



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PENTADACTILINA E FALAXINA:
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SINÉRGICOS COM POLIMIXINA B SOBRE
Klebsiella pneumoniae CARBAPENEMASE E DOS EFEITOS
IMUNOMODULATÓRIOS SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS**

NATANAEL SALES SILVA

BRASÍLIA-DF

2023



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PENTADACTILINA E FALAXINA:
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SINÉRGICOS COM POLIMIXINA B SOBRE
Klebsiella pneumoniae CARBAPENEMASE E DOS EFEITOS
IMUNOMODULATÓRIOS SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS**

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

Autor: Natanael Sales Silva

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

BRASÍLIA-DF

2023



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

NATANAEL SALES SILVA

**PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PENTADACTILINA E FALAXINA:
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SINÉRGICOS COM POLIMIXINA B
SOBRE *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE E DOS EFEITOS
IMUNOMODULATÓRIOS SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Mariana S. Castro

Presidente

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada

Membro Titular

Universidade Católica de Brasília

Dr. Lucas Silva de Oliveira

Membro Titular

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar toda essa oportunidade e me guiar por essa trajetória. Aos meus pais e minha irmã pelo suporte prestado.

Agradeço a minha orientadora Mariana por te me aceitar como aluno durante uma pandemia, e ter me orientado com zelo e paciência em todos os pontos necessários para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço as minhas colegas de laboratório Isa, Day e Raquel pela paciência e disposição de me ajudar a desenvolver grande parte do meu trabalho, sem elas meus resultados não seriam possíveis. E as minhas amigas de grupo Bruna e Joyce que foram grandes companheiras em toda essa minha jornada acadêmica.

Por fim, agradeço a minha namorada Beatriz que esteve sempre comigo, me apoiando, me ajudando e me dando forças nos momentos que mais precisei. Foi certamente meu porto seguro nessa jornada. Obrigado!

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Peptídeos antimicrobianos Pentadactilina e Falaxina: avaliação dos efeitos sinérgicos com polimixina B sobre *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase e dos efeitos imunomodulatórios sobre neutrófilos humanos” foi desenvolvida por Natanael Sales Silva sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro, teve o apoio financeiro do CNPq, da FAPDF, da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas produzidas naturalmente por uma variedade de organismos, incluindo anfíbios como sapos e rãs que os secretam na pele como uma forma de defesa contra patógenos. Esses peptídeos atuam contra uma ampla gama de bactérias, fungos e vírus e possuem potencial terapêutico significativo devido a sua capacidade de matar microrganismos sem causar danos às células humanas. A aplicação desses peptídeos é promissora em diversas áreas, como no desenvolvimento de novos antibióticos e no tratamento de infecções. Além disso, eles estão sendo estudados como uma alternativa aos antibióticos tradicionais que são cada vez mais ineficazes devido à seleção de genes de resistência microbiana. No entanto, apesar do potencial promissor desses peptídeos, ainda há muita pesquisa a ser feita para entender melhor sua eficácia em diferentes contextos e a viabilidade de sua aplicação em grande escala. Além da atividade antimicrobiana, os peptídeos presentes na secreção cutânea de anuros também podem exibir atividade imunomodulatória, o que significa que eles podem afetar a função do sistema imunológico. Esses peptídeos podem agir como agentes pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, regulando a resposta imunológica do organismo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antibacteriano e sinérgico dos peptídeos antimicrobianos Pentadactilina e Falaxina em bactéria multirresistente *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Adicionalmente, foi avaliada a resposta de neutrófilos humanos expostos a essas moléculas. A purificação por RP-HPLC e a análise por espectrometria de massas revelou um alto grau de homogeneidade desses peptídeos para a realização dos ensaios propostos. Ambos os peptídeos apresentaram atividade antibacteriana contra bactéria KPC (Concentração Inibitória Mínima, CIM = 128 µM para os dois peptídeos), e os danos promovidos foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em que se evidenciou deformações na membrana dessa bactéria, o que possivelmente leva à desestruturação da parede e lise do microrganismo. Os testes de combinação de drogas entre os peptídeos e o antibiótico polimixina B indicaram que ambos apresentam efeitos sinérgicos, diminuindo a CIM quando testados contra a bactéria KPC. Na avaliação de seus efeitos imunomodulatórios, ambos os peptídeos não apresentaram resultados significativos quando modularam a resposta fagocitária dos neutrófilos. A Falaxina promoveu uma diminuição na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Ambos os peptídeos não exibiram potencial quimiotático. Os efeitos sinérgicos e imunomodulatórios sobre neutrófilos dos peptídeos Pentadactilina e Falaxina demonstram outras possibilidades de aplicação terapêutica para esses peptídeos.

Palavras-chave: *L. labyrinthicus*, Pentadactilina, Falaxina, Neutrófilos, Sinergismo, KPC.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides are molecules produced naturally by a variety of organisms, including amphibians such as toads and frogs that secrete them into their skin as a form of defense against pathogens. These peptides act against a wide range of bacteria, fungi and viruses and have significant therapeutic potential due to their ability to kill microorganisms without causing harm to human cells. The application of these peptides is promising in several areas, such as the development of new antibiotics and the treatment of infections. Furthermore, they are being studied as an alternative to traditional antibiotics that are increasingly ineffective due to the selection of microbial resistance genes. However, despite the promising potential of these peptides, there is still much research to be done to better understand their effectiveness in different contexts and the feasibility of their large-scale application. In addition to antimicrobial activity, peptides present in anuran skin secretions can also exhibit immunomodulatory activity, which means they can affect the function of the immune system. These peptides can act as pro-inflammatory or anti-inflammatory agents, regulating the body's immune response. The present project aimed to evaluate the antibacterial and synergistic effect of the antimicrobial peptides pentadactylin and fallaxin on multidrug-resistant bacteria *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Additionally, the response of human neutrophils exposed to these molecules was evaluated. Purification by RP-HPLC and mass spectrometry analysis revealed a high degree of homogeneity of these peptides for carrying out the proposed assays. Both peptides showed antibacterial activity against KPC bacteria (Minimum Inhibitory Concentration, MIC = 128 μ M for both peptides), and the damage caused was evaluated by scanning electron microscopy (SEM), which showed deformations in the membrane of this bacterium, which possibly leads to the destruction of the wall and lysis of the microorganism. Drug combination tests between the peptides and the antibiotic polymyxin B indicated that both have synergistic effects, reducing the MIC when tested against KPC bacteria. When evaluating their immunomodulatory effects, both peptides did not show significant results when modulating the phagocytic response of neutrophils. Fallaxin promoted a decrease in the production of Reactive Oxygen Species (ROS). Both peptides did not exhibit chemotactic potential. The synergistic and immunomodulatory effects of the peptides pentadactylin and fallaxin on neutrophils demonstrate other possibilities of therapeutic application for these peptides.

Keywords: *L. labyrinthicus*, Pentadactylin, Fallaxin, Neutrophils, Synergism, KPC.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diversidade estrutural dos peptídeos antimicrobianos (PAMs). Fonte: Büyükkiraz e Kesmen (2021), com modificações.21
- Figura 2.** Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. Os PAMs interagem eletrostaticamente com a membrana bacteriana promovendo a ruptura de membrana ou inibindo funções celulares, resultando na lise bacteriana. Fonte: Zhang e Gallo (2016), com modificações.22
- Figura 3.** Modelos de ação dos PAMs. (A) Os PAMs (cilindros vermelhos) se associam paralelamente à superfície da membrana e (B) se acumulam na superfície, desorganizando o empacotamento lipídico. (C) Os PAMs se inserem na membrana como um canal tipo barril ou (D) induzem a formação localizada de poros toroidais. Fonte: Sato e Feix (2006).23
- Figura 4.** Ilustração do modelo carpet-like. (A) Os PAMs (cilindros vermelhos) se associam paralelamente à superfície da membrana e (B) se acumulam na superfície, desorganizando o empacotamento lipídico. (C) Revestimento de toda superfície da membrana (D) e desintegração por meio da formação de micelas. Fonte: Sato e Feix (2006).24
- Figura 5.** Espécime adulto de *L. labyrinthicus*. Fonte: <https://www.flickr.com/photos/pedrohmartins/9530015903>.31
- Figura 6.** Esquema de plaqueamento da Polimixina B e dos peptídeos para avaliação do possível sinergismo entre as duas drogas. Fonte: Santos (2023), com modificações.40
- Figura 7.** Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção bruta de *L. labyrinthicus* em coluna C₁₈ (Shim-pack VP-ODS, 150 x 6.0 mm) com fluxo de 1 mL/min. As frações de interesse estão identificadas com as setas vermelhas.45
- Figura 8.** Espectro de massas, em sistema do tipo MALDI-TOF, da fração correspondente ao peptídeo Falaxina. Os espectros foram obtidos plaqueando-se as amostras com matriz HCCA (20 µg/µL) e analisadas no modo refletido positivo.46
- Figura 9.** Espectro de massas, em sistema do tipo MALDI-TOF, da fração correspondente ao peptídeo Pentadactilina, com a presença de contaminantes. Os espectros foram obtidos plaqueando-se as amostras com matriz HCCA (20 µg/µL) e analisadas no modo refletido positivo.47
- Figura 10.** Perfil cromatográfico resultante da recromatografia da fração correspondente ao peptídeo Pentadactilina em coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac, 218TP54 4,6 x 250 nm) com fluxo de 1 mL/min. A fração de interesse está identificada com seta vermelha.48

Figura 11. Espectro de massas, em sistema tipo MALDI-TOF, da fração correspondente ao peptídeo Pentadactilina. Os espectros foram obtidos plaqueando as amostras com matriz HCCA (20 µg/µL) e analisadas no modo refletido positivo.	49
Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura da bactéria KPC após 45 min de incubação com os peptídeos Pentadactilina e Falaxina, avaliado seu comportamento morfológico. (A) Controle sem tratamento (ausência dos peptídeos); (B) Incubação da bactéria com a Pentadactilina a 128 µM; (C) Incubação da bactéria com a Falaxina a 128 µM.	50
Figura 13. Distribuição dos neutrófilos após o procedimento de separação celular.	52
Figura 14. Fagocitose de leveduras <i>S. cerevisiae</i> por neutrófilos humanos. As setas verdes indicam neutrófilos; a seta azul indica uma levedura <i>S. cerevisiae</i> ; a seta vermelha indica um neutrófilo fagocitando as leveduras. Aumento de 100x. Fonte: Autor.	52
Figura 15. Avaliação da capacidade fagocitária de leveduras <i>S. cerevisiae</i> por neutrófilos humanos submetidos a diferentes condições. O estímulo duplo (fMLP + Falaxina) promoveu um aumento significativo da fagocitose em comparação com o grupo controle. *p<0,05, n.s.=não significativo.	53
Figura 16. Quantidade de leveduras por neutrófilos em 100 células contadas. O estímulo duplo (fMLP + Falaxina) promoveu um aumento significativo em comparação com o grupo controle. *p<0,05, n.s.=não significativo.	53
Figura 17. Avaliação da capacidade fagocitária de leveduras <i>S. cerevisiae</i> por neutrófilos humanos submetidos a diferentes condições. O estímulo duplo (fMLP + Pentadactilina) causou um aumento significativo da fagocitose em comparação com o grupo controle. *p<0,05, n.s.=não significativo.	54
Figura 18. Quantidade de leveduras por neutrófilos em 100 células contadas. Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados. n.s.=não significativo.	54
Figura 19. Neutrófilos resultantes do ensaio de NBT em lâmina. A figura 19A consiste nos neutrófilos quiescentes (controle) tratados com NBT. As figuras 19B e C consistem nos neutrófilos ativados com fMLP e que, quando tratados com o NBT, reagem com as EROs produzindo os cristais de formazan de coloração azul. Aumento de 100x. Fonte: Autor.	55
Figura 20. Avaliação da produção de EROs de neutrófilos humanos nos testes de NBT em lâmina, submetidos a diferentes condições. O estímulo duplo (fMLP + Falaxina) causou uma redução significativa da produção de EROs em comparação com o grupo ativado com fMLP. *p<0,05 ***p<0,0001, n.s.=não significativo.	56

- Figura 21.** Avaliação da produção de EROs de neutrófilos humanos nos testes de NBT colorimétrico, submetidos a diferentes condições. O estímulo duplo (fMLP + Falaxina) causou uma redução significativa da produção de EROs em comparação com o grupo dos neutrófilos ativados com fMLP. * $p < 0,05$, n.s.=não significativo..... 56
- Figura 22.** Avaliação da produção de EROs de neutrófilos humanos nos testes de NBT em lâmina, submetidos a diferentes condições. Não houve resultados significativos da produção de EROs quando comparados os grupos de interesse: Neutrófilos ativados com a Pentadactilina comparados com o grupo controle; neutrófilos ativados com o estímulo duplo comparados com o grupo fMLP. *** $p < 0,0001$, n.s.=não significativo. 57
- Figura 23.** Avaliação da produção de EROs de neutrófilos humanos nos testes de NBT colorimétrico, submetidos a diferentes condições. Não houve diferenças significativas na produção de EROs quando comparados os grupos de interesse: Neutrófilos ativados com a Pentadactilina comparados com o grupo controle; neutrófilos ativados com o estímulo duplo comparados com o grupo fMLP. * $p < 0,05$, n.s.=não significativo. 57
- Figura 24.** Avaliação do potencial quimiotático do peptídeo Falaxina. As amostras foram avaliadas por um período de 3 horas, em intervalos de 1 minuto em cada leitura. As medidas são realizadas pelo valor da impedância (eixo Y) pelo tempo (eixo X)..... 58
- Figura 25.** Avaliação do potencial quimiotático do peptídeo Pentadactilina. As amostras foram avaliadas por um período de 3 horas, em intervalos de 1 minuto em cada leitura. As medidas são realizadas pelo valor da impedância (eixo Y) pelo tempo (eixo X)..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações dos peptídeos Pentadactilina e Falaxina isolados da secreção cutânea de <i>L. labyrinthicus</i> . Fonte: Chagas (2014), com modificações.	33
Tabela 2. Comparação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos PAMs Pentadactilina e Falaxina. Os valores das CIMs foram obtidos por meio de ensaios contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	33
Tabela 3. Valores de ICIF e relação com atividade sinérgica, aditiva, indiferente ou antagonica.	41
Tabela 4. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Pentadactilina e Falaxina.	50
Tabela 5. Avaliação dos efeitos dos peptídeos Pentadactilina e Falaxina em associação com Polimixina B contra bactéria KPC.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima, do inglês <i>Minimal inhibitory concentration</i>
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
fMLP	Formil-metionina-leucil-fenilalanina, do inglês <i>Formyl-methionine-leucyl-phenylalanine</i>
Fmoc	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
HBSS	Solução de sais balanceados de Hank – Solução Tampão
HCCA	Ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
HUB	Hospital universitário de Brasília
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz, do inglês <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
NETs	Armadilha extracelular de neutrófilos, do inglês <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NK	Células assassinas naturais, do inglês <i>Natural Killers</i>
nm	Nanômetro
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PBS	Tampão fosfato salino
PMNs	Polimorfonucleares
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês

	<i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>
RPM	Rotações por minuto
RTCA	do inglês, <i>Real Time Cell Analyzer</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
TLR	Receptores do tipo Toll, do inglês <i>Toll-like Receptors</i>
TOF	Tempo de voo, do inglês <i>Time-of-Flight</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. ADVENTO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	17
1.1.1. Antibióticos e mecanismos de resistência bacteriana	18
1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMs).....	20
1.2.1. Mecanismos de ação	21
1.2.2. Uso combinado de PAMs como alternativa terapêutica a infecções bacterianas multirresistentes	25
1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS IMUNOMODULATÓRIOS.....	25
1.3.1. Imunidade inata e adaptativa	26
1.3.2. Neutrófilos.....	27
1.4. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EXTRAÍDOS DE ANFÍBIOS	29
1.4.1. Peptídeos antimicrobianos do gênero <i>Leptodactylus</i>	30
1.4.2. <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	31
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)..	37
4.2. SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS.....	37
4.3. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF	37
4.4. QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	38
4.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	38
4.6. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS PEPTÍDEOS SOBRE A MORFOLOGIA CELULAR DA BACTÉRIA KPC POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	39
4.7. ENSAIO DE SINERGISMO PELO MÉTODO DE CHECKERBOARD	39
4.8. ENSAIOS IMUNOMODULÁTORIOS SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS	41
4.8.1. Seleção de doadores e coleta de sangue	41
4.8.2. Separação dos neutrófilos.....	42
4.8.3. Ativação dos neutrófilos	42
4.8.4. Fagocitose de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
4.8.5. Avaliação da produção de EROS (NBT).....	43
4.8.6. Migração de neutrófilos em tempo real por RTCA	44
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44

5. RESULTADOS	45
5.1. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SECREÇÃO BRUTA DE <i>L. labyrinthicus</i> E ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	45
5.2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS PEPTÍDEOS PENTADACTILINA E FALAXINA	50
5.3. ENSAIOS IMUNOMODULÁTORIOS SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS	52
5.3.1. Separação dos neutrófilos.....	52
5.3.2. Fagocitose de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
5.3.3. Avaliação da produção de EROs (NBT).....	55
5.3.4. Migração de neutrófilos em tempo real por RTCA	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

A classe Amphibia contém 8652 espécies descritas distribuídas em 3 diferentes ordens: Gymnophiona, Caudata e Anura, sendo a ordem Anura a de maior ocorrência global de espécies, com aproximadamente 7617 espécies (Frost, 2023). De acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia, a fauna de anfíbios brasileira é composta por 1188 espécies, sendo também sua grande maioria de anuros – 1144 espécies (Segalla *et al.*, 2021).

