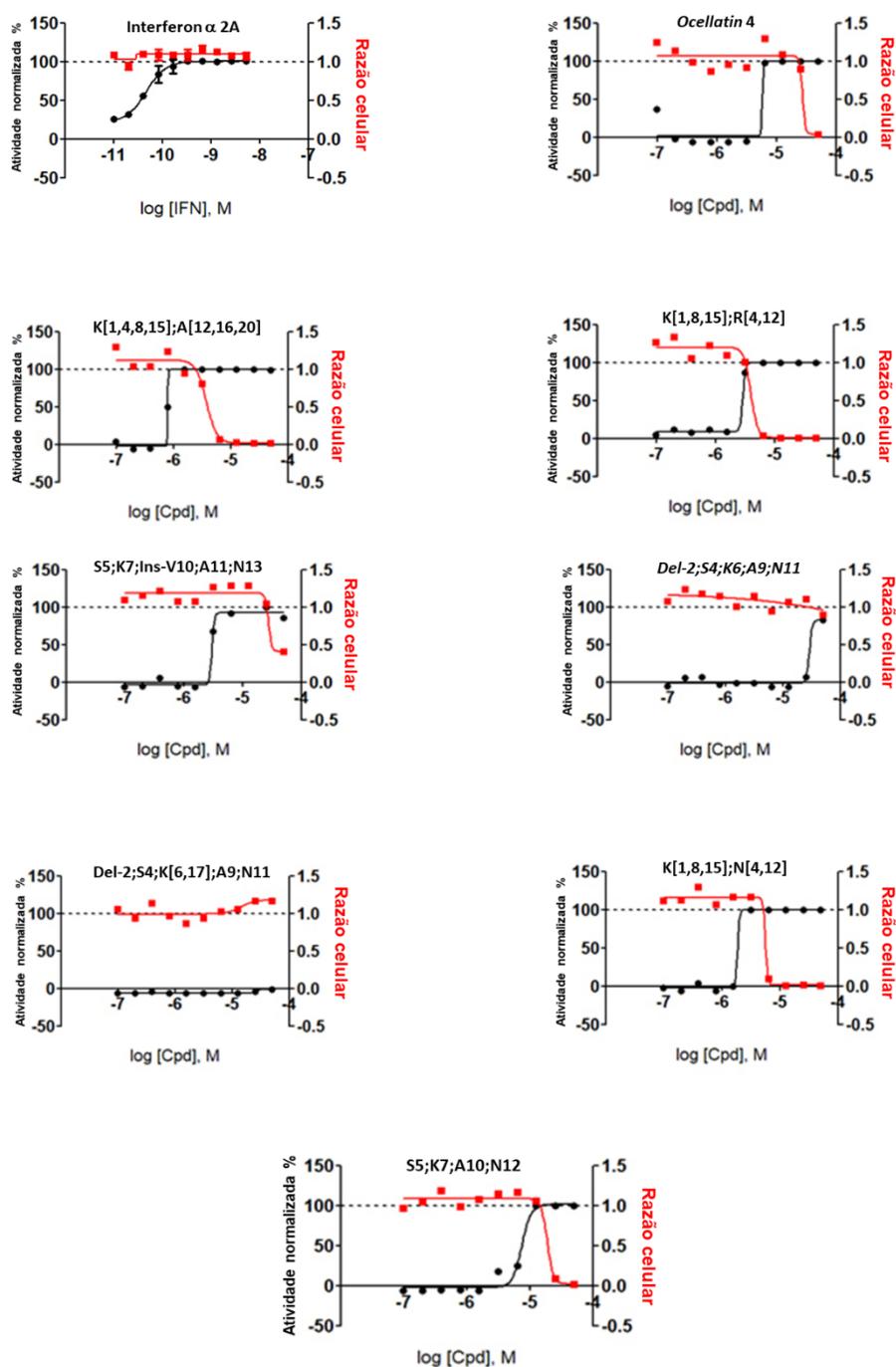
A membrana é adquirida da célula hospedeira infectada no momento da saída da partícula viral da mesma. As glicoproteínas virais do envelope, por estarem expostas na superfície do vírus, constituem o principal sítio alvo para ação dos PAMs (GUZMAN *et al.*, 2010).

### 5.2.2. Ensaio de inibição sobre o vírus da febre amarela

A atividade antiviral sobre o vírus da febre amarela foi avaliada utilizando-se os mesmos parâmetros para o vírus da Dengue sorotipo 4.

**Tabela 9.** Concentração citotóxica 50% ( $\mu\text{M}$ ), concentração efetiva 50% ( $\mu\text{M}$ ) e índice de seletividade (IS) da ocelatina 4 e de seis dos seus análogos sobre o vírus da febre amarela e células Huh7.

Peptídeo	CC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	IS
Ocelatina 4	27,51	5,74	4,79
K[1,4,8,15];A[12,16,20]	3,93	0,78	5,03
K[1,8,15];R[4,12]	4,10	2,83	1,45
S5;K7;Ins-V10;A11;N13	30,98	3,01	10,28
Del-2;S4;K6;A9;N11	49,94	29,38	1,7
K[1,8,15];N[4,12]	5,66	1,84	3,07
S5;K7;A10;N12	19,14	7,40	2,58



**Figura 21.** Efeitos do Interferon  $\alpha$  2A (controle positivo), da ocelatina 4 e de seus análogos 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.

O interferon  $\alpha$  2A manteve a viabilidade celular e inibiu as partículas virais em 50% na dose de 0,17 pM.

O análogo Del-2;S4;K[6,17];A9;N11 não apresentou atividade antiviral e citotoxicidade em nenhuma concentração testada.

O peptídeo ocelatina 4 (IS = 4,79) e os análogos K[1,4,8,15];A[12,16,20] (IS = 5,03), K[1,8,15];R[4,12] (IS = 1,45), Del-2;S4;K6;A9;N11 (IS = 1,7), K[1,8,15];N[4,12] (IS = 3,07) e S5;K7;A10;N12 (IS = 2,58) não exibiram capacidade seletiva relevante.

Apenas o análogo S5;K7;Ins-V10;A11;N13 demonstrou uma concentração citotóxica 50% de 30,98  $\mu\text{M}$  e uma concentração efetiva 50% de 3,01  $\mu\text{M}$ , o que representou IS = 10,28, indicando potencial terapêutico frente ao vírus da febre amarela.

A febre amarela ocorre nas Américas do Sul e Central, além de em alguns países da África e é transmitida por mosquitos em áreas urbanas ou silvestres. Sua manifestação é idêntica em ambos os casos de transmissão, pois o vírus e a evolução clínica são os mesmos — a diferença está apenas nos transmissores. No ciclo silvestre, em áreas florestais, o vetor da febre amarela é principalmente o mosquito *Haemagogus* e do gênero *Sabethes*. Já no meio urbano, a transmissão se dá através do mosquito *Aedes aegypti*, podendo o *Aedes albopictus* também transmitir os vírus. As primeiras manifestações da doença são repentinas: febre alta, calafrios, cansaço, dor de cabeça, dor muscular, náuseas e vômitos por cerca de três dias. A forma mais grave da doença é rara e costuma aparecer após um breve período de bem-estar (até dois dias), quando podem ocorrer insuficiências hepática e renal, icterícia, manifestações hemorrágicas e cansaço intenso (GARDNER *et al.*, 2010).

Além do homem, a infecção pelo vírus também pode acometer outros vertebrados. Os macacos podem desenvolver a febre amarela silvestre de forma inaparente, mas ter a quantidade de vírus suficiente para infectar mosquitos. O macaco não transmite a doença para os humanos, assim como uma pessoa não transmite a doença para outra. A transmissão se dá somente pelo mosquito. Os macacos ajudam a identificar as regiões onde estão acontecendo a circulação do vírus (BRASIL, 2015; HEUKELBACH *et al.*, 2016).

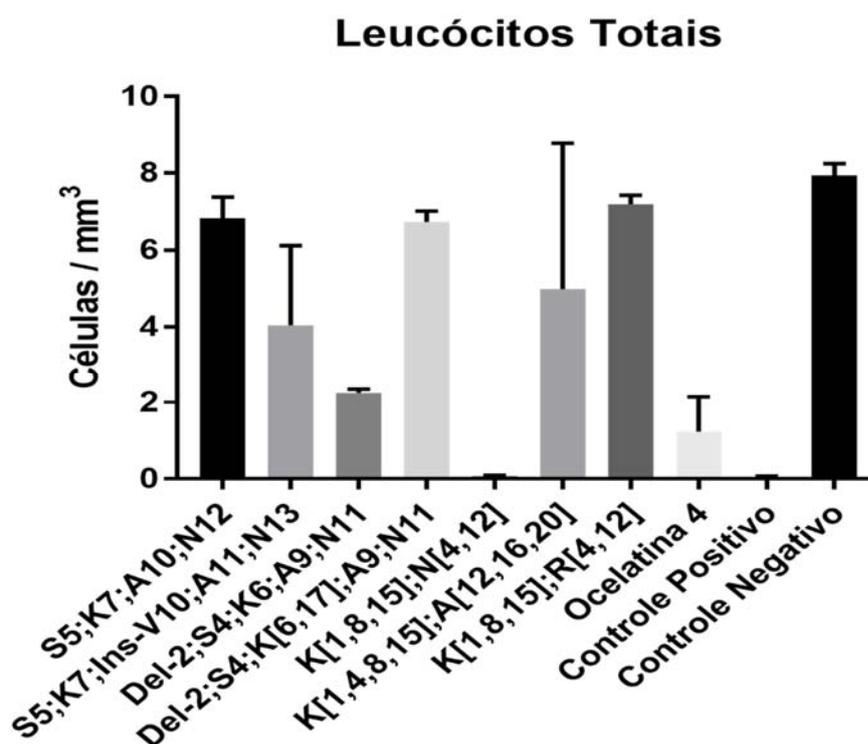
No caso do vírus da febre amarela ele é o principal representante da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivírus*, sendo que por suas características o nome foi dado a família (*flavus* é amarelo em latim), como o vírus da dengue também é composto de fita de RNA a qual contém as informações necessárias para codificar as proteínas do vírus. Os flavivírus ligam-se aos receptores das células hospedeiras através das proteínas E. Os viriões entram na célula através de endocitose mediada pelos receptores, após a fusão das membranas viral e celular, processo durante o qual

a nucleocápside viral se desintegra sendo os viriões transcritos em mRNA e traduzidos em várias proteínas (WAGNER, 2004). De maneira similar com o observado para o vírus da dengue, as glicoproteínas virais do envelope, por estarem expostas na superfície do vírus, constituem o principal sítio alvo para ação dos PAMs (GUZMAN *et al.*, 2010).

