



PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS E SEUS ANÁLOGOS: PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS, ANTIFÚNGICAS, ANTIPARASITÁRIAS E CITOLÍTICAS

**ALUNO: DIOGO GUTIERRES DE ALMEIDA
ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIANA DE SOUZA CASTRO**

**BRASÍLIA
2018**



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

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS E SEUS ANÁLOGOS: PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS, ANTIFÚNGICAS, ANTIPARASITÁRIAS E CITOLÍTICAS

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.

**ALUNO: DIOGO GUTIERRES DE ALMEIDA
ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIANA DE SOUZA CASTRO**

**BRASÍLIA
2018**



Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal
Universidade de Brasília

Diogo Gutierrez de Almeida

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS E SEUS ANÁLOGOS: PROPRIEDADES
ANTIBACTERIANAS, ANTIFÚNGICAS, ANTIPARASITÁRIAS E CITOLÍTICAS**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro

Presidente

Departamento de Ciências Fisiológicas/IB

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Simone Nardin Weis

Membro Titular

Departamento de Biologia Celular/IB

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Jacqueline Coimbra Gonçalves

Membro Titular

Centro Universitário de Brasília - UniCEUB

Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Membro Suplente

Departamento de Genética e Morfologia/IB

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram a realizar esse trabalho e especialmente:

- ✓ À minha família, por sempre ter me dado o suporte necessário.
- ✓ À Profa. Dra. Mariana S. Castro, pela orientação e pelo conhecimento.
- ✓ Ao Dr. Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior pela orientação na realização dos ensaios com *T. cruzi*.
- ✓ À Dra. Alice da Cunha Morales Álvares e à Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas pela orientação na realização dos experimentos de dicroísmo circular.
- ✓ Ao mestrando Fabiano Fagundes Moser da Silva pela orientação na realização dos experimentos de citólise.
- ✓ Ao MSc Carlos José Correia de Santana pela orientação no uso do Prism.
- ✓ Ao Matheus, Lucas e Victor pela amizade ao longo da graduação e do mestrado.
- ✓ À Naywara pelo companheirismo e pela força ao longo desses anos.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Peptídeos antimicrobianos de anuros e seus análogos: propriedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias e citolíticas” desenvolvida por Diogo Gutierrez de Almeida sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos números 311202/2015-2 - Produtividade em Pesquisa e 407801-2013 - Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processos números. 193.000.955/2015, 0193.000417/2016 e 0193.001736/2017), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

A crescente resistência de microrganismos patogênicos aos antibióticos convencionais vêm despertando a necessidade de novas alternativas para o combate destes patógenos. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs), moléculas envolvidas na imunidade inata dos seres vivos, vem se mostrando como uma boa alternativa terapêutica. No presente estudo foram avaliadas as propriedades inibitórias das natererinas, uma classe de PAMs previamente isolada do anuro *Physalaemus nattereri*, e de 4 novos análogos desenhados a partir das estruturas das natererinas sobre microrganismos de interesse médico como bactérias, fungos e o parasita *Trypanosoma cruzi*, bem como sobre os vírus causadores da febre amarela e da dengue. Além disso, foram avaliados também os seus efeitos citolíticos sobre eritrócitos e leucócitos humanos e citotóxicos sobre células de hepatoma humano Huh7. As natererinas apresentaram atividade antimicrobiana sobre as bactérias patogênicas avaliadas, principalmente contra as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e contra a levedura encapsulada *C. neoformans*. Dentre as três natererinas, a natererina 2 foi a que apresentou a melhor atividade inibitória, com valores de CMI iguais a 2 μM para a bactéria *K. pneumoniae* e a 4 μM para a levedura *C. neoformans*, valores que sinalizam para o potencial terapêutico desses PAMs. No caso dos análogos das natererinas, o análogo 1 obteve melhora em suas propriedades inibitórias em quase todos os casos quando comparado aos 3 peptídeos selvagens demonstrando ganho de atividade sobre as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* e sobre a levedura *C. albicans*, com valores de CMI que variaram de 64 a 2 μM ; em oposição, o análogo 2 teve seu desempenho piorado com perda da capacidade inibitória em vários casos. Já o análogo 3 teve desempenho piorado em alguns casos, mas foi o que obteve os melhores valores de CMI para as espécies de fungos analisadas, com ganho significativo de potência sobre *C. albicans* (CMI = 16 μM), em comparação com os peptídeos selvagens que apresentaram CMI = 128 μM . Os efeitos das natererinas e de seus análogos sobre a viabilidade do parasita *T. cruzi* foram parciais, sendo que nenhum dos peptídeos testados conseguiu inibir completamente o parasita mesmo nas maiores concentrações empregadas (128 μM). Nos experimentos realizados para se avaliar os efeitos inibitórios sobre a replicação de arbovírus, observou-se que as natererinas exibiram efeitos citotóxicos altos com valores de IS que variaram de 1,98 a 3,93 (para o vírus da febre amarela). Já no caso do vírus da dengue, a natererina 3 apresentou uma atividade mais relevante com valor de IS = 8,24. Ao se analisar o desempenho dos análogos, o análogo 1 apresentou o melhor valor de IS (7,34), exibindo possível potencial terapêutico devido à baixa concentração necessária para inibir a replicação do vírus da febre amarela (EC_{50} = 1,66 μM). Tal comportamento se repetiu no caso do vírus da dengue, onde o análogo 1, que continuou sendo o que agiu de maneira mais eficaz, com IS = 10,85. Apenas o análogo 2 exibiu atividade citolítica relevante sobre eritrócitos humanos na concentração de 128 μM , promovendo a lise de quase metade dos eritrócitos presentes na amostra. Os leucócitos humanos mostraram-se mais susceptíveis à ação citolítica dos peptídeos, com exceção da natererina 2 e dos análogos 2 e 3 que exibiram baixas taxas de citólise sobre esse tipo celular. Todos os peptídeos foram capazes de formar estruturas em α -hélice em ambiente membrana-mimético (na presença de micelas de SDS). O presente estudo reforça o potencial terapêutico dos PAMs isolados da secreção cutânea de anuros e dos análogos produzidos a partir deles como agentes anti-infecciosos e antiparasitários de largo espectro.

Palavras-chave: Anuros, análogos sintéticos, peptídeos antimicrobianos, natererinas, propriedades inibitórias, patógenos e parasitas

ABSTRACT

The increasing resistance of pathogenic microorganisms to conventional antibiotics has led to the need for new alternatives to combat these pathogens. Antimicrobial peptides (AMPs), molecules involved in the innate immunity of living beings, have been considered a good therapeutic alternative. In the present study, the inhibitory properties of nattererins, a class of AMPs previously isolated from the anuran *Physalaemus nattereri*, and of 4 new analogues designed based on nattererins structures were evaluated on microorganisms of medical interest such as bacteria, fungi and the parasite *Trypanosoma cruzi* as well as on yellow fever and dengue virus. In addition, their cytolytic effects on human erythrocytes and leukocytes and cytotoxicity on Huh7 human hepatoma cells were also assessed. Nattererins exhibited antimicrobial activity on pathogenic bacteria, mainly against Gram-negative bacteria (*E. coli* and *K. pneumoniae*) and on the encapsulated yeast *C. neoformans*. Among the three nattererins, nattererin 2 showed the best inhibitory activity, with MIC values equal to 2 μM for *K. pneumoniae* and 4 μM for yeast *C. neoformans*, values that indicate the therapeutic potential of these AMPs. Considering the properties of the analogues, analogue 1 showed improvements in its inhibitory properties in almost all cases when compared to the wild peptides (demonstrating gain of activity on bacteria *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* and on the yeast *C. albicans*, with MIC values ranging from 64 to 2 μM). Analogue 2 had its performance worsened with loss of inhibitory capacity in several cases, while analogue 3 had a worse performance in some cases, but it exhibited best MIC values for the fungal species analyzed, with a significant gain of potency over *C. albicans* (MIC = 16 μM), compared to the wild peptides with MIC = 128 μM . The effects of nattererins and their analogues on *T. cruzi* viability were partial, and none of the tested peptides could completely inhibit the parasite even in the largest concentration used (128 μM). In experiments performed to evaluate the inhibitory effects on arbovirus replication, nattererins exhibited high cytotoxic effects with SI values ranging from 1.98 to 3.93 (for yellow fever virus). In the case of the dengue virus, nattererin 3 had a more relevant activity with SI = 8.24. When analyzing the analogue performance, analogue 1 presented the best SI value (7.34), showing a putative therapeutic potential due to the low concentration required to inhibit the yellow fever virus replication (EC_{50} = 1.66 μM). This behavior was repeated in the case of dengue virus, where the analogue 1, which remained the most effective, with SI = 10.85. Only analogue 2 exhibited significant cytolytic activity on human erythrocytes at the concentration of 128 μM , promoting the lysis of nearly half of the erythrocytes present in the sample. Human leukocytes were more susceptible to peptides cytolytic activity, with the exception of nattererin 2 and analogues 2 and 3, which showed low rates of cytolysis on this cell type. All peptides were able to form α -helix structures in membrane-mimetic environment (in the presence of SDS micelles). The present study reinforces the therapeutic potential of AMPs isolated from the cutaneous secretion of anurans and the analogues inspired on them as anti-infectives and antiparasitic agents of broad spectrum.

Key words: Anurans, synthetic analogues, antimicrobial peptides, nattererins, inhibitory properties, pathogens and parasites

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustrações dos principais modelos de ação dos PAMs sobre a membrana bacteriana.....	12
Figura 2. Modos de ação dos PAMs.....	13
Figura 3. Modificações da superfície bacteriana que aumentam a resistência contra PAMs.....	16
Figura 4. Indivíduo adulto da espécie <i>Physalaemus nattereri</i> . Comportamento deimático de <i>P. nattereri</i> exibindo os ocelos na região posterior do corpo.....	17
Figura 5. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após incubação por 96 horas com a natererina 1 (A) e com a natererina 2 (B).....	30
Figura 6. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após incubação por 96 horas com a natererina 3.....	31
Figura 7. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após incubação por 96 horas com os análogos 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D).....	32
Figura 8. Efeitos do Interferon α 2a (A, controle positivo) e das natererinas 1, 2 e 3 (B, C e D, respectivamente) sobre a proliferação de células Huh7 e a replicação do vírus da febre amarela.....	33
Figura 9. Efeitos dos análogos das natererinas (A, B, C e D, respectivamente) sobre a proliferação de células Huh7 e a replicação do vírus da febre amarela.....	34
Figura 10. Efeitos do Interferon α 2a (A, controle positivo) e das natererinas 1, 2 e 3 (B, C e D, respectivamente) sobre a proliferação de células Huh7 e a replicação do vírus da dengue.....	36

Figura 11. Efeitos dos análogos das natererinas (A, B, C e D, respectivamente) sobre a proliferação de células Huh7 e a replicação do vírus da dengue.....	36
Figura 12. Efeitos citolíticos das natererinas (N1, N2 e N3) e seus análogos (A1, A2, A3 e A4) na concentração de 128 μ M sobre eritrócitos humanos após 1 hora de incubação.....	37
Figura 13. Efeitos citolíticos das natererinas (N1, N2 e N3) e seus análogos (A1, A2, A3 e A4) na concentração de 128 μ M sobre leucócitos totais humanos após 1 hora de incubação.....	38
Figura 14. Espectros dicróicos das natererinas 1 (A), 2 (B) e 3 (C) a 50 μ M em água e em SDS 35 mM.....	39
Figura 15. Espectros dicróicos dos análogos 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) a 50 μ M em água e em SDS 35 mM.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas primárias e cargas líquidas das natererinas 1, 2 e 3.....	26
Tabela 2. Efeitos antimicrobianos (CMI ₅₀ , μM) das natererinas sobre bactérias e fungos patogênicos.....	27
Tabela 3. Efeitos antimicrobianos (CMI ₅₀ , μM) dos análogos das natererinas sobre bactérias e fungos patogênicos.....	29
Tabela 4. Concentração efetiva 50% (μM), concentração citotóxica 50% (μM) e índice de seletividade (IS) das natererinas e seus análogos sobre o vírus da febre amarela e células Huh7.....	33
Tabela 5. Concentração efetiva 50% (μM), concentração citotóxica 50% (μM) e índice de seletividade (IS) das natererinas e seus análogos sobre o vírus da dengue e células Huh7.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection

ATP - *Adenosine triphosphate* - Adenosina trifosfato.

CC₅₀ – Concentração que causa 50% da citotoxicidade máxima

CMI - *Minimum inhibitory concentration* - Concentração mínima inibitória

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

DENV – *Dengue virus* – sorotipo do vírus da dengue

DMSO – Dimetilsulfóxido

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

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

IS – Índice de seletividade

LIT - *Liver Infusion Tryptose*

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

mM – Milimolar

n.a. – Não ativo

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

nm – Nanômetro

nM – Nanomolar

p/v – Peso/volume

PAMs - Peptídeos antimicrobianos

RPM – Rotações por minuto

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

v/v – Volume/volume

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

µM – Micromolar

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Protozoários patogênicos	2
1.1.1. Doença de Chagas	2
1.2. Bactérias patogênicas.....	3
1.2.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	5
1.2.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
1.3. Fungos patogênicos	6
1.3.1. <i>Candida albicans</i>	7
1.3.2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	8
1.4. Vírus	8
1.4.1. Febre amarela.....	9
1.4.2. Dengue	9
1.5. Peptídeos antimicrobianos	10
1.5.1. Mecanismos de resistência contra PAMs	14
1.6. <i>Physalaemus nattereri</i>	16
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Desenho racional e síntese química dos análogos propostos.....	19
4.2. Dosagem dos peptídeos sintéticos.....	19
4.3. Ensaio sobre bactérias patogênicas	20
4.4. Ensaio sobre fungos patogênicos.....	21
4.5. Ensaio sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	21
4.6 Ensaio antivirais	22
4.6.1. Vírus da febre amarela.....	22
4.6.2. Vírus da dengue.....	23
4.7. Ensaio citolítico sobre células sanguíneas humanas	24
4.8. Análises da estrutura secundária dos peptídeos por difração circular.....	24

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Ensaio sobre bactérias e fungos patogênicos	26
5.2. Ensaio sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	30
5.3. Ensaio antivirais	32
5.4. Ensaio citolítico sobre células sanguíneas humanas	37
5.5. Análises da estrutura secundária dos peptídeos por dicroísmo circular.....	39
6. CONCLUSÃO	41
7. PERSPECTIVAS	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

A crescente resistência de microrganismos aos compostos antimicrobianos tradicionais vem sendo fonte de preocupação da comunidade científica há algum tempo (Jindal *et al.*, 2015; Luepke *et al.*, 2017). Doenças que hoje são, em sua maior parte, facilmente tratáveis (ou pelo menos tratáveis, mesmo que com dificuldade), na era pré penicilina podiam ser consideradas uma sentença de morte. Sair de casa e entrar em contato com pessoas tossindo na rua podia resultar em uma tuberculose fatal (Smith *et al.*, 2013). Doenças sexualmente transmissíveis, como a sífilis, além de matarem, ainda desfiguravam as pessoas afetadas no decorrer da doença (Ambrose, 2016).

Atualmente, o uso indiscriminado ou incorreto de antimicrobianos, seja por erro médico, erro do paciente ao utilizar esses compostos (ao desistir do uso do medicamento no meio do tratamento) ou até mesmo pelo uso em larga escala na pecuária, tem selecionado microrganismos com resistência, aumentando sua presença e ligando o sinal de alerta para o fato de que, se nada for feito, problemas como os citados anteriormente podem voltar a ser comuns (Mole, 2013; Jindal *et al.*, 2015).