Apesar de sua inofensiva aparência, esses organismos apresentam diversos mecanismos fisiológicos, morfológicos e comportamentais de sobrevivência que foram adquiridos diante da pressão seletiva do ambiente, uma vez que apresentam um ciclo de vida bifásico, ou seja, metade aquático e metade terrestre. Dentre esses mecanismos, podemos citar: camuflagem; mimetismo; e características cutâneas com diferentes funções, como cores chamativas indicando presença de veneno, respiração, osmorregulação, proteção e liberação de secreção pelas glândulas (Duellman; Trueb, 1986).

As glândulas cutâneas dos anfíbios se dividem em dois tipos: as glândulas mucosas, que são mais abundantes e têm função umidificante e lubrificante, auxiliando também na respiração cutânea, termorregulação e proteção contra predação; e as glândulas granulosas, menos numerosas, mas responsáveis por sintetizar e armazenar grande parte das substâncias tóxicas encontradas nas secreções cutâneas dos anfíbios (Rollins-Smith *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2003). As substâncias tóxicas encontradas nas secreções das glândulas granulosas revestem a pele dos anfíbios, sendo capazes de promover defesa contra organismos patogênicos, auxiliar na cicatrização e ser desagradável ao paladar dos predadores, favorecendo a sua sobrevivência (Duellman; Trueb, 1986).

Algumas populações ao redor do mundo, por questões culturais, acreditam no uso medicinal dessas secreções e as utilizam desde a prevenção de doenças até em seu uso afrodisíaco (Gomes *et al.*, 2007). Vários compostos biologicamente ativos são encontrados na secreção granulosa, tais como: peptídeos, proteínas, esteroides e alcaloides. Esses compostos podem apresentar diversas propriedades farmacológicas como: neurotoxicidade, vasoconstritor, alucinógeno, antimicrobiano, citotóxico, entre outros (Toledo; Jared, 1995; Nascimento *et al.*, 2007).

Um dos grupos mais estudados são os peptídeos com atividade antimicrobiana, por apresentarem um importante papel na imunidade inata, que constitui a primeira linha de defesa contra organismos invasores, e por serem capazes de atuar no processo inflamatório e na

quimiotaxia (Izadpanah; Gallo, 2005). Tendo em vista o aumento crescente de bactérias resistentes aos antibióticos presentes no mercado, inúmeros peptídeos foram isolados da secreção cutânea dos anuros e têm sido estudados quanto a sua atividade antibacteriana (Libério, 2008).

1.1. ADVENTO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

As bactérias apresentam formas de se adaptarem e sobreviverem no meio em que vivem, tendo uma grande capacidade de resposta às ameaças ambientais, ao sistema imune e aos medicamentos, o que afeta de forma negativa a eficácia das terapias antibacterianas (Jolivet-Gougeon; Bonnaure-Mallet, 2014). Essa resistência adquirida aos medicamentos ocorre de forma natural como mecanismo de sobrevivência, explicadas pela seleção natural de Charles Darwin por meio da transferência de genes, mutações e formação de biofilmes (Hopman *et al.*, 2019; Oliveira; Silveira, 2021).

A sociedade globalizada enfrenta atualmente uma crise em larga escala com relação a resistência bacteriana aos antibióticos. Clinicamente, essa resistência promove o desequilíbrio da flora bacteriana do paciente e a proliferação de microrganismos oportunistas com o surgimento de novas infecções (Mcgowan Junior, 1983). Além disso, quando um mecanismo de resistência aos efeitos de um antibiótico é selecionado, isso acaba por favorecer resistência também contra todos os outros antibióticos que fazem parte da mesma classe (Guardabassi *et al.*, 2018; Guardabassi; Prescott, 2015).

O uso indiscriminado e a prescrição excessiva de antibióticos, desde os tempos da descoberta dos antibióticos, promoveu essa crise, gerando o surgimento de microrganismos chamados de superbactérias, sendo um grande problema de saúde pública. As pesquisas e o desenvolvimento de novos antibióticos é um processo que requer muito tempo, além de seu alto custo, comprometendo assim o controle das infecções na sociedade (Luepke *et al.*, 2017). Diante desse panorama, é urgente a necessidade de desenvolver novas metodologias contra as infecções causadas por essas superbactérias. Na busca por novos agentes antimicrobianos se destacam os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Bahar; Ren, 2013).

Os PAMs apresentam uma potente atividade antimicrobiana com diferentes alvos de ação, podendo ser utilizados na neutralização de diversos patógenos como vírus, bactérias, protozoários e fungos (Berglund *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2020). Os PAMs agem sem alta especificidade em relação a um alvo proteico, reduzindo a probabilidade de resistência dos microrganismos, sendo considerados excelentes alternativas a utilização excessiva da

farmacologia convencional (Wimley; Hristova, 2011). Com isso, convém desenvolver e aprofundar os estudos sobre os mecanismos exercidos pelos PAMs, facilitando novas abordagens terapêuticas e o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos (Peters; Shirliff; Jabra-Rizk, 2010).

1.1.1. Antibióticos e mecanismos de resistência bacteriana

Os antibióticos são compostos que podem ser naturais ou sintéticos, e que são capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de organismos como bactérias e fungos. Possuem uma classificação, sendo bactericidas quando causam a morte de uma bactéria, ou bacteriostáticos quando inibem o crescimento microbiano (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010).

Dentre as diversas classes de antibióticos, podemos citar os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, e monobactamas) que atuam inibindo a correta formação das cadeias de peptidoglicano e com isso, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana; tetraciclínas, aminoglicosídeos e macrolídeos que atuam na inibição de síntese proteica bacteriana; peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos) que afetam a permeabilidade da membrana bacteriana; entre outros (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010).

A classe de antibióticos conhecida como polimixinas, composta por cinco substâncias semelhantes denominadas de polimixinas A, B, C, D e E, são potentes polipeptídios catiônicos que atuam sobre várias bactérias Gram-Negativas, através da interação desses polipeptídios com os lipopolissacarídeos e fosfolipídeos da superfície externa bacteriana, desestabilizando a parede celular e promovendo um aumento da permeabilidade da membrana (Lima *et al.*, 2021). No entanto, seu uso foi abandonado nos anos 1970 e 1980 devido sua toxicidade e o surgimento de drogas menos tóxicas. Com o surgimento de bactérias resistentes, renovou-se o interesse de uso por essa classe de antibióticos. Atualmente, somente as polimixinas B e E são utilizadas na clínica contra bactérias resistentes, devido a toxicidade elevada das demais (Mendes; Burdman, 2009). A polimixina B, utilizada por administração intravenosa, apresenta efeitos adversos como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, sendo um antibiótico utilizado como último recurso (Lima *et al.*, 2021).

As bactérias apresentam diversos mecanismos para resistirem aos antibióticos que são utilizados para combatê-los. Podemos citar dois tipos fundamentais de resistência inerentes a esses organismos: resistência constitutiva e resistência induzida (Libério, 2008).

Na resistência constitutiva, os mecanismos são inerentes ao organismo e normalmente expressos, podendo citar a alteração da polaridade da membrana das bactérias (ex: redução do

potencial transmembrana). Na resistência induzida, as respostas são causadas pelo estresse do ambiente rico em moléculas usadas para a destruição desses organismos, na qual a bactéria apresenta respostas adaptativas, tais como: modificações de alvos intracelulares; alteração da permeabilidade da membrana plasmática; inativação enzimática; bombas de efluxo dependentes de energia (eliminando das células os antibióticos); produção de biofilmes (impedindo a permeabilização de moléculas antibacterianas) (Libério, 2008; Yeaman; Yount, 2003).

Os fármacos adentram na membrana bacteriana por difusão simples na bicamada fosfolipídica e difusão facilitada por meio de proteínas transmembranares como as porinas. Todos esses mecanismos induzem a ruptura da membrana bacteriana e promovem a entrada facilitada do fármaco. Logo, alguns mecanismos de alteração da permeabilidade promovido pelas bactérias estão relacionados com a alteração de funções, quantidade e/ou tamanho das porinas, fazendo com que os antibióticos atravessem a membrana em menor quantidade e tenham uma redução de seus efeitos (Toleman, 2011; Costa; Júnior, 2017).

A inativação enzimática consiste em um processo em que as bactérias produzem enzimas que se ligam aos fármacos e que os degradam e/ou inativam por meio de reações químicas como hidrólise, transferência de grupos ou oxirredução. Podemos citar a produção pelas bactérias da enzima β -lactamase que promove a hidrólise do anel de β -lactâmico nos fármacos que possuem essa estrutura, como as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (Kumar; Singh, 2013).

Um outro mecanismo de resistência das bactérias são as bombas de efluxo que consistem em proteínas presentes em suas membranas, que transferem o fármaco para o meio extracelular (através de sistema antiporte - força próton-motriz). Um aumento no sistema de efluxo dessas bombas promove essa resistência, diminuindo a concentração e atividade dos fármacos. (Dzidic *et al.*, 2008).

A presença de biofilmes é um mecanismo de resistência, sendo um agregado multicelular microbiológico aderido a uma superfície e é composto por várias moléculas como proteínas, vitaminas, lipídios, etc., que promovem uma espécie de crosta, debaixo da qual, as bactérias continuam seu crescimento em associação com outros microrganismos. Nos biofilmes, essas bactérias estão mais resistentes à ação de agentes químicos, físicos e biológicos como os antibióticos (Macêdo, 2000).

Os PAMs apresentam menores taxas de evasão desses mecanismos de resistência das bactérias em comparação aos antibióticos convencionais, devido ao mecanismo de ação não

específico. Alguns estudos apresentam a eficácia dos PAMs mesmo na presença de mecanismos de resistência citados anteriormente (ex: inibição de biofilmes), continuando a ser uma ótima alternativa contra as bactérias multirresistentes (Pletzer; Coleman; Hancock, 2016).

1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)

A superfície de células eucariontes como plantas, vertebrados e invertebrados, na qual incluímos os humanos produzem, como uma forma de proteção, os peptídeos antimicrobianos. Sua produção é regulada geneticamente e são sintetizados no ribossomo, influenciados por fatores ambientais e hormonais (Libério, 2008).

Os PAMs são uma classe única de compostos muito conservados e no geral possuem uma região hidrofílica e outra hidrofóbica bem definida (isto é, são moléculas anfipáticas), o que permite solubilidade em ambientes aquosos (Moretta *et al.*, 2021). Além disso, são constituídos por aminoácidos e apresentam diferentes comprimentos, podendo ter até 100 resíduos de aminoácidos (Jenssen; Hamill; Hancock, 2006). Em sua maioria, apresentam carga líquida positiva, resultante da presença de resíduos de lisina, arginina e histidina em sua estrutura (Kumar; Kizhakkedathu; Straus, 2018). Os PAMs são produzidos por todas as formas de vida e são encontrados naturalmente em animais e plantas, desempenhando um papel crucial na resposta imune desses organismos e auxiliando em sua evolução (Huan *et al.*, 2020).

Dentre as funções dos PAMs podemos destacar seu papel pró-apoptótico, sua atuação na defesa inata, no combate a microrganismos invasores, no processo de cicatrização, e suas atividades antifúngicas, antivirais e anticâncer (Huan *et al.*, 2020). Os PAMs apresentam também função de sinalização, promovem proteção através de quimiocinas, inibem e estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzem a modulação das atividades do sistema imune humano, como as células T e as células dendríticas (Kumar; Kizhakkedathu; Straus, 2018).

Os PAMs podem adotar diferentes estruturas que estão diretamente relacionadas com seu mecanismo de ação. A classificação usualmente utilizada é baseada em sua estrutura secundária, sendo divididos em quatro grupos principais: α -hélice, folhas- β , mista (α -hélice/ β -folha) e estendida (Figura 1) (Büyükkiraz; Kesmen, 2021).

Os PAMs com uma estrutura em α -hélice são os mais estudados e sua presença é um fator primordial nas interações dos peptídeos com a membrana alvo das bactérias, permitindo a ruptura dessas membranas por meio de poros (Büyükkiraz; Kesmen, 2021). Já os PAMs que apresentam estruturas em folhas- β atuam de diversas maneiras, por exemplo, na inibição de

componentes lipídicos na membrana alvo e na inibição da síntese da parede celular (Wang, 2017).

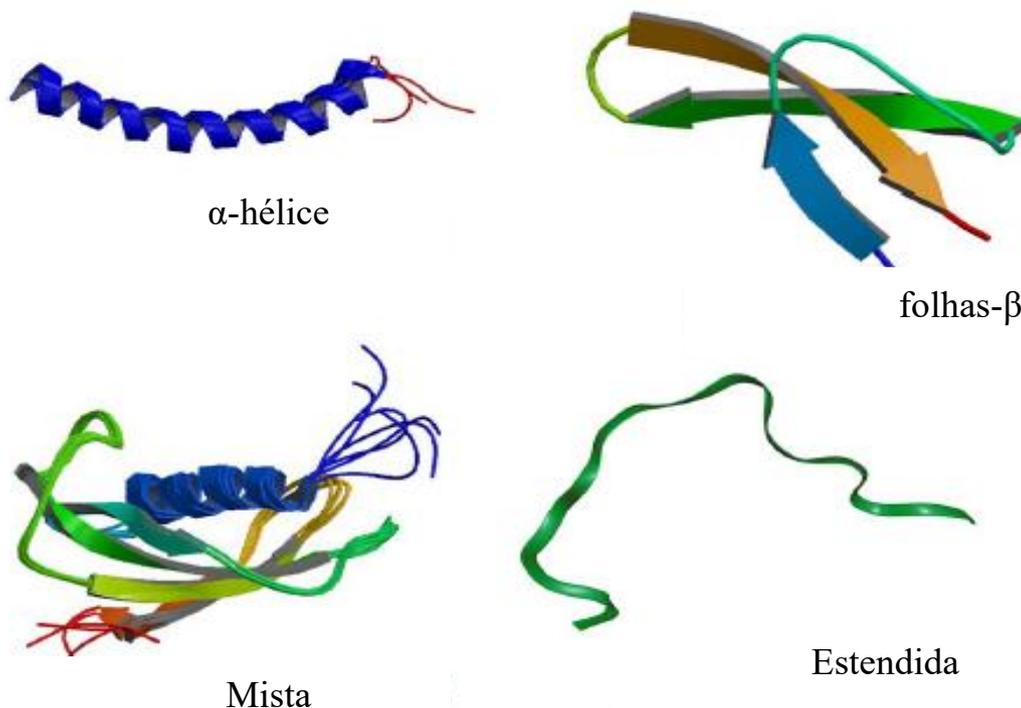


Figura 1. Diversidade estrutural dos peptídeos antimicrobianos (PAMs). Fonte: Büyükkiraz e Kesmen (2021), com modificações.

Os parâmetros físico-químicos dos PAMs tais como comprimento da cadeia peptídica, cationicidade, hidrofobicidade, anfipaticidade e tipo de estruturas secundárias adotadas são de extrema importância para a sua atividade biológica e esses fatores interagem de modo a proporcionar uma melhor resposta antimicrobiana (Li *et al.*, 2021).

1.2.1. Mecanismos de ação

Os componentes das membranas biológicas, constituídas principalmente de fosfolípidios e proteínas, se diferenciam entre os organismos eucariotos e procariotos. Os fosfolípidios aniônicos, que possuem eletronegatividade, são os principais constituintes das membranas bacterianas patogênicas. Além disso, outros componentes com carga negativa como o ácido teicoico, o ácido lipoteicoico e os lipopolissacarídeos (LPS) estão presentes na superfície celular bacteriana e são considerados alvos potenciais para os PAMs (Zasloff, 2002; Büyükkiraz; Kesmen, 2021). Já as membranas celulares de mamíferos apresentam fosfolípidios com carga neutra e possuem colesterol que estabiliza a membrana e bloqueia a interação dos

PAMs (Gaspar; Veiga; Castanho, 2013). Essa compreensão é necessária para entender a seletividade e o modo de interação dos PAMs com as membranas (Zasloff, 2002).

A capacidade dos PAMs de interagir com a membrana das bactérias ou com as paredes celulares definirá sua capacidade de destruir esses organismos. Como os PAMs apresentam carga líquida positiva e uma porção de aminoácidos hidrofóbicos, eles se ligam de forma seletiva aos fosfolipídios das membranas bacterianas com cargas negativas, e essas interações eletrostáticas prejudicam a integridade estrutural da membrana bacteriana (Zhang; Gallo, 2016). Alguns peptídeos apresentam também a capacidade de atravessar a camada lipídica bacteriana sem causar danos e atuam inibindo funções intracelulares, como bloqueio da atividade enzimática ou inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Zhang; Gallo, 2016) (Figura 2).