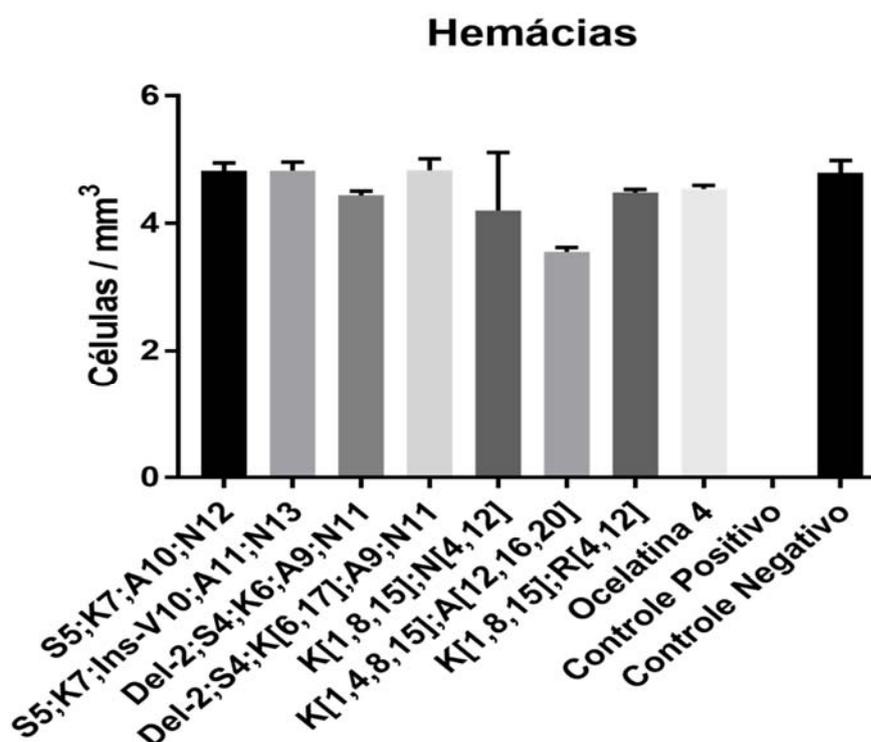
### **5.3. Efeitos citolíticos sobre leucócitos totais e hemácias**

Os leucócitos foram analisados em dois canais, um empregando citometria de fluxo e um por impedância. Através do canal de citometria de fluxo, as células em suspensão, orientadas em fluxo laminar são interceptadas, uma a uma, por um feixe de luz (laser). O feixe de laser incide sobre cada célula (de forma individual). A radiação incidente sofrerá desvios que serão reconhecidos pelos fotosensores. As informações provenientes dos diferentes sensores são agrupadas, formando as características (complexidade e tamanho) de cada célula. Por meio da impedância, as células são contadas e medidas a partir de impulsos elétricos gerados quando são imersas em um meio condutor (solução eletrolítica). As células também são orientadas em um fluxo laminar e interceptadas uma a uma por uma corrente elétrica. O número de pulsos obtidos durante o ciclo de contagem é correspondente ao número de células contadas. Quanto maior a corrente elétrica, ou seja, a intensidade do pulso elétrico, maior é o tamanho da célula.

As figuras a seguir representam os efeitos citolíticos dos peptídeos testados na concentração final de 128  $\mu\text{M}$  sobre leucócitos totais e eritrócitos humanos. A fase plasmática do sangue foi retirada com o objetivo de eliminar possíveis interferentes presentes no plasma que pudessem inibir ou diminuir a atividade dos peptídeos testados.



**Figura 22.** Efeitos citolíticos da ocelatina 4 e seus análogos na concentração de 128  $\mu$ M sobre leucócitos humanos totais após 1 hora de incubação. Controle negativo: solução de NaCl 0,9% (p/v) e controle positivo: Triton X-100 a 10% (v/v).



**Figura 23.** Efeitos citolíticos da ocelatina 4 e seus análogos na concentração de 128  $\mu$ M sobre hemácias humanas após 1 hora de incubação. Controle negativo: solução de NaCl 0,9% (p/v) e controle positivo: Triton X-100 a 10% (v/v).

Pela observação das contagens dos leucócitos totais, os peptídeos Ocelatina 4, S5;K7;Ins-V10;A11;N13, Del-2;S4;K6;A9;N11 e K[1,8,15];N[4,12] causaram maior destruição dos leucócitos totais quando comparados com os demais peptídeos, principalmente o K[1,8,15];N[4,12] que apresentou a maior destruição celular, atividade comparável com os efeitos líticos induzidos pelo detergente empregado nesse ensaio, o Triton X-100. Esses efeitos citolíticos intensos podem representar um problema ao se considerar a utilização de tais peptídeos como uma opção terapêutica aos antimicrobianos convencionais em administração sistêmica. Porém ao se observar outras vias de administração como via respiratória, ocular, intranasal, auricular e intradérmica, pode vir a se tornar um análogo promissor, porém são necessários estudos com células dessas vias para elucidação de possíveis interações e efeitos deletérios.

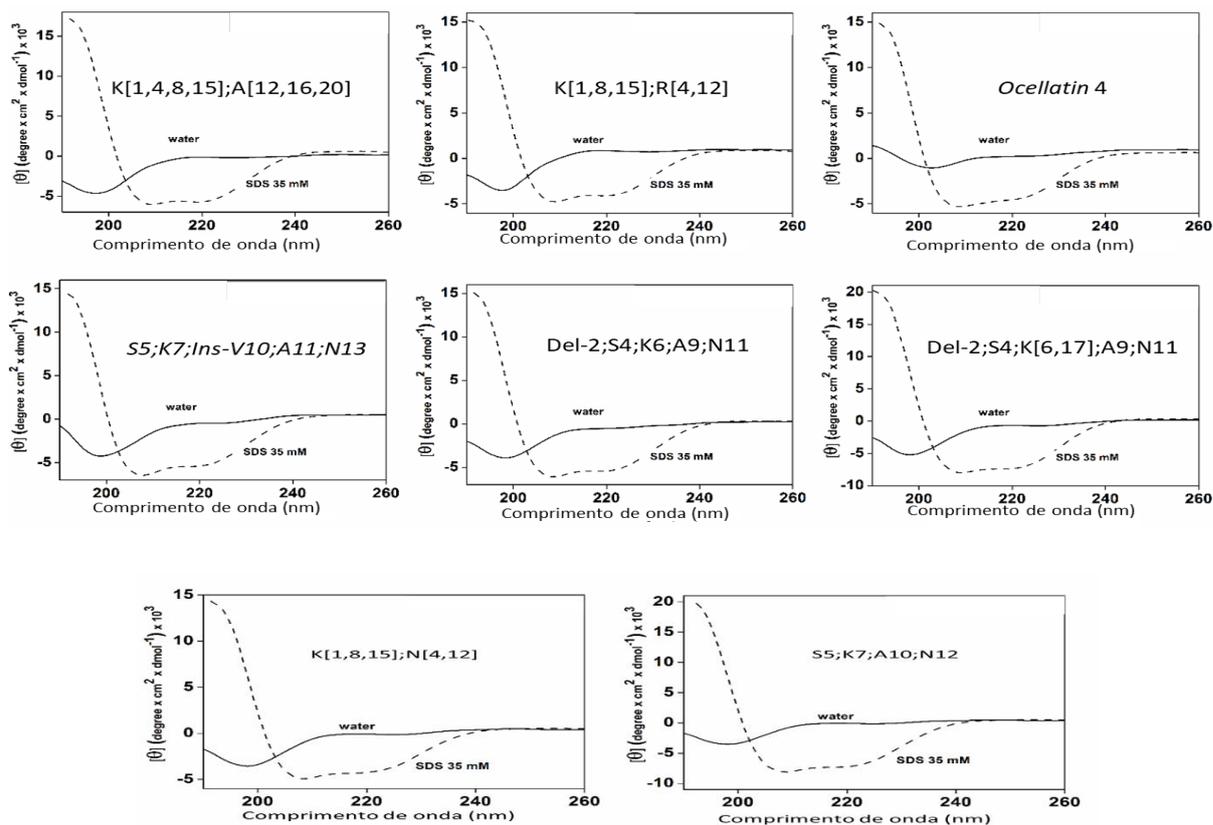
Em relação à atividade sobre eritrócitos, o único peptídeo que apresentou atividade considerável foi o K[1,4,8,15];A[12,16,20] em comparação com os demais.

#### **5.4. Análises por dicroísmo circular**

A determinação da composição de estruturas secundárias dos peptídeos testados foi realizada por meio de espectroscopia de dicroísmo circular, método que se baseia na absorção diferencial de luz polarizada por moléculas opticamente ativas (MICSONAI *et al.*, 2015).

Os peptídeos foram avaliados em solução aquosa e também na presença de SDS, solvente comumente usado para mimetizar o ambiente hidrofóbico de membranas. Os espectros dicroicos dos peptídeos estão apresentados na Figura 24.

Todos os peptídeos apresentaram estrutura desordenada em água, sem preferências conformacionais, fato evidenciado pela presença de um mínimo em 198 nm em seus espectros dicroicos (Figura 24). Já quando em contato com as micelas de SDS, os peptídeos adquiriram conformação em  $\alpha$ -hélice bem definida, visto que produziram bandas dicroicas negativas próximas a 208 e 220 nm, padrão típico de peptídeos antimicrobianos lineares formadores de  $\alpha$ -hélice (Figura 24).



**Figura 24.** Espectros dicróicos dos peptídeos a 50  $\mu\text{M}$  em água Mili-Q (linha contínua) e em SDS 35 mM (linha tracejada).

O percentual de helicidade dos peptídeos (Tabela 10) foi calculado considerando-se a elipticidade molar  $[\theta]$  a 208 nm.

Os análogos S5;K7;A10;N12, Del-2;S4;K[6,17];A9;N11 e S5;K7;Ins-V10;A11;N13 foram os que apresentaram maiores níveis de formação de  $\alpha$ -hélice na presença de micelas de SDS, sendo que os análogos K[1,8,15];N[4,12] e K[1,8,15];R[4,12] apresentaram uma leve redução em comparação com a ocelatina 4.

A capacidade dos peptídeos de apresentarem mudanças em sua estrutura secundária frente a condições ambientais tem sido associada a um alto predomínio de lise em membranas (SUN *et al.*, 2014). A integridade conformacional da  $\alpha$ -hélice pode ser correlacionada com as propriedades biológicas dos peptídeos antimicrobianos descritos, visto que essa configuração estrutural é a mais comum encontrada em peptídeos selvagens ativos em membranas biológicas (MAI *et al.*, 2015).

**Tabela 10.** Estimativa do conteúdo de  $\alpha$ -hélice (%) da ocelatina 4 e seus análogos em água Milli-Q e em SDS 35mM.

Peptídeo	Solvente	Conteúdo de $\alpha$ -hélice (%)
Ocelatina 4	Água Milli-Q	12.1
	SDS 35mM	25.0
S5;K7;A10;N12	Água Milli-Q	13.7
	SDS 35mM	32.6
S5;K7;Ins-V10;A11;N13	Água Milli-Q	16.4
	SDS 35mM	28.2
Del-2;S4;K6;A9;N11	Água Milli-Q	14.9
	SDS 35mM	27.2
Del-2;S4;K[6,17];A9;N11	Água Milli-Q	16.7
	SDS 35mM	32.2
K[1,8,15];N[4,12]	Água Milli-Q	13.7
	SDS 35mM	24.1
K[1,4,8,15];A[12,16,20]	Água Milli-Q	14.7
	SDS 35mM	26.8
K[1,8,15];R[4,12]	Água Milli-Q	11.7
	SDS 35mM	23.6

## 6. Conclusões

Neste trabalho foram avaliadas as propriedades antimicrobianas, antivirais e citolíticas da ocelatina 4 e sete de seus análogos propostos por NASCIMENTO (2007).

Com relação às propriedades antimicrobianas sobre bactérias Gram-positivas, os análogos K[1,8,15];N[4,12], K[1,4,8,15];A[12,16,20], K[1,8,15];R[4,12] demonstraram-se mais ativos sobre *S. aureus* com CIMs dentro da faixa de aplicação terapêutica que variaram de 2-4  $\mu$ M e com os análogos K[1,8,15];N[4,12] e K[1,8,15];R[4,12] exibindo capacidade antimicrobiana acentuada também sobre *E. faecalis* com valores de CIMs iguais a 8  $\mu$ M.