A prescrição de antibióticos tem sido objeto de estudo nos últimos anos. Coenen *et al.* (2013) observaram que um grande número de pacientes chegam ao consultório médico já esperando por uma prescrição de antibióticos e isso, por sua vez, influencia na decisão do médico de concedê-la. O anseio do paciente para obter a prescrição para resolver seus problemas de saúde rapidamente combinado à percepção equivocada de que os antibióticos podem tratar doenças como resfriados e outras doenças virais (Comissão Europeia, 2010), assim como médicos cedendo às pressões do paciente, resultam em antibióticos sendo utilizados de maneira inapropriada ou desnecessária em grande escala.

Mesmo contra os antimicrobianos de último recurso, que possuem alta atividade microbicida, ao custo de uma alta toxicidade ao organismo e diversos efeitos colaterais, os microrganismos vêm apresentando resistência (Reardon, 2017). Para contornar esse crescente problema, pesquisadores têm buscado alternativas aos compostos antimicrobianos atualmente utilizados. Essas alternativas incluem bacteriófagos, óleos essenciais, ácidos orgânicos e metais, minerais e nanopartículas antimicrobianas (Willing, 2018), além dos

peptídeos antimicrobianos, um dos temas centrais deste trabalho (Mandal *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2018).

1.1. Protozoários patogênicos

Doenças parasitárias provocadas por protozoários são um sério problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento ou pobres. Doenças como a leishmaniose, a malária e a doença de Chagas atingem milhões de pessoas em todo o mundo, interferindo diretamente com a capacidade produtiva da população dos países atingidos (Guimarães *et al.*, 2016; Torrent *et al.*, 2012). Os tratamentos existentes são dispendiosos e não são eficientes, havendo a necessidade de mais estudos voltados para o desenvolvimento de tratamentos alternativos aos existentes (Angélique *et al.*, 2015).

1.1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é considerada uma enfermidade negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que estima em 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria delas na América Latina (OMS¹). Martins-Melo *et al.* (2014) estimaram que o número de pessoas infectadas no Brasil pode variar entre 1,9 e 4,6 milhões de pessoas.

A doença de Chagas possui uma fase aguda, que dura algumas semanas e frequentemente transcorre sem sintomas, e uma fase crônica, que pode levar ao desenvolvimento de problemas cardíacos e digestórios (CDC¹). Atualmente, existem apenas duas drogas disponíveis para o tratamento da doença de chagas, o nifurtimox e o benznidazol. Ambas são efetivas se administradas na fase aguda da doença, mas perdem eficácia em infecções prolongadas, além de possuírem diversos efeitos colaterais (Lewies *et al.*, 2015).

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando o vetor triatomíneo se alimenta do vertebrado hospedeiro e libera, nas suas fezes, a forma alongada (tripomastigota metacíclico) do parasito, que entra na corrente sanguínea do hospedeiro através de ferimentos (muitas vezes causados pelo próprio triatomíneo) ou mucosas. Uma vez no organismo do hospedeiro, os parasitos invadem células, diferenciam-se na forma amastigota e se multiplicam por fissão binária. Após alguns ciclos de fissão, eles revertem à forma tripomastigota e são liberados na corrente sanguínea, invadindo novas células e se

multiplicando. Se o hospedeiro infectado for picado pelo inseto vetor, este poderá ingerir o parasito que, em seu intestino, irá se diferenciar na forma epimastigota a qual se reproduz por fissão binária e poderá ser liberado novamente pelas fezes do vetor na forma tripomastigota infectante, completando o ciclo (FIOCRUZ).

1.2. Bactérias patogênicas

Bactérias são organismos procariontes, possuindo material genético espalhado pelo citoplasma. Elas estão distribuídas por todo o mundo, habitando locais inóspitos para quase todos os outros organismos, como a crosta terrestre, fontes hidrotérmicas e lixo nuclear. Outro lugar inóspito que bactérias habitam é o sistema digestivo dos seres humanos. Mas sua presença no corpo humano não se limita ao trato digestivo. Estima-se que a quantidade de células bacterianas dentro de nossos corpos é próxima (e até um pouco maior) à quantidade de células humanas próprias (Sender *et al.*, 2016).

Bactérias são normalmente divididas em dois grupos: as Gram-positivas e as Gram-negativas. Bactérias são assim classificadas devido ao processo de coloração desenvolvido pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram em 1884: bactérias Gram-positivas retêm a coloração da fase inicial, resistindo à descoloração e se apresentando como células azuis ou violetas ao microscópio, ao contrário das bactérias Gram-negativas, que perdem o corante violeta na fase de descoloração e acabam se apresentando como células vermelhas, devido à adição de fucsina na fase final da coloração. Essa diferença nas colorações se dá pelas diferentes composições e conformações da superfície celular desses microrganismos. A parede celular mais espessa, com grande quantidade de peptidoglicanos, das bactérias Gram-positivas apresentam maior resistência ao agente descolorante, o que não ocorre com as bactérias Gram-negativas, que possuem uma parede celular mais fina, com menor quantidade de peptidoglicano e protegida pela membrana externa que envolve a célula (Beveridge, 2001).

1.2.1. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis é uma bactéria Gram-positiva e faz parte da microbiota humana (e de outros mamíferos (Kloos e Schleifer, 1986), mais especificamente da pele, com maior frequência, e das mucosas, onde está menos presente (Fey e Olson, 2010). Tal bactéria em um

indivíduo saudável geralmente não causa complicações, mas indivíduos com imunidade baixa podem sofrer com infecções causadas por *S. epidermidis*, sendo assim um patógeno oportunista. Essa espécie é um problema em particular para pessoas portadoras de cateteres ou outros dispositivos intravasculares, pois ela forma biofilmes quando infectando regiões com esses aparatos (Salyers e Whitt, 2002). Esse biofilme hidrofóbico é um grande fator de virulência para a espécie, pois dificulta a ação de antibióticos e permite a adesão de outras bactérias, formando várias camadas de biofilme (Nilsson *et al.*, 1998). Por estar presente na microbiota humana, *S. epidermidis* exibe resistência contra a maioria dos antibióticos amplamente utilizados como meticilina, rifamicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, clindamicina e sulfonamidas (Otto, 2010)

1.2.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus, assim como *S. epidermidis* e todas as outras aproximadamente 40 espécies do gênero *Staphylococcus*, é uma bactéria Gram-positiva. Está presente de maneira natural no nariz, trato respiratório e na pele de humanos (Das *et al.*, 2016), não causando complicações a indivíduos com imunidade normal. Em indivíduos debilitados, entretanto, *S. aureus* pode causar desde infecções na pele e em diversos sítios de feridas até complicações mais graves como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite (ANVISA).

Um importante fator de virulência de *S. aureus* é a sua capacidade de secretar a enzima coagulase, uma característica que compartilha com outras 6 espécies do gênero *Staphylococcus* (Sasaki *et al.*, 2010). A coagulase atua formando coágulos no plasma do indivíduo, causando abscessos e protegendo a célula bacteriana de fagocitose, facilitando sua replicação e permanência no organismo infectado, o que pode resultar em sepse (McAdow *et al.*, 2012).

As linhagens mais preocupantes de *S. aureus*, as *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, em inglês), são um desafio para hospitais do mundo inteiro. É estimado que nos Estados Unidos morram 12.000 pessoas anualmente por infecção por MRSA (CDC²).

1.2.3. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria Gram-negativa que habita o meio ambiente, alimentos e os intestinos de humanos e animais (CDC³). A maioria dos isolados da espécie são inofensivos, presentes naturalmente na microbiota intestinal e inclusive beneficiam o hospedeiro ao produzir vitamina K2 (Bentley e Meganathan, 1982), mas alguns podem causar diarreia, infecção do trato urinário, doenças respiratórias, pneumonia e outros problemas (CDC³).

Um fator de virulência particularmente importante em *E. coli* é a produção da toxina shiga, que pode causar falha renal grave e diarreia com sangue (CDC³). Outros fatores de virulência incluem adesinas (como fimbrias e proteínas da membrana externa), produção de hemolisinas e leucotoxinas (principalmente HlyA), antígeno capsular K (que protege a bactéria de fagocitose) e secreções do sistema tipo 3 (provocam a perda das microvilosidades dos enterócitos e permitem o livre ancoramento com a membrana externa) (Johnson, 1991; Mainil, 2013), bem como toxinas termolábeis ou termorresistentes, que são oligopeptídeos secretados pela bactéria e responsáveis por infecção alimentar (Mainil, 2013; CDC⁴).

Algumas linhagens de *E. coli* estão entre as bactérias chamadas Enterobacteriaceae resistente a carbapenema (*Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae* – CRE, em inglês) (Guh Alice *et al.*, 2015), um grupo de bactérias Gram-negativas que produz a enzima carbapenemase, que inativa os antibióticos dessa classe, considerados o último recurso para infecções por esses organismos. As CRE estão entre as três ameaças mais graves entre os microrganismos resistentes à antibióticos (CDC⁵).

1.2.4. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa encontrada nos intestinos, boca e pele de humanos (Ryan e Ray, 2004). Também é encontrada em solos férteis, onde pode fixar nitrogênio (Postgate, 1998). É um patógeno oportunista que causa complicações com maior frequência em indivíduos hospitalizados e que usam aparelhos médicos como cateteres, além de indivíduos que fazem uso prolongado de antibióticos (CDC⁶). A espécie causa diversos tipos de infecção, como pneumonia, infecção do trato urinário, abscessos no fígado e bacteremia (Paczosa e Mecsas, 2016). Em ambientes hospitalares, um dos grandes fatores de complicação para pacientes em ventilação mecânica é a invasão do trato respiratório por bactérias

resistentes a antibióticos a partir da inserção do tubo respiratório na traqueia, causando pneumonias com taxas de mortalidade entre 20 e 40% (Craven e Hjalmarson, 2010) .

Segundo Clegg e Murphy (2016), isolados mais virulentos de *K. pneumoniae* produzem uma cápsula viscosa de polissacarídeos, que impede sua fagocitose e confere proteção contra o soro do hospedeiro. Além disso, os pesquisadores também citam fímbrias como importantes fatores, facilitando a formação de biofilmes; sideróforos, que facilitam a captura de ferro pelo microrganismo; produção da enzima urease, que causa a precipitação de sais inorgânicos e problemas com cateteres; e alta resistência a antibióticos.

A bactéria *K. pneumoniae* é altamente resistente a antibióticos, com diversas linhagens resistentes a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina, entre outros (Nathisuwan *et al.*, 2001). A resistência mais preocupante da espécie, entretanto, é das linhagens que produzem a carbapenemase (Guh Alice *et al.*, 2015), sendo elas parte do grupo das CRE.

1.3. Fungos patogênicos

Fungos são organismos eucariontes, que possuem organelas e núcleo celulares envelopados por membranas. Uma das características que melhor definem o reino dos fungos é a presença de quitina em suas paredes celulares. A quitina é um longo polímero de carboidrato (N-acetilglicosamina) que confere rigidez e suporte estrutural à parede celular dos fungos (Gow *et al.*, 2017).

Os fungos, assim como as bactérias, estão presentes ao redor do mundo e podem habitar ambientes extremos como desertos ou áreas com alta concentração de sal (Vaupotic *et al.*, 2008). Esses organismos se apresentam de diversas maneiras: a maioria deles cresce como hifas, que podem ser de apenas uma ou diversas células alongadas conectadas. Quando várias hifas se juntam, elas formam os micélios, estruturas com diversas ramificações que são colônias fúngicas. Essas colônias, quando da classe dos basidiomicetos, formam os cogumelos, que contêm os esporos fúngicos para reprodução; existem também os fungos unicelulares, as chamadas leveduras, que têm grande importância econômica e cultural na fermentação de alimentos e bebidas alcoólicas; e os fungos que apresentam as duas formas (fungos dimórficos) (Carris *et al.*, 2012).

Apesar da grande importância dos fungos em nossa sociedade, eles também são responsáveis por diversos problemas, podendo causar doenças tanto em animais quanto em plantas e sendo consideradas pragas agrícolas em alguns casos (Talbot, 2003).

Em humanos, os fungos são geralmente patógenos oportunistas e podem causar diversas doenças como candidíase e aspergilose, entre outras, além de infecções localizadas. (Carris *et al.*, 2012).

1.3.1. *Candida albicans*

C. albicans é um fungo patogênico oportunista que habita naturalmente a microbiota gastrointestinal, urogenital e da boca de humanos e outros animais (Erdogan e Rao, 2015). Giacomazzi *et al.* (2016) estimaram que ocorrem aproximadamente 3 milhões de infecções graves por fungos do gênero *Candida* no Brasil por ano. Segundo o CDC⁷ a candidíase é uma infecção fúngica que pode atingir a boca, esôfago, genitais e a corrente sanguínea e o seu responsável mais comum entre os membros do gênero é *C. albicans*.

O fungo *C. albicans* apresenta diversos fatores de virulência. Gow e Yadav (2017), fizeram um perfil de virulência da espécie e ressaltaram alguns desses fatores: alteração da própria parede celular para modular a resposta imune do hospedeiro; expressão de invasinas, que induzem a absorção do fungo pelas células epiteliais; adesinas, que facilitam a formação de biofilmes, principalmente em aparelhos médicos como cateteres; enzimas hidrolíticas; e candidalisina, uma toxina que facilita sua penetração em tecidos e danifica o epitélio do hospedeiro. Além desses fatores, a capacidade que a espécie tem de mudar seu tipo celular de levedura para pseudohifa em resposta a diversas situações contribui para a virulência e adaptabilidade do fungo (Noble *et al.*, 2017).

O tratamento de infecções por *C. albicans* é normalmente feito com antifúngicos azólicos, como o fluconazol e o clotrimazol, mas a resistência dos microrganismos a estes medicamentos tem aumentado nos últimos anos (Whaley *et al.*, 2017). A anfotericina B é um medicamento que possui grande atividade antifúngica, mas sua alta nefrotoxicidade faz com que seja utilizada apenas como último recurso (Günter *et al.*, 2011).

1.3.2. *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans é uma levedura encapsulada obrigatoriamente aeróbia que pode viver em plantas e animais e causar problemas de saúde em indivíduos imunodeficientes, particularmente portadores de HIV, raramente sendo um problema para indivíduos imunocompetentes (CDC⁸).

Importantes fatores de virulência desse fungo são a cápsula de polissacarídeos, que protege a espécie de ambientes desfavoráveis, além de fosfolipases e vesículas extracelulares, que transportam diversas moléculas que facilitam a sobrevivência e entrada do fungo nos tecidos do hospedeiro (Alspaugh, 2015), ureases, que conferem resistência a ambiente ácidos (Rutherford, 2014) e a melanina, que diminui a fagocitose sobre o microrganismo, além de diminuir o efeito de drogas antifúngicas e espécies reativas oxigênio.

Infecções por *C. neoformans*, chamadas de criptococoses, normalmente afetam os pulmões, causando sintomas como tosse, falta de ar, dores no peito e febre, e o cérebro (meningite criptocócica), onde causam febre, dor de cabeça, náusea e vômito e outros sintomas (CDC⁸).

Indivíduos com criptococoses diagnosticadas geralmente precisam tomar medicamentos antifúngicos por seis meses ou mais. Se a infecção não for grave, o medicamento de escolha geralmente é o fluconazol; se ela for grave, a droga de escolha geralmente é a anfotericina B sozinha (CDC⁸) ou em conjunto com a flucitocina (NIH).