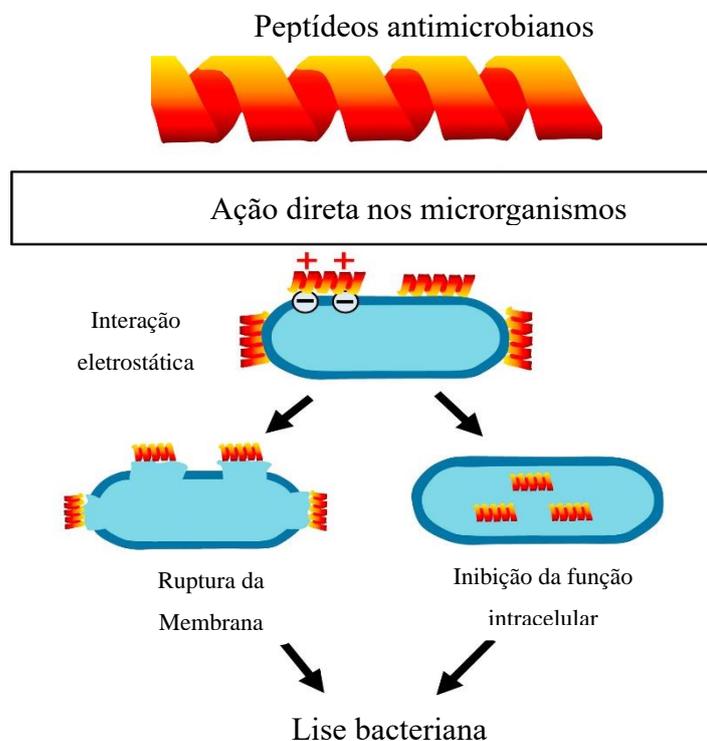


Figura 2. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. Os PAMs interagem eletrostaticamente com a membrana bacteriana promovendo a ruptura de membrana ou inibindo funções celulares, resultando na lise bacteriana. Fonte: Zhang e Gallo (2016), com modificações.

Baseado nessas informações, alguns modelos de interações dos PAMs com as membranas bacterianas foram propostos para explicar como essas interações, após a fixação inicial dos PAMs, promovem a perturbação da membrana e sua consequente permeabilização (Figuras 3 e 4) (Jenssen; Hamill; Hancock, 2006).

No modelo *barrel-stave* (Figura 3C), os peptídeos se agregam paralelamente à membrana e inserem-se perpendicularmente ao plano da bicamada movida pela combinação hidrofóbica, formando poros ou canais transmembranares. A estrutura anfipática dos peptídeos é extremamente importante nesse modelo, tendo uma interação inicial da parte hidrofílica com a cabeça polar dos lipídios da membrana e, após isso, as regiões hidrofóbicas interagem com esses mesmos lipídios membranares, formando um poro com a região hidrofílica revestindo o lúmen do canal transmembranar (Toke, 2005).

No modelo do poro toroidal (Figura 3D), os peptídeos se inserem perpendicularmente na bicamada, semelhante ao modelo *barrel-stave*, mas dessa vez formam um complexo composto em parte por peptídeo e parte pelos próprios fosfolipídios da membrana, promovendo a curvatura da membrana e resultando na formação do poro (Hazam; Goyal; Ramakrishnanet, 2019).

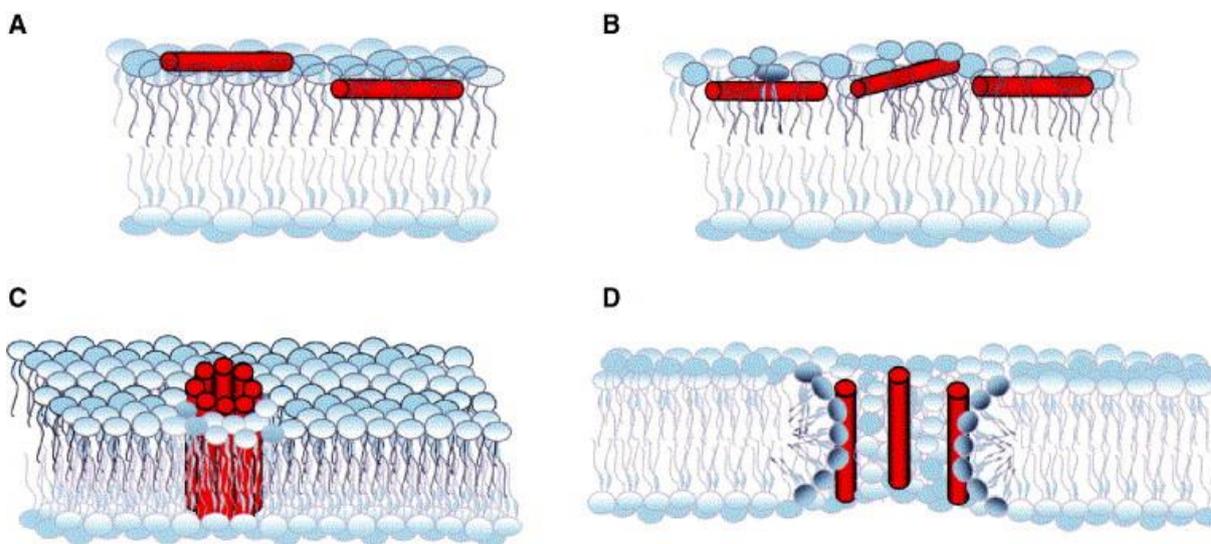


Figura 3. Modelos de ação dos PAMs. (A) Os PAMs (cilindros vermelhos) se associam paralelamente à superfície da membrana e (B) se acumulam na superfície, desorganizando o empacotamento lipídico. (C) Os PAMs se inserem na membrana como um canal tipo barril ou (D) induzem a formação localizada de poros toroidais. Fonte: Sato e Feix (2006).

Outro modelo conhecido é o *carpet-like* (Figura 4), onde os peptídeos se ligam paralelamente à superfície da membrana graças a interações eletrostáticas dos componentes catiônicos dos peptídeos e aniônico dos fosfolipídios. Ao atingir uma concentração crítica de

peptídeos eles se reorientam e causam a desintegração da membrana ao formarem micelas (Hazam; Goyal; Ramakrishnanet, 2019).

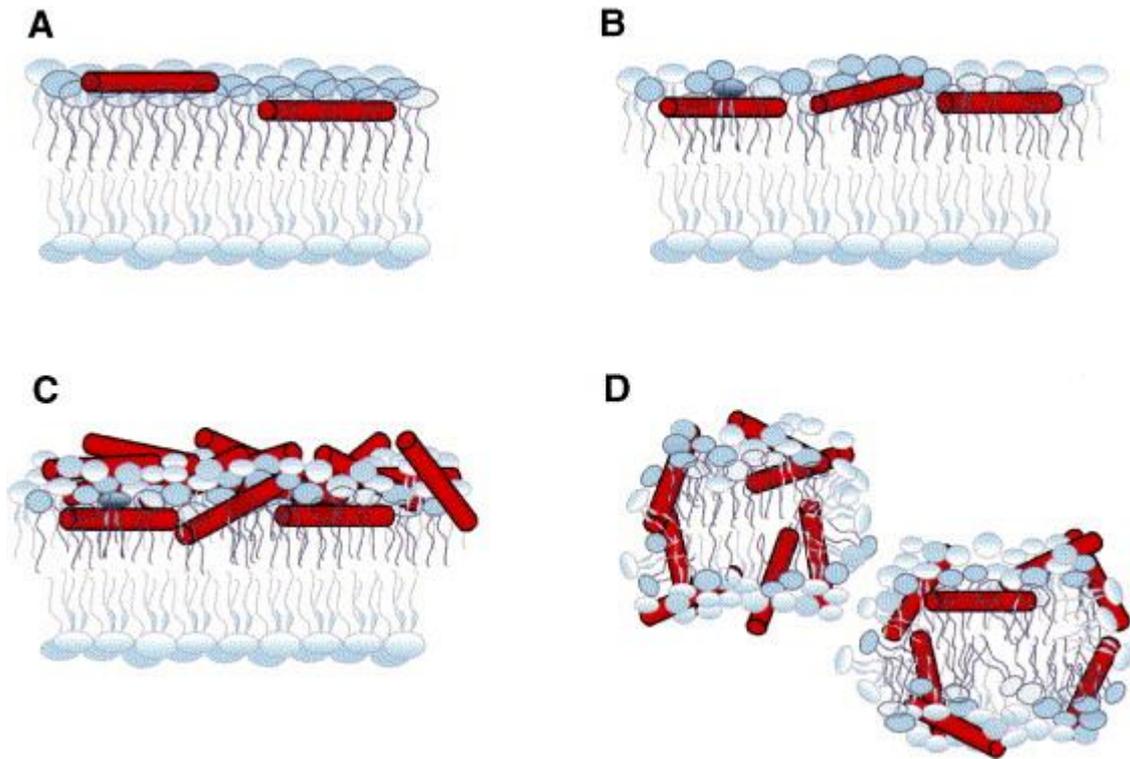


Figura 4. Ilustração do modelo *carpet-like*. (A) Os PAMs (cilindros vermelhos) se associam paralelamente à superfície da membrana e (B) se acumulam na superfície, desorganizando o empacotamento lipídico. (C) Revestimento de toda superfície da membrana (D) e desintegração por meio da formação de micelas. Fonte: Sato e Feix (2006).

Um outro mecanismo que envolve inicialmente o modelo *carpet-like* é denominado *Shai-Matsuzaki-Huang*, onde os peptídeos não atuam diretamente na membrana bacteriana, mas no seu meio intracelular. Esse modelo envolve a formação dos carpetes e dos poros por meio da ligação dos PAMs à membrana. A bicamada é esticada, permitindo a difusão dos PAMs para o citoplasma celular, atingindo alvos intracelulares da bactéria (Zasloff, 2002). Uma vez no citoplasma, esses PAMs podem inibir a biossíntese de proteínas e de ácidos nucleicos, inibir a atividade das proteases e inibir a divisão celular, dentre outros mecanismos (Huan *et al.*, 2020). Assim os PAMs são capazes de eliminar seus alvos por mecanismos distintos.

1.2.2. Uso combinado de PAMs como alternativa terapêutica a infecções bacterianas multirresistentes

A resistência adquirida por muitas cepas bacterianas como a *K. pneumoniae* e o *Staphylococcus aureus* diante da maioria das classes de antimicrobianos desenvolvidos tem causado dificuldades nos tratamentos terapêuticos. A resistência bacteriana promovida pelo uso contínuo de medicamentos acaba sendo algo inevitável, ocasionando assim um baixo investimento para desenvolvimento de fármacos pela indústria farmacêutica (Golkar; Bagasra; Pace, 2014). Esse desinteresse pela descoberta de novas drogas é ocasionado por fatores como o alto custo de ensaios clínicos e o longo período para conclusão de testes pré-clínicos e clínicos (Martens; Demain, 2017).

A utilização de PAMs em conjunto com outros antibióticos pode ser usada como uma forma de reduzir a resistência bacteriana, já que os antibióticos são moléculas bastante estudadas. Propor estudar combinações que levem a sinergias antimicrobianas eficazes pode ser uma alternativa contra bactérias resistentes, uma vez que esse mecanismo possui vários alvos em vias independentes, sendo mais letal e diminuindo a probabilidade das bactérias escaparem e adquirirem resistência (Zhu *et al.*, 2022).

O sinergismo pode ser definido como uma resposta farmacológica que é obtida através da combinação de dois ou mais fármacos cujo resultado é maior do que a soma dos efeitos isolados de cada um deles (Porcino, 2018). Cada fármaco pode apresentar um mecanismo de ação distinto, favorecendo o uso dessa metodologia e com o intuito de aumentar a ação bactericida (Langeveld; Veldhuizen; Burt, 2014). Com isso, os benefícios do uso combinado desses compostos consistem na redução das doses administradas; redução de possíveis efeitos tóxicos desses fármacos; diminuição dos gastos com medicamentos e redução da resistência desenvolvida pelo microrganismo (Porcino, 2018).

1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS IMUNOMODULATÓRIOS

Além da ação direta contra os microrganismos, os PAMs possuem mecanismos indiretos de defesa ao modular o sistema imune. As células do sistema imunológico, como os neutrófilos e os macrófagos que são células de defesa inicial do organismo, produzem uma variedade de PAMs. Curiosamente, alguns PAMs possuem a capacidade de induzir a respostas imune, como ativação de células, quimiotaxia e diferenciação de glóbulos brancos; atividade anti-inflamatória; controle da expressão de quimiocinas e de espécies reativas de oxigênio; e

também estão envolvidos na modulação do sistema imune adaptativo (Kumar; Kizhakkedathu; Straus, 2018; Zhang; Gallo, 2016).

Denominamos de catelicidinas e defensinas os peptídeos mais abundantes e bem caracterizados, que são essenciais na resposta imune inata e na defesa do hospedeiro. Os PAMs humanos, como o LL-37 e β -defensinas são responsáveis por modular a quimiotaxia de leucócitos, induzir ou suprimir mediadores pró-inflamatórios, alterar a cascata de sinalização, entre outros (Kumar; Kizhakkedathu; Straus, 2018; Alford *et al.*, 2020). Todos esses mecanismos podem ser usados para atividade anti-inflamatória, antisséptica, anticâncer e cicatrizante (Alford *et al.*, 2020).

É necessário entender o funcionamento básico do sistema imune e suas células para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos PAMs com atividade imunomodulatória.

1.3.1. Imunidade inata e adaptativa

O sistema imunológico dos vertebrados é dividido em imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, composta por células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e células *natural killer* (NK). Essas células reconhecem danos nos tecidos e a presença de patógenos por meio de receptores de reconhecimento padrão, detectando padrões moleculares associados aos patógenos e ao dano. Os processos que sucedem esse reconhecimento são rápidos, inespecíficos, eficientes e incluem respostas como morte dos patógenos ou células, produção de citocinas, fagocitose e locomoção celular (Netea *et al.*, 2020). A imunidade inata conta também com outros componentes como PAMs, proteínas do sistema complemento, colectinas e pentraxinas (Kaur; Secord, 2019).

As primeiras barreiras do sistema imune inato são as barreiras anatômicas e fisiológicas. O tecido epitelial atua na blindagem contra agentes invasores, auxiliado pelos cílios e pela produção de muco. A barreira fisiológica atua com a produção de proteínas secretadas pelas mucosas que agem contra os microrganismos invasores (Abbas, 2012).

Uma outra barreira, que é a fagocítica, consiste na atuação de células como os macrófagos, que atuam na eliminação de restos celulares e na apresentação de antígenos; células dendríticas que atuam na apresentação de antígenos e na modulação do sistema imune adaptativo (Clark *et al.*, 2000); e por neutrófilos que fagocitam corpos estranhos e liberam mecanismos de ação microbicida como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, NETs) (Kolaczowska; Kubes, 2013).

Por fim, a barreira inflamatória atua na presença de danos nos tecidos ativando o recrutamento de fagócitos pela produção de citocinas, as quais são proteínas sinalizadoras da inflamação (Quinn; Gauss, 2004). Esse recrutamento de células pelas citocinas induz uma sequência de eventos conhecida como resposta inflamatória. Esse processo é modulado principalmente pelos neutrófilos, que se locomovem em direção ao local que ocorreu o dano e, por meio da liberação de proteínas, proteases e de seus mecanismos de ação (EROs e NETs), atenuam os danos causados pela agressão inicial (Fonseca, 2017).

Algumas respostas imunes adaptativas são induzidas simultaneamente com as respostas inatas por meio de células dendríticas, células T e B. No entanto, são mecanismos de resposta com um desenvolvimento mais lento, mas são antígenos-específicas e promovem uma memória imunológica a longo prazo (Netea *et al.*, 2020). Os linfócitos T se diferenciam em três tipos: linfócitos T auxiliares (ou *helpers*) com função de ativar e auxiliar as células B na produção de anticorpos; linfócitos T citotóxicos que, ao reconhecerem antígenos específicos, eliminam células estranhas ao organismo; e linfócitos T supressores que possuem a função de finalização da resposta humoral (produção de anticorpos) (Abbas, 2012).

1.3.2. Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) mais abundantes na circulação sanguínea, compondo a principal barreira do sistema imune inato e apresentam um curto período de vida, com duração de 8 a 12 horas na circulação antes de migrarem para o tecido. São formados durante a hematopoiese, através da proliferação e diferenciação das células precursoras da medula óssea a partir da estimulação de citocinas, principalmente o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (Amulic *et al.*, 2012; Mayadas *et al.*, 2013).