Novamente os análogos K[1,8,15];N[4,12] e K[1,8,15];R[4,12] exibiram o melhor desempenho frente à linhagem metilicina resistente de *Staphylococcus aureus* (MRSA), com CIMs iguais a 2 e 4  $\mu$ M, respectivamente.

Ao se analisar os efeitos sobre as bactérias Gram-negativas, observou-se que os análogos S5;K7;A10;N12, S5;K7;Ins-V10;A11;N13, K[1,8,15];N[4,12] e K[1,8,15];R[4,12] demonstraram-se mais ativos sobre *E. coli* com valores de CIMs que variaram de 4-16  $\mu$ M e os análogos K[1,8,15];N[4,12], K[1,4,8,15];A[12,16,20] e K[1,8,15];R[4,12] sobre *K. pneumoniae* com valores de CIMs iguais a 4, 8 e 4  $\mu$ M,

respectivamente. Ao serem incubados com a linhagem de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo metalo-beta-lactameses, o análogo que se mostrou mais ativo foi o análogo K[1,8,15];N[4,12] com valor de CIM igual a 16  $\mu$ M.

Os análogos S5;K7;A10;N12 e K[1,8,15];N[4,12] mostraram-se ativos sobre a levedura patogênica *C. albicans*, exibindo valores de CIMs iguais a 16 e 8  $\mu$ M, respectivamente.

Ao se considerar a atividade antiviral, os análogos K[1,4,8,15];A[12,16,20] e S5;K7;Ins-V10;A11;N13 merecem destaque, em especial o K[1,4,8,15];A[12,16,20] que demonstrou uma atividade citotóxica 50% na concentração de 38,52  $\mu$ M e uma concentração efetiva sobre a atividade viral de 0,65  $\mu$ M, o que representou um índice de seletividade de 59,15 sobre o vírus da dengue.

Observou-se que a ocelatina 4 e seus análogos S5;K7;Ins-V10;A11;N13, Del-2;S4;K6;A9;N11 e K[1,8,15];N[4,12] foram os mais ativos sobre leucócitos humanos, principalmente o análogo K[1,8,15];N[4,12] que apresentou a maior destruição celular, atividade comparável com os efeitos líticos induzidos pelo detergente empregado nesse ensaio, o Triton X-100.

No caso dos efeitos sobre eritrócitos humanos, apenas o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20] exibiu efeitos citolíticos, com redução de cerca de 25% na população de eritrócitos em relação ao controle.

Todos os peptídeos avaliados apresentaram capacidade de formar  $\alpha$ -hélices em ambientes membrana-miméticos, sendo que os análogos S5;K7;A10;N12, Del-2;S4;K[6,17];A9;N11 e S5;K7;Ins-V10;A11;N13 foram os que apresentaram maiores níveis de formação de  $\alpha$ -hélice na presença de micelas de SDS.

Ao se analisar o conjunto de atividades antimicrobianas, antivirais e citolíticas gerado para a ocelatina 4 e seus análogos, pode-se concluir que vários dos análogos exibiram ganho de potência em relação ao peptídeo selvagem, o PAM ocelatina 4, com especial destaque para os análogos S5;K7;A10;N12 e K[1,8,15];R[4,12] que exibiram atividades inibitórias em faixas baixas de concentração (Tabela 11) sem apresentarem efeitos citolíticos relevantes sobre as células sanguíneas humanas.

O presente estudo comprovou o potencial de análogos de peptídeos antimicrobianos como possíveis agentes anti-infecciosos contra um leque bem diversificado de alvos patogênicos.

**Tabela 11.** Resumo das atividades antimicrobianas e antivirais da ocelatina 4 e seus análogos.

Composto	CIM ( $\mu\text{M}$ )							IS		
	Ec	Kp	KpC	Pm	Sa	MRSa	Ef	Ca	D	FA
<i>Ocelatina 4</i>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	-	4,79
<i>S5;K7;A10;N12</i>	8	32	64	>128	16	16	16	16	3,70	2,58
<i>S5;K7;Ins-V10;A11;N13</i>	16	>128	128	>128	128	>128	>128	64	13,56	10,28
<i>Del-2;S4;K6;A9;N11</i>	32	>128	128	>128	>128	>128	>128	64	2,12	1,7
<i>Del-2;S4;K[6,17];A9;N11</i>	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	-	-
<i>K[1,8,15];N[4,12]</i>	4	4	16	>128	2	2	8	8	2,79	3,07
<i>K[1,4,8,15];A[12,16,20]</i>	32	16	32	>128	4	8	32	128	59,15	5,03
<i>K[1,8,15];R[4,12]</i>	8	4	32	>128	2	4	8	>128	2,95	1,45
<i>Ampicilina</i>	32	128	-	-	-	-	16	-	-	-
<i>Vancomicina</i>	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-

CIM = Concentração inibitória mínima; IS = Índice de seletividade; PAMs = Peptídeos antimicrobianos; Ec = *Escherichia coli* (ATCC25922); Kp = *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603); KpC = *Klebsiella pneumoniae* produtora de cabapenemase; Pm = *Proteus mirabilis* (ATCC25933); Sa = *Staphylococcus aureus* (ATCC25923); MRSa = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; Ef = *Enterococcus faecalis* (ATCC29212); Ca = *Candida albicans* (ATCC14053); D = Vírus da dengue sorotipo 4; FA = Vírus da febre amarela; (-) = valores não obtidos.

## 7. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews of Infectious Diseases*. v.10, n.4, p.677–678, 1988.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*. v.4, n.1, p.117-139, 2014.

AITKEN, A.; LEARMONTH, M. Protein identification by in-gel digestion and mass spectrometric analysis. *Molecular Biotechnology*. v.20, n.1, p.95-97, 2002.

ALMEIDA, P. F.; POKORNY, A. Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cellpenetrating peptides: from kinetics to thermodynamics. *Biochemistry*. v.48, n.34, p.8083-8093, 2009.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*. v.289, n.1036, p.321–331, 1980.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*. v.26, p.43–57, 2016.

ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de bactérias multirresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências. *Revista brasileira de terapia intensiva*, v.18, n.1, p.27-33, 2006.

APPONYI, M. A.; PUKALA, T. L.; BRINKWORTH, C. S.; MASELLI, V. M.; BOWIE, J. H.; TYLER, M. J.; SEPAROVIC, F. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides*, v.25, n.6, p.1035-1054, 2004.

ASADOLLAHI PARISA, FARAHANI NARGES NODEH, MIRZAI MEHDI, KHORAMROOZ SEYED SAJJAD, VAN BELKUM ALEX, ASADOLLAHI KHAIRULLAH, DADASHI MASOUD, DARBAN-SAROKHALIL DAVOOD. Distribution of the most prevalent Spa types among clinical isolates of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* around the world: A Review. *Frontiers in Microbiology*. v.9, n.163, p.1-16, 2018

BAUER, M. E.; SHAFER, W. M. On the in vivo significance of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. v.1848, n.11, p.3101–3111, 2015.

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

BEN-AMI, R., BERMAN, J., NOVIKOV, A., BASH, E., SHACHOR-MEYOUHAS, Y., ZAKIN, S., MAOR, Y., TARABIA, J., SCHECHNER, V., ADLER, A., FINN, T. Multidrug-resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, v.23, n.2, p.195–203, 2017.

BENGOECHEA, J. A.; SKURNIK, M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Molecular Microbiology*, v.37, n.1, p.67-80, 2000.

BIGGIN, P. C.; SANSOM, M. S. P. Interactions of  $\alpha$ -helices with lipid bilayers: a review of simulation studies. *Biophysical Chemistry*, v.76, n.3, p.161-183, 1999.

BISPO, N.J.; FRANCISCO, N.M.A.C.; SCHIMITT, A.C. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos da planta *Guettarda angelica* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *LAES & HAES*, São Paulo: Mc Will Editores Incorporados v.28, n.168, p.164-169, 2007.

BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K.; AGUILAR, M. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology*, v.1462, n.1-2, p.89-108, 1999.

BOCCHINFUSO, G.; PALLESCHI, A.; ORIONI, B.; GRANDE, G.; FORMAGGIO, F.; TONIOLO, C.; PARK, Y.; HAHM, K.; STELLA, L. Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations. *Journal of Peptide Science*. v.15, n.9, p.550-558, 2009.

BOTA, D. P.; RODRIGUEZ, H.; DIMOPOULOS, G.; DaROS, A.; MÉLOT, C.; STRUELENS, M. J.; VINCENT, J.L. Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? *Journal of Infection*. v.47, n.4, p.307-316, 2003.

BRASIL 2015. Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia. Ministério da Saúde, Brasília. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus\\_zika\\_brasil\\_resposta\\_sus.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf)> Acesso em 30 de julho de 2018.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n.3, p.238-250, 2005.

BROWN, K.; UWIERA, R. R. E.; KALMOKOFF, M. L.; BROOKS, S. P. J.; INGLIS, G. D. Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.49, n.1, p.12–24, 2017.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*. V. 65, p. 455-78, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.54, n.3, p.969–976, 2010.

CEPEDA, J. A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; HAILS, J.; JONES, K.; KWAKU, F.; TAYLOR, L.; HAYMAN, S.; COOKSON, B.; SHAW, S.; KIBBLER, C.; SINGER, M.; GEOFFREY, B.; WILSON, A. P. R. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. *The Lancet*. v.365, n.9456, p.295-304, 2005.

CHEN, H.-R., SHERR, D. H., HU, Z., DELISI, C. A network based approach to drug repositioning identifies plausible candidates for breast cancer and prostate cancer. *BMC Medical Genomics*, v.9, p.51, 2016.

CHEN, Y.; MANT, C. T.; FARMER, S. W.; HANCOCK, R. E. W.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced

activities and specificity/therapeutic index. *The Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.13, p.12316–12329, 2005.

CHUNG, P. Y.; KHANUM, R. Antimicrobial peptides as potential antibiofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. v.50, n.4, p.405–410, 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty eight informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S28.

CONLON, J. M. Host-defense peptides of the skin with therapeutic potential: from hagfish to human. *Peptides*. v.67, p.29–38, 2015.

CORDES, J.; WITTERSHEIM, M.; HARDER, J.; GLÄSER, R. The skin's own antibiotics. Important features of antimicrobial peptides for clinical practice. *Hautarzt*. v.65, n.1, p.50–55, 2014.

CORDWELL, S. J. Technologies for bacterial surface proteomics. *Current Opinion in Microbiology*. v.9, n.3, p.320–329, 2006.

CUNLIFFE, R. N.; MAHIDA, Y. R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *Journal of Leukocyte Biology*, v.75, n.1, p.49-58, 2004.

DA MATTA, D. A., SOUZA, A. C. R., & COLOMBO, A. L. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from Latin American Medical Centers. *Journal of Fungi*. v.3, n.2, p.24, 2017.

DAHER, K. A.; SELSTED, M. E.; LEHRER, R. I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *Journal of Virology*. v.60, n.3, p.1068–1074, 1986.

DATHE, M.; MEYER, J.; BEYERMANN, M.; MAUL, B.; HOISCHEN, C.; BIENERT, M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1558, p. 171-186, 2002.

DEL CASTILLO, F. J.; DEL CASTILLO, I.; MORENO, F. Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* gyrB gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA Gyrase. *Journal of Bacteriology*, v.183, n.6, p.2137-2140, 2001.