1.4. Vírus

Vírus são agentes infecciosos que não possuem metabolismo próprio, necessitando das estruturas celulares de outros organismos para se reproduzir. As formas e tamanhos dos vírus podem variar de acordo com a espécie, mas a estrutura geral sempre apresenta um capsídeo externo, formado por proteínas, que envolve os ácidos nucleicos (DNA ou RNA) que codificam para as proteínas do vírus. Alguns vírus possuem uma estrutura similar a uma membrana lipídica externa, chamada de cápsula ou envelope viral, formada por glicoproteínas e fosfolipídios derivados da célula hospedeira (Granoff e Webter, 1999).

1.4.1. Febre amarela

A febre amarela é uma doença viral hemorrágica aguda transmitida por mosquitos infectados. Nos últimos anos, a doença apresentou novo surto no Brasil, tendo matado 300 pessoas do início de julho de 2017 até 13 de março de 2018, dando início a campanhas de vacinação por parte do poder público, mesmo em áreas não tradicionalmente incluídas como áreas de risco (Ministério da Saúde¹).

Os sintomas da febre amarela incluem febre, dores de cabeça, dores musculares, náusea, vômito e fadiga (OMS²). Indivíduos infectados podem entrar numa segunda fase da doença, chamada de fase tóxica, que pode causar sangramento nos olhos, boca e trato gastrointestinal, resultando em vômito contendo sangue, além de febre alta e icterícia (CDC⁹), sintomas que levaram a sua denominação como febre amarela.

Não há medicamento específico para a febre amarela e o tratamento é sintomático, com analgésicos para a dor e reidratação (NHS¹).

1.4.2. Dengue

A dengue é uma doença tropical causada pelo vírus da dengue, um vírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (a mesma família dos vírus da Zika e da febre amarela), e transmitida por algumas espécies de mosquito do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*. Segundo o Ministério do Saúde², a dengue é a doença viral que mais se espalha no mundo, com 2,5 bilhões de pessoas vivendo em área de risco de contaminação e até 100 milhões de infecções por ano, com mais de 20 mil mortes nesse intervalo de tempo. Existem cinco sorotipos conhecidos do vírus da dengue (DENV 1, 2, 3, 4 e 5) (Mustafa *et al.*, 2014). A infecção por um sorotipo deixa a pessoa imunizada contra futuras infecções por esse sorotipo, mas uma segunda infecção por sorotipo diferente pode ser ainda mais grave, com maior chance de resultar em dengue hemorrágica (CDC¹⁰).

Os principais sintomas da dengue são febre alta, dores de cabeça e atrás dos olhos, dores nas juntas, músculos e ossos, sangramentos e irritação na pele. Na dengue hemorrágica pode haver vômito persistente, possivelmente com sangue, dores abdominais, manchas vermelhas na pele, dificuldade de respirar, sonolência e irritabilidade e sangramentos (CDC¹¹).

1.5. Peptídeos antimicrobianos

A classe Anfíbia contém 7.892 espécies descritas incluídas em três ordens: Apoda (cecilídeos), Caudata (salamandra e tritões) e Anura (sapos, rãs e pererecas) (Frost, 2018). Diante dos números atuais, o Brasil ocupa a primeira colocação na relação de países com maior riqueza de espécies de anfíbios, com 1.080 espécies descritas, seguido pela Colômbia e pelo Equador (Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2016).

Anfíbios utilizam sua pele úmida como órgão respirador auxiliar para compensar seu sistema respiratório primitivo. Por isso, seus habitats são restritos a lugares também úmidos, que são favoráveis ao crescimento de diversos microrganismos patogênicos. Para sobreviver nesses ambientes sem sofrer infecções, a pele dos anfíbios apresenta grande quantidade de glândulas que secretam substâncias hidratantes e peptídeos antimicrobianos para evitar infecções (Conlon, 2011; Kawasaki e Iwamuro, 2008; Shen *et al.*, 2015). De fato, a secreção cutânea dos anfíbios é conhecida como sendo uma rica fonte de peptídeos farmacologicamente ativos há bastante tempo e os PAMs isolados da secreção cutânea de anfíbios se apresentam como uma alternativa no desenvolvimento de drogas antimicrobianas (Torrent *et al.*, 2012).

Em sua revisão sobre os PAMs da pele de anfíbios, Xu e Lai (2015) relataram a existência de cerca de 1.900 PAMs descritos e demonstraram a enorme variedade de modos de ação e efeitos sobre diversos tipos de microrganismos, inclusive sobre protozoários e, também, sobre células tumorais. Tais PAMs foram encontrados em 178 espécies de anfíbios, distribuídos em 28 gêneros.

Os PAMs são uma família de peptídeos que surgiu há milhões de anos e cuja presença se conservou fortemente durante o processo evolutivo dos seres vivos (Muñoz *et al.*, 2016). Esses peptídeos podem ser encontrados em praticamente todos os grupos de organismos e podem promover a imunidade inata e eliminar microrganismos rivais na disputa pelo mesmo ambiente (Nawrocki *et al.*, 2014). Plantas, que não possuem imunidade adaptativa (mediada por linfócitos B e T), têm nos PAMs uma ferramenta importantíssima para a imunidade inata contra bactérias e fungos (Kumar *et al.*, 2018).

Eles apresentam diversas estruturas secundárias, divididas em três grupos principais: 1) peptídeos que adotam folhas- β , contendo de seis a oito resíduos de cisteína e estabilizados por duas ou mais ligações dissulfeto; 2) peptídeos sem resíduos de cisteína que adotam

conformações anfipáticas em α -hélice ao entrar em contato com a membrana do microrganismo alvo e 3) peptídeos lineares ou estendidos, que são ricos em triptofano, glicina, arginina, prolina e/ou histidina (Lewies *et al.*, 2015).

Peptídeos que não pertencem a nenhuma das três principais categorias geralmente são chamados de PAMs circulares (Vale *et al.*, 2014). Alguns autores também citam uma categoria de PAMs compostos por aminoácidos raros. (Guimarães *et al.*, 2016).

A estrutura secundária não é a única forma de dividir os PAMs. Também é possível dividi-los de acordo com sua carga: PAMs aniônicos (PAMAs) e PAMs catiônicos (PAMCs). Como a parede celular bacteriana é altamente carregada negativamente, os PAMCs têm maior capacidade de interagir com a membrana bacteriana e de causar danos a ela (Omardien *et al.*, 2016), sendo assim a classe de PAMs mais estudada para uso terapêutico, bem como a classe mais presente na natureza (Lewies *et al.*, 2015).

A hidrofobicidade e a anfipaticidade dos PAMs também são características importantes para sua ação antimicrobiana. A primeira diz respeito à porcentagem de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes no peptídeo e está relacionada à capacidade do PAM de interagir com e permeabilizar a bicamada lipídica dos microrganismos. A segunda diz respeito às diferentes regiões hidrofóbicas e hidrofílicas do peptídeo, não apenas na estrutura primária, mas também em sua conformação espacial e em como essas características influenciam nas interações entre os PAMs e os microrganismos (Kumar *et al.*, 2018). Essas características dos PAMs resultam em seus modos de ação. Existem quatro modelos principais (Figura 1) que descrevem a maneira como essas moléculas interagem com a membrana celular.

Wimley (2010) fez uma breve descrição desses quatro modelos. O primeiro é o modelo *barrel-stave*. Nele, os peptídeos vão se inserindo na membrana e interagem lateralmente, formando uma espécie de barril que lembra um canal iônico que desestabiliza a membrana celular. Esse modelo utiliza a própria estrutura de hidrocarbonetos da bicamada lipídica para se formar e se manter. O segundo modelo é o poro toroidal, em que os peptídeos não interagem uns com os outros, mas se inserem na membrana e afetam sua curvatura, formando um toróide que a desestabiliza. Aqui, os peptídeos agem contra os hidrocarbonetos da bicamada lipídica ao acabar com a separação natural entre a parte polar e apolar dessa estrutura. Isso ocorre porque os peptídeos inseridos na membrana oferecem superfícies para

que os hidrocarbonetos hidrofóbicos e a cabeça hidrofílica interajam. O terceiro modelo é o tipo carpete, em que as moléculas forram a membrana celular e, com o aumento de sua concentração, vão desestabilizando a membrana e causando perda de integridade estrutural, até que ela colapse. Após o colapso, os peptídeos formam micelas com os componentes da camada lipídica. Essa associação pós-lise é chamada de modelo detergente.

Apesar desses modelos serem sempre citados quando o mecanismo de ação dos PAMs é discutido, é provável que no caso dos dois modelos que formam poros (*barrel-stave* e toroidal, mas principalmente no modelo *barrel-stave*), a causa real da disrupção da membrana celular não sejam os poros em si, pois estudos realizados pelo próprio Wimley (2010), Perrin *et al.* (2016) e Ulmschneider (2017) vêm mostrando que as interações entre os peptídeos não são muito estáveis, se desfazendo rapidamente e não causando perda de material intracelular suficiente. Assim, o que causaria a disrupção da membrana seriam os efeitos dessa breve formação e desestabilização de estruturas transientes ao longo de toda a membrana. Wimley (2010) alerta que os peptídeos que, porventura, tenham mostrado ação citolítica por meio de formação de poros na membrana, possivelmente teriam sido beneficiados por uma alta concentração, caso em que qualquer molécula que interaja com a membrana poderia causar disrupção.

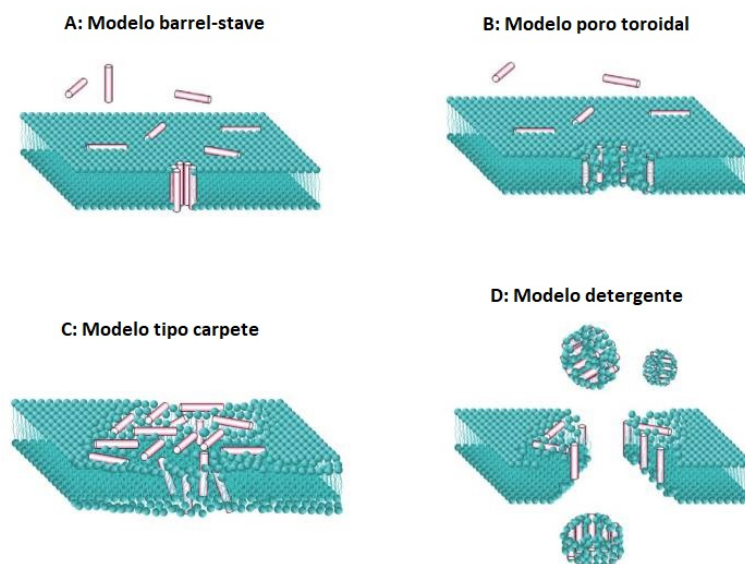


Figura 1. Ilustrações dos principais modelos de ação dos PAMs sobre a membrana bacteriana. Modificado de Wimley, 2010.

Apesar do principal mecanismo que os peptídeos antimicrobianos utilizam para matar microrganismos ser a permeabilização da membrana celular, alguns PAMs conseguem matar esses organismos sem danificá-la (Lewies *et al.*, 2015), podendo atravessar as membranas celulares externa e interna de bactérias Gram-negativas (Bechinger e Gorr, 2016) e inibir atividades enzimáticas no citoplasma, afetando a síntese de DNA/RNA e de proteínas (Figura 2). Os mecanismos de ação que os PAMs utilizam para internalização nas células de microrganismos ainda não foram completamente elucidados, mas é provável que a maioria deles se ligue à superfície da membrana e, devido à sua estrutura anfipática, se insiram na bicamada lipídica e formem poros que rapidamente se desfazem, mas que permitem a entrada das moléculas na célula. Um método utilizado por certos PAMs ricos em prolina é o de se associar à proteínas transportadoras da própria membrana para penetrar a superfície celular (Scocchi *et al.*, 2016).

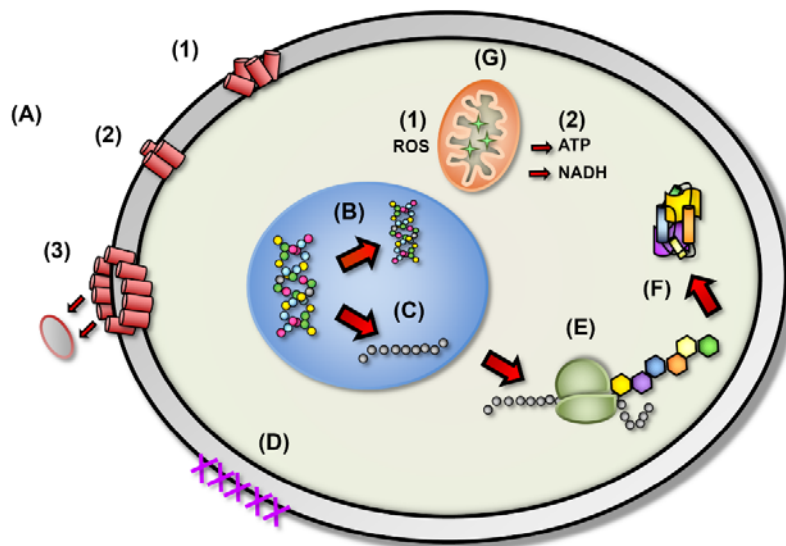


Figura 2. Modos de ação dos PAMs: (A) Disrupção da integridade da membrana celular: 1, 2 e 3 mostram os modelos de ação sobre a membrana. B) Inibição da síntese de DNA. C) Bloqueio da síntese de RNA. D) Inibição das enzimas necessárias para a ligação de proteínas estruturais da parede celular. E) Inibição das funções ribossômicas e síntese proteica. F) Bloqueio das proteínas chaperonas necessárias para o enovelamento correto de proteínas. G) Atingindo a mitocôndria (organismos eucariotos): (1) Inibição da respiração celular e indução da formação de espécies reativas de oxigênio. (2) Disrupção da integridade da membrana da mitocôndria e efluxo de ATP e NADH. Modificado de Peters *et al.*, 2010.

Os PAMs apresentam quatro propriedades principais que lhes permitem agir na primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos. Primeiramente, possuem toxicidade seletiva por meio da qual conseguem diferenciar células patogênicas, pela sua membrana celular carregada mais negativamente, das células do hospedeiro, que possuem membrana zwitteriônica. Também apresentam ação microbicida rápida, em que o sítio de ação é preferencialmente a superfície celular. Possuem amplo espectro de ação e, por último, a probabilidade de promoverem o surgimento de resistência por parte dos patógenos é baixa, visto que os alvos dos peptídeos antimicrobianos são componentes conservados das membranas biológicas dos microrganismos (Bechinger e Gorr, 2016; Conlon *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2003).

Entretanto, a perspectiva da utilização de PAMs como alternativa aos antimicrobianos convencionais apresenta desafios aos pesquisadores. Por exemplo, essas moléculas, sendo peptídeos, são extremamente suscetíveis à ação de proteases do trato gastrointestinal, o que dificulta sua administração por via oral. A ação sistêmica do peptídeo também tem seus obstáculos, como degradação dos peptídeos e citotoxicidade sobre as células sanguíneas. Devido a esses fatores, a maioria dos PAMs em fase de testes clínicos é administrada topicamente (Kumar *et al.*, 2018). Outro problema é que, apesar da dificuldade dos microrganismos de desenvolverem resistência aos PAMs pelos motivos já apresentados, ao surgir alguma linhagem resistente, ela geralmente apresenta resistência cruzada contra uma grande variedade de PAMs com diferentes modos de ação (Andersson *et al.*, 2016).

Para contornar essas dificuldades, pesquisadores podem recorrer a diversas estratégias. Kumar *et al.* (2018), em seu artigo de revisão sobre as características dos PAMs, discorreram sobre essas possibilidades, como modificações químicas (utilização de D-aminoácidos, acetilação e peptidomimética), que podem aumentar a estabilidade das moléculas, dificultando sua degradação; e mecanismos de transporte para os peptídeos, que facilitam a sua chegada ao local desejado sem que haja degradação e com diminuição da citotoxicidade contra células do organismo.