Após sua maturação, os neutrófilos são liberados da medula e entram na circulação. Quando ocorre um dano mecânico ou físico no hospedeiro, sinais químicos inflamatórios são produzidos pelas células e quando ocorre alguma infecção, há secreção de compostos pelos patógenos. Esses fatores irão desencadear uma série de respostas de sinalização que irão recrutar células imunes ao local específico, processo esse denominado de quimiotaxia (Mayadas *et al.*, 2013). Durante esse recrutamento, os neutrófilos são ativados por meio de receptores transmembranares acoplados à proteína G, como o receptor de quimiocina FPR1 e membros da família de receptores semelhantes a *Toll-like* (TLR) (Kolaczowska; Kubes, 2013).

Um potente quimioatraente e ativador de neutrófilos conhecido é o fMLP (n-formil-metionil-leucil-fenilalanina), um peptídeo composto por três aminoácidos isolado de bactérias

Gram-positivas. Esse peptídeo é reconhecido por meio de receptores de peptídeos formilados acoplados à proteína G (Marasco *et al.*, 1984; Panaro; Mitolo, 1999).

Os neutrófilos, quando ativados, apresentam uma ampla gama de mecanismos utilizados na defesa contra os patógenos, sendo as principais: fagocitose, liberação de EROs e de NETs (Kolaczowska; Kubes, 2013).

FAGOCITOSE: A fagocitose consiste em um mecanismo na qual o neutrófilo neutraliza seu alvo ao envolvê-lo com todo seu conteúdo celular e elimina-o por mecanismos desencadeados em seu interior. Nesse processo, inicialmente, temos o reconhecimento do microrganismo pelos receptores do neutrófilo, a extensão de pseudópodes em todo o alvo e o completo engolfamento, resultando na formação do fagossomo (Van Kesse; Bestebroer; Van Strijp, 2014). A fagocitose é mediada por receptores, onde os microrganismos são reconhecidos diretamente como polissacarídeos pelos receptores de manose, por dectina-1 ou por opsonização de partículas (Flannagan; Jaumouillé; Grinstein, 2012). Importantes opsoninas como IgG e fragmentos gerados pela ativação do Sistema Complemento (iC3b e C3b) se agregam na superfície de antígenos e se ligam aos receptores específicos presentes na superfície dos neutrófilos, induzindo a fagocitose (Flannagan; Jaumouillé; Grinstein, 2012). Após a internalização, inicia-se a maturação do fagossomo dando origem ao fagolisossomo que assume capacidade microbicida, degradando o alvo engolfado por meio de grânulos citoplasmáticos ou pela formação de EROs (Mayadas *et al.*, 2013).

PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO: Consideradas um dos principais mecanismos de ação dos neutrófilos, as EROs são formadas a partir da redução parcial do oxigênio molecular, em uma reação catalisada pelo complexo enzimático NADPH oxidase, resultando em uma “explosão respiratória” ou “explosão oxidativa”, ocorrendo dentro dos fagossomos e auxiliando na eliminação de microrganismos fagocitados ou no meio extracelular, quando por exemplo, o organismo é muito grande para ser fagocitado (Dupré-Crochet; Erard; Nüße, 2013).

A deficiência dos mecanismos de EROs permite a colonização dos patógenos nos tecidos, enquanto sua produção em excesso prejudica os tecidos e células imunes saudáveis, incluindo o próprio neutrófilo, prolongando a inflamação (Mittal *et al.*, 2014).

A ação das EROs e sua toxicidade inerente não é direcionada exclusivamente contra os patógenos que induziram a explosão respiratória, sendo afetadas todas as células do sítio

inflamatório. Seu subproduto radical hidroxila (OH^\bullet) reage com muitas macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas e DNA (Glennon-alty *et al.*, 2018). Durante a explosão respiratória, um outro subproduto se torna abundante: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que possui meia vida longa e participa da formação de HOCl e ambos se difundem livremente pelas membranas por não possuírem carga. Com isso, os próprios neutrófilos estão sujeitos a ação desses subprodutos das EROs os quais, ao adentrarem no seu citoplasma, podem induzir oxidação proteica, dano em ácidos nucleicos e por fim, indução de apoptose (Ulfig; Leichert, 2021).

ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs): as NETs podem ser induzidas por diversos fatores como fungos, bactérias, protozoários, vírus e alguns compostos como citocinas e anticorpos (Silva; Finotti, 2019). É um dos mecanismos utilizados para aprisionar, eliminar e prevenir a disseminação dos microrganismos (Brinkmann; Zychlinsky, 2012). Os neutrófilos expõem para o meio extracelular seu conteúdo nuclear em estruturas com formato de rede, compostas por grânulos citoplasmáticos que apresentam em seu interior elastase, lactoferrina, gelatinase, e o DNA (histonas e cromatina) como o maior componente estrutural das NETs (Brinkmann; Zychlinsky, 2012). A liberação das NETs pode ocorrer de forma lenta, dependente de EROs e tem como consequência a morte da célula que liberou esse mecanismo, processo conhecido como netose. (Costa, 2022).

1.4. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EXTRAÍDOS DE ANFÍBIOS

Distribuídos por todo o planeta (exceto Antártica), os anfíbios representam o grupo de vertebrados terrestres mais antigos, e essa persistência contínua na biosfera é, em parte, atribuída as suas secreções cutâneas que têm potencial defensivo contra predadores e microrganismos invasores (Ge, *et al.*, 2014). Como descrito anteriormente, as glândulas cutâneas (mucosas e granulares) presentes nesses anfíbios produzem uma grande diversidade de compostos que são responsáveis por diversas atividades que permitem a sobrevivência desses organismos.

Essas secreções são muito utilizadas e pesquisadas por muitos anos, sendo que muitas moléculas extraídas desses animais, isoladas e caracterizadas, atuam nos organismos vivos como compostos imunomodulatórios, antibióticos e anti-inflamatórios. Com isso, a pele dos anfíbios tem sido considerada como um depósito de moléculas bioativas com potencial terapêutico (Barros *et al.*, 2022).

Os PAMs bioativos são liberados por mecanismo holócrino, onde alguns PAMs são expressos naturalmente e outros são induzidos pela presença de algum microrganismo ou por citocinas endógenas em situações de estresse ou injúria (Schröder, 1999; Mangoni *et al.*, 2001). Esses PAMs derivam do processamento de um precursor, que contém uma sequência sinalizadora e uma pró-região acídica bastante semelhantes. Nos anfíbios, essa porção sinalizadora direciona os PAMs para um local apropriado na glândula, e quando ocorre um estímulo, esse composto é liberado (Libério, 2008).

Os primeiros PAMs isolados são datados de 1987 nos experimentos de Zasloff (Zasloff, 1987), extraindo esses compostos da espécie *Xenopus laevis*. Desde então, nas últimas décadas, um grande número de PAMs extraídos da pele de anfíbios foram relatados, tal como descreve Xu e Lai (2015) em sua revisão sobre PAMs, onde existem aproximadamente 1900 PAMs de anfíbios encontrados em 178 espécies, distribuídas em 28 gêneros. Esses PAMs são classificados em aproximadamente 26 famílias distintas, como as Dermaseptinas, Temporinas, Bombininas, Ocelatinas, entre outros, sendo componentes únicos de acordo com a espécie da qual foram extraídas (Carvalho, 2011; Ladram; Nicolas, 2016). Esses PAMs apresentam diferentes sequências, tamanhos e mecanismos de ação e podem ter efeitos imunomodulatórios, antibacterianos, antifúngicos, antitumoral e antiviral (Carvalho, 2011; Ladram; Nicolas, 2016).

1.4.1. Peptídeos antimicrobianos do gênero *Leptodactylus*

Como descrito anteriormente, a ordem Anura possui o maior número de representantes dentro da classe de anfíbios. A família Leptodactilidae tem descrito 233 espécies, das quais 84 delas se encontram incluídas dentro do gênero *Leptodactylus*, distribuídas no continente Americano e na Ásia (Frost, 2023). De acordo com Pedroca (2018), diversos PAMs foram isolados dentro deste gênero, das secreções cutâneas das espécies *L. ocellatus* (Nascimento *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2010), *L. pentadactylus* (King *et al.*, 2005), *L. fallax* (Rollins-Smith *et al.*, 2005), *L. laticeps* (Conlon *et al.*, 2006), *L. syphax* (Dourado *et al.*, 2007), *L. validus* (King *et al.*, 2008), *L. labyrinthicus* (Libério *et al.*, 2011; Gusmão *et al.*, 2017) e *L. pustulatus* (Marani *et al.*, 2015).

Os peptídeos isolados dessas espécies foram denominados inicialmente de acordo com as respectivas espécies das quais foram extraídos. No entanto, Conlon (2008) propõe uma mudança de nomenclatura, na qual os PAMs sejam denominados de “Ocelatinas”, uma vez que as Ocelatinas de *L. ocellatus* foram os primeiros peptídeos desse tipo a serem caracterizados.

Alguns PAMs que fazem parte da família das Ocelatinas apresentam atividades que variam de acordo com a composição de seus aminoácidos. Entre as atividades, podemos citar a antimicrobiana e citotóxica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, atividades antifúngicas e baixa atividade citolítica contra células sanguíneas (Pedroca, 2018).

1.4.2. *Leptodactylus labyrinthicus*

O anuro *Leptodactylus labyrinthicus* (Figura 5), popularmente conhecido como rã-pimenta, é uma espécie pertencente à família Leptodactylidae, e que pode ser encontrada em biomas do Brasil como Cerrado e Caatinga, e outros países sul-americanos como Argentina, Venezuela, Bolívia e leste do Paraguai, sendo capaz de ocupar bosques tropicais e áreas de assentamento humanos (Pedroca, 2018; Frost, 2023).



Figura 5. Espécime adulto de *L. labyrinthicus*. Fonte: <https://www.flickr.com/photos/pedrohmartins/9530015903>.

São animais de grande porte que podem atingir 1800 g e apresentam uma coloração avermelhada com marrom, dispostos como uma espécie de labirinto. Possuem hábitos noturnos, são carnívoros e podem se alimentar de pequenos pássaros, serpentes e outros anfíbios (Alves, 2012). Essa espécie possui um longo período de acasalamento relacionados com a chuva, onde os machos vocalizam as margens de corpos d'água, e seus ovos são encontrados em ninhos de espuma (Libério, 2008).

Os PAMs alvo do presente estudo foram isolados da pele da rã *L. labyrinthicus*: peptídeo Ocelatina-P1, também conhecido como Pentadactilina, e o peptídeo Ocelatina-F1, conhecido como Falaxina. Ambos apresentam atividade antimicrobiana.

PENTADACTILINA: Inicialmente isolado e caracterizado na secreção cutânea de *L. pentadactylus* (King *et al.*, 2005), e posteriormente isolado e caracterizado na secreção de *L. labyrinthicus* (Libério, 2008), consiste num PAM α -hélice de 25 aminoácidos (Tabela 1). No trabalho de King *et al.* (2005), esse PAM apresentou atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* não resistente e *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações abaixo de 200 μ M; e atividade em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Tabela 2). No trabalho de Libério (2008), esse PAM apresentou atividades citotóxica contra linhagens tumorais MCF-7, HeLa e B16F10, no entanto se mostrou pouco seletiva, atingindo células de fibroblastos humanos.

FALAXINA: Esse PAM com uma estrutura em α -hélice consiste em 25 aminoácidos de comprimento e foi originalmente isolado e caracterizado na secreção da pele da rã-da-montanha *L. fallax* (Rollins-Smith *et al.*, 2005) e posteriormente de *L. pentadactylus* (King *et al.*, 2005), espécie da qual também foi isolado o peptídeo Pentadactilina (Tabela 1). No trabalho de Rollins-Smith (2005), esse peptídeo apresentou atividade antibacteriana em bactérias Gram-negativas como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Em concentrações abaixo de 160 μ M, esse PAM não apresentou atividade contra bactéria Gram-positiva *S. aureus* (Tabela 2). A Falaxina apresentou concentrações de toxicidade em eritrócitos humanos, com uma atividade hemolítica de $HC_{50} > 200 \mu$ M (sigla HC_{50} representa a concentração capaz de promover 50% de hemólise), não apresentado essa atividade em concentrações inferiores. Posteriormente, um outro trabalho isolou e caracterizou a Falaxina a partir da secreção cutânea da rã-pimenta *L. labyrinthicus* (Libério, 2008). Nesse trabalho, se opondo aos resultados de Rollins-Smith, o peptídeo obteve atividade inibindo o crescimento das bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* e *S. aureus* (Tabela 2) (Rollins-Smith *et al.*, 2005). Nesse mesmo trabalho, tal como o PAM Pentadactilina, a Falaxina apresentou atividades citotóxica contra linhagens tumorais MCF-7, HeLa e B16F10.

Tabela 1. Informações dos peptídeos Pentadactilina e Falaxina isolados da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*.
Fonte: Chagas (2014), com modificações.

Nome	Massa Molecular	Estrutura primária	Referências
Pentadactilina (Ocelatina-P1)	2.540,5 Da	GLLDTLKGAAKNVVGSLSASKVMEKL-NH ₂	King <i>et al.</i> , 2005 Libério, 2008
Falaxina (Ocelatina-F1)	2.546,5 Da	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL-NH ₂	Rollins-Smith <i>et al.</i> , 2005 King <i>et al.</i> , 2005 Libério, 2008

Tabela 2. Comparação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos PAMs Pentadactilina e Falaxina. Os valores das CIMs foram obtidos por meio de ensaios contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Peptídeo	CIM (µM)						Referências
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	
Pentadactilina	25	100	100	200	100	-	King <i>et al.</i> (2005)
	32	-	>128	>128	-	2	Libério (2008)
Falaxina	40	80	80	>160	-	-	Rollins-Smith <i>et al.</i> (2005)
	32	-	64	32	-	16	Libério (2008)

2. JUSTIFICATIVA

Os organismos vivos estão em constante exposição a microrganismos que apresentam patogenicidade, sendo necessária a ação de seu sistema imunológico que, muitas vezes, é ineficaz, acarretando assim a susceptibilidade a infecções e progressão de doenças responsáveis pelo aumento da mortalidade (Machado *et al.*, 2004). Em vista disso, ocorreu um grande avanço na saúde com a criação de antibióticos, proporcionando tratamento e cura de infecções, aumentando assim a expectativa da vida humana (Aoki; Ueda, 2013). Porém, a emergência de microrganismos resistentes a esses antibióticos tem gerado um alerta para a necessidade urgente de se estudar e desenvolver novas metodologias e fármacos que sejam capazes de combater as infecções de modo eficiente, visto que o lançamento desses antimicrobianos não tem acompanhado o índice de resistência dos patógenos (Aponte *et al.*, 2011).

Nessa perspectiva, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como alternativa eficaz no combate a infecções e resistência desses patógenos, já que possuem um amplo espectro de atividades associadas a baixas chances de seleção de resistência, devido ao fato de apresentarem múltiplos mecanismos de ação (Patocka, 2019). Os PAMs podem ser utilizados também como alternativa em esquemas de monoterapia ou em associação com outros antibióticos, podendo diminuir a dosagem e possíveis efeitos colaterais desses medicamentos, sem prejudicar os efeitos sobre as bactérias (León-Buitimea *et al.*, 2020)

Os anfíbios da ordem Anura representam uma rica fonte de compostos biologicamente ativos. Nas células que revestem as paredes de glândulas granulosas presentes em suas peles, há a produção de uma variedade de princípios ativos que compreendem moléculas de diversos grupos químicos, destacando-se, dentre os compostos com atividade antimicrobiana, os PAMs.

Existem muitos estudos em desenvolvimento a fim de elucidar o potencial de novos peptídeos para o auxílio de terapias existentes. Alguns peptídeos da secreção cutânea de anuros apresentam efeitos imunomodulatórios, como descreve Xu e Lai (2015), com a produção de citocinas, liberação de pró-inflamatório TNF- α de macrófagos peritoneais de camundongos e anti-inflamatórios de células linfóides. Dentre outros mecanismos de ação dos PAMs de anuros encontramos atividades bactericidas de amplo espectro e contra determinados microrganismos; peptídeos letais contra células tumorais; atividade antibiótica ou anticancerígena (Honorato, 2009). Todas essas funções destacadas mostram a importância da atividade imunomodulatória desses peptídeos para a potencialização da resposta imune. Tais estudos são de extrema importância, uma vez que os microrganismos apresentam uma crescente resistência diante dos tratamentos atualmente disponíveis.