DELEO, F. R.; OTTO, M. KREISWIRTH, B. N.; CHAMBERS, H. F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. v.375, p.1557–1568, 2010.

DENNISON, S. R.; WALLACE, J.; HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. Amphiphilic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Protein and Peptide Letters*, v.12, n.1, p.31-39, 2005.

DHIMAN, N.; HALL, L.; WOHLFIEL, S. L.; BUCKWALTER, S. P.; WENGENACK, N. L. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *Journal of Clinical Microbiology*. v.49, n.4, p.1614–1616, 2011.

DOBSON, A. J.; PURVES, J.; ROLFF, J. Increased survival of experimentally evolved antimicrobial peptide-resistant *Staphylococcus aureus* in an animal host. *Evolutionary Applications*. v.7, n.8, p.905–912, 2014.

DUNNILL, P. The use of helical net-diagrams to represent protein structures. *Biophysical Journal*, v.8, n.7, p.865–875, 1968.

EGAL, M.; CONRAD, M.; MACDONALD, D. L.; MALOY, W. L.; MOTLEY, M.; ATTARDO GENCO C. Antiviral effects of synthetic membrane-active peptides on herpes simplex virus, type 1. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.13, n.1, p.57–60, 1999.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*. v.299, n.5881, p.371-374, 1982.

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

ERNST, R. K.; GUINA, T.; MILLER, S. I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *Journal of Infectious Diseases*, v.179, n.2, p.326-330, 1999.

ETZERODT, T.; HENRIKSEN, J. R.; RASMUSSEN, P.; CLAUSEN, M. H.; ADRESEN, T. L. Selective acylation enhances membrane charge sensitivity of the antimicrobial peptide mastoparan-X. *Biophysical Journal*, v.100, p.399-409, 2011.

FEDER, R.; DAGAN, A.; MOR, A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. v.275, p.4230-4238, 2000.

FILGONA, J.; BANERJEE, T.; ANUPURBA, S. Role of efflux pumps inhibitor in decreasing antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in North India. *The Journal of Infection in Developing Countries*. v.9, n.8, p.815–820, 2015.

FISHER, J. F.; MEROUEH, S. O.; MOBASHERY, S. Bacterial resistance to betalactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*. v.105, n.2, p.395–424, 2005.

FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E.; SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*. v.11, n.1, p.37–51, 2011.

FRIEDRICH, C.; SCOTT, M. G.; KARUNARATNE, N.; YAN, H.; HANCOCK, R. E. Salt resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.7, p.1542-1548, 1999.

GANGULY, N. K.; ARORA, N. K.; CHANDY, S. J.; FAIROZE, M. N.; GILL, J. P.; GUPTA, U.; HOSSAIN, S.; JOGLEKAR, S.; JOSHI, P. C.; KAKKAR, M.; KOTWANI, A.; SUDARSHAN, H.; THOMAS, K.; WATTAL, C.; EASTON, A.; LAXMINARAYAN, R.; GLOBAL ANTIBIOTIC RESISTANCE PARTNERSHIP (GARP) - INDIA WORKING GROUP. Rationalizing antibiotic use to limit antibiotic resistance in India. *Indian Journal of Medical Research*. v.134, n.3, p.281–294, 2011.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clinics in Laboratory Medicine*, v.30, n.1, p.237–260, 2010

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: WALKER, J. M. (Ed). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press. p. 571-607, 2005.

GAUTIER, R.; DOUGUET, D.; ANTONNY, B.; DRIN, G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics*. v.24, n.18, p.2101-2102, 2008.

GHOSH, J. K.; SHAOOL, D.; GUILLAUD, P.; CICÉRON, L.; MAZIER, D.; KUSTANOVICH, I.; SHAI, Y.; MOR, A. Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *Journal of Biological Chemistry*. v.272, p.31609-31616, 1997.

GONCALVES, S. S.; SOUZA, A. C.; CHOWDHARY, A.; MEIS, J. F.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*. v.4, p.198–219, 2016.

GOUDARZI, M., FAZELI, M., GOUDARZI, H., AZAD, M., AND SEYEDJAVADI, S. S. Spa typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens of patients with nosocomial infections in Tehran, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. v.9, p.35685, 2016.

GOW, N. A.; VEERDONK, F. L. V.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*. v.10, n.2, p.112-22, 2012.

GRAILLE, M., STURA, E. A., CORPER, A. L., SUTTON, B. J., TAUSSIG, M. J., CHARBONNIER, J.-B., SILVERMAN, G. J. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, n.10, p.5399–5404, 2000.

GUILLAMET, C. V.; KOLLEF, M. H. How to stratify patients at risk for resistant bugs in skin and soft tissue infections? *Current Opinion in Infectious Diseases*. v.29, n.2, p.116–123, 2016.

GUIMARÃES, A. B.; COSTA, F. Q.; JÚNIOR, O. R. P.; FONTES, W.; CASTRO, M. S. The amazing world of peptide engineering: the example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein and Peptide Letters*, v.23, n.8, p.722-737, 2016.

GUO, L.; LIM, K. B.; PODUJE, C. M.; DANIEL, M.; GUNN, J. S.; HACKETT, M.; MILLER, S. I. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*, v.95, n.2, p.189-198, 1998.

GUSMÃO, K. A. G.; DOS 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. Ocelatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus*(Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. v.23, n.4, p.1-14, 2017.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Viruses*, v.2, n.12, p.2649–2662, 2010.

HANCOCK, R. E. W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, v.1, n.3, p.156-164, 2001.

HANCOCK, R. E. W.; PATRZYKAT, A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets Infectious Disorders*, v.2, n.1, p.79–83, 2002a.

HANCOCK, R. E. W.; ROZEK, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, v.206, n.2, p.143-149, 2002b.

HANSSSEN, A. M.; ERICSON SOLLID, J. U. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunology Medical Microbiology*. v.46, p.8–20, 2006.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.64, p.3–10, 2009.

HE, L., ZHENG, H.-X., WANG, Y., LE, K. Y., LIU, Q., SHANG, J., LI, M. Detection and analysis of methicillin-resistant human-adapted sequence type 398 allows insight into community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution. *Genome Medicine*, v.10, n.5, 2018.

HELMERHORST, E. J.; BREEUWER, P.; VAN'T HOF, W.; WALGREEN-WETERINGS, E.; OOMEN, L. C. J. M.; VEERMAN, E. C.; AMERONGEN, A. V. N.; ABEE, T. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.7286-7291, 1999.

HEUKELBACH, J.; ALENCAR, C. H.; KELVIN, A. A.; OLIVEIRA, W. K.; PAMPLONA DE GÓES CAVALCANTI, L. Zika virus outbreak in Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries*. v.10, n.2, p.116-120, 2016.

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

ISLAM, D.; BANDHOLTZ, L.; NILSSON, J.; WIGZELL, H.; CHRISTENSSON, B.; AGERBERTH, B.; GUDMUNDSSON, G. H. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nature Medicine*, v.7, p.180-185, 2001.

JACOBS, D. M.; SAFIR, M. C.; HUANG, D.; MINHAJ, F.; PARKER, A.; RAO, G. G. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v.16, n.76, p.1-12, 2017.

JANG, W. S.; KIM, H. K.; LEE, K. Y.; KIM, S. A.; HAN, Y. S.; LEE, I. H. Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Letters*, v.580, n.5, p.1490-1496, 2006.

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

JOO, H. S.; FU, C. I.; OTTO, M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*. v.371, n.20150292, p. 1-11, 2016.

KACZMAREK, F. M., DIB-HAJJ, F., SHANG, W., GOOTZ, T. D. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of *bla*<sub>ACT-1</sub>  $\beta$ -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, n.10, p.3396–3406, 2006.

KANG, H. K., KIM, C., SEO, C. H., AND PARK, Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology*. v.55, n.1, p.1–12, 2017.

KANTOR I.N. Dengue, Zika y Chikungunya. *Medicina (Buenos Aires)* v.76, n.2, p.93-97, 2016.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.56, n.3, p.285-289, 2004.

KAYSER, F. H.; BIENZ, K. A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R. M. Medical microbiology. *Thieme, Stuttgart – New York*, 2005.

KIKUKAWA, T.; ARAISO, T. Changes in lipid mobility associated with alamethicin incorporation into membranes. *Arch. Biochem. Biophys*, v. 405, n. 2, p. 214-222, 2002.

KOO, J. C.; LEE, B.; YOUNG, M. E.; KOO, S. C.; COOPER, J. A.; BAEK, D.; LIM, C. O.; LEE, S. Y.; YUN, D. J.; CHO, M. J. Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. *Plant and Cell Physiology*, v.45, n.11, p.1669-1680, 2004.

KRUGLIAK, M.; FEDER, R.; ZOLOTAREV, V. Y.; GAIDUKOV, L.; DAGAN, A.; GINSBURG, H.; MOR, A. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.44, n.9, p.2442–2451, 2000.

KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z.; LOFTON, H.; VESTERGAARD, M.; HJORT, K.; INGMER, H.; ANDERSSON, D. I. Antimicrobial peptide exposure selects for *Staphylococcus aureus* resistance to human defence peptides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.72, n.1, p.115–127, 2017.

KUMAR, A. Role of microbes in food and industrial microbiology. *Journal of Food & Industrial Microbiology*. v.2, n.2, p.100-101, 2016.

KYTE J, DOOLITTLE RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. v.157, n.1, p.105-132, 1982.

LATOUD, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; GENET, R.; MORGAT, J. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.856, n.3, p.526-535, 1986.

LEE, D. G.; KIM, H. K.; KIM, S. A.; PARK, Y.; PARK, S. C.; JANG, S. H.; HAHM, K. S. Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.305, n.2, p. 305-310, 2003.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, v.86, n.6, p.973-983, 1996.

LI, L., WANG, L., GAO, Y., WANG, J. E ZHAO, X. Atividade Antimicrobiana Efetiva de Peptídeos Antimicrobianos Derivados de Plectasin Contra Infecção por *Staphylococcus aureus* em Glândulas Mamárias. *Fronteiras em Microbiologia* , 8 , 2386, 2017.

LIN, C. H.; HOU, R. F.; SHYU, C. L.; SHIA, W. Y. LIN, C. F.; TU, W. C. In vitro activity os mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from animals. *Peptides*. v.36, n.1, p.14-120, 2012.

LITTMANN, J.; VIENS, A. M. The ethical significance of antimicrobial resistance. *Public Health Ethics*. v.8, n.3, p.209–224, 2015.

LOHNER, K. Membrane-active antimicrobial peptides as template structures for novel antibiotic agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. v.17, n.5, p.508–519, 2017.

LÓPEZ-GARCÍA, B.; MARCOS, J. F.; ABAD, C.; PÉREZ-PAYÁ, E. Stabilisation of mixed peptide/lipid complexes in selective antifungal hexapeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.1660, n.1-2, p.131-137, 2004.

LOVERING, A. L.; SAFADI, S. S.; STRYNADKA, N. C. Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annual Review of Biochemistry*. v.81, p.451–478, 2012.

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

MAGILL, S. S., EDWARDS, J. R., BAMBERG, W., BELDAVS, Z. G., DUMYATI, G., KAINER, M. A., LYNFIELD, R.; MALONEY, M.; McALLISTER-HOLLOD, L.; NADLE, J.; RAY, S. M.; THOMPSON, D. L.; WILSON, L. E.; FRIDKIN, S. K. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *The New England Journal of Medicine*. v.370, n.13, p.1198–1208, 2014.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v.6, n.194, p.1-12, 2016.