1.5.1. Mecanismos de resistência contra PAMs

Por serem tão presentes na natureza e terem um grande potencial antimicrobiano, é natural que os microrganismos apresentem diversas formas de resistência aos PAMs, e

também é natural que os organismos que produzem essas substâncias apresentem novos peptídeos (Nawrocki *et al.*, 2014), constituindo uma corrida armamentista ao longo da história da Terra.

Já foram observadas e caracterizadas diversas formas de sistemas de detecção (*sensing*) de PAMs em bactérias. Esses sistemas são úteis para que a bactéria possa se preparar com antecedência ao detectar a presença de PAMs sem precisar gastar energia por estar constantemente em estado de alerta (Joo *et al.*, 2016).

Como já foi discutido, os PAMs mais presentes na natureza são os PAMCs. Sendo assim, bactérias, que possuem superfície carregada negativamente, podem alterar a composição da sua superfície celular a fim de tornar sua carga mais neutra e dificultar ou impossibilitar a ligação da molécula peptídica com a membrana celular (Figura 3). Essas alterações incluem mudanças no potencial-zeta e no potencial de membrana do microrganismo (Domingues *et al.*, 2014; Nawrocki *et al.*, 2014).

Outra estratégia comum consiste na produção e liberação de peptidases extracelulares. Os microrganismos secretam essas moléculas que interagem com os PAMs e destroem ou alteram sua estrutura para que percam sua função biológica (Joo *et al.*, 2016; Maria-Neto *et al.*, 2015). PAMs lineares são mais suscetíveis a essa estratégia de defesa, pois as ligações dissulfeto conferem grande resistência contra degradação proteolítica (Joo *et al.*, 2016).

Já os PAMs que agem intracelularmente podem ser expulsos do interior da célula por efluxo ativo, assim como os antibióticos clássicos (Cole e Nizet, 2016). Além disso, bactérias podem produzir biofilmes, que são um conjunto de células associadas pela sua superfície e mergulhadas em uma matriz composta principalmente por proteínas extracelulares, DNA e exopolissacarídeos (Otto, 2006). Bactérias em biofilmes exibem uma maior resistência a PAMs, pois a matriz pode causar repulsão destas moléculas, que não conseguirão se aproximar das células, ou até mesmo imobilizá-las uma vez que entrem no biofilme, impedindo que cheguem até elas (Bechinger e Gorr, 2016).

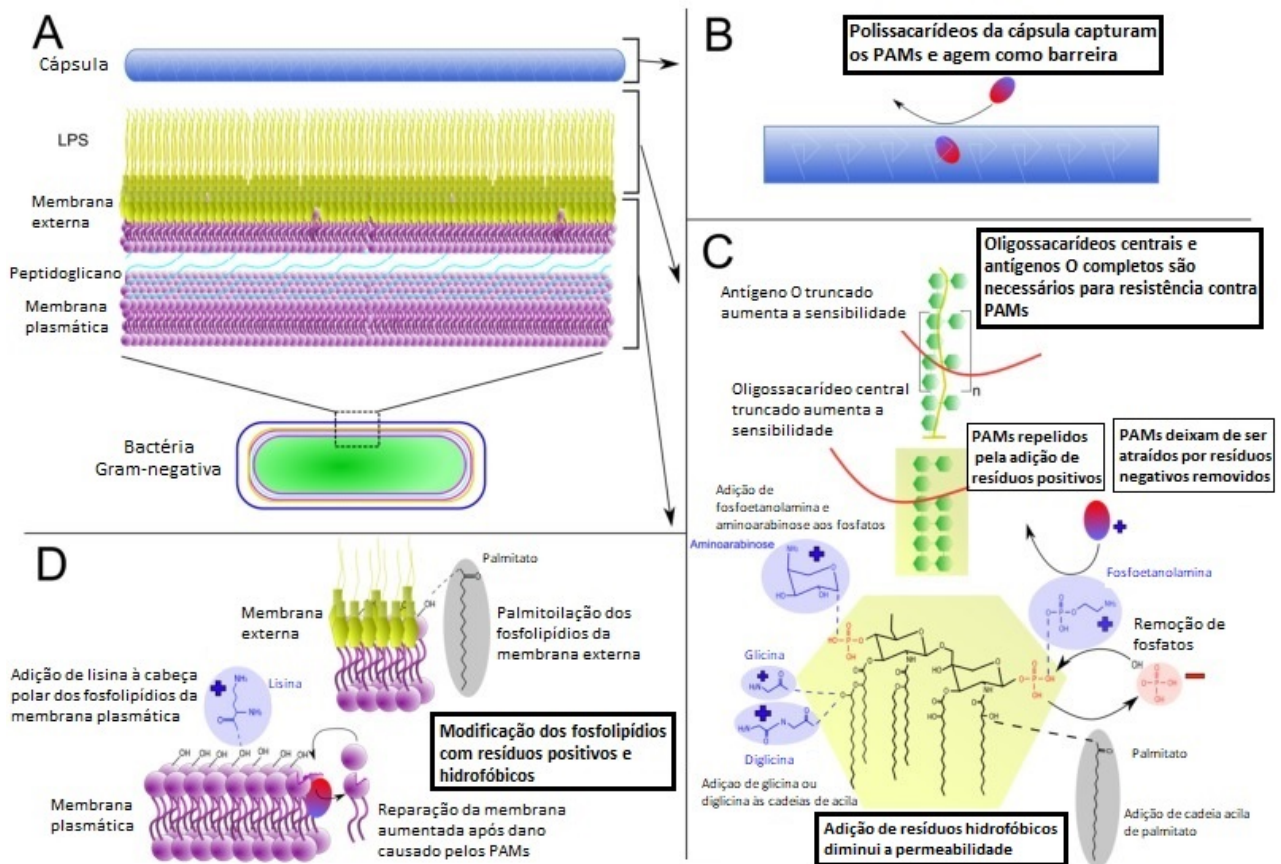


Figura 3. Modificações da superfície bacteriana que aumentam a resistência contra PAMs. (A) Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas, com aumento da (B) cápsula, (C) lipopolissacarídeo, e (D) membranas externa e interna. A estrutura dos lipopolissacarídeos varia muito entre espécies; ilustração é representativa do lipopolissacarídeo de *E. coli*, com modificações de várias outras espécies. Modificado de Band e Weiss, 2014.

1.6. *Physalaemus nattereri*

O anuro *Physalaemus nattereri* (Figura 4) é conhecido como rã-piadeira e pertence à família Leptodactylidae. É uma família exclusivamente encontrada nas Américas, com mais de 800 espécies e cerca de 50 gêneros (Freitas & Silva, 2007). Além do Brasil, também pode ser encontrada na Bolívia e no Paraguai (Frost, 2018).

É uma espécie fossorial e sazonal que vive no Cerrado e é encontrada no solo e em corpos d'água temporários, como pântanos e lagoas. A espécie não se adapta bem a distúrbios antropogênicos em seu habitat (Aquino *et al.*, 2004).

A espécie *P. nattereri* tem entre 3-4 cm de comprimento e possui dois olhos falsos (Figura 5) na parte traseira de seu corpo. Quando o anuro se sente ameaçado, ele levanta as

patas traseiras, evidenciando os olhos falsos e assustando o predador. Se mesmo assim a ameaça continuar, o sapo libera uma secreção com odor desagradável das glândulas localizadas nos olhos falsos (Owen, 1980).



Figura 4. Esquerda: Indivíduo adulto da espécie *Physalaemus nattereri*. Imagem disponível em: <https://www.flickr.com/photos/mariosacramentophotos/4842066886/in/photostream/>. Direita: Comportamento deimático de *P. nattereri* exibindo os ocelos na parte posterior do corpo (setas vermelhas). Imagem disponível em https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?where-taxon=Eupemphix+nattereri.

A reprodução da espécie é explosiva, ocorrendo poucos dias após a chuva. Os machos cantam para atrair fêmeas, mas também podem procurá-las ativamente. Os ovos são depositados em ninhos de espuma nas margens de lagoas temporárias e os locais podem ser compartilhados por mais de um casal (Rodrigues *et al.*, 2004). Os ninhos de espuma são feitos pelo macho, que esfrega rapidamente o muco presente no dorso e região inguinal da fêmea. Esta espuma possui propriedades que protegem os ovos da ação de microrganismos e ressecamento, favorecendo assim a espera de maior volume de água para os girinos. Após um ou alguns dias, os ovos eclodem e os girinos nascem e completam o seu ciclo de desenvolvimento em lagos temporários e lagoas (Freitas & Silva, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Análogos de peptídeos antimicrobianos de plantas e animais ou ainda novos compostos inspirados em suas estruturas já foram sintetizados e é esperado que cada vez mais novos compostos sejam produzidos. A química combinatória tem se mostrado uma poderosa

ferramenta para o desenho de novas moléculas a partir de compostos que possam ser otimizados, potencializando sua atividade contra alvos selecionados e minimizando sua toxicidade para plantas ou animais e sua susceptibilidade a proteases (Guimarães *et al.*, 2016; Montesinos, 2007; Castro *et al.*, 2006; Zasloff, 2002).

O potencial terapêutico dos peptídeos antimicrobianos é atribuído à sua capacidade de lisar membranas, matando rapidamente um amplo espectro de microrganismos. Devido ao seu mecanismo de ação relativamente não específico, o surgimento de resistência aos peptídeos pelos microrganismos ocorre a uma taxa bem menor que a dos antibióticos convencionais. Outro fator positivo é o sinergismo que ocorre com o uso concomitante destes peptídeos com antibióticos clássicos e com misturas de peptídeos (com estrutura e origem bastante diferentes para evitar o aumento da toxicidade), útil no combate às infecções por patógenos multi-resistentes (Angélique *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2003).

O grupo de "Tecnologia de Peptídeos Biologicamente Ativos" da Universidade de Brasília é especialista na purificação e caracterização de PAMs isolados da secreção cutânea de anuros e vem se dedicando, nos últimos anos, ao desenho racional e síntese química de seus análogos com vistas ao seu emprego terapêutico. Sendo assim, o presente estudo justifica-se pelo intuito de contribuir com formas alternativas ao tratamento de doenças infecciosas e parasitárias visando determinar o potencial antimicrobiano, antiparasitário e antiviral de análogos das natererinas propostos pelo nosso grupo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente projeto teve como objetivo geral propor e sintetizar quimicamente quatro novos análogos derivados das natererinas de modo a avaliar seus efeitos antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antivirais e citolíticos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Determinar os efeitos antibacterianos das natererinas e de seus quatro novos análogos sobre bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas por meio da determinação das concentrações mínimas inibitórias;

3.2.2. Determinar os efeitos antifúngicos das natererinas e de seus quatro novos análogos sobre fungos leveduriformes patogênicos por meio da determinação das concentrações mínimas inibitórias;

3.2.3. Determinar os efeitos antiparasitários das natererinas e de seus quatro novos análogos sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi*;

3.2.4. Determinar os efeitos antivirais das natererinas e de seus quatro novos análogos sobre os vírus causadores da febre amarela e da dengue empregando-se a técnica de HCA (*High Content Analysis*);

3.2.5. Determinar os efeitos citolíticos das natererinas e de seus quatro novos análogos sobre células sanguíneas humanas (eritrócitos e leucócitos) empregando-se a técnica de citometria de fluxo.

3.2.6. Determinar a composição de elementos de estrutura secundária das natererinas e de seus quatro novos análogos com o emprego da técnica de dicroísmo circular

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho racional e síntese química dos análogos propostos

Os análogos propostos foram desenhados tendo como base as estruturas primárias das natererinas 1, 2 e 3 previamente identificadas pelo nosso grupo (Honorato, 2009; Carvalho, 2015) e foram propostas alterações nas faces polar e apolar das moléculas procurando diminuir sua toxicidade sobre eritrócitos humanos. Isso foi feito considerando a manutenção de sua estrutura anfipática, importante para a preservação da atividade citolítica. Os 4 análogos propostos (denominados no presente trabalho análogos 1, 2, 3 e 4), bem como os peptídeos selvagens (as natererinas 1, 2 e 3) foram produzidos por meio de síntese química pela empresa Genone, empresa especializada em síntese de peptídeos, mediante contrato de confidencialidade. As estruturas primárias dos análogos em estudo não serão divulgadas por questões de proteção de propriedade intelectual.

4.2. Dosagem dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos sintéticos foram dosados em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) com leituras nos comprimentos de onda de 205 nm, 215 nm e 225 nm (Aitken e Learmonth, 2002).

As concentrações dos peptídeos em µg/mL foi estimada empregando-se as equações descritas abaixo:

$$\text{Concentração}_1 = \frac{\text{Abs}_{(205\text{nm})} \times 1000}{31} \qquad \text{Concentração}_2 = 144 \times [\text{Abs}_{(215\text{nm})} - \text{Abs}_{(225\text{nm})}]$$

$$\frac{\text{Concentração}_1 + \text{Concentração}_2}{2} = \text{Concentração da alíquota analisada}$$

Alíquotas de 1 mL de cada peptídeos foram submetidas a secagem em concentrador a vácuo (SC 100, Thermo Scientific, EUA) e armazenadas a -20°C até o momento de sua utilização.

4.3. Ensaio sobre bactérias patogênicas

O método utilizado foi baseado em Castro *et al.* (2009). Alíquotas de 200 µL de suspensão da bactéria a ser testada (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) foram adicionadas a 7 mL de meio Mueller Hinton em um tubo plástico de 15 mL. O tubo, então, foi incubado entreaberto em um *shaker* a 37°C durante 16 horas, com agitação constante. Em seguida, foi avaliada a proliferação celular por meio de detecção no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) e as suspensões foram ajustadas para um valor próximo a 1 com a adição de meio Mueller Hinton. Após esse ajuste, foram preparados os inóculos (diluição 1:50 para as culturas de bactérias Gram-negativas e de 1:100 para as culturas de bactérias Gram-positivas).

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

assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

4.4. Ensaio sobre fungos patogênicos

O método utilizado foi baseado em Castro *et al.* (2009). Aliquotas de 200 µL de suspensão dos fungos a serem testados (*Candida albicans* ATCC 14053 e *Cryptococcus neoformans* H99) foram adicionadas a 7 mL de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) em um tubo plástico de 15 mL. O tubo, então, foi incubado entreaberto em um *shaker* a 37°C durante 16 horas, com agitação constante. Em seguida, foi avaliada a proliferação celular por meio de detecção no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (UV-M51, Bel Photonics, Brasil) e as suspensões foram ajustadas para um valor próximo a 1 com a adição de meio BHI. Após esse ajuste, foram preparados os inóculos (diluição 1:100 em meio BHI).

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

4.5. Ensaio sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*

As culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* (CL-Brener) foram cultivadas a 28°C em estufa, em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*), contendo 10% de SFB (soro fetal bovino). Resumidamente, as culturas foram crescidas até que a densidade celular de 10⁷ parasitos/mL fosse atingida. Cem microlitros da suspensão de parasita a 5 x 10⁶ parasitas/mL foram incubados em microplacas de 96 poços para leitura de fluorescência com um volume

igual dos peptídeos, diluídos em série (128 a 1 μM) em meio LIT, por 96 horas, para avaliação da ação inibitória sobre o crescimento dos protozoários. Depois deste tempo, foram transferidos 100 μL de cada poço da placa transparente para uma placa branca e fosca e foram adicionados 20 μL de CellTiter-Blue[®] (Promega, EUA) para avaliação dos efeitos sobre a viabilidade celular, determinada por fluorescência a 560 nm (excitação) e 590 nm (emissão), após 1 hora de incubação a 37°C, em uma leitora de microplacas (SpectraMax[®] M5 Microplate Reader, Molecular Devices, EUA). Como controle positivo, foi utilizado o composto Nifurtimox. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6 Ensaios antivirais

4.6.1. Vírus da febre amarela

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

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

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

estimativa da atividade do composto testado sobre as células hospedeiras Huh7 é determinada para estimar a seletividade do composto para o vírus da febre amarela.