A secreção de anuros podem conter um arsenal de peptídeos bioativos, entre eles a Pentadactilina e a Falaxina, com atividades antimicrobianas contra microrganismos invasores, o que as tornam importantes sujeitos de investigações. Alinhando a importância desses dois peptídeos com os efeitos antimicrobianos e imunomodulatórios apresentados pelos PAMs, esse trabalho visa avaliar os efeitos antibacterianos e sinérgicos em *K. pneumoniae* carbapenemase e o possível efeito imunomodulatório da Pentadactilina e da Falaxina sobre neutrófilos humanos quanto a resposta do sistema imune contra microrganismos invasores.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Purificar os peptídeos antimicrobianos Pentadactilina e Falaxina extraídos da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus* e avaliar seus efeitos antibacteriano e sinérgico em associação com polimixina B sobre a bactéria resistente *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase e seus efeitos imunomodulatórios sobre neutrófilos humanos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Identificar e purificar os peptídeos Pentadactilina e Falaxina por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC);
- 3.2.2. Analisar os peptídeos por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF;
- 3.2.3. Determinar seus efeitos antibacterianos sobre a bactéria multirresistente *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) por meio da determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs);
- 3.2.4. Avaliar os efeitos dos peptídeos sobre a morfologia celular da bactéria KPC por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- 3.2.5. Avaliar os possíveis efeitos sinérgicos dos peptídeos em associação com o antibiótico polimixina B;
- 3.2.6. Avaliar possíveis efeitos imunomodulatórios dos peptídeos sobre neutrófilos humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Os peptídeos Pentadactilina e Falaxina foram purificados a partir da secreção cutânea da espécie *L. labyrinthicus*, retiradas do banco de secreções do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília. Alíquotas de 10 mg da secreção bruta foram dissolvidas em 1 mL de TFA 0,10% (v/v) em água deionizada (solvente A) e centrifugadas a 10.000 g durante 10 min. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram injetadas no aparelho de HPLC com detector UV, monitorados nas faixas de comprimento de 216 nm e 218 nm. A fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa C₁₈ (Shim-pack VP-ODS, 150 x 6.0 mm). A fase móvel foi realizada em um tempo de 27 min, com fluxo de 1 mL/min com o seguinte gradiente: de 0% até 39% de TFA 0,10% (v/v) em acetonitrila (solvente B) em 5 min e de 39% até 50% de solvente B em 22 min.

Os peptídeos que foram empregados no método anterior e que não apresentaram pureza foram recromatografados aplicando alíquotas de 50 µL em coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac, 218TP54 4,6 x 250 nm). A fase móvel foi realizada em um tempo de 35 min, com fluxo de 1 mL/min com o seguinte gradiente: de 0% até 40% de TFA 0,10% (v/v) em acetonitrila (solvente B) em 10 min e de 40% até 50% de solvente B em 25 min. As frações cromatográficas eluídas correspondentes aos peptídeos foram coletadas manualmente, secadas em concentrador a vácuo (SpeedVac Modelo SC100, Savant) e armazenadas a -20 °C.

Os ensaios realizados com os peptídeos extraídos da secreção bruta de *L. labyrinthicus* são os descritos no tópico 4.8.

4.2. SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS

Devido a insuficiência de peptídeos adquiridos por meio da metodologia apresentada no tópico 4.1, foi necessário realizar a síntese química desses peptídeos.

Os peptídeos foram produzidos por síntese química em fase sólida por estratégia Fmoc pela empresa especializada Genone (<https://www.genone.com.br/>).

Os peptídeos sintetizados foram usados nos ensaios descritos nos tópicos 4.5, 4.6 e 4.7.

4.3. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF

As frações correspondentes aos peptídeos foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/MS modelo Autoflex II (Bruker, Alemanha) de modo a confirmar seu

grau de pureza. Cada fração cromatográfica foi ressuspensa em TFA 0,1% (v/v) em água deionizada e 1 µL de amostra foi aplicada em placa de aço inoxidável juntamente com 1 µL de matriz de ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico (HCCA 20 µg/µL), ressuspensa em 0,1% de TFA (v/v) em 50% (v/v) de acetonitrila. O equipamento foi previamente calibrado com o padrão Peptide Calibration Standard II (Bruker, Alemanha) e as análises realizadas no modo positivo com uso do refletor na faixa m/z de 500 a 4000.

4.4. QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos Pentadactilina e Falaxina foram quantificados com o emprego de espectroscopia UV nos comprimentos de onda 205, 215 e 225 nm como descrito por Aitken e Learmonth (1996) em espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51).

4.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os experimentos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados baseados no protocolo de inibição por microdiluição em caldo padronizadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (M07-A9, 2018).

Para determinação da CIM, os efeitos antimicrobianos foram avaliados com a bactéria multirresistente *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) de um isolado clínico do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Inicialmente, para cultivar os microrganismos, 200 µL do inóculo mencionado foram adicionados a 7 mL de caldo Muller-Hinton. A solução foi incubada por 24 h a 37 °C sob agitação constante.

Passado este período, a densidade óptica foi avaliada e ajustada para uma faixa entre 0,08-0,1 utilizando um espectrofotômetro a 625 nm. Posteriormente, foram realizadas duas diluições: a primeira de 1:10 a partir do inóculo com a densidade óptica ajustada, e a segunda de 1:20 a partir do inóculo diluído (CLSI, 2018).

Todo o experimento foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato contendo os peptídeos em diferentes concentrações, iniciando na concentração de 256 µM no primeiro poço, sendo esse volume diluído seriadamente até a concentração de 0,125 µM no último poço. Posteriormente à diluição, foram adicionados aos poços 50 µL do inóculo diluído (diluição 1:20) da bactéria, obtendo-se uma concentração final de 5×10^5 células/mL e um volume de 100 µL por poço. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,8% (v/v) e água deionizada, ambos incubados com as suspensões bacterianas. As placas foram incubadas a 37 °C por 22 h. A leitura foi realizada a

620 nm em leitora de placas Multiskan® FC (Thermo Scientific, USA) após o tratamento. A CIM foi assumida como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento espectrofotometricamente detectável.

4.6. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS PEPTÍDEOS SOBRE A MORFOLOGIA CELULAR DA BACTÉRIA KPC POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As bactérias foram retiradas diretamente da placa de cultura bacteriana, com o auxílio de uma alça calibrada de 10 µL, e colocadas em tubos de polipropileno contendo 7 mL de tampão PBS 1x. Em seguida, foram centrifugadas a 1000 g por 10 min, lavadas três vezes com PBS 10 mM e ressuspensas para uma $DO_{600} = 0.3$. Alíquotas de 200 µL da suspensão celular foram incubadas a 37 °C por 45 min com 200 µL dos peptídeos na CIM. Após a incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS três vezes a 5000 g por 5 min. Os sedimentos das bactérias foram fixados durante a noite com glutaraldeído 2,5% (v/v) em PBS a 4 °C. Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS. Logo após, foi adicionado o reagente tetróxido de ósmio 1 (p/v) e, após 1 h de incubação, foi realizada a lavagem com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e as amostras foram inseridas em uma lamínula, onde adicionou-se 1 gota da solução de poli- L-lisina, que foi então espalhada pela superfície. O material resultante foi reservado por 5 min para secagem e, posteriormente, foi retirado o excesso de reagente. A amostra passou então por uma série de lavagens com acetona em diferentes concentrações (50%, 70%, 90% e duas vezes a 100%) por 10 min cada. Após a desidratação, a amostra foi inserida em câmara de ponto crítico por 40 min, para que toda a água fosse retirada. Por fim, a amostra foi submetida ao processo de metalização com ouro. As imagens foram geradas no equipamento Quanta 450 – FEI (Philips/FEI), com um aumento de 10.000 vezes no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) da UnB.

4.7. ENSAIO DE SINERGISMO PELO MÉTODO DE CHECKERBOARD

A avaliação de sinergismo foi realizada por ensaio de *checkerboard*. Esse método permite avaliar concentrações combinadas dos agentes antimicrobianos, sendo possível observar se as concentrações e as combinações resultam em atividades sinérgicas, aditiva, antagônicas ou indiferentes, comparadas às concentrações isoladas de cada agente (Orhan *et al.*, 2005; Karaoglan *et al.*, 2013).

Em um primeiro momento, foi realizado o ensaio antibacteriano em triplicata com o antibiótico Polimixina B contra *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) seguindo a metodologia do tópico 4.5, com o objetivo de se obter a CIM do antibiótico contra a cepa resistente avaliada.

Seguido o esquema de plaqueamento apresentado na figura 6, a Polimixina B e os peptídeos foram filtrados em filtro Millex GV 0,22 µm e, logo após, foram inseridos 100 µL da solução de Polimixina B a 369,50 µM no poço A12 e 100 µL a 184,75 µM na coluna 12, da linha B à F de uma placa de 96 poços (uma placa para cada peptídeo). Foi então realizada uma diluição seriada do antibiótico da coluna 12 até a 2. Após a diluição do antibiótico, foram inseridos 50 µL dos peptídeos na concentração de 256 µM do poço 2A até o poço 12A, e dessa vez foi feita uma diluição de cima para baixo, da linha A – F, sendo possível obter diferentes combinações dos agentes antimicrobianos em uma solução final de 100 µL. Ao finalizar as diluições, 50 µL da suspensão bacteriana (aproximadamente 5×10^5 células/mL) foram inseridos. Os respectivos controles foram: solução de Polimixina B 5,77 µM + KPC para inibição do crescimento, água + KPC para crescimento pleno, Peptídeo + KPC para CIM do peptídeo e água deionizada + meio Mueller Hinton como branco. A leitura foi realizada a 625 nm em leitora de placas (Multiskan® FC, Thermo Scientific, EUA) após 22 h de incubação a 37 °C.

Ao fim da tripla diluição, a concentração inicial da Polimixina B e dos peptídeos passaram a ser 92,38 µM e 64 µM respectivamente.

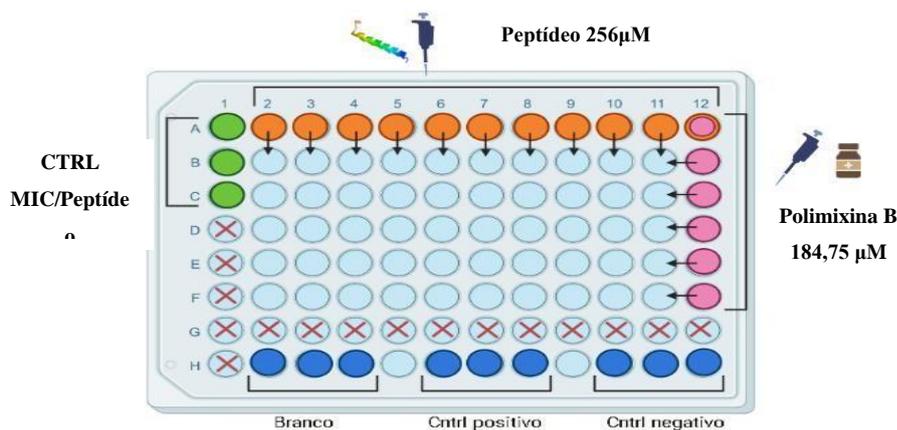


Figura 6. Esquema de plaqueamento da Polimixina B e dos peptídeos para avaliação do possível sinergismo entre as duas drogas. Fonte: Santos (2023), com modificações.

A análise foi realizada por meio das concentrações inibitórias fracionadas (CIF) em relação às concentrações inibitórias mínima (CIM) isoladas, que foram comparadas a partir da fórmula:

$$\text{CIF A} = \text{CIM (peptídeo em combinação)} / \text{CIM (peptídeo isolado)} \text{ (Eq1)}$$

$$\text{CIF B} = \text{CIM (Polimixina B em combinação)} / \text{CIM (Polimixina B isolada)} \text{ (Eq2)}$$

$$\text{ICIF} = \text{CIF A} + \text{CIF B} \text{ (Eq3)}$$

Os resultados considerados sinérgicos, aditivos, antagônicos e indiferentes são analisados de acordo com Azzam, (2020), como mostrado abaixo (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de ICIF e relação com atividade sinérgica, aditiva, indiferente ou antagônica.

ICIF = CIF A + CIF B	
ICIF ≤ 0,5	Sinergismo
ICIF 0,5-≤1,0	Aditivo
ICIF 1,0 - 4,0	Indiferente
ICIF > 4,0	Antagônico

CIF: Concentração Inibitória Fracionada
 ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada

4.8. ENSAIOS IMUNOMODULÁTORIOS SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

4.8.1. Seleção de doadores e coleta de sangue

Sangue utilizado para obtenção dos neutrófilos foi coletado de 7 doadores voluntários entre 18 e 35 anos, do sexo masculino.

Todos os doadores preencheram uma ficha de anamnese. Os critérios de higiene foram: não apresentar histórico de doenças crônicas, alérgicas ou inflamatórias; não estar fazendo uso de nenhum tipo de medicamento; não fumantes; não ter ingerido bebidas alcoólicas nas 48 horas anteriores à coleta e em jejum no momento da coleta por pelo menos oito horas.

A coleta do sangue foi realizada pelos doutorandos do laboratório com experiência, por punção venosa periférica, utilizando seringa heparinizada, e 20 mL de sangue foram coletados de cada doador. 12 mL de sangue foram destinados à separação de PMNs e o restante foi centrifugado a 1600 rpm por 5 min para obtenção de plasma autólogo e utilizado na ativação celular.

4.8.2. Separação dos neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados do sangue periférico por meio de centrifugação em gradiente de densidade de Percoll em tubo de polipropileno de 50 mL (60% sobre 70% de Percoll) durante 15 min a 1300 rpm em temperatura ambiente. O gradiente inclui Percoll como agente de separação por densidade e Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS) como solução mantenedora de pH 7.35-7.45, pressão osmótica e demais condições fisiológicas das células (Aquino *et al.*, 2016). Ao final da centrifugação, foram realizadas duas lavagens com HBSS e duas etapas de lise hipotônica para eliminar completamente Percoll e hemácias, respectivamente (Teles *et al.*, 2012). O sedimento de células foi ressuspensionado em HBSS e duas alíquotas foram retiradas. A primeira (6 µL) foi dividida em 3 poços de uma lâmina, secados com ar quente e corados com Kit Panótico para avaliação da morfologia e da pureza da amostra. A segunda alíquota (1 µL) foi ressuspensionada em 49 µL de azul de tripan 0,2% (v/v) para avaliação da viabilidade celular e da quantidade de células.

4.8.3. Ativação dos neutrófilos

Antes da ativação celular, foram adicionados HBSS com Ca^{2+} e Mg^{2+} e plasma autólogo à suspensão de células, de modo que a concentração final da suspensão fosse 6667 células/µL e para restauração de íons e fatores plasmáticos necessários durante a ativação. O volume total foi então dividido igualmente em seis condições, sendo quatro delas estímulos simples (controle, 100 nM fMLP, 16 µM peptídeo (Falaxina) e 16 µM peptídeo (Pentadactilina)) e duas condição de estímulo duplo (fMLP + Falaxina, fMLP + Pentadactilina). A concentração de peptídeo utilizada se baseia em uma aproximação dos valores de CIM de 4 µM e 8 µM dos peptídeos contra bactérias. Todas as condições foram incubadas em Thermomixer a 37 °C durante 1 h. Na condição de estímulo duplo, os peptídeos foram adicionados após 20 min de incubação com o fMLP, com o intuito de avaliar a interferência deles nos neutrófilos ativados.

4.8.4. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae*

Após 20 minutos de incubação, uma alíquota de 5 µL de suspensão de células (6667 células/µL) de cada condição foi incubada com 5 µL de uma suspensão de *S. cerevisiae* (33000 leveduras/µL), na proporção de 1:5 (neutrófilos: leveduras), divididas em 3 poços de lâmina e colocada para incubação em banho maria por mais 40 min. Finalizada a incubação, as lâminas foram secas com ar quente e coradas utilizando o kit Panótico rápido. Para análise, 100 células de cada poço foram avaliadas quanto à presença de leveduras no interior ou na membrana dos

neutrófilos e quanto à quantidade de leveduras em cada fagócito. Para essa etapa, a *S. cerevisiae* utilizada foi extraída de fermento biológico de uso comercial.

4.8.5. Avaliação da produção de EROS (NBT)

A avaliação da produção de EROs foi realizada através do teste de cloreto azul de nitrotetrazólio (NBT), que indica a formação de cristais de formazan resultante da reação do NBT com as EROs geradas pelos neutrófilos (Afzal; Jeshtadi; Mohmmmed, 2014). Para cada alíquota, uma solução de NBT 6 mM foi preparada primeiramente diluindo 0,5 mg de NBT em 10 µL de DMSO e deixada em vórtex por, pelo menos, 15 min. O volume foi ajustado para 100 µL com HBSS 1X Ca²⁺ e Mg²⁺ e o respectivo ativador nas concentrações estudadas. Todo procedimento envolvendo NBT foi feito ao abrigo da luz.

4.8.5.1. Teste de NBT em lâmina

Para avaliação por microscopia, após 20 min de ativação, uma alíquota de células de cada condição foi retirada do sistema de ativação e transferida para uma lâmina limpa (3 poços de 3,6 µL cada) e incubadas em câmara úmida por 20 min. Após o período de incubação, 2 µL da solução de NBT foram adicionados em cada poço e as lâminas foram incubadas por mais 20 min, totalizando 60 min de ativação. As células foram fixadas com 1 gota de metanol em cada poço após secagem com ar quente e coradas com Safranina 0,03 %. Para análise, 100 células de cada poço foram avaliadas quanto a presença ou não de cristais de formazan.