MARCOCCI, M. E., AMATORE, D., VILLA, S., CASCIARO, B., AIMOLA, P., FRANCI, G., NENCIONI, L. The Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin B Inhibits *In Vitro* Herpes Simplex Virus 1 Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.62, n.5, p.2367–17, 2018.

MARINACH-PATRICE, C., FEKKAR, A., ATANASOVA, R., GOMES, J., DJAMDJIAN, L., BROSSAS, J.-Y., MAZIER, D. Rapid species diagnosis for invasive Candidiasis using mass spectrometry. *PLoS ONE*. v.5, n.1, p.8862, 2010.

MÁRQUEZ, C. A. P. Atividade antitumoral da secreção cutânea de *Hypsiboas crepitans* e de peptídeos derivados da pele dos anuros *Hypsiboas crepitans* e *Leptodactylus labyrinthicus*. 118 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2016.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. W. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, v.6, n.5, p.468-472, 2006.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v.8, n.4, p.1-15, 2018.

MATANIC, A. V. C.; CASTILLA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.23, n.4, p.382-389, 2004.

MELISSA N. LANGER, STEFANIE BLODKAMP, MARTIN BAYERBACH, ANDREA T. FEßLER, NICOLE DE BUHR, THOMAS GUTSMANN, LOTHAR KREIENBROCK, STEFAN SCHWARZ, MAREN VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, Testing cathelicidin susceptibility of bacterial mastitis isolates: Technical challenges and data output for clinical isolates, *Veterinary Microbiology*, Volume 210, Pages 107-115, 2017.

MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; LEE, Y.-H.; GOTO, Y.; RÉFRÉGIERS, M.; KARDOS, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.112, n.24, p.3095–3103, 2015.

MOOSAZADEH MOGHADDAM, MEHRDAD & AGHAMOLLAIEI, HOSSEIN & KOOSHKI, HAMID & AZIZI, KAMAL & MIRNEJAD, REZA & CHOOPANI, ALI. The development of antimicrobial peptides as an approach to prevention of antibiotic resistance. *Reviews in Medical Microbiology*. 26. 98-110, 2015.

MURPHY, J. B.; KIES, M. W. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.45, p.382-384, 1960.

NARAYANA, J. L.; CHEN, J. Y. Antimicrobial peptides: possible antiinfective agents. *Peptides*, v.72, p.88-94, 2015.

NASCIMENTO, A. C. C. C. Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos citolíticos e proteases 73 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

NASCIMENTO, A. C. C.; FONTES, W.; SEBEN, A.; CASTRO, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and Peptide Letters*, v.10, n.3, p.227-238, 2003.

NAVON-VENEZIA, S.; FEDER, R.; GAIDUKOV, L.; CARMELI, Y.; MOR, A. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with *in vivo* activity. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, v.46, n.3, p.689-694, 2002.

NICOLAS P, MOR A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annual Review of Microbiology*. v.49, p.277–304, 1995.

NIJNIK, A.; HANCOCK, R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging Health Threats Journal*. v.2, n.1, p.1-7, 2009.

NISSEN MEYER J, NES IF. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Archives of Microbiology*. v.167, n.1-2, p.67–77, 1997.

OMARDIEN, S.; BRUL, S.; ZAAT, S. A. Antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides against gram-positives: current progress made in understanding the mode of action and the response of bacteria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. v.4, n.111, p.1-16, 2016.

OTTO M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. v.64, p.143-162, 2010.

OUHARA, K.; KOMATSUZAWA, H.; KAWAI, T.; NISHI, H.; FUJIWARA, T.; FUJIIUE, Y.; M; SAYAMA, K.; HASHIMOTO, K.; SUGAI, M. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.61, n.6, p.1266-1269, 2008.

PALZKILL, T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.1277, p.91–104, 2013.

PALZKILL, T. Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance mutations in altering the specificity of TEM, CTX-M, and KPC  $\beta$ -lactamases. *Frontiers in Molecular Biosciences*. v.5, n.16, p.1-19, 2018.

PARK, Y.; LEE, D. G.; HAHM, K. S. HP (2-9)-magainin 2(1-12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. *Journal of Peptide Science*, v.10, n.4, p.204-209, 2004.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*. v.32, n.2, p.143–71, 2012.

PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology*. v.9, n.281, p.1-23, 2018.

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>.

PORTO, W. F.; PIRES, A. S.; FRANCO, O. L. Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. *Biotechnology Advances*. v.35, p.337–349, 2017.

PORTO, W. F.; SILVA, O. N.; FRANCO, O. L. Prediction and rational design of antimicrobial peptides. *New York, NY: InTech*. 2012.

RAAYMAKERS, C.; VERBRUGGHE, E.; HERNOT, S.; HELLEBUYCK, T.; BETTI, C.; PELEMAN, C.; CLAEYS, M.; BERT, W.; CAVELIERS, V.; BALLEET,

S.; MARTEL, A.; PASMANS, F.; ROELANTS, K. Antimicrobial peptides in frog poisons constitute a molecular toxin delivery system against predators. *Nature Communications*. v.8, n.1495, p.1-8, 2017.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.24, n.6, p.536-547, 2004.

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

RIVAS, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; ANDREU, D. Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: lessons from parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.1788, n.8, p.1570-1581, 2009.

ROJAS, L. J., SALIM, M., COBER, E., RICHTER, S. S., PEREZ, F., SALATA, R. A. *et al.* Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v.64, n.6, p.711–718, 2017.

NIELSEN, P. F.; SONNEVEND, A.; CONLON, J. M. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). *Regulatory Peptides*. v.124, n.1-3, p.173-178, 2005.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Research International*. v.2016, n.2475067, p.1-8, 2016.

SANTANA, P. A.; SALINAS, N.; ÁLVAREZ, C. A.; MERCADO, L. A.; GUZMÁN, F. Alpha-helical domain from IL-8 of salmonids: mechanism of action and identification of a novel antimicrobial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. In press, 2018.

SCAPATICCI, M.; BARTOLINI, A.; DEL CHIERICO, F.; ACCARDI, C.; DI GIROLAMO, F.; MASOTTI, A.; PUTIGNANI, L. Phenotypic typing and epidemiological survey of antifungal resistance of *Candida* species detected in clinical samples of Italian patients in a 17 months' period. *Germs*, v.8, n.2, p.58–66, 2018.

SCHIFFER, M.; EDMUNDSON, A. B. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophysical Journal*, v.7, n.2, p.121–135, 1967.

SCHNEIDER T., KRUSE T., WIMMER R., WIEDEMANN I., SASS V., PAG U. A plectasina, uma defensina fúngica, tem como alvo o precursor da parede celular bacteriana, o Lípido II. *Ciência* 3281168–1172, 2010.

SHAFER, W. M.; QU, X.; WARING, A. J.; LEHRER, R. I. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.95, n.4, p.1829-1833, 1998.

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

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

SHARMA, C.; ROKANA, N.; CHANDRA, M.; SINGH, B. P., GULHANE, R. D.; GILL, J. P. S.; RAY, P.; PUNIYA, A. K.; PANWAR, H. Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. *Frontiers in Veterinary Science*. v.4, n.237, p.1-27, 2018.

SHEN, D.; WU, B. Structure, biological properties and utilities of marine-derived antimicrobial peptides. *Current Organic Chemistry*, v.18, n.7, p.793-803, 2014.

SIEVERS, F., WILM, A., DINEEN, D., GIBSON, T. J., KARPLUS, K., LI, W., LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. v.7, n.539, p.1-6, 2011.

SORENSEN, O. E.; BORREGAARD, N.; COLE, A. M. Antimicrobial peptides in innate immune responses. *Contributions of Microbiology*. v.15, p.61–77, 2008.

SOUZA, F. C. S. J.; GONÇALVES, J. C. Resistência bacteriana: a era pós-antibióticos. Disponível em [http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais\\_simposio/arquivos\\_up/documentos/artigos/faeff272f1986b0f710be3841c963a7c.pdf](http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais_simposio/arquivos_up/documentos/artigos/faeff272f1986b0f710be3841c963a7c.pdf), 2016.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H. W.; SCHELD, W. M.; JOHN, G. B.; JOHN, E. JR. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. v.46, n.2, p.155–164, 2008.

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS, J. E. JR. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clinical Infectious Diseases*. v.38, n.9, p.1279–1286, 2004.

SRIJAN, A.; MARGULIEUX, K. R.; RUEKIT, S.; SNESRUD, E.; MAYBANK, R.; SERICHANTALERGS, O.; SWIERCZEWSKI, B. E. Genomic characterization of nonclonal mcr-1-positive multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from clinical samples in Thailand. *Microbial Drug Resistance*, v.24, n.4, p.403–410, 2018

SUN, J.; XIA, Y.; LI, D.; DU, Q.; LIANG, D. Relationship between peptide structure and antimicrobial activity as studied by de novo designed peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. v.1838, n.12, p.2985-2993, 2014.

TAMANG, J. P.; SHIN, D.; JUNG, S.; CHIA, S. Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Frontiers in Microbiology Food Microbiology*. v.7, n.578, p.1-13, 2016.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in lipid research*, v.51, n.2, p.149-177, 2012.

THAKUR, N.; ROKANA, N.; PANWAR, H. Probiotics: selection criteria, safety and role in health and disease. *Journal of Innovative Biology*. v.3, n.1, p.259-270, 2016.

TRIANA-VIDAL, L. E.; CASTRO, M. S.; PIRES JÚNIOR, O. R.; ÁLVARES, A. C. M.; DE FREITAS, S. M.; FONTES, W.; VARGAS, J. A. G.; ZÚÑIGA-BAOS, J.

A.; CORREIA BATISTA, I. F.; GRELLIER, P.; CHARNEAU, S. Dendropsophin 1, a novel antimicrobial peptide from the skin secretion of the endemic Colombian frog *Dendropsophus columbianus*. *Journal Natural Product Research Formerly Natural Product Letters*. v.32, n.12, p.1383-1389, 2017.

TURLEJ, A.; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Scmec) classification and typing methods: an overview. *Polish Journal of Microbiology*. v.60, p.95–103, 2011.

VAN DER BIJ, A. K.; PITOUT, J. D. D. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.67, n.9, p.2090–2100, 2012.

WAGHU, F. H.; JOSEPH, S.; GHAWALI, S.; MARTIS, E. A.; MADAN, T.; VENKATESH, K. V.; IDICULA-THOMAS, S. Designing antibacterial peptides with enhanced killing kinetics. *Frontiers in Microbiology*. v.9, n.325, p.1-10, 2018.

WAGNER, E.; HEWLETT, M. Basic Virology, 2nd edition, *Blackwell Science,inc*. United Kingdom, 440pp, 2004.

WANG, G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods in Molecular Biology*. v.1268, p.43-66, 2015.

WANG, S., ZENG, X., YANG, Q. E QIAO, S. Peptídeos Antimicrobianos como Alternativas Potenciais aos Antibióticos na Indústria de Alimentos para Animais. *Revista Internacional de Ciências Moleculares* , 17 (5), 603, 2016.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews of Microbiology* v.5, p.518–528, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO's First Global Report on Antibiotic Resistance Reveals Serious, Worldwide Threat to Public Health. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>, 2014.

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

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. *Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. Protein and Peptide Letters*, v.12, n.1, p.49-67,2005.

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

ZHAO KINNUNEN PJ. Binding of the antimicrobial peptide Temporin L to liposomes assessed by trp fluorescence. *J Biol Chem* 277:25170-25177, 2002.