Av. CRT: média da razão celular do composto testado

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

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

4.6.2. Vírus da dengue

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

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

Av. CRT: média da razão celular do composto testado

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

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

4.7. Ensaio citolítico sobre células sanguíneas humanas

Para este ensaio foram utilizados quatro tubos de EDTA com 8 mL de sangue tipo O⁺ de doador voluntário após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Após o sangue ter sua fase plasmática removida, o volume foi completado com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Este processo de lavagem foi repetido três vezes. A fase plasmática foi retirada para que as proteínas do plasma sanguíneo (principalmente a albumina) não interferissem com a leitura dos resultados e nem com a interação entre os peptídeos e as células. Para os experimentos, foram separadas alíquotas de 800 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 ressuspendido 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 *eppendorf* por amostra, cada um com volume de 600 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, com a remoção de uma alíquota de 88 µL de cada réplica para análise no equipamento Sysmex XN-9000 TM (Analisador Hematológico Automatizado, Sysmex, Japão). Os gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software).

4.8. Análises da estrutura secundária dos peptídeos por dicroísmo circular

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

Os espectros dicróicos foram gerados a partir das 7 soluções peptídicas a 50 µM em água e a 50 µM em SDS (dodecilsulfato de sódio) na concentração de 35 mM. A elipticidade

molar foi calculada a partir da conversão das elipticidades observadas através da equação abaixo:

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

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro análogos utilizados neste trabalho foram propostos baseados principalmente na análise da estrutura primária das natererinas 1, 2 e 3. Tais peptídeos antimicrobianos foram caracterizados em estudos realizados previamente por Honorato. (2009) que, em sua dissertação de mestrado, isolou as natererinas 1, 2 e 3 da secreção cutânea do anuro *Physalaemus nattereri* e demonstrou atividade antimicrobiana desses peptídeos contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Adicionalmente, Carvalho. (2015), em sua tese de doutoramento, evidenciou atividade anticâncer dessas moléculas contra células B16F10 (melanoma murino).

Os análogos, foco do presente estudo, aqui designados análogos 1, 2, 3 e 4, bem como as natererinas 1, 2 e 3 foram produzidos por síntese química em sintetizador automático de peptídeos, empregando-se a química Fmoc. Em seguida, os análogos sintetizados foram purificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C18 e seu grau de homogeneidade e a correção do processo de síntese foram avaliados por espectrometria de massas. Tais etapas foram realizadas pela empresa Genone, especializada na área de síntese de peptídeos, mediante contrato de confidencialidade.

As estruturas primárias das natererinas estão apresentadas na Tabela 1. Já as estruturas primárias dos análogos em estudo não serão divulgadas por questões de proteção da propriedade intelectual.

Tabela 1. Estruturas primárias e cargas líquidas das natererinas 1, 2 e 3.

PEPTÍDEO	ESTRUTURA PRIMÁRIA	CARGA
Natererina 1	¹ GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ.COOH ³⁰	+3
Natererina 2	¹ GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ.COOH ³⁰	+3
Natererina 3	¹ GLKDIKNLAKDALVKVAGAVINKLSPQPQ.COOH ³⁰	+3

Uma vez concluída a etapa inicial e de posse das versões sintéticas dos quatro análogos propostos e dos peptídeos selvagens, foram realizados ensaios de microdiluição *in vitro* para avaliar seus efeitos antimicrobianos sobre bactérias patogênicas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e sobre os fungos patogênicos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Também foram avaliados os efeitos inibitórios sobre o protozoário causador da Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, bem como ensaio citolítico para analisar os efeitos desses peptídeos sobre células sanguíneas humanas. Finalmente foram avaliados seus efeitos sobre a replicação dos vírus causadores da febre amarela e da dengue, assim como sobre a proliferação da célula hospedeira empregada nesses ensaios, a linhagem celular de hepatocarcinoma humano, Huh7.

5.1. Ensaios sobre bactérias e fungos patogênicos

De maneira geral, as natererinas apresentaram atividade antimicrobiana sobre as bactérias patogênicas avaliadas (Tabela 2), principalmente contra as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e contra a levedura encapsulada *C. neoformans*. As diferenças entre a atuação dos três peptídeos foram pontuais e não passaram de uma ordem de grandeza na escala de diluição realizada. Dentre as três, a natererina 2 foi a que apresentou a melhor atividade inibitória, com valores de CMI iguais a 2 µM para a bactéria *K. pneumoniae* e a 4 µM para a levedura *C. neoformans*, valores que confirmam o potencial terapêutico desses PAMs.

Tabela 2. Efeitos antimicrobianos (CMI_s, µM) das natererinas sobre bactérias e fungos patogênicos.

	Natererina 1	Natererina 2	Natererina 3
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	32	16	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	128	64	128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	8	4
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	2	2	2
<i>C. neoformans</i> H99	8	4	4
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	128	128	128

As diferenças morfológicas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas afetam várias características desses microrganismos, dentre elas a sua resistência a PAMs e antibióticos. Sabe-se que bactérias podem tornar a carga líquida de suas superfícies mais positiva a fim de diminuir a interação entre elas e algum PAM presente por meio da modificação dos diferentes componentes de suas parede celulares (Maria-Neto *et al.*, 2015), que muitas vezes são únicos em um dos dois grupos, como ácidos teicóicos em Gram-positivas e lipopolissacarídeos nas Gram-negativas (Joo *et al.*, 2016).

Alguns estudos já levantaram a possibilidade de que a espessa, porém porosa, parede de peptidoglicanos pode não ter grande influência na resistência de bactérias Gram-positivas aos PAMs, podendo até mesmo ser utilizadas pelos próprios PAMs para se concentrar na

membrana celular com mais facilidade (Malanovic e Lohner, 2016; Castanho *et al.*, 2009), tornando necessárias mudanças como um aumento na densidade dessa parede celular, estratégia utilizada tanto por *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva, contra os efeitos da daptomicina (Yang *et al.*, 2010), quanto por *E. coli* (Maria-Neto *et al.*, 2015), uma bactéria Gram-negativa.

Os resultados aqui obtidos são muito parecidos com os obtidos nos ensaios antibacterianos com os PAMs ascafina (Conlon *et al.*, 2004) e opistoporina 1 (Moerman *et al.*, 2002), em que os valores de CMIs obtidos diante de bactérias Gram-negativas foram muito menores do que valores observados para as bactérias Gram-positivas. A ascafina, inclusive, teve seus efeitos antimicrobianos avaliados também sobre a levedura *C. albicans* e, assim como os natererinas analisadas no presente estudo, não apresentou atividade antimicrobiana significativa.

No caso dos análogos das natererinas os resultados obtidos foram bem mais diversificados (Tabela 3): o análogo 1 obteve melhora em suas propriedades antimicrobianas em quase todos os casos quando comparado aos 3 peptídeos selvagens (demonstrando ganho de atividade sobre as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* e sobre a levedura *C. albicans*, com valores de CMI que variaram de 64 a 2 μM ; em oposição, o análogo 2 teve seu desempenho piorado com perda da capacidade inibitória em vários casos. Já o análogo 3 foi o que obteve os melhores valores de CMI sobre as espécies de fungos analisadas, com ganho significativo de potência sobre *C. albicans* (CMI = 16 μM), em comparação com os peptídeos selvagens, que apresentaram CMI = 128 μM . O análogo 3 também apresentou valor de CMI menor contra *S. epidermidis* em relação aos outros peptídeos .

Tabela 3. Efeitos antimicrobianos (CMI_s, µM) dos análogos das natererinas sobre bactérias e fungos patogênicos.

	Análogo 1	Análogo 2	Análogo 3	Análogo 4
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	16	Inativo	2	16
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	32	Inativo	Inativo	Inativo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2	>128	32	8
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	2	>128	128	32
<i>C. neoformans</i> H99	4	32	4	8
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	64	Inativo	16	64

A capacidade dos PAMs de interagirem com microrganismos patogênicos e causarem lise celular está diretamente relacionada à cationicidade dessas moléculas. Entretanto, essa relação não é linear. A partir de uma certa carga positiva, a capacidade antimicrobiana dos PAMs pode diminuir. Isso possivelmente se dá porque uma molécula com carga altamente positiva seria tão atraída pela cabeça polar dos fosfolipídios da parte externa da membrana que elas ficariam presas, sem conseguir realizar a translocação para o interior da membrana (Kumar *et al.*, 2018). Os resultados aqui apresentados evidenciam essa ausência de linearidade. O análogo 1, com carga +4, obteve melhores resultados em relação aos demais peptídeos na maioria dos casos, superando os análogos 2 e 3, apesar destes possuírem carga +5. Como já foi discutido anteriormente, outros fatores como anfipaticidade e hidrofobicidade também são importantes.

A levedura *C. albicans* foi um dos microrganismos menos afetados pelos PAMs testados, diferente de *C. neoformans*, que foi bastante susceptível. Swidergall e Ernst (2014) relataram em seu artigo de revisão um “mecanismo de três fases” que *C. albicans* usa para resistir à ação de PAMs. Esse mecanismo inclui secreção de proteínas que se ligam aos PAMs e inibem sua atividade, bombas de efluxo que expulsam PAMs que tenham invadido a célula e ativação de vias de resposta ao estresse. Enquanto isso, é provável que *C. neoformans* seja mais suscetível à ação dos PAMs devido a sua cápsula de polissacarídeos negativamente carregada, mas outros testes precisariam ser realizados para confirmar essa hipótese, bem como para a elucidação de outros motivos que expliquem a diferença entre as atividades antimicrobianas dos peptídeos testados contra essas espécies.

5.2. Ensaios sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*

Nos ensaios realizados com a forma epimastigota de *T. cruzi* (Figuras 5 e 6), as natererinas apresentaram inibição apenas parcial da proliferação do parasita mesmo na maior concentração testada (128 μM). As três natererinas exibiram comportamentos semelhantes, resultando em viabilidade celular próxima aos 60% na maior concentração de peptídeos testada.

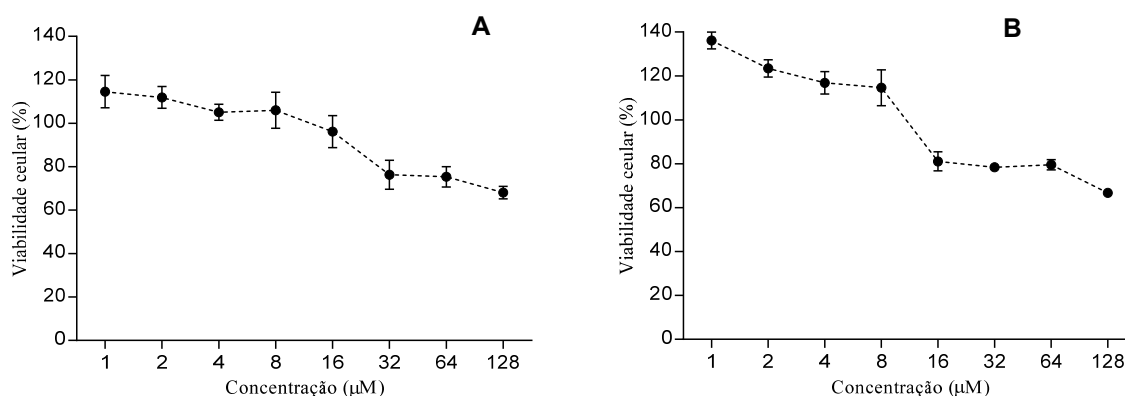


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* após incubação por 96 horas com a natererina 1 (A) e com a natererina 2 (B). Os pontos no eixo X foram renomeados para facilitar a leitura do gráfico, mas estão em escala logarítmica.

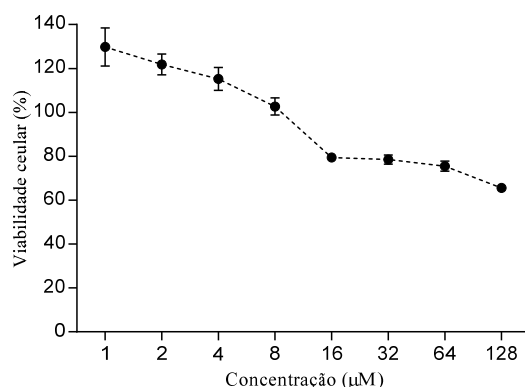


Figura 6. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* após incubação por 96 horas com a natererina 3. Os pontos no eixo X foram renomeados para facilitar a leitura do gráfico, mas estão em escala logarítmica.

O análogo 1 (Figura 7) apresentou resultados parecidos com os dos peptídeos selvagens. Já os outros três análogos não parecem ter surtido efeito inibitório sobre a proliferação dos parasitas nas concentrações testadas (Figuras 8 e 9). Alguns peptídeos, nas menores concentrações testadas, parecem ter estimulado a proliferação dos parasitas. Este efeito precisa de melhor elucidação em futuros trabalhos.

Segundo Xu e Lai (2015), o modo de ação mais comum dos peptídeos antimicrobianos contra protozoários é a interação com a membrana plasmática e sua subsequente destruição, sendo também possível a ação intracelular de maneira acessória ou principal. Esse mecanismo de ação é praticamente o mesmo que o observado sobre bactérias e fungos, microrganismos que apresentaram suscetibilidade às natererinas e seus análogos. Outros experimentos, com maior foco no mecanismo de ação desses peptídeos tanto sobre bactérias e fungos quanto sobre protozoários são necessários para melhor compreender os motivos para a atividade menos acentuada sobre os parasitas.

É provável que, em concentrações maiores, as natererinas e o análogo 1 viessem a apresentar efeitos inibitórios sobre a viabilidade desse parasita, mas a citotoxicidade sobre as células dos hospedeiro impediria sua utilização terapêutica.