4.8.5.2. Teste de NBT colorimétrico

Para avaliação por espectrofotometria, após 40 min de ativação, uma alíquota de cada condição de 90 µL de células foi transferida para um novo microtubo contendo 20 µL da solução de NBT e incubado a 37 °C por 20 min. Para liberação e solubilização dos cristais de formazan, após a incubação, 100 µL de SDS 10% (p/v) foram adicionados a cada microtubo e as alíquotas foram sonicadas em tip-sonicador por 1 min e 15 seg com 15 seg de intervalo a uma potência de 70%. Após solubilização, as soluções foram centrifugadas a 12000 g por 5 min. Um total de 60 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa limpa de 96 poços e lidas a 560 nm no equipamento CLARIOStar BMG Labtech, a fim de detectar a formação dos cristais de formazan.

4.8.6. Migração de neutrófilos em tempo real por RTCA

A avaliação da capacidade de migração foi feita em RTCA (do inglês, *Real Time Cell Analyzer*) como descrito em (Cano; Vargas; Lavoie, 2016). A placa de invasão celular e migração (“*cell invasion and migration*”) foi preparada 1 h antes da adição das células e da análise no instrumento xCELLigence RTCA-DP (Agilent, USA). A placa foi montada na seguinte ordem: 160 μ L de HBSS foram adicionados ao poço inferior para o controle negativo, 160 μ L de fMLP 100 nM foram adicionados aos poços inferiores para avaliação da migração, e 160 μ L dos peptídeos 16 μ M para avaliar seu potencial quimiotático. A câmara superior foi encaixada sobre a câmara contendo os poços inferiores e 25 μ L de HBSS foram adicionados a todos os poços superiores e a placa foi incubada a temperatura ambiente por pelo menos 1 h, antes dos neutrófilos serem adicionados, para formação do gradiente quimiotático entres as câmaras. Imediatamente após a ativação celular descrita no tópico 4.8.3, uma alíquota de 60 μ L de células do sistema de ativação foi adicionada aos poços superiores da placa da seguinte forma: 60 μ L de neutrófilos quiescentes migrando para o poço contendo HBSS (controle negativo); 60 μ L de neutrófilos quiescentes migrando para o poço contendo fMLP (controle positivo); 60 μ L de neutrófilos quiescentes migrando para o poço contendo os peptídeos para avaliar seu potencial quimiotático; e 60 μ L de neutrófilos ativados com os peptídeos migrando para um poço contendo fMLP no intuito de avaliar o efeito competitivo quimiotático do peptídeo em relação ao fMLP.

A análise programada para medição do índice celular foi feita a cada 60 seg durante o período de 3 h. A placa foi lavada em fluxo sem qualquer contato com os eletrodos 2 vezes com PBS e 2 vezes com água deionizada, deixada montada com 100 mL de tripsina 0,25% em EDTA por 40 min e posteriormente lavada 3 vezes com água deionizada.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios com neutrófilos foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPed Prism 7.03[®] a partir das leituras de lâminas, em triplicata, e dos valores obtidos pelo espectrofotômetro. Foi realizado o teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey para comparação entre todos os valores obtidos adotando um valor de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA SECREÇÃO BRUTA DE *L. labyrinthicus* E ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Alíquotas de 10 mg da secreção bruta de *L. labyrinthicus* foram ressuspensas em 1 mL de água deionizada e 200 μ L dessa suspensão foram fracionadas por RP-HPLC em coluna C₁₈ em fluxo de 1 mL/min, obtendo o perfil cromatográfico abaixo (Figura 7). Cada corrida cromatográfica resultou, em média, em 20 frações. Na primeira corrida realizada, todas as frações foram coletadas, secas e analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF a fim de verificar quais frações correspondiam aos peptídeos Pentadactilina e Falaxina.

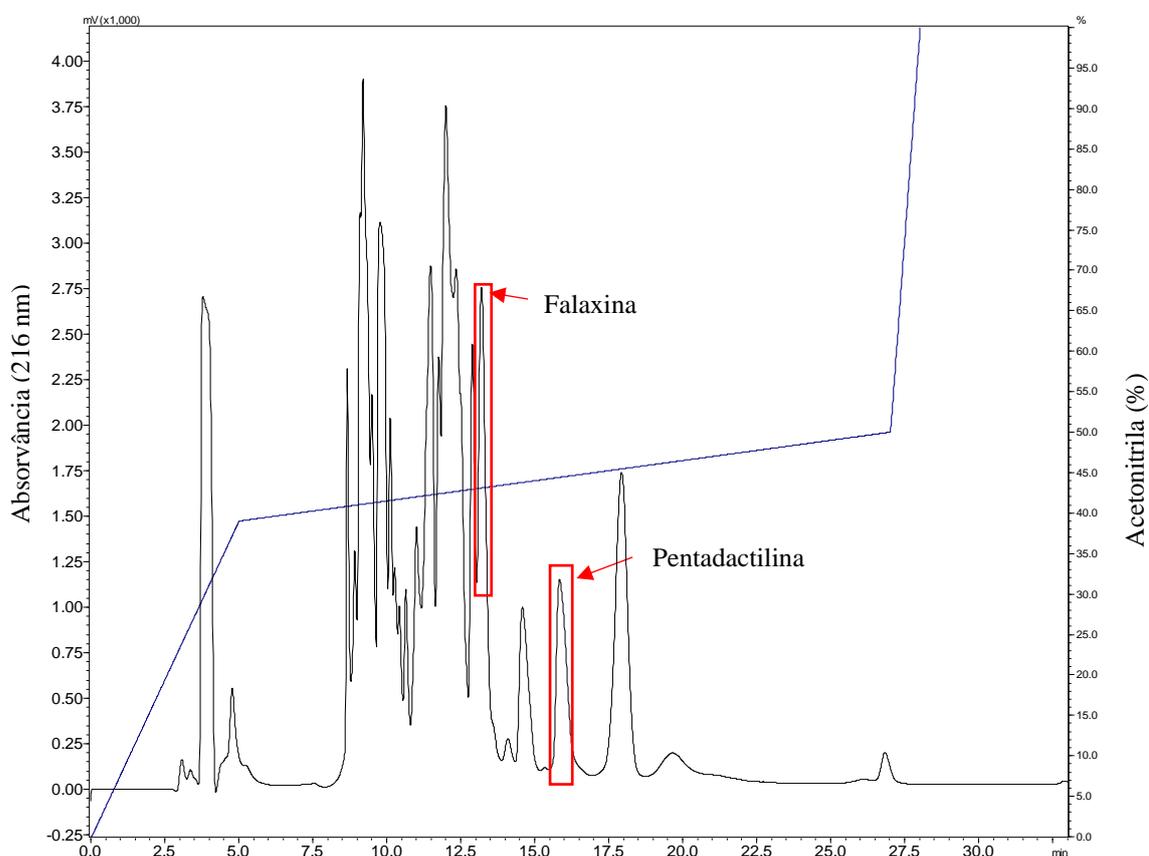


Figura 7. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da secreção bruta de *L. labyrinthicus* em coluna C₁₈ (Shim-pack VP-ODS, 150 x 6.0 mm) com fluxo de 1 mL/min. As frações de interesse estão identificadas com as setas vermelhas.

As análises por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/MS das frações correspondentes aos peptídeos Falaxina e Pentadactilina exibiram massas monoisotópicas protonadas ($M+H^+$) de 2547.0 Da e 2541.6 Da, respectivamente. Essa análise permitiu constatar

que a fração do peptídeo Falaxina encontra-se com elevado grau de pureza, sem a presença de contaminantes (Figura 8).

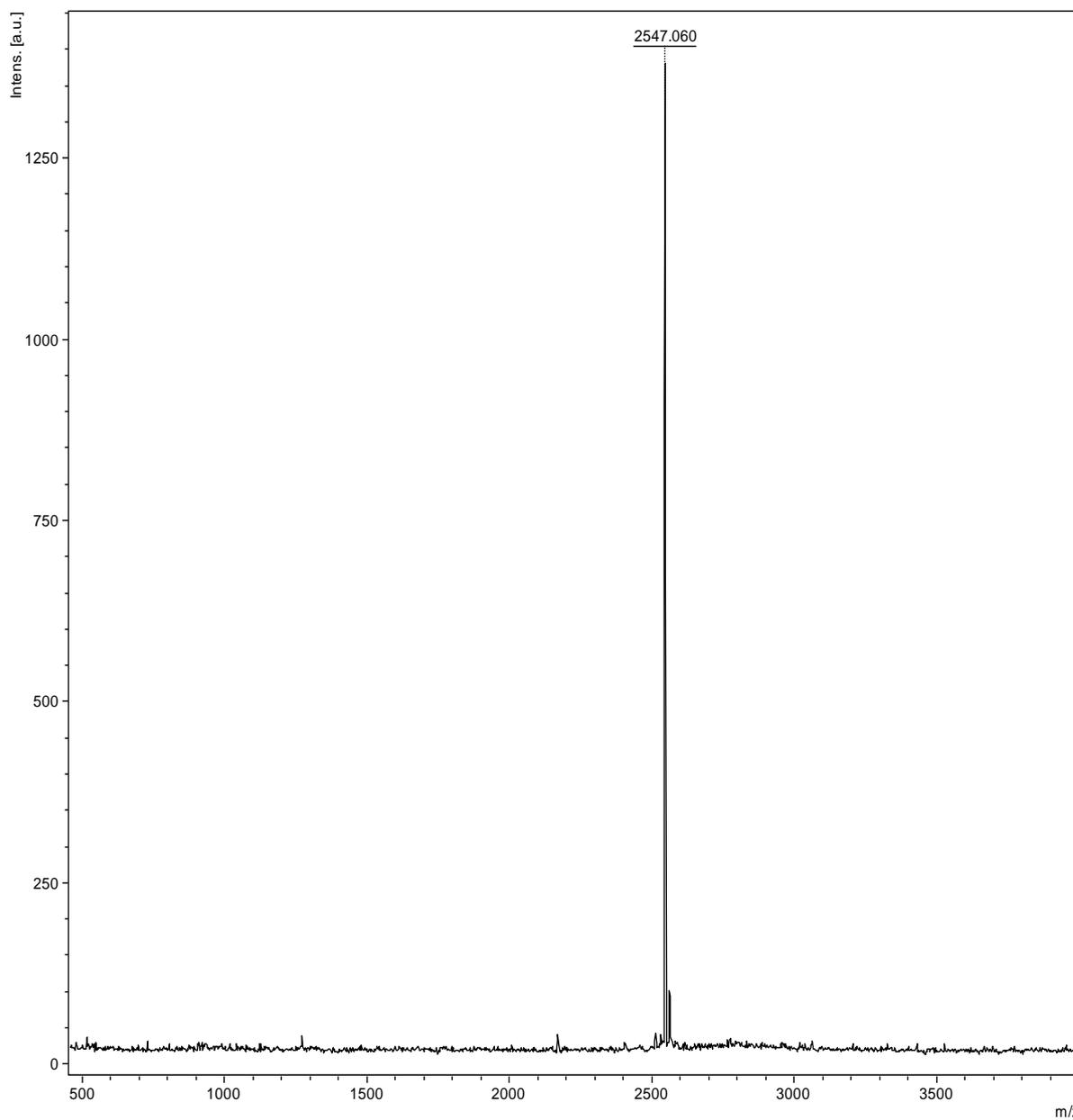


Figura 8. Espectro de massas, em sistema do tipo MALDI-TOF, da fração correspondente ao peptídeo Falaxina. Os espectros foram obtidos plaqueando-se as amostras com matriz HCCA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e analisadas no modo refletido positivo.

A fração correspondente ao peptídeo Pentadactilina (Figura 9) apresentou a presença de contaminantes, sendo então submetida a recromatografia em coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac, 218TP54 4,6 x 250 nm) com fluxo de 1 mL/min, resultando no perfil cromatográfico apresentado na Figura 10.

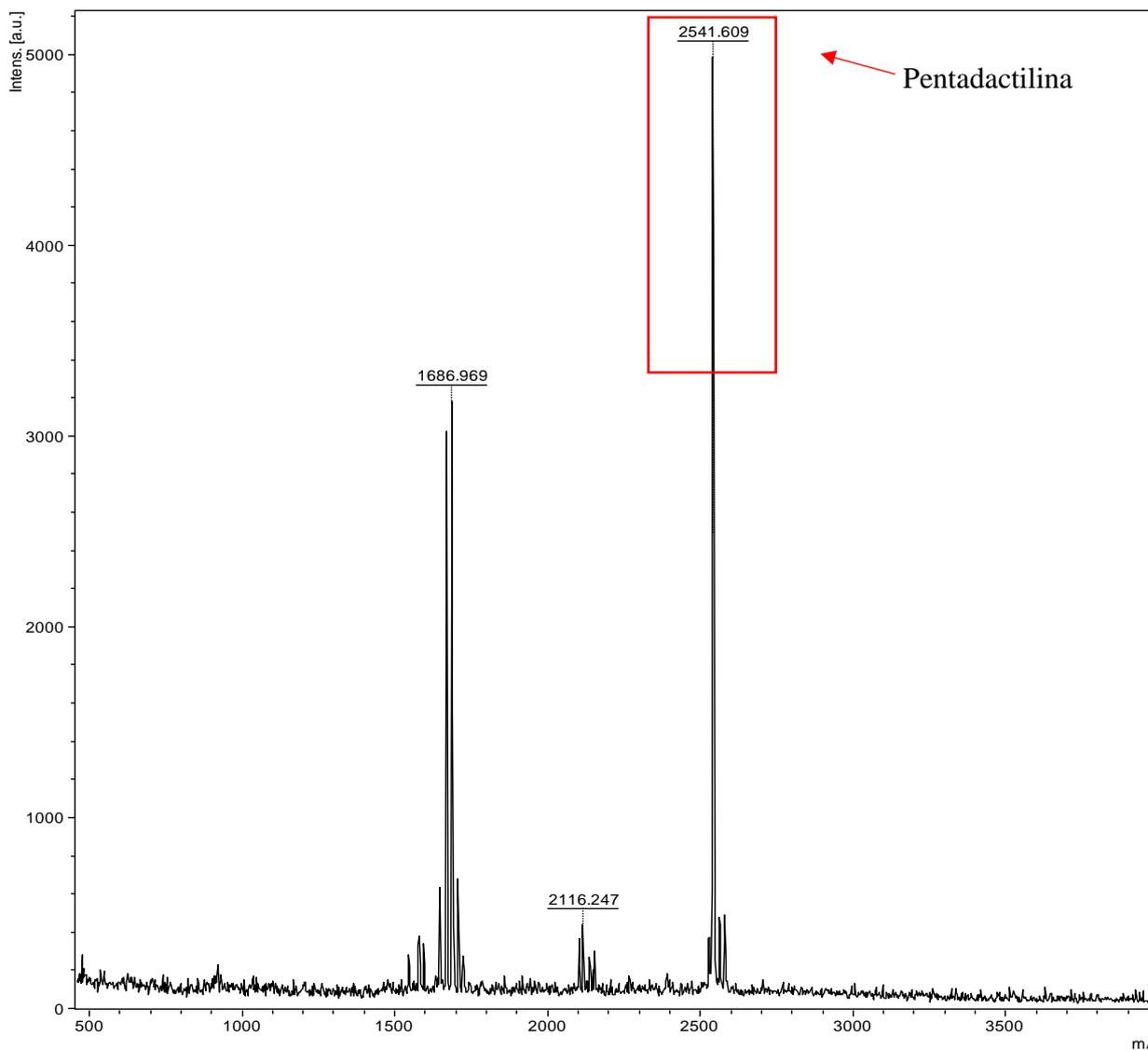


Figura 9. Espectro de massas, em sistema do tipo MALDI-TOF, da fração correspondente ao peptídeo Pentadactilina, com a presença de contaminantes. Os espectros foram obtidos plaqueando-se as amostras com matriz HCCA (20 µg/µL) e analisadas no modo refletido positivo.