ZHOU, Z.; LIN, S.; COTTER, R. J.; RAETZ, C. R. H. Lipid A Modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> in *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.18503-18514, 1999.

## **8. ANEXOS**

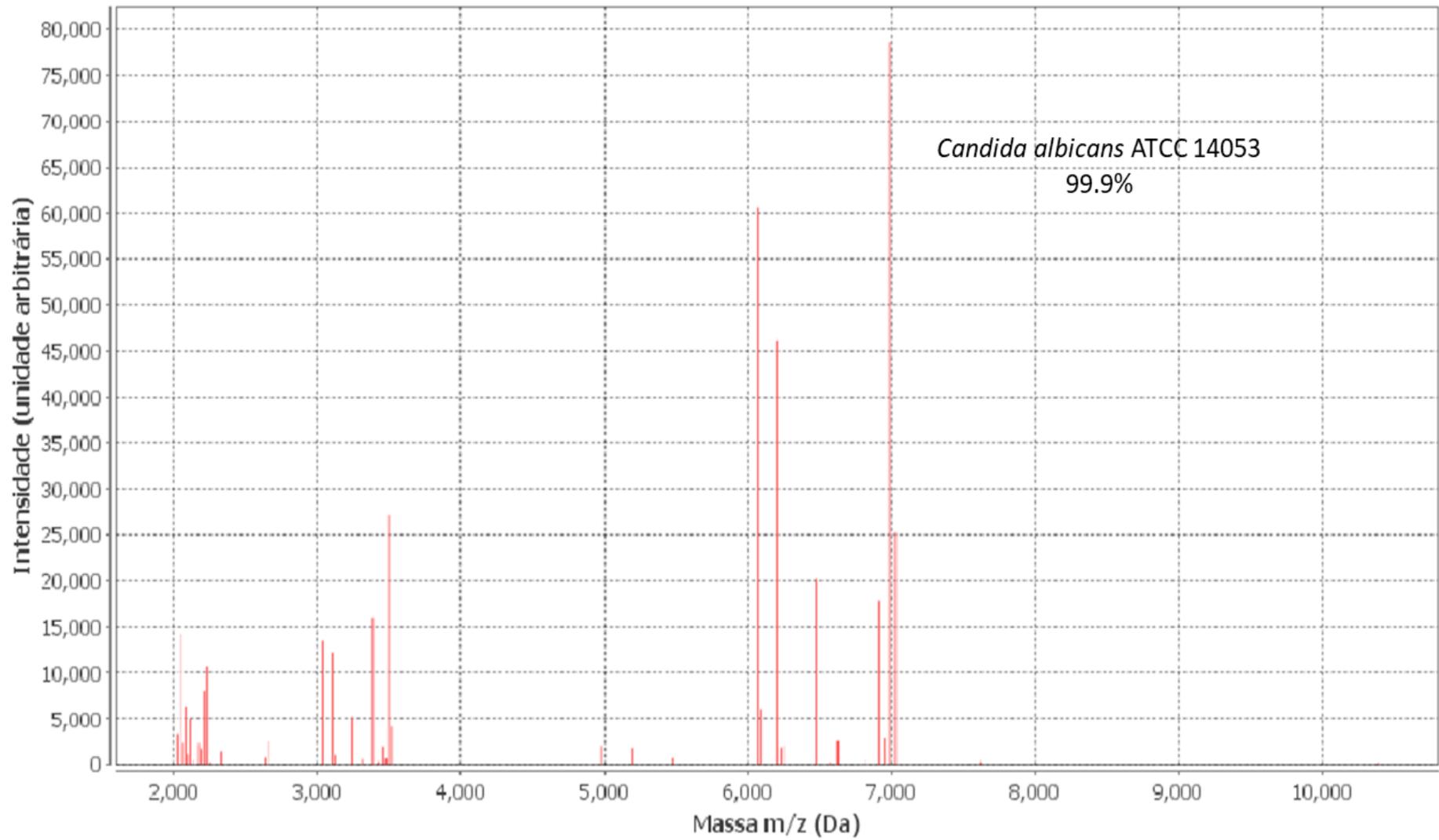
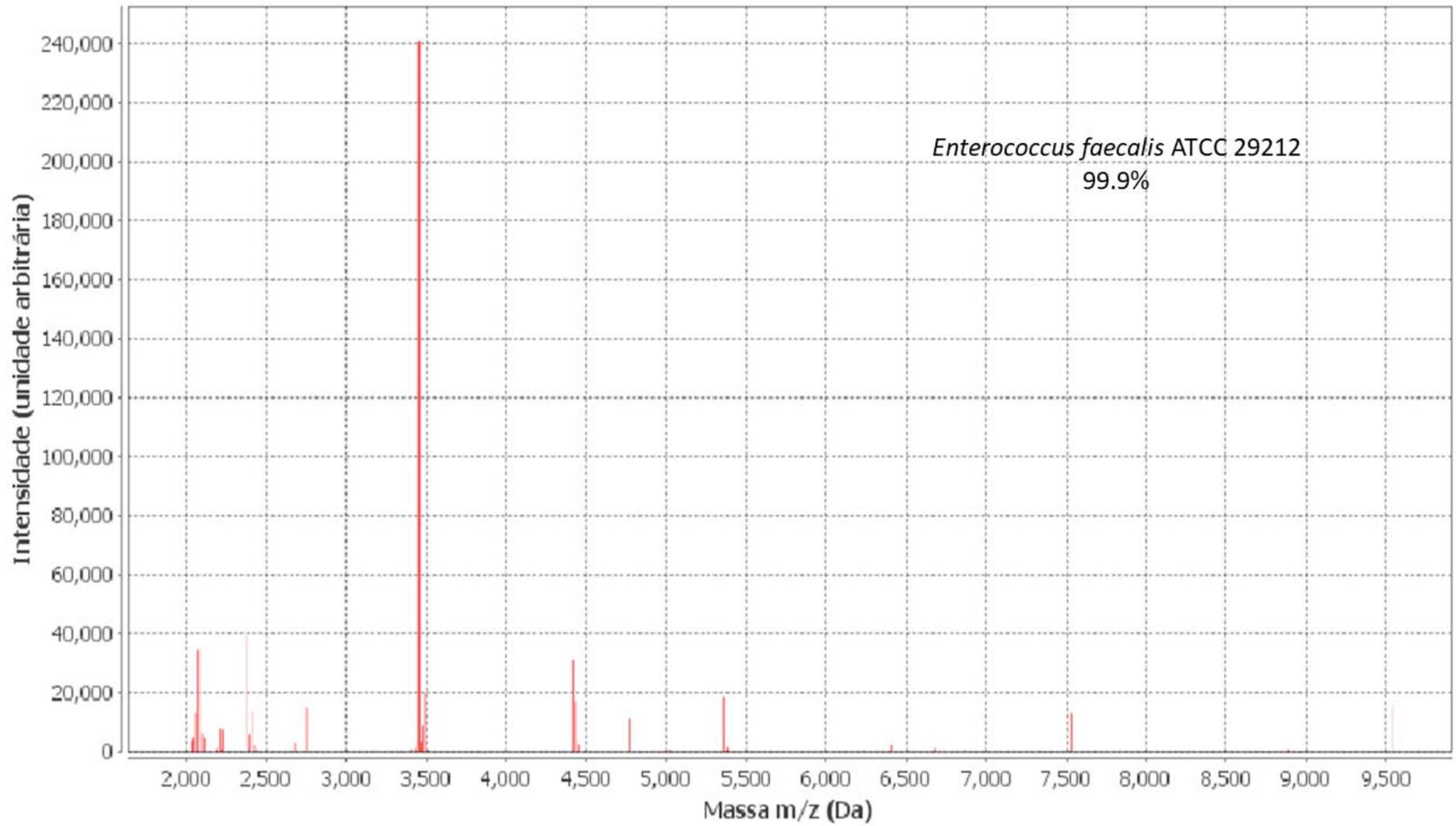
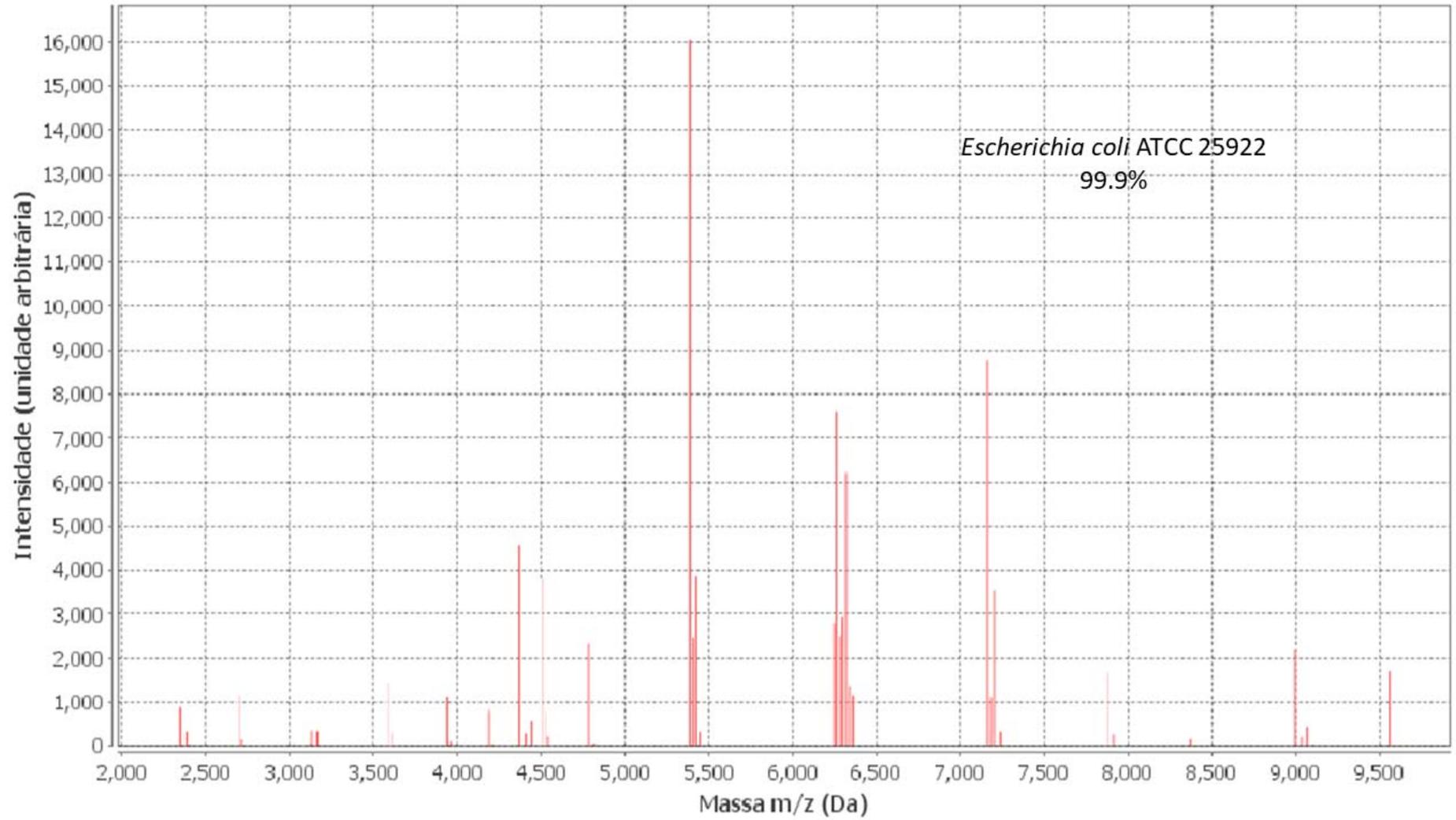