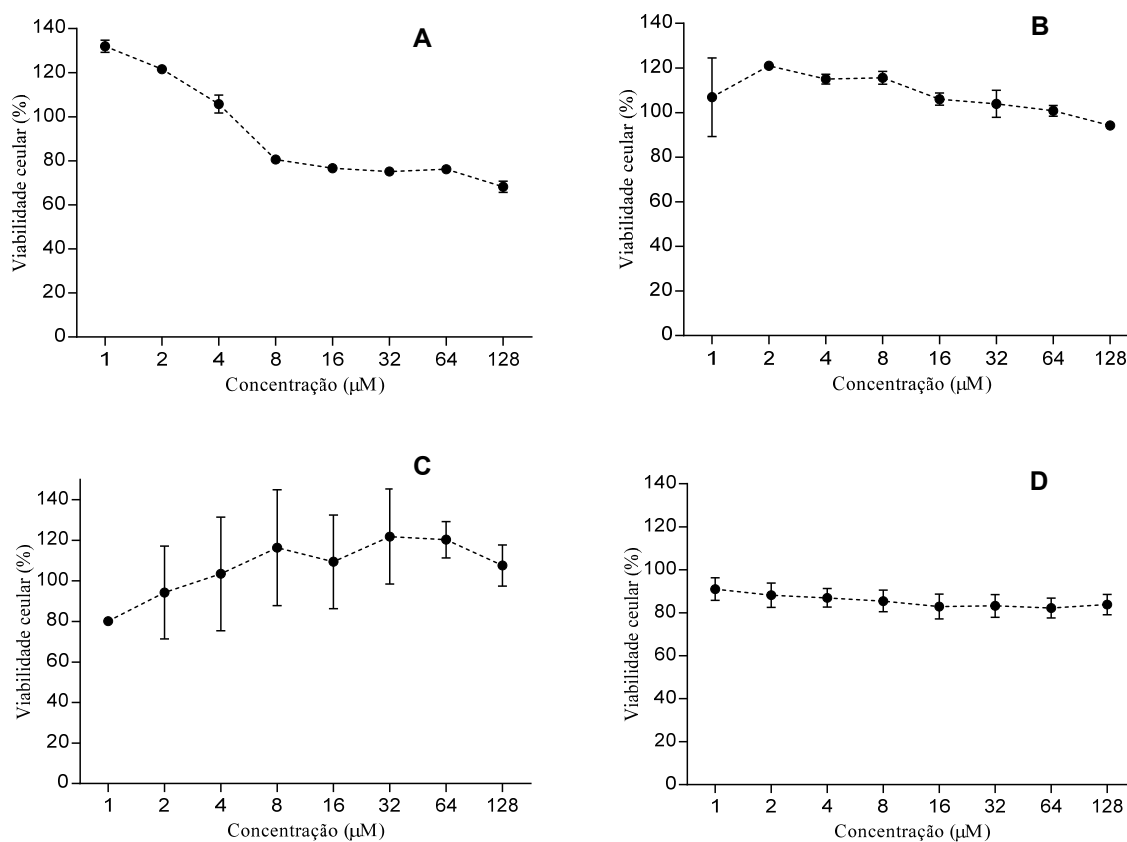


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* após incubação por 96 horas com os análogos 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D). Os pontos no eixo X foram renomeados para facilitar a leitura do gráfico, mas estão em escala logarítmica.

5.3. Ensaios antivirais

Nos experimentos realizados para se avaliar os efeitos inibitórios sobre a replicação dos arbovírus, observou-se, no caso do vírus da febre amarela (Tabela 4 e Figuras 8 e 9), que as natererinas exibem efeitos citotóxicos altos com valores de IS (índice de seletividade, a razão entre a concentração citotóxica 50% e a concentração efetiva 50%) que variaram de 1,98 a 3,93. O análogo 1 apresentou o melhor valor de IS (7,34), exibindo possível potencial terapêutico devido à baixa concentração necessária para inibir a replicação do vírus ($EC_{50} = 1,66 \mu\text{M}$). O análogo 2 apresentou atividade antiviral sem causar a morte de células humanas, mas a EC_{50} se mostrou muito elevada, $35,63 \mu\text{M}$. Os análogos 3 e 4 não causaram inibição viral nem morte celular mesmo na concentração máxima testada de $50 \mu\text{M}$.

Tabela 4. Concentração efetiva 50% (μM), concentração citotóxica 50% (μM) e índice de seletividade (IS) das natererinas e seus análogos sobre o vírus da febre amarela e células Huh7.

Peptídeo	EC ₅₀	CC ₅₀	IS
Natererina 1	6,73	21,18	3,15
Natererina 2	14,59	28,94	1,98
Natererina 3	2,5	9,81	3,93
Análogo 1	1,66	12,19	7,34
Análogo 2	35,63	n.a.	>1,4
Análogo 3	n.a.	n.a.	n.a.
Análogo 4	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. – não ativo

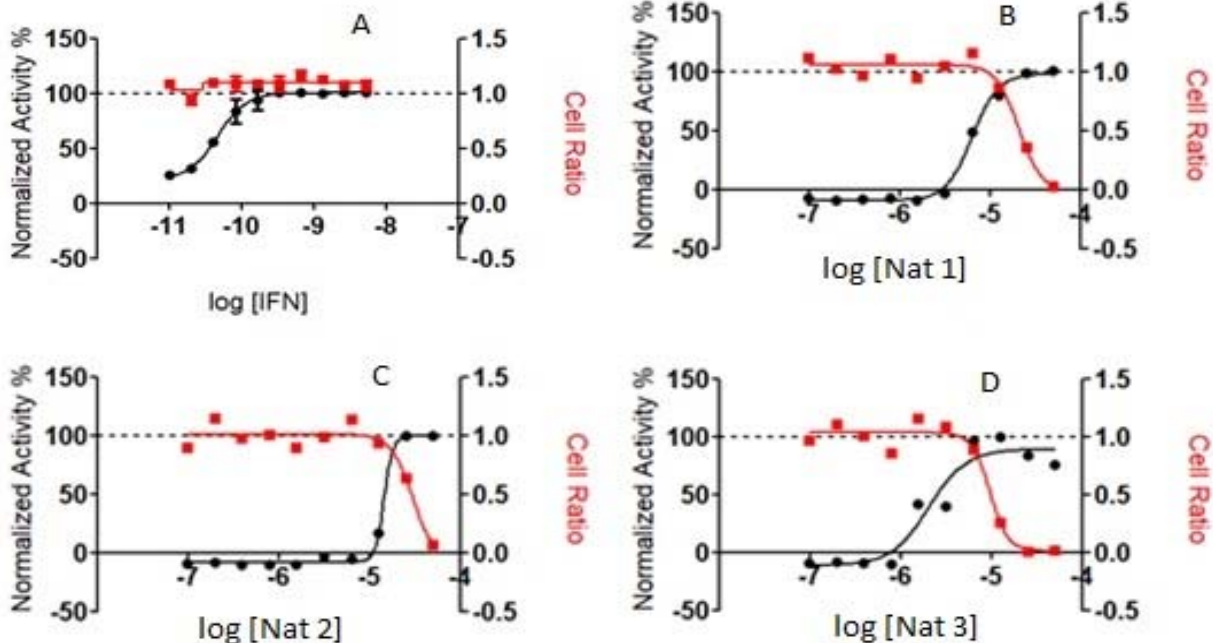


Figura 8. Efeitos do Interferon α 2a (A, controle positivo) e das natererinas 1, 2 e 3 (B, C e D, respectivamente) sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e a replicação do vírus da febre amarela (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.

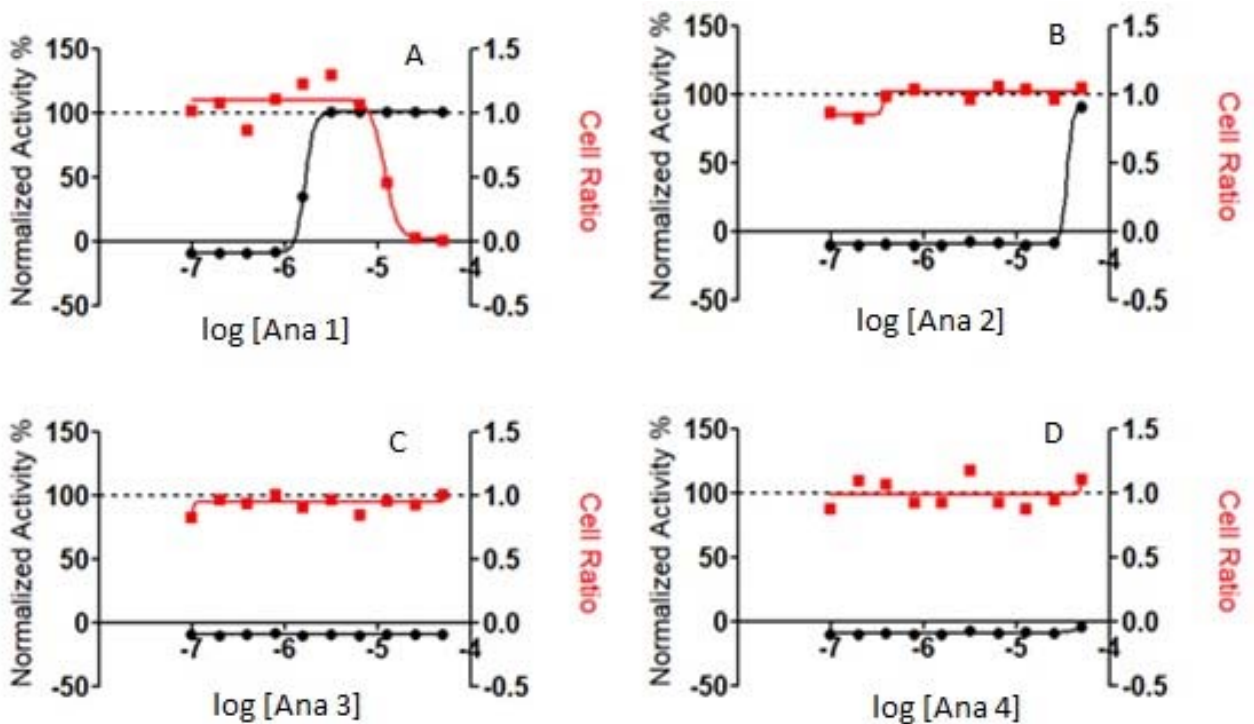


Figura 9. Efeitos dos análogos das natererinas (A, B, C e D, respectivamente) sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e a replicação do vírus da febre amarela (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.

Em relação ao sorotipo 4 do vírus da dengue (DENV 4) (Tabela 5, Figuras 10 e 11), a natererina 3 apresentou valor de IS próximo ao do análogo 1, que continuou sendo o que agiu de maneira mais eficaz, com IS = 10,85. De maneira geral, os peptídeos apresentaram efeitos inibitórios mais relevantes sobre a replicação desse vírus do que sobre o da febre amarela. Até os análogos 3 e 4, que no experimento anterior não apresentaram atividade biológica detectável, agora conseguiram causar inibição, mesmo que em altas concentrações.

Os vírus da família *Flaviviridae*, caso dos dois vírus aqui testados, são envelopados, ou seja, possuem uma bicamada lipídica externa ao capsídeo. Essa membrana viral é um bom alvo para os PAMs, que possivelmente interagem com ela de maneira semelhante ao modo que interagem com bactérias, apesar das membranas virais não possuírem carga negativa tão acentuada quanto a das bactérias (Chazal e Gerlier, 2003), e a destroem. Essa interação é especialmente importante contra virions, pois quando estes são encapsulados, geralmente são

dependentes da membrana para invadir uma nova célula hospedeira e voltar a se replicar (Cosset e Lavillette, 2011)

Alguns PAMs também conseguem inibir a atividade viral de maneira indireta ao interagir com a célula hospedeira e impedir a entrada do virion, seja essa interação com proteínas da membrana (da célula hospedeira) que o virion utiliza para se internalizar, ou com a própria membrana da célula (Wang *et al.*, 2016).

Tabela 5. Concentração efetiva 50% (μM), concentração citotóxica 50% (μM) e índice de seletividade (IS) das natererinas e seus análogos sobre o vírus da dengue e células Huh7.

Peptídeo	EC₅₀	CC₅₀	IS
Natererina 1	5,24	22,31	4,26
Natererina 2	10,55	32,11	3,04
Natererina 3	1,56	12,88	8,24
Análogo 1	1,24	13,49	10,85
Análogo 2	28,87	n.a.	>1,73
Análogo 3	57,91	55,43	0,96
Análogo 4	41,25	n.a.	>1,21

n.a. – não ativo

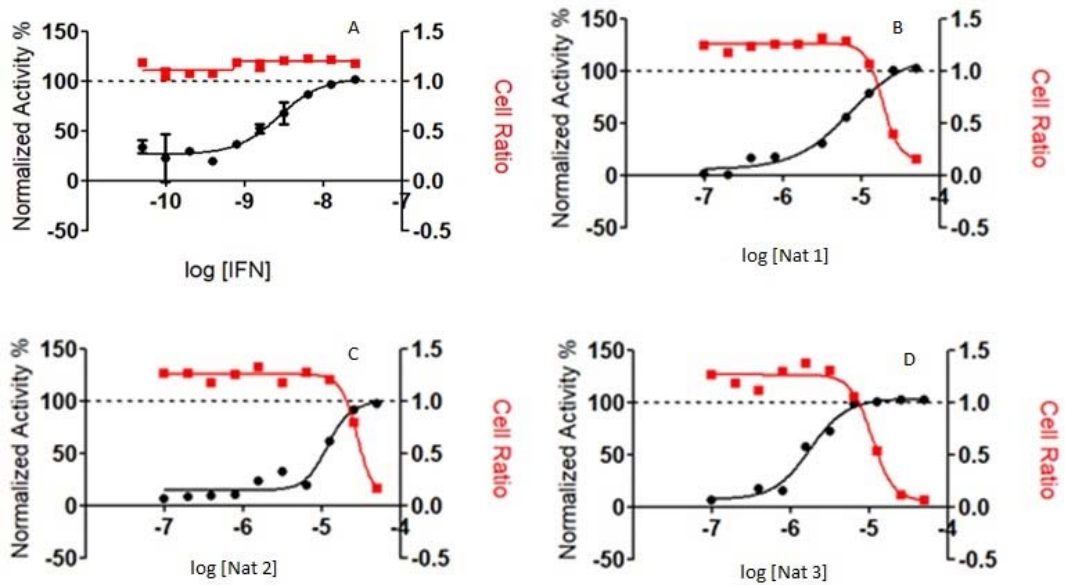


Figura 10. Efeitos do Interferon α 2a (A, controle positivo) e das natererinas 1, 2 e 3 (B, C e D, respectivamente) sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e a replicação do vírus da dengue (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.

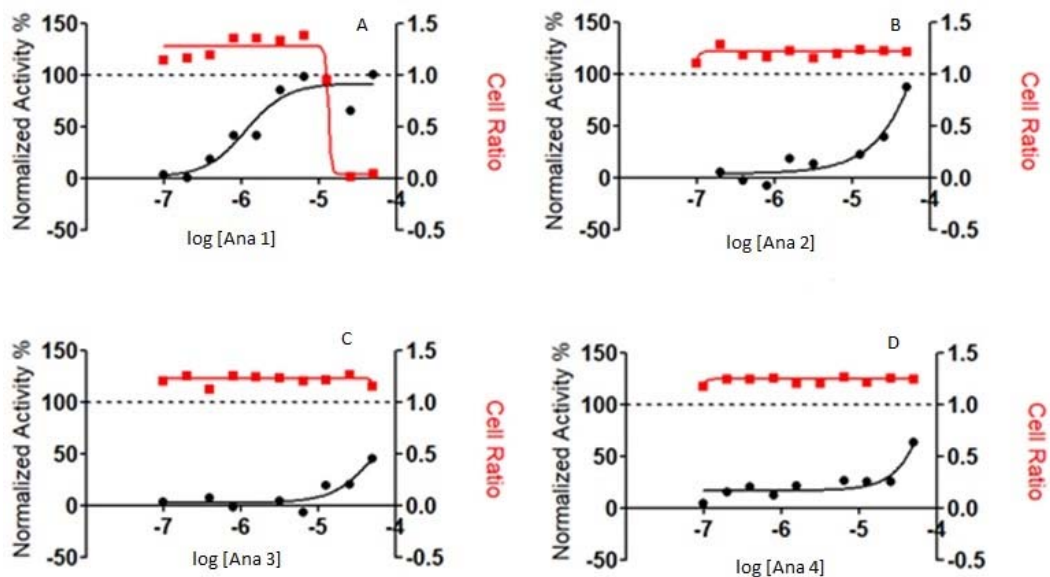


Figura 11. Efeitos dos análogos das natererinas (A, B, C e D, respectivamente) sobre a proliferação de células Huh7 (linha vermelha) e a replicação do vírus da dengue (linha preta). O eixo X representa a concentração do peptídeo, em escala logarítmica. O eixo Y da esquerda mostra a atividade viral normalizada (em relação aos controles) e o da direita a citotoxicidade.