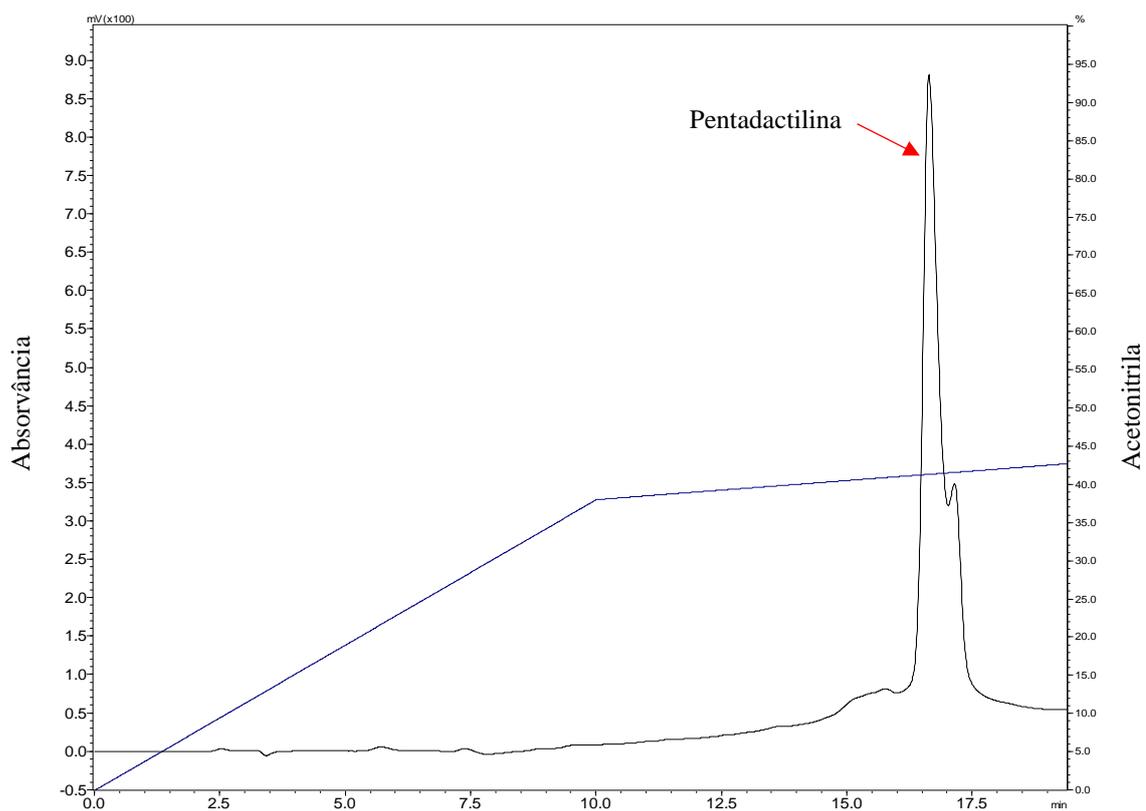


Figura 10. Perfil cromatográfico resultante da recromatografia da fração correspondente ao peptídeo Pentadactilina em coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac, 218TP54 4,6 x 250 nm) com fluxo de 1 mL/min. A fração de interesse está identificada com seta vermelha.

Após a recromatografia, a fração correspondente ao peptídeo Pentadactilina foi novamente analisada por espectrometria de massas, a fim de verificar a homogeneidade dessa fração (Figura 11).

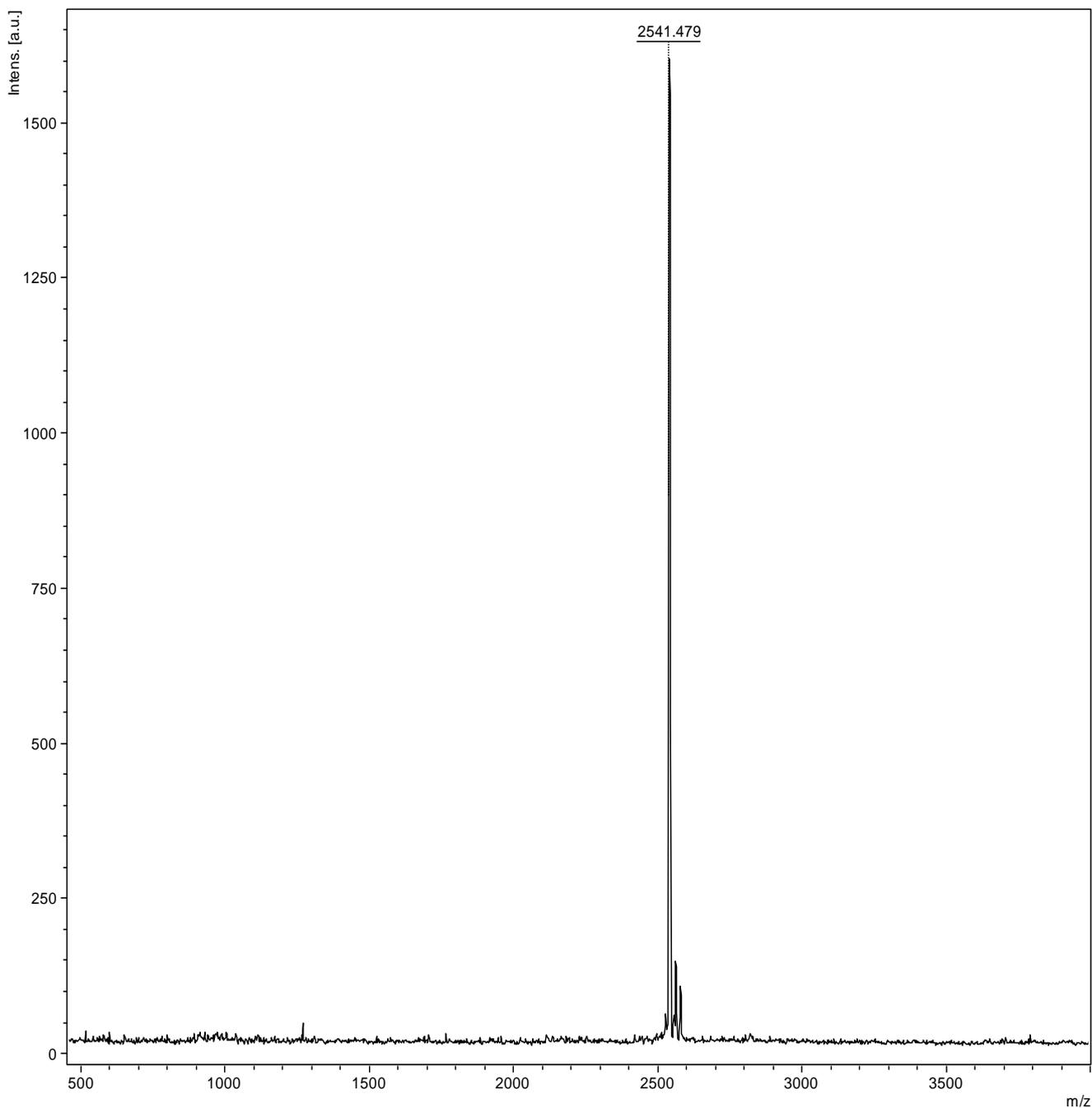


Figura 11. Espectro de massas, em sistema tipo MALDI-TOF, da fração correspondente ao peptídeo Pentadactilina. Os espectros foram obtidos plaqueando as amostras com matriz HCCA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e analisadas no modo refletido positivo.

5.2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS PEPTÍDEOS PENTADACTILINA E FALAXINA

Os peptídeos Pentadactilina e Falaxina foram testados em ensaio antibacteriano realizado contra a bactéria Gram-negativa multirresistente *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) a fim de avaliar sua atividade a partir da determinação das CIMs. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4, onde ambos os peptídeos exibiram um valor de CIM igual a 128 μM .

Tabela 4. Atividade antimicrobiana dos peptídeos Pentadactilina e Falaxina.

Peptídeo	CIM (μM)
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	
Pentadactilina	128
Falaxina	128

As alterações morfológicas que foram sofridas pela bactéria KPC foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após a bactéria sofrer tratamento com os peptídeos na concentração equivalente às CIMs, porém em um tempo de incubação menor, possibilitando que algumas células estariam disponíveis para análise. A figura 12 apresenta esse resultado, onde a figura 12A corresponde às bactérias não tratadas (controle); 12B e 12C exibem as bactérias tratadas com o peptídeo Pentadactilina e Falaxina, respectivamente, na concentração de 128 μM (valores das CIMs).

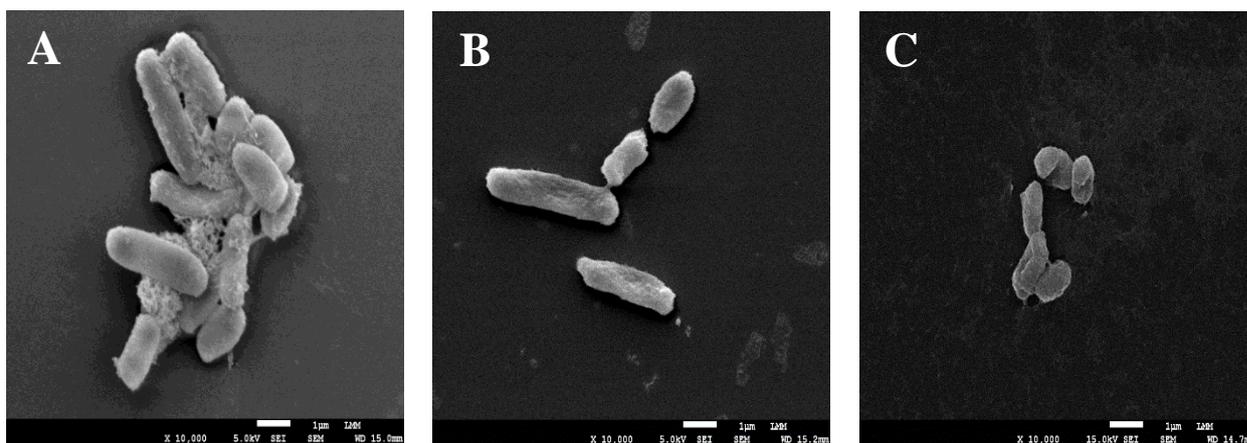


Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura da bactéria KPC após 45 min de incubação com os peptídeos Pentadactilina e Falaxina, avaliando seu comportamento morfológico. (A) Controle sem tratamento (ausência dos peptídeos); (B) Incubação da bactéria com a Pentadactilina a 128 μM ; (C) Incubação da bactéria com a Falaxina a 128 μM .

Os peptídeos foram avaliados em ensaio de combinação de drogas sobre a bactéria KPC, com o objetivo de identificar atividades sinérgicas em associação com o antibiótico polimixina B.

Previamente foram realizados testes antibacterianos para definir o valor da CIM da Polimixina B sobre a KPC, tendo sido obtido o resultado de 5,77 μM (8 $\mu\text{g/mL}$). Após isso, foi realizado o ensaio de combinação entre os peptídeos e o antibiótico, observando-se uma redução dos valores das CIMs combinadas em comparação aos valores das CIMs isoladas (Tabela 5). A atividade resultante desse ensaio consistiu em um efeito sinérgico, seguindo os cálculos obtidos pela fórmula apresentada no tópico 4.7 e da tabela 3 ($\text{ICIF} \leq 0,5 = \text{Sinergismo}$). Para esse resultado, foi avaliado o poço na placa de 96 poços em que continha o menor valor de concentração de Polimixina B e dos peptídeos (poço 6E para ambos os peptídeos). Com isso, foi possível observar uma redução da dose dos peptídeos em 32X e do antibiótico em 4X.

Tabela 5. Avaliação dos efeitos dos peptídeos Pentadactilina e Falaxina em associação com Polimixina B contra bactéria KPC.

Microrganismo	Droga	CIM (μM)		CIF	ICIF	Efeito observado
		Combinado	Sozinho			
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase	Polimixina B	1,44	5,77	0,25	0,281	Sinérgico
	Pentadactilina	4	128	0,031		
	Polimixina B	1,44	5,77	0,25	0,281	Sinérgico
	Falaxina	4	128	0,031		

5.3. ENSAIOS IMUNOMODULÁTORIOS SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

5.3.1. Separação dos neutrófilos

Após a separação, os neutrófilos foram avaliados quanto a pureza, obtendo um resultado de 97,4% (Figura 13), garantindo assim um adequado grau de homogeneidade necessário para a execução dos experimentos propostos.



Figura 13. Distribuição dos neutrófilos após o procedimento de separação celular.

5.3.2. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae*

Esse ensaio consistiu em avaliar a capacidade do neutrófilo de fagocitar a levedura *S. cerevisiae* (Figura 14).

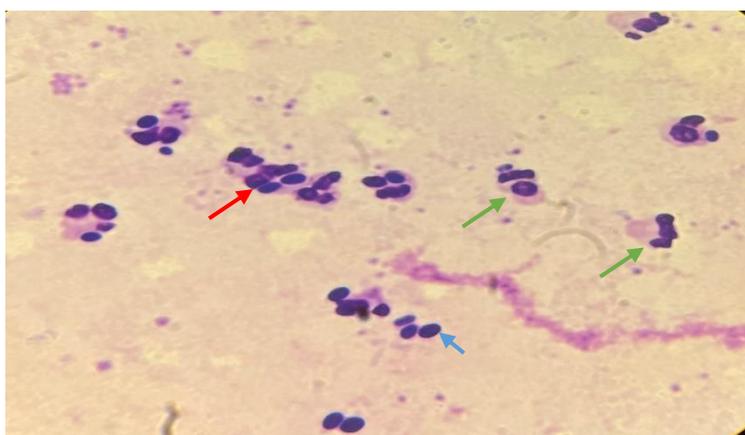


Figura 14. Fagocitose de leveduras *S. cerevisiae* por neutrófilos humanos. As setas verdes indicam neutrófilos; a seta azul indica uma levedura *S. cerevisiae*; a seta vermelha indica um neutrófilo fagocitando as leveduras. Aumento de 100x. Fonte: Autor.

Ao analisar os neutrófilos ativados com o peptídeo Falaxina (Figura 15), não foi observado uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p = 0,693$)

quanto à fagocitose de levedura *S. cerevisiae*. Com relação aos neutrófilos ativados com o estímulo duplo (fMLP + Falaxina), a Falaxina favoreceu um pequeno aumento no número de neutrófilos fagocitando quando comparada aos neutrófilos ativados apenas com o fMLP. No entanto, essa diferença não foi significativa ($p = 0,605$). Quando comparado o estímulo duplo com o controle, observa-se valores significativos da fagocitose ($p = 0,003$), uma vez que não houve valores significativos ao comparar o grupo controle e o grupo fMLP ($p=0,064$).

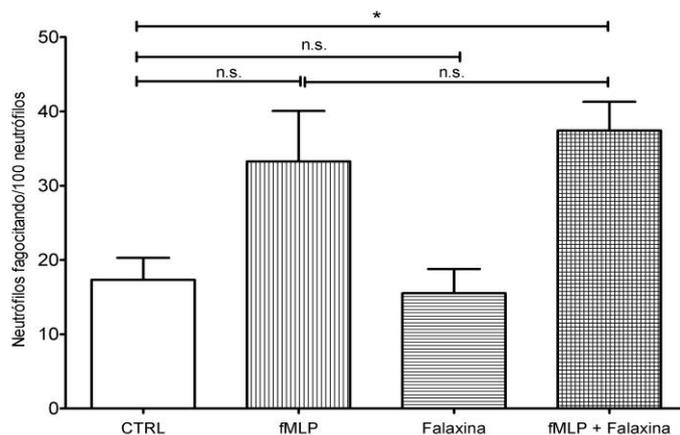


Figura 15. Avaliação da capacidade fagocitária de leveduras *S. cerevisiae* por neutrófilos humanos submetidos a diferentes condições. O estímulo duplo (fMLP + Falaxina) promoveu um aumento significativo da fagocitose em comparação com o grupo controle. * $p < 0,05$, n.s.=não significativo.

Quanto ao número de leveduras fagocitadas por cada neutrófilo, não houve diferenças significativas ao comparar o grupo controle com o grupo Falaxina ($p = 0,414$) e o grupo controle com o grupo fMLP ($p = 0,188$). Também não houve diferenças significativas ao se comparar o grupo fMLP com o grupo submetido a estímulo duplo ($p = 0,062$). No entanto, houve diferenças significativas entre o estímulo duplo e o grupo controle ($p = 0,013$) (Figura 16).

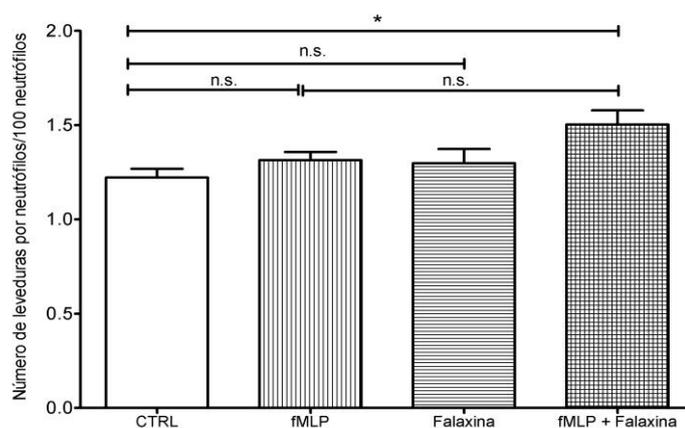


Figura 16. Quantidade de leveduras por neutrófilos em 100 células contadas. O estímulo duplo (fMLP + Falaxina) promoveu um aumento significativo em comparação com o grupo controle. * $p < 0,05$, n.s.=não significativo.

No caso dos ensaios com a Pentadactilina, os neutrófilos ativados com esse peptídeo não apresentaram diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p = 0,567$). Os neutrófilos ativados com o estímulo duplo (fMLP + Pentadactilina) apresentaram um pequeno aumento na fagocitose comparados aos neutrófilos ativados apenas com o fMLP, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,399$). Quando comparado o estímulo duplo com o controle, observou-se valores significativos para a fagocitose ($p = 0,006$), mas não houve valores significativos ao comparar o grupo controle e o grupo fMLP ($p = 0,064$) (Figura 17).