Figura 25. Identificação de *Candida albicans* por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França)



**Figura 26.** Identificação de *Enterococcus faecalis* por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomérieux, França)



**Figura 27.** Identificação de *Escherichia coli* por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França)

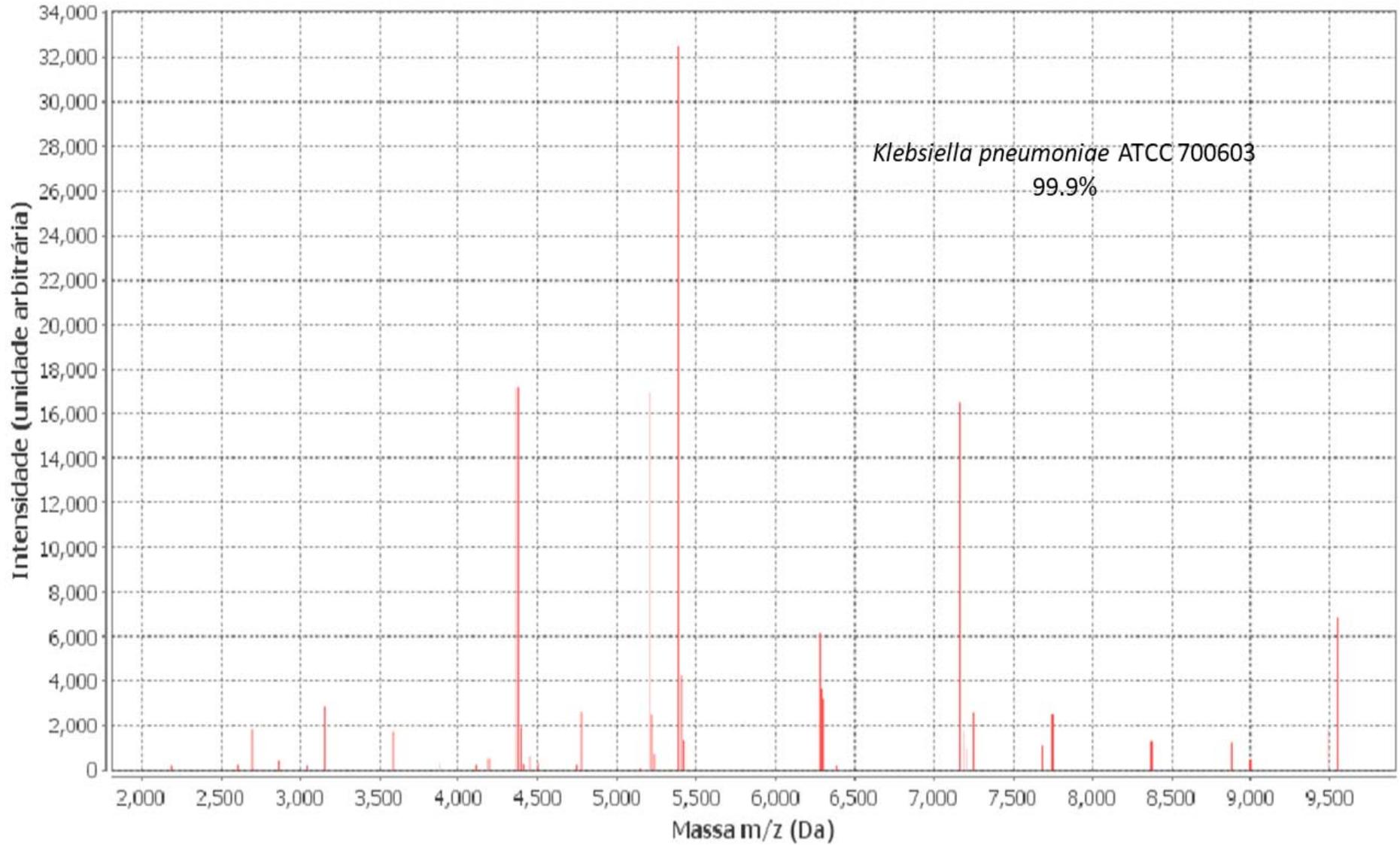
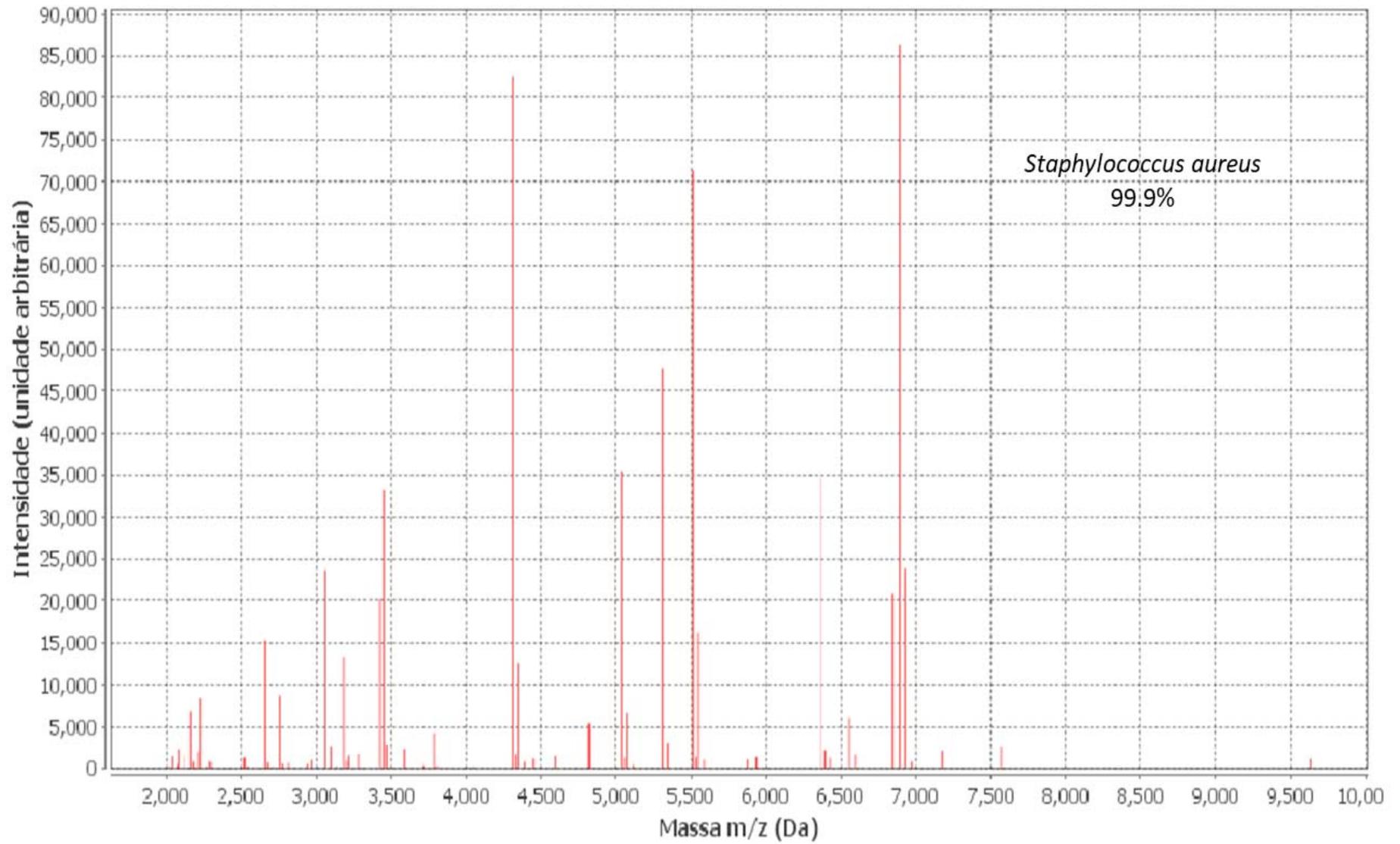
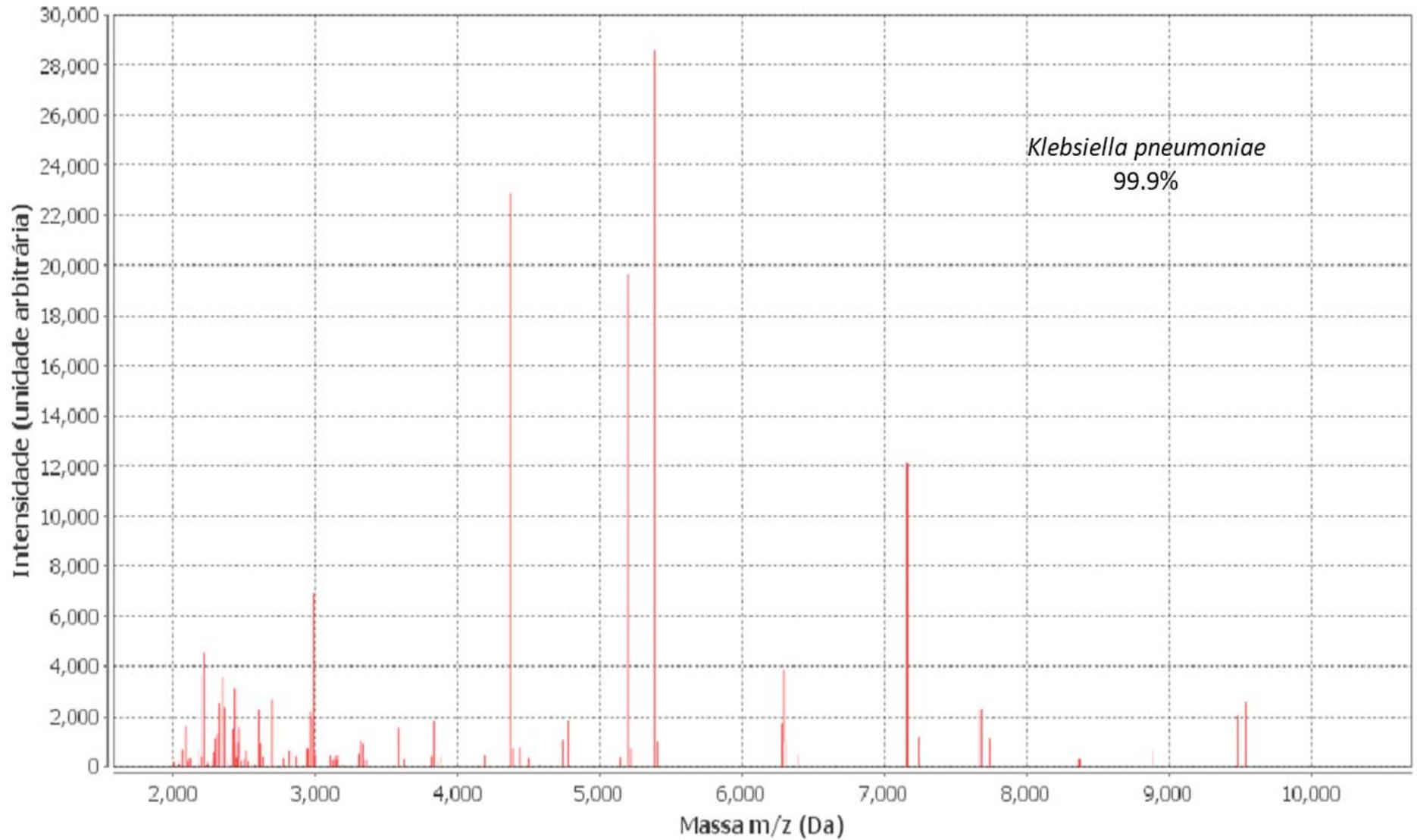