5.4. Ensaio citolítico sobre células sanguíneas humanas

Os efeitos citolíticos das natererinas e seus análogos sobre eritrócitos e leucócitos humanos também foi avaliado por meio da técnica de citometria de fluxo na concentração única de 128 μM , concentração bem superior a dos valores de CMI evidenciados para alguns dos peptídeos aqui avaliados que exibiram CMI entre 2-8 μM .

Ao serem incubados com sangue total por 1 hora na concentração de 128 μM , as natererinas e seus análogos não comprometeram a integridade dos eritrócitos, tendo sido observados resultados similares aos obtidos com a adição apenas de solução salina (NaCl 0,9%) ao invés dos peptídeos (Figura 12). A única exceção foi o análogo 2, que causou uma redução considerável no número de células, promovendo a lise de quase metade dos eritrócitos presentes na amostra (Figura 12).

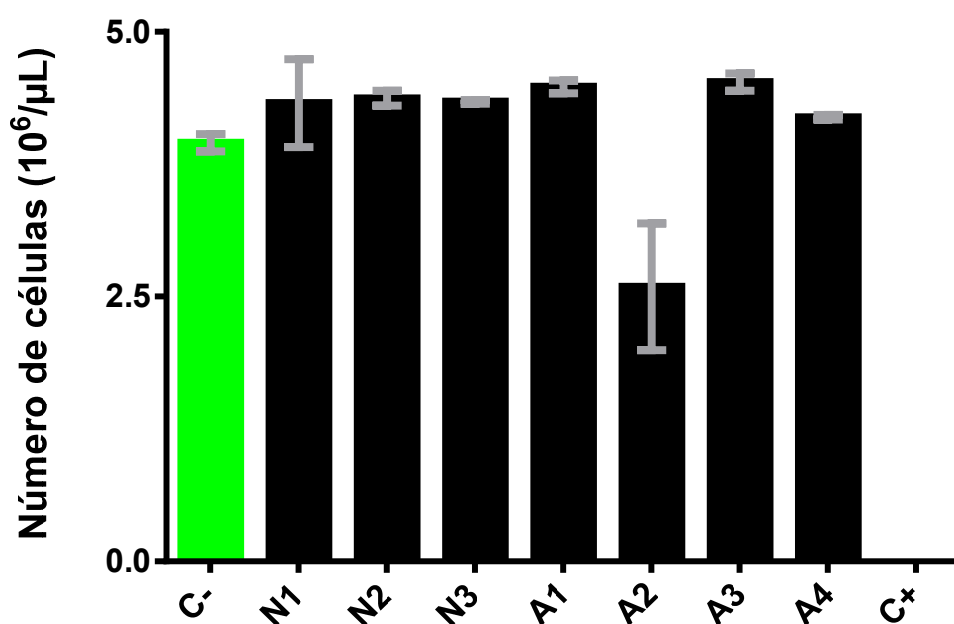


Figura 12. Efeitos citolíticos das natererinas (N1, N2 e N3) e seus análogos (A1, A2, A3 e A4) na concentração de 128 μM sobre eritrócitos humanos após 1 hora de incubação. Controle negativo (C-): solução de NaCl 0,9% (p/v) e controle positivo (C+): Triton X-100 a 10% (v/v).

A relação não linear entre cationicidade e atividade citolítica já mencionada aqui não pareceu se aplicar quando os PAMs foram colocados na presença dos eritrócitos. Nesse caso, segundo Ruiz *et al.* (2014), um aumento na cationicidade acima de certo limite

geralmente resulta em aumento na capacidade hemolítica e diminuição da ação antimicrobiana. Esse limite parece ter sido alcançado pelo análogo 2, com carga +5, que apresentou capacidade inibitória sobre os microrganismos testados abaixo dos outros peptídeos e foi o único que causou hemólise. Além disso, é importante notar que o peptídeo 3 também possui carga +5 mas não se mostrou hemolítico, o que sugere que outros fatores além da carga também são importantes para a ação hemolítica dos PAMs

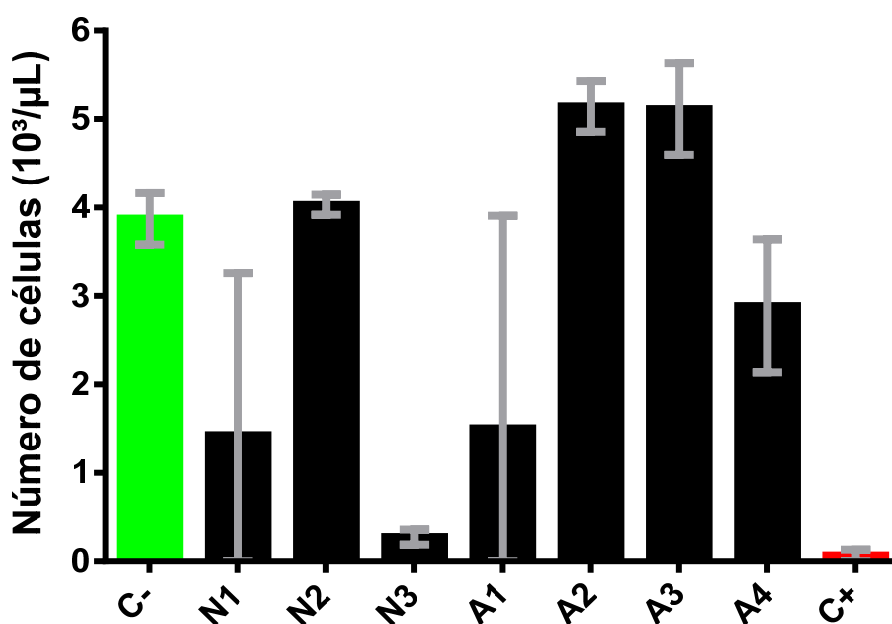


Figura 13. Efeitos citolíticos das natererinas (N1, N2 e N3) e seus análogos (A1, A2, A3 e A4) na concentração de 128 μM sobre leucócitos totais humanos após 1 hora de incubação. Controle negativo (C-): solução de NaCl 0,9% (p/v) e controle positivo (C+): Triton X-100 a 10% (v/v).

Na Figura 13 é apresentado o efeito citolítico das natererinas e seus análogos sobre leucócitos totais humanos. Nela, pode-se observar que a natererina 2 e os análogos 2 e 3 exibiram baixas taxas de citólise.

As diferenças entre os resultados obtidos entre os testes com eritrócitos e leucócitos é perceptível. Enquanto os glóbulos vermelhos parecem ter uma boa resistência à atividade dos PAMs, glóbulos brancos foram razoavelmente suscetíveis. Um dos possíveis motivos para essa diferença é a composição da membrana plasmática dos dois grupos em relação à moléculas específicas: enquanto 29,2% dos fosfolipídeos da membrana de eritrócitos são fosfatidilcolinas, esse valor é de 39,4% em leucócitos. Outra molécula que possui proporções

diferentes entre os dois grupos celulares em relação ao total de fosfolipídeos é a esfingomiéline (26% nos eritrócitos e 12,2% nos leucócitos) (Gottfried, 1967; Schwartz et al., 1985). Talvez os PAMs tenham mais facilidade de se associar às fosfatidilcolinas, mais presentes nas membranas dos glóbulos brancos, mas testes mais específicos precisarão ser feitos para se confirmar essa hipótese.

Ajustes metodológicos precisarão ser feitos em testes futuros, a fim de se reduzir os desvios padrão observados nos experimentos aqui realizados, principalmente com os leucócitos

5.5. Análises da estrutura secundária dos peptídeos por dicroísmo circular

Por fim, foram realizados experimentos de dicroísmo circular para avaliar a formação de α -hélices nas estruturas secundárias das natererinas e seus análogos. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 14 e 15.

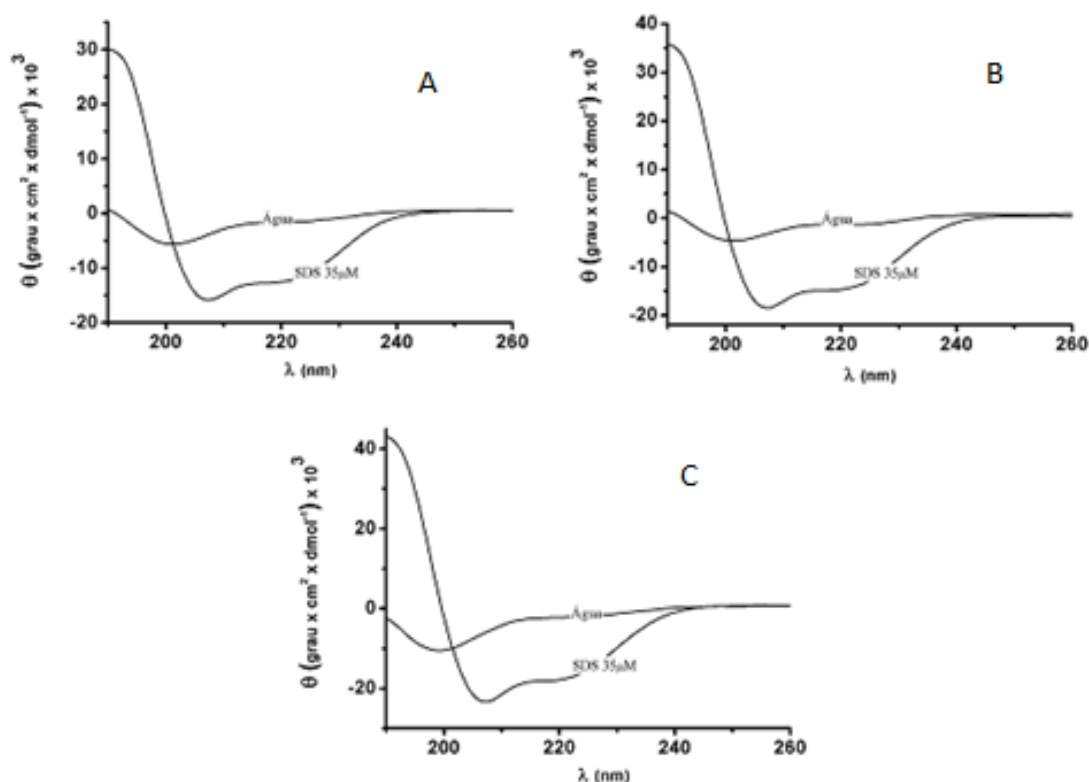


Figura 14. Espectros dicróicos das natererinas 1 (A), 2 (B) e 3 (C) a 50 μ M em água e em SDS 35 mM.

As natererinas, ao se enovelarem na presença de SDS 35 mM, que forma micelas com estrutura similar às da membrana celular de microrganismos, apresentaram formação de α -hélice, como é possível observar pela presença característica de vales a 208 nm e a 222 nm, apesar de nesse segundo comprimento de onda esses vales estarem menos pronunciados, indicando que essa formação não ocorre ao longo de toda a sequência dos peptídeos (Figura 14).

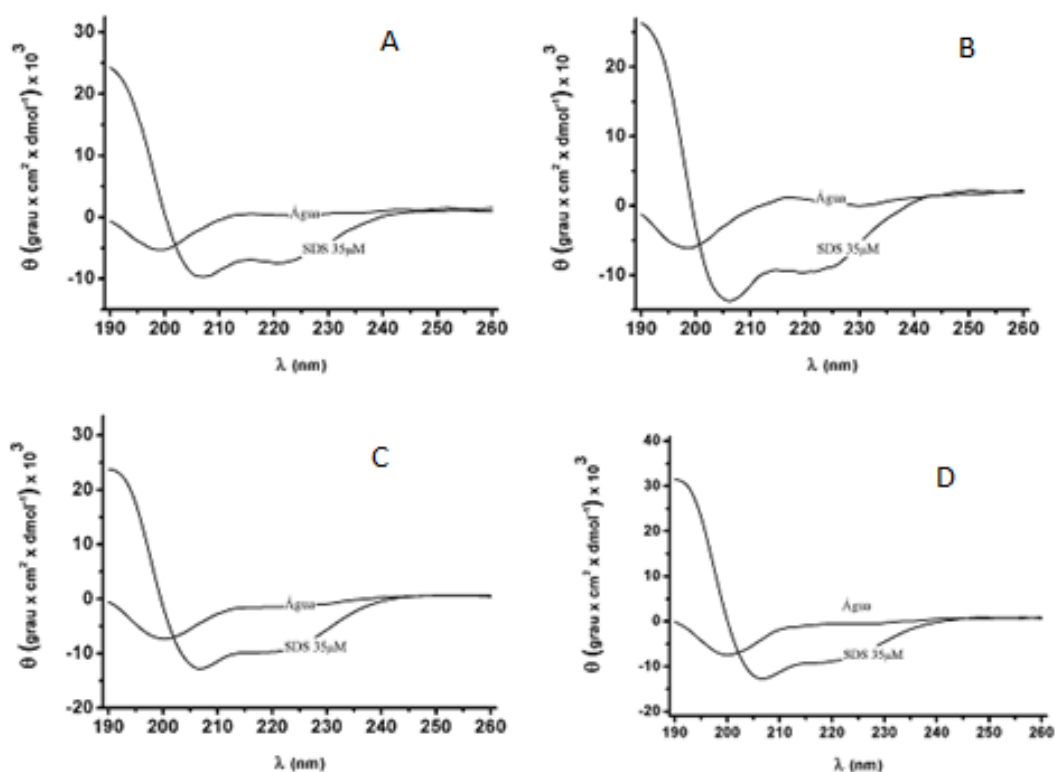


Figura 15. Espectros dicróticos dos análogos 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D) a 50 μM em água e em SDS 35 mM.

Com os análogos da natererina ocorreu situação similar: vales mais pronunciados a 208 nm e menos intensos a 222 nm, indicando formação de α -hélice, mas não ao longo de todo o peptídeo.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral, as natererinas apresentaram atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos semelhante aquela exibida pelos PAMs de anfíbios analisados na revisão de Xu e Lai (2015). As natererinas apresentaram atividade antimicrobiana sobre as bactérias patogênicas avaliadas, principalmente contra as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e contra a levedura encapsulada *C. neoformans*. Dentre as três, a natererina 2 foi a que apresentou a melhor atividade inibitória, com valores de CMI iguais a 2 μM para a bactéria *K. pneumoniae* e a 4 μM para a levedura *C. neoformans*, valores que confirmam o potencial terapêutico desses PAMs.

No caso dos análogos das natererinas, o análogo 1 obteve melhora em suas propriedades antimicrobianas em quase todos os casos quando comparado aos 3 peptídeos selvagens (demonstrando ganho de atividade sobre as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* e sobre a levedura *C. albicans*, com valores de CMI que variaram de 64 a 2 μM ; em oposição, o análogo 2 teve seu desempenho piorado com perda da capacidade inibitória em vários casos. Já o análogo 3 teve desempenho piorado em alguns casos, mas foi o que obteve os melhores valores de CMI para as espécies de fungos analisadas, com ganho significativo de potência sobre *C. albicans* (CMI = 16 μM), em comparação com os peptídeos selvagens que apresentaram CMI = 128 μM .

Os efeitos das natererinas e de seus análogos sobre a inibição da proliferação do parasita *T. cruzi* foram parciais, sendo que nenhum dos peptídeos testados conseguiu inibir completamente a proliferação do parasita mesmo nas maiores concentrações empregadas (128 μM).