Figura 28. Identificação de *Klebsiella pneumoniae* por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomérieux, França)



**Figura 29.** Identificação de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França)



**Figura 30.** Identificação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França)

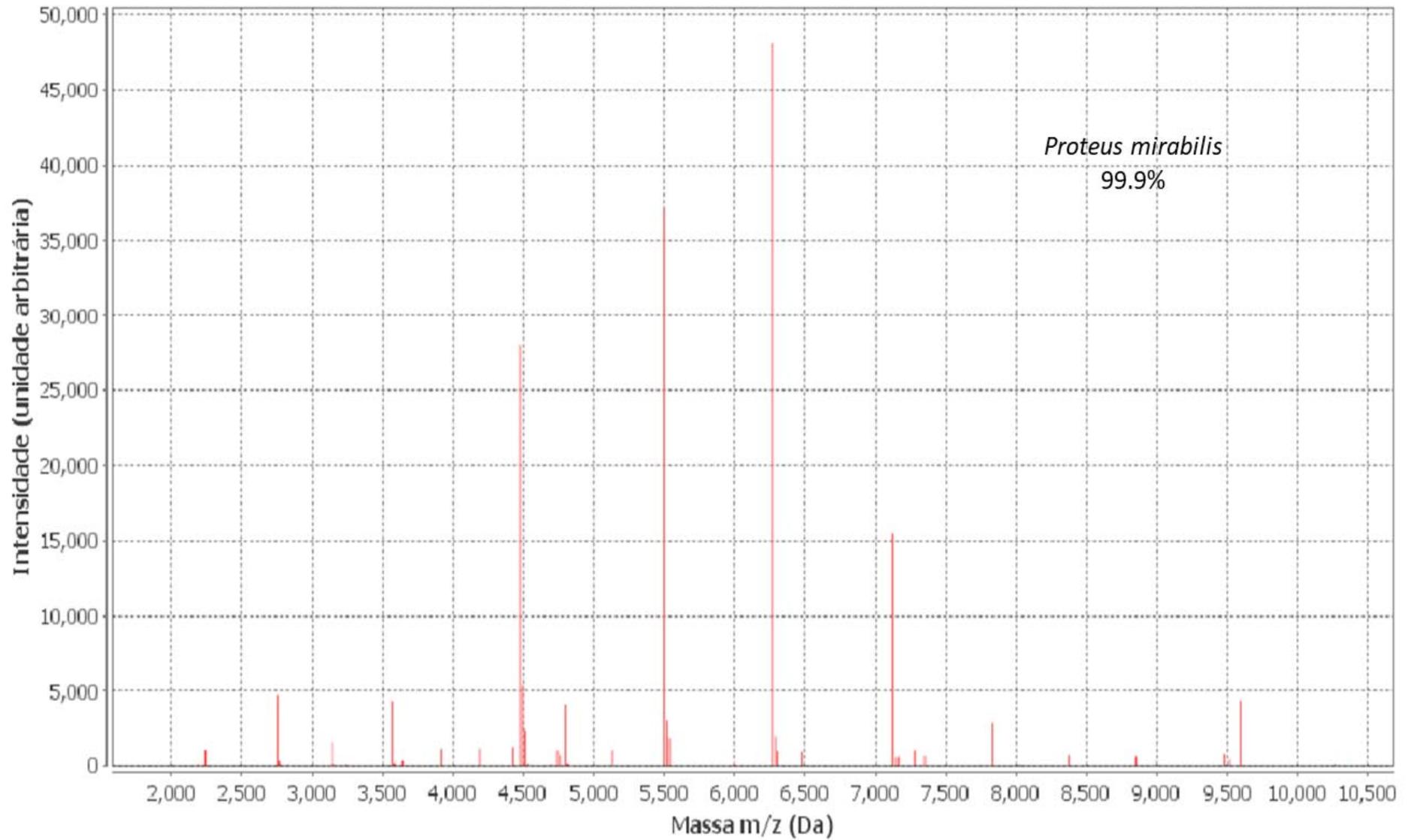
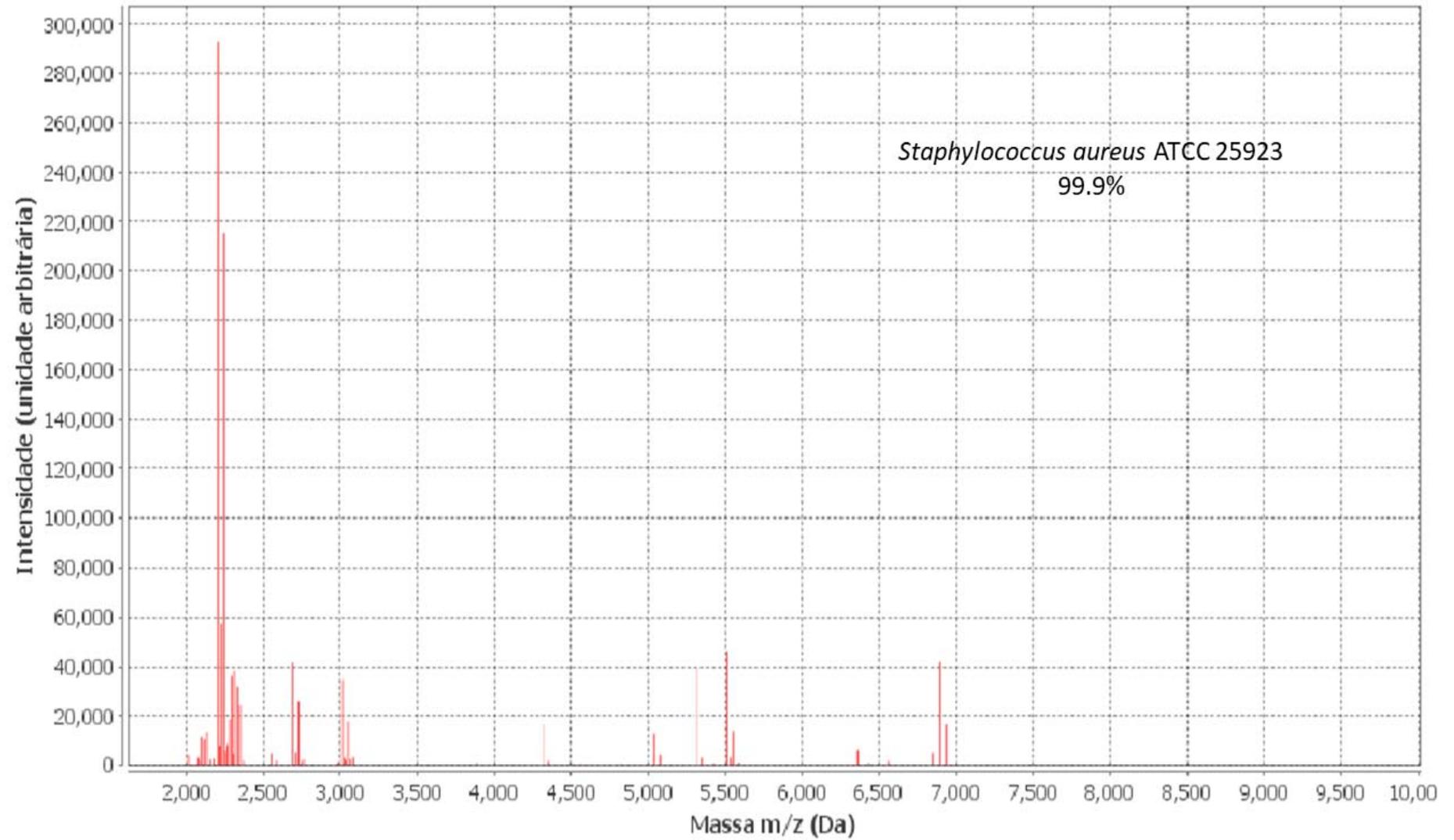


Figura 31. Identificação de *Proteus mirabilis* ATCC25933 por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França)



**Figura 32.** Identificação de *Staphylococcus aureus* por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF MS (Biomerieux, França)







Home
  Sobre
  Serviços
  Contato

ISO 9001
  ISO 15189
  ISO 17025
  ISO 17026



**Nome** : NAP FABIANO SILVA 05

**Código da OS** : 108-64719-9971

**DN** : 10/12/1983

**Médico** : Sem solicitação Médica

**Atendimento** : 12/03/2018

**Convênio**: BSB-IS NAP FABIANO SILVA

**Qnt de exames**: 2

**Unidade** : CRISPIM

**Página**: 1/1

Responsável Técnico: Lídia Freire Abdalla Nery - CRF 1453

Endereço da Unidade: SMHN Qd 02 Bloco C Sobreloja n°14

Laboratório registrado no CRF/DF sob o número 03/000054 e no CRM-DF número 3724

#### CULTURA (1a AMOSTRA)

**Método** : Cultivo em meio específico. Identificação por Espectrometria de massa (MALDI-TOF) e antibiograma automatizado VITEK II.

**Material**: RASPADO DE PELE

#### Resultado: *Escherichia coli*

**Vz**: Para sítios estéreis : Negativa ou ausência de microrganismos.

Para sítios com microbiota: Negativa ou ausência de microrganismos patogênicos.

Classificação/Categoria	Antimicrobiano	MIC
Sensível	Amicacina	<=2
	Ampicilina	4
	Ampicilina/sulbactam	<=2
	Cefepima	<=1
	Cefoxitina	<=4
	Ceftazidima	<=1
	Ceftriaxona	<=1
	Cefuroxima	4
	Cefuroxima Axetil	4
	Ciprofloxacina	<=0.25
	Ertapenem	<=0.5
	Gentamicina	<=1
	Imipenem	<=0.25
	Meropenem	<=0.25
	Piperacilina/Tazobactam	<=4
Tigeciclina	<=0.5	

#### ESBL Negativo

Na seleção de antimicrobiano para tratamento, os dados de MIC devem ser analisados em conjunto com as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga, sendo que, as MICS de diferentes drogas não são comparáveis entre si.

MIC - Concentração Inibitória Mínima expressa em mcg/mL.

Nota: Na definição dos critérios interpretativos de sensibilidade foram utilizados os pontos de corte propostos pelo CLSI 2017 e EUCAST 2017 e NT- ANVISA 01/2013.

Para as drogas que não tem pontos de corte definidos pelos documentos em 2017 foram utilizadas as referências dos documentos de 2015.

**Liberação**: 19/04/2018 - 10:32:58

LIBERADO ELETRONICAMENTE POR DRA. LIDIA FREIRE ABDALLA CRF-DF 1453

#### ASSINATURA DIGITAL

949EABB7ABB7ABB7ABB7ABB7ABB7ABB7ABB7ABB7A998A998ABB7ABB7ABB7ABB7ABB7

Para a interpretação de todos os resultados é necessário correlacionar com informações clínicas contidas apenas por seu médico responsável.

Resposta de emergência:

**(61) 3329.8000**

**Figura 35.** Perfil de susceptibilidade de *Escherichia coli* determinado pela automação Vitek 2 XL (Biomérieux, França)