Nos experimentos realizados para se avaliar os efeitos inibitórios sobre a proliferação dos arbovírus, observou-se que as natererinas exibem efeitos citotóxicos altos com valores de IS que variaram de 1,98 a 3,93 (para o vírus da febre amarela). Já no caso do vírus da dengue, a natererina 3 apresentou uma atividade mais relevante com valor de IS = 8,24. Ao se analisar o desempenho dos análogos, o análogo 1 apresentou o melhor valor de IS (7,34), exibindo possível potencial terapêutico devido à baixa concentração necessária para inibir a replicação do vírus da febre amarela (EC_{50} = 1,66 μM). Tal comportamento se repetiu no caso do vírus da dengue, onde o análogo 1, que continuou sendo o que agiu de maneira mais eficaz, com IS = 10,85.

Apenas o análogo 2 exibiu atividade citolítica significativa sobre eritrócitos humanos na concentração de 128 μM , promovendo a lise de quase metade dos eritrócitos presentes na amostra. Os leucócitos humanos mostraram-se mais susceptíveis à ação citolítica dos peptídeos, com exceção da natererina 2 e dos análogos 2 e e 3 que exibiram baixas taxas de citólise sobre esse tipo celular.

Todos os peptídeos foram capazes de formar estruturas em α -hélice em ambiente membrana-mimético (na presença de micelas de SDS).

Os PAMs, apesar da atenção que vêm recebendo nos últimos anos, ainda não são moléculas completamente compreendidas. Modos de aplicação mais eficientes para esses compostos ainda precisam ser testados e modificações que diminuam sua citotoxicidade são desafios a serem enfrentados. O presente estudo reforça o potencial terapêutico dos PAMs isolados da secreção cutânea de anuros e dos análogos produzidos a partir deles como agentes anti-infecciosos e antiparasitários de largo espectro.

7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, as perspectivas para experimentos futuros incluem:

- ✓ Avaliar os efeitos antimicrobianos dos peptídeos analisados sobre patógenos multi-resistentes em circulação na sociedade;
- ✓ Avaliar os efeitos antimicrobianos dos peptídeos analisados sobre patógenos associados a biofilmes;
- ✓ Determinar a curva dose-resposta para avaliar de maneira mais acurada os efeitos citolíticos dos peptídeos analisados sobre células sanguíneas;
- ✓ Avaliar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos sobre linhagens de células tumorais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitken A, Learmonth M. Protein Determination by UV Absorption. The Protein Protocol Handbook. Humana Press. **1996**, 3-6.

Alsbaugh JA. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis, *Fungal Genetics and Biology*, **2015**, *78*, 55-58.

Ambrose CT. Pre-antibiotic therapy of syphilis. *NESSA Journal of Infectious Diseases and Immunology*, **2016**, 1(1), 1-20.

American Museum of Natural History. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Leptodactylidae/Leiuperinae/Physalaemus/Physalaemus-nattereri>. Acessado em 21/04/2017.

Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, **2016**, 26, 43-57.

Angélique L, Frederik WJ, Garmi J, Hester du PL. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases. *Molecules*, **2015**, 20(8), 15, 392-433.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – BRASIL, Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm. Acessado em 23/01/2018.

Band VI, Weiss DS. Mechanisms of antimicrobial peptide resistance in Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, **2015**, 4(1), 18–41.

Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial peptides. *Journal of Dental Research*, **2016**, 96, 254-260.

Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*. **1982**, 46 (3), 241–280.

Beveridge TJ. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech. Histochem*, **2001**, 76(3), 111-118.

Carris L, Little C, Stiles C. Introduction to Fungi. *The Plant Health Instructor*. **2012**.

Carvalho AC. Avaliação dos efeitos citotóxicos e antiproliferativos da secreção cutânea e de peptídeos do anuro *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863). **2015**. 178 f., Tese (Doutorado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, Brasília.

Castanho MA, Melo MN., Ferre R. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, 7(3), 245–250.

Castro MS, Cilli EM, Fontes W. Combinatorial synthesis and directed evolution applied to the production of alpha-helix forming antimicrobial peptides analogues. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2006**, 7(6), 473-478.

Castro MS, Ferreira TC, Cilli EM, Crusca E Jr, Mendes-Giannini MJ, Sebben A, Ricart CA, Sousa MV, Fontes W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides*, **2009**, 30(2), 291-296.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [1] - EUA, Disponível em https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html. Acessado em 21/04/2017.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [2] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/> Acessado em 23/01/2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [3] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html> Acessado em 25/01/2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [4] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html> Acessado em 25/01/2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [5] - EUA, Disponível em https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html Acessado em 26/01/2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [6] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html> Acessado em 27/01/2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [7] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html> Acessado em 30/01/2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [8] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/index.html> Acessado em 01/02/2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [9] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/yellowfever/qa/index.html> Acessado em 01/02/2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention [10] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html> Acessado em 25/07/2018

CDC - Center for Disease Control and Prevention [11] - EUA, Disponível em <https://www.cdc.gov/dengue/symptoms/index.html> Acessado em 25/07/2018

Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2003**, 67, 226-237.

Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, **2016**, 4(1).

Coenen S, Francis N, Kelly M, Hood K, Nuttall J, Little P, Verheij TJ, Melbye H, Goossens H, Butler CC. Are patient views about antibiotics related to clinician perceptions, management and outcome? A multi-country study in outpatients with acute cough. *PLoS One*, **2013**, 23, 8(10).

Comissão Europeia - Eurobarometer 338. Disponível em http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/docs/ebs_338_en.pdf. Acessado em 07/08/2018.

Conlon JM. The contribution of skin antimicrobial peptides to the system of innate immunity in anurans. *Cell Tissue Res.*, **2011**, 343(1), 201–212.

Conlon JM, Mechkarska M, Lukic ML, Flatt PR. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides*, **2014**, 57, 67-77.

Conlon JM, Sonnevend A, Davidson C, Smith DD, Nielsen PF. The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, 320(1), 170–175.

Cosset FL, Lavillette D. Cell entry of enveloped viruses. *Advances in Genetics*, **2011**, 73, 121-183.

Craven DE, Hjalmarson KI. Ventilator-associated tracheobronchitis and pneumonia: Thinking outside the box. *Clinical Infectious Diseases*. **2010**, 51(IS 1), S59-S66.

Das S, Claudia L, Bernadette CY, Julius M, Babett Ö, Nicola T, Ann-Cathrin W, Kerstin P, Richard R, Konrad F, Elizabeth A, Amy F, Yuko Y, Christine SR, Pauline v. D, Sebastian B, Christian WR, Martina S, Marcus D, Tobias M, Jörg V, Knut O, Derrick WC, Ruth M, Daniel JW, Thomas R, David HW, Martin JF. Natural mutations in a *Staphylococcus aureus* virulence regulator attenuate cytotoxicity but permit bacteremia and abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2016**, 113(22), E3101-110.

Domingues MM, Silva PM, Franquelim HG, Carvalho FA, Castanho MA, Santos NC. Antimicrobial protein rBPI21-induced surface changes on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanomedicine*, **2014**, 10(3), 543–551.

Erdogan A, Rao SS. Small intestinal fungal overgrowth. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **2015**, 17(4), 16.

Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*, **2010**, 5(6), 917–933.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz – BRASIL, disponível em <http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/doen-ciclo-trypanosoma.html>. Acessado em 25/07/2018.

Freitas MA, Silva TFS. Guia ilustrado - A herpetofauna das caatingas e áreas de altitudes do nordeste brasileiro. *USEB*, **2007**, 388p.

Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*, **2016**, 59(3), 145-150.

Gottfried EL. Lipids of human leukocytes: relation to cell type. *Journal of Lipid Research*, **1967**, 8(4), 321-327.

Gow NAR, Latje JP, Munro CA. The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr*, **2017**, 5(3).

Gow NAR, Yadav B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology*, **2017**, 163(8), 1145–1147.

Granoff A, Webster RG. Encyclopedia of Virology. 2. Editora: London: Academic Press, **1999**, 2000p.

Guh AY, Bulens SN, Mu Y, Jacob JT, Reno J. Epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013. *JAMA*, **2015**, 314(14), 1479–1487.

Guimarães AB, Costa FJ, Pires OR, Fontes W, Castro MS. The amazing world of peptide engineering: The example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein Pept Lett.*, **2016**, 23(8), 722-737.

Günter R, Heidemarie O, Cornelia S, Cornelia L-F, Susceptibility of *Candida* species and various moulds to antimycotic drugs: use of epidemiological cutoff values according to EUCAST and CLSI in an 8-year survey. *Medical Mycology*, **2011**, 49(8), 856–863.

Honorato CTM. Análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos. **2009**. 74 f., Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, Brasília.

IUCN - International Union for Conservation of Nature - Disponível em <http://www.iucnredlist.org/details/summary/57267/0>. Acessado em 21/04/2017.

Jindal AK, Pandya K, Khan ID. Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Medical Journal, Armed Forces India*, 2015, 71(2), 178-181.

Joo H-S, Fu C-I, Otto M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2016, 371(1695), pii: 20150292.

Kawasaki H, Iwamuro S. Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug Targets*, 2008, 8(3), 195–205.

Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules*, 2018, 8(1), pii: E4.

Lewies A, Wentzel JF, Jacobs G, Du Plessis LH. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases. *Molecules*, 2015, 20(8), 15392-15433.

Luepke KH, Suda KJ, Boucher H, Russo RL, Bonney MW, Hunt TD, Mohr JF. Past, present, and future of antibacterial economics: Increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy*, 2017, 37, 71-84.

Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 152(1–2), 2-12.

Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2016, 1858(5), 936–946.

Mandal SM, Roy A, Ghosh AK, Hazra TK, Basak A, Franco OL. Challenges and future prospects of antibiotic therapy: From peptides to phages utilization. *Frontiers in Pharmacology*, 2014, 5, 105.

Maria-Neto S, de Almeida KC, Macedo ML, Franco OL. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, 1848(11 Pt B), 3078-88.

Martins-Melo FR, Ramos Júnior AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.*, 2014, 130, 167-174.

McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *Journal of Innate Immunity*, 2012, 4(2), 141-148.

Ministério da Saúde (1) - BRASIL. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42849-vacina-de-febre-amarela-sera-ampliada-para-todo-o-brasil>. Acessado em 25/07/2018.

Ministério da Saúde (2) - BRASIL. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue>. Acessado 25/07/2018.

Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, Thevissen K, Tytgat J, Van Eldere J, van der Walt J, Verdonck F. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biochemistry*, **2002**, 269(19), 4799–4810.

Mole B. MRSA: Farming up trouble. *Nature*, **2013**, 499, 398–400.

Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbial Lett.*, **2007**, 270(1), 1-11.

Muñoz M, Craske M, Severino P, et al. Antimicrobial peptide LL-37 participates in the transcriptional regulation of melanoma cells. *Journal of Cancer*, **2016**, 7(15), 2341-2345.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal, Armed Forces India*, **2015**, 71(1), 67–70.

Nascimento AC, Fontes W, Sebben A, Castro MS. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept Lett.*, **2003**, 10(3), 227-238.

Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis JS. Extended-spectrum β -lactamases: Epidemiology, detection, and treatment. *Pharmacother*, **2001**, 21(8), 920–928.

Nawrocki KL, Crispell EK, McBride SM. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. *Antibiotics*, **2014**, 3(4), 461-492.

NHS - National Health Service – REINO UNIDO. Disponível em <https://www.nhs.uk/conditions/yellow-fever/>. Acessado em 01/02/2018.

NIH – National Institutes of Health – EUA, disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Fluorocytosine>. Acessado em 08/08/2018.

Nilsson M, Lars F, Flock J-I, Pei L, Lindberg M, Guss B. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, **1998**, 66(6), 2666-2673.

Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*, **2017**, 15(2), 96–108.

Omardien S, Brul S, Zaat SAJ. 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*, **2016**, *4*, 111.

OMS - Organização Mundial da Saúde [1] - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em 20/04/2017.

OMS - Organização Mundial da Saúde [2] - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>. Acessado em 01/02/2018.

Otto M. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **2006**, *306*, 251–258.

Otto M. *Staphylococcus epidermidis* - the "accidental" pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, **2010**, *7(8)*, 555–567.

Owen DF. Survival in the wild: Camouflage and mimicry. *Oxford University Press*, **1980**, 158p.

Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2016**, *80(3)*, 629–661.

Perrin BS Jr., Fu R, Pastor RW. Simulations of membrane-disrupting peptides II: AMP piscidin 1 favors surface defects over pores. *Biophys. J.*, 2016, *111(6)*, 1258–1266.

Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, **2010**, *6(10)*.

Pilger DRB, Moraes CB., Gil L., Freitas-Junior L. Drug repurposing for yellow fever using high content screening. bioRxiv 225656, **2017**, doi: <https://doi.org/10.1101/225656>.

Postgate JR. The fundamentals of nitrogen fixation (3rd ed.). *Cambridge University Press*. **1982**, 252p.

Reardon S. Resistance to last ditch antibiotic has spread further than anticipated. *Nature*, **2017**. Disponível em <https://www.nature.com/news/resistance-to-last-ditch-antibiotic-has-spread-farther-than-anticipated-1.22140> Acessado em 25/07/2018

Rodrigues DJ, Uetanabaro M, Lopes FS. Reproductive strategies of *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) and *P. albonotatus* (Steindachner, 1864) at Serra da Bodoquena, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Española de Herpetología*, **2004**, *18*, 63–73.

Ruiz J, Calderon J, Rondón-Villarreal P, Torres R. Analysis of structure and hemolytic activity relationships of antimicrobial peptides (AMPs). In: Castillo L, Cristancho M, Isaza G, Pinzón A, Rodríguez J. *Advances in Computational Biology. Advances in Intelligent Systems and Computing*, **2014**, 232.

Rutherford JC. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. *PLoS Pathog*, **2014**, *10*(5): e1004062.

Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology (4th ed.) *McGraw Hill*, **2004**, 979p.

Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis: A molecular approach, 2nd ed. *ASM Press*, **2002**, 560p.

Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, **2010**, *48*, 765-769.

Schwartz RS, Chiu DT, Lubin B. Plasma membrane phospholipid organization in human erythrocytes. *Curr Top Hematol*. **1985**; *5*: 63-112.

Scocchi M, Mardirossian M, Runti G, Benincasa M. Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria. *Curr Top Med Chem.*, **2016**, *16*(1), 76-88.

Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.*, **2016**, *14*, 1–14.

Shen W, Chen Y, Yao H, Du C, Luan N, Yan X. A novel defensin-like antimicrobial peptide from the skin secretions of the tree frog, *Theloderma kwangsiensis*. *Gene*, **2016**, *576*, 136-140.

Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2013, *374*, 53-80.

Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/anfibios>. Acessado em 23/01/2017.

Swidergall M, Ernst JF. Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryotic Cell*, **2014**, *13*(8), 950–957.

Talbot NJ. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, **2003**, *57*, 177–202.

Torrent M, Pulido D, Rivas L, Andreu D. Antimicrobial peptide action on parasites. *Curr. Drug Targets*, **2012**, *13*(9), 1138-1147.

Ulmschneider JP. Charged antimicrobial peptides can translocate across membranes without forming channel-like pores. *Biophysical Journal*, **2017**, *113*(1), 73–81.

Vale N, Aguiar L, Gomes P. Antimicrobial peptides: A new class of antimalarial drugs? *Front. Pharmacol.*, **2014**, *5*, 275.

Vaupotic T, Veranic P, Jenoe P, Plemenitas A. Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *Fungal Genetics and Biology*, **2008**, *45*(6), 994–1007.

Wang S, Zeng X, Yang Q, Qiao S. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, *17*(603), 1–12.

Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*, **2017**, *7*, 2173.

Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology*, **2010**, *5*(10), 905–917.

Xu X, Lai R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 1760–1846.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **2002**, *415*, 389–395.