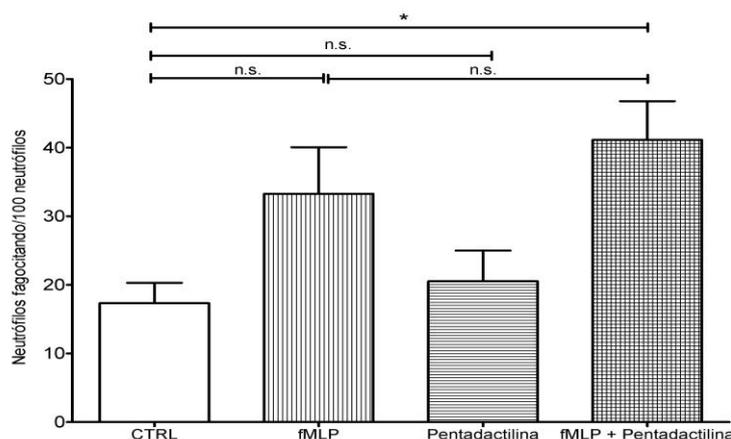


Figura 17. Avaliação da capacidade fagocitária de leveduras *S. cerevisiae* por neutrófilos humanos submetidos a diferentes condições. O estímulo duplo (fMLP + Pentadactilina) causou um aumento significativo da fagocitose em comparação com o grupo controle. * $p < 0,05$, n.s.=não significativo.

Em relação ao número de leveduras fagocitadas, não houve diferenças significativas entre as condições testadas (Figura 18).

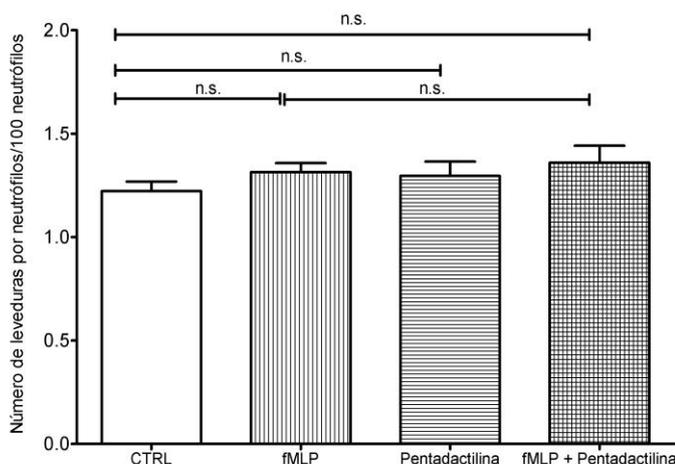


Figura 18. Quantidade de leveduras por neutrófilos em 100 células contadas. Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados. n.s.=não significativo.

5.3.3. Avaliação da produção de EROs (NBT)

A avaliação da produção de EROs foi feita com a análise do teste de NBT em lâmina (Figuras 19, 20 e 22) e dos valores de espectrofotometria do teste de NBT colorimétrico (Figuras 21 e 23).

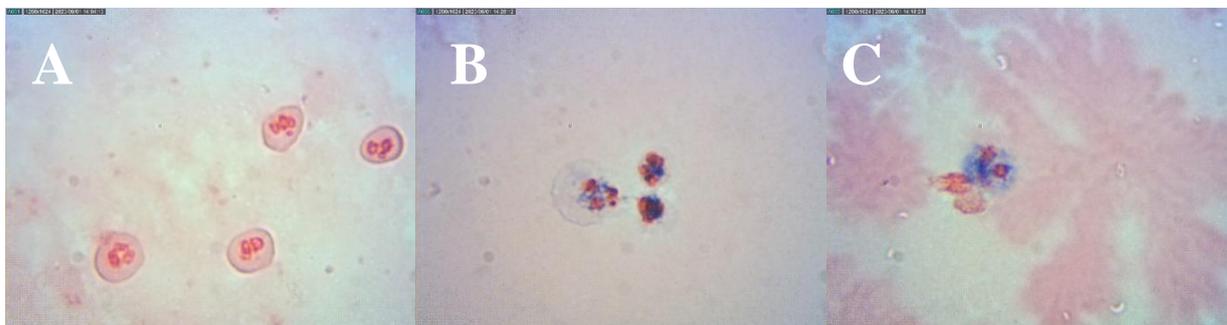


Figura 19. Neutrófilos resultantes do ensaio de NBT em lâmina. A figura 19A consiste nos neutrófilos quiescentes (controle) tratados com NBT. As figuras 19B e C consistem nos neutrófilos ativados com fMLP e que, quando tratados com o NBT, reagem com as EROs produzindo os cristais de formazan de coloração azul. Aumento de 100x. Fonte: Autor.

Ao analisar os neutrófilos ativados com a Falaxina, na contagem de lâminas, não foram obtidas diferenças significativas quando comparados ao grupo controle ($p= 0,515$). No entanto, analisando-se o estímulo duplo comparado ao grupo dos neutrófilos ativados com o fMLP, percebe-se uma diminuição no número de neutrófilos ativados, com valor estatisticamente significativo ($p= 0,002$) (Figura 20).

Esses mesmos resultados se repetem na análise por espectrofotometria, onde não foram obtidas diferenças significativas ao analisar o grupo dos neutrófilos ativados com a Falaxina em comparação ao grupo controle ($p= 0,111$); houve uma diminuição dos valores de ativação, analisando-se o grupo do estímulo duplo em comparação ao grupo ativado apenas com fMLP ($p= 0,015$) (Figura 21).

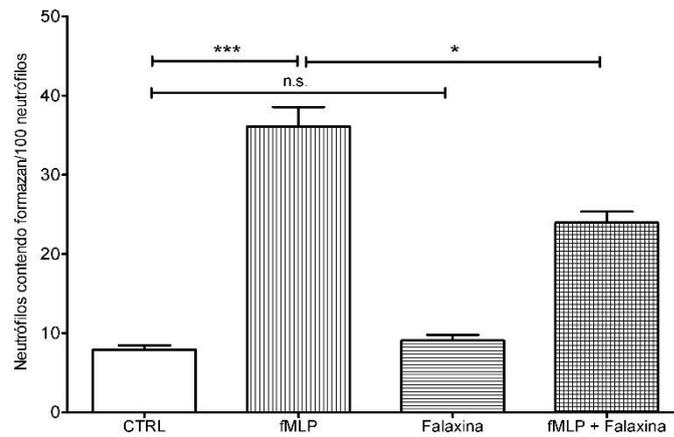


Figura 20. Avaliação da produção de EROs de neutrófilos humanos nos testes de NBT em lâmina, submetidos a diferentes condições. O estímulo duplo (fMLP + Falaxina) causou uma redução significativa da produção de EROs em comparação com o grupo ativado com fMLP. * $p < 0,05$ *** $p < 0,0001$, n.s.=não significativo.

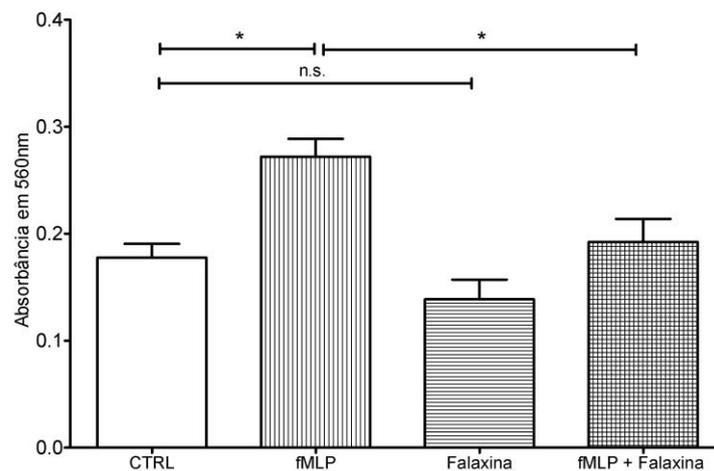


Figura 21. Avaliação da produção de EROs de neutrófilos humanos nos testes de NBT colorimétrico, submetidos a diferentes condições. O estímulo duplo (fMLP + Falaxina) causou uma redução significativa da produção de EROs em comparação com o grupo dos neutrófilos ativados com fMLP. * $p < 0,05$, n.s.=não significativo.

A respeito da Pentadactilina, tanto nos testes de NBT em lâmina (Figura 22) quanto nos testes de NBT colorimétrico (Figura 23), os neutrófilos ativados com esse peptídeo não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p = 0,908$ para NBT lâmina e $p = 0,583$ para NBT colorimétrico). O mesmo vale para os neutrófilos ativados com o estímulo duplo (fMLP + Pentadactilina), que não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos neutrófilos ativados apenas com o fMLP ($p = 0,056$ para NBT lâmina e $p = 0,730$ para NBT colorimétrico).

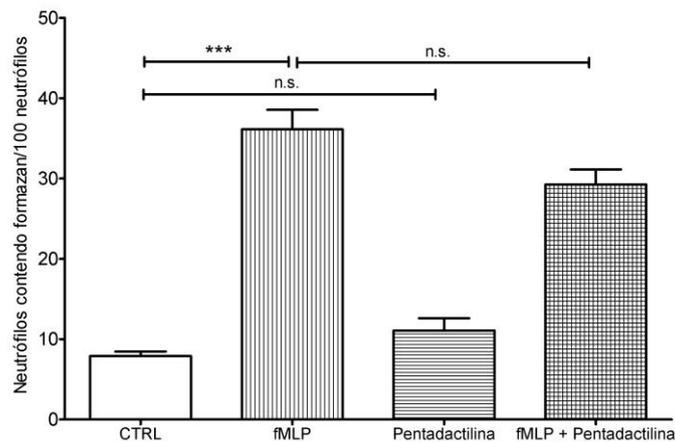


Figura 22. Avaliação da produção de EROs de neutrófilos humanos nos testes de NBT em lâmina, submetidos a diferentes condições. Não houve resultados significativos da produção de EROs quando comparados os grupos de interesse: Neutrófilos ativados com a Pentadactilina comparados com o grupo controle; neutrófilos ativados com o estímulo duplo comparados com o grupo fMLP. *** $p < 0,0001$, n.s.=não significativo.

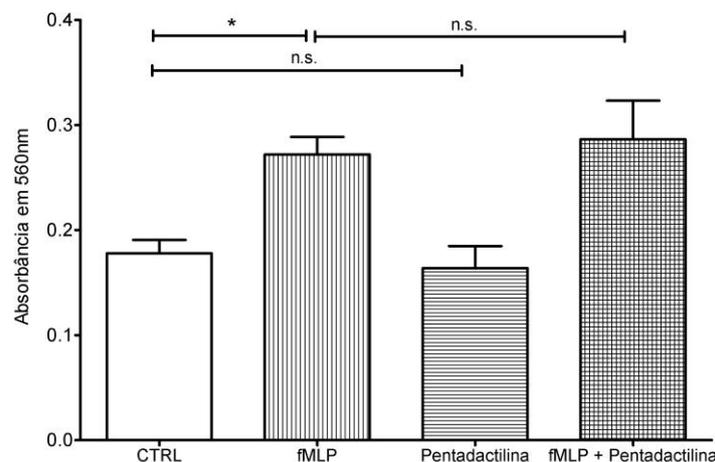


Figura 23. Avaliação da produção de EROs de neutrófilos humanos nos testes de NBT colorimétrico, submetidos a diferentes condições. Não houve diferenças significativas na produção de EROs quando comparados os grupos de interesse: Neutrófilos ativados com a Pentadactilina comparados com o grupo controle; neutrófilos ativados com o estímulo duplo comparados com o grupo fMLP. * $p < 0,05$, n.s.=não significativo.

5.3.4. Migração de neutrófilos em tempo real por RTCA

As figuras 24 e 25 apresentam os resultados do potencial quimiotático dos peptídeos Falaxina e Pentadactilina respectivamente. Em ambos os experimentos, os resultados obtidos indicam que os peptídeos não possuem atividade quimiotática, uma vez que as curvas referentes aos peptídeos estão semelhantes às curvas geradas com o controle negativo.

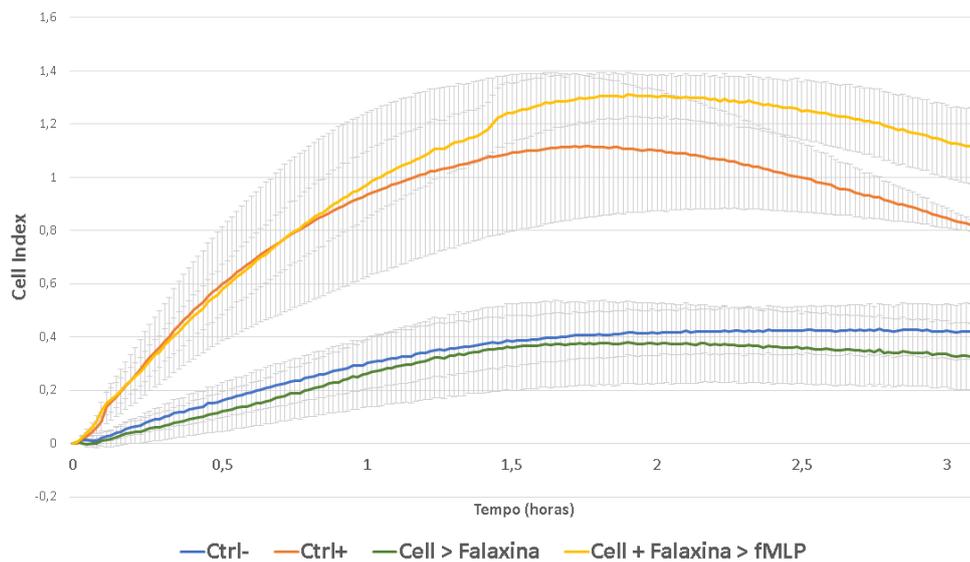


Figura 24. Avaliação do potencial quimiotático do peptídeo Falaxina. As amostras foram avaliadas por um período de 3 horas, em intervalos de 1 minuto em cada leitura. As medidas são realizadas pelo valor da impedância (eixo Y) pelo tempo (eixo X).

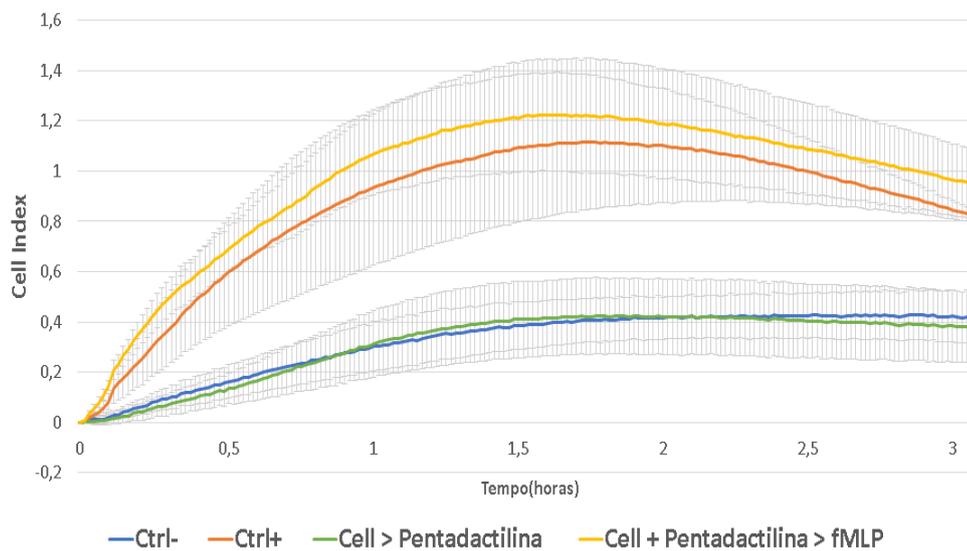


Figura 25. Avaliação do potencial quimiotático do peptídeo Pentadactilina. As amostras foram avaliadas por um período de 3 horas, em intervalos de 1 minuto em cada leitura. As medidas são realizadas pelo valor da impedância (eixo Y) pelo tempo (eixo X).

6. DISCUSSÃO

A etapa inicial do trabalho consistiu no fracionamento da secreção bruta de *L. labyrinthicus* e a identificação das frações correspondentes aos peptídeos Pentadactilina e Falaxina, com o intuito de se obter esses peptídeos em alto grau de pureza de modo a se avançar na caracterização de suas propriedades biológicas na busca por alternativas farmacológicas. A análise do perfil cromatográfico dessa espécie revela uma variedade de substâncias com alta complexidade e que, conseqüentemente, se tornam potenciais alvos de estudos. Diversas espécies dentro do gênero *Leptodactylus* apresentam secreções ricas em peptídeos bioativos, dentre as quais podemos citar as espécies *L. fallax*, *L. pentadactylus*, *L. laticeps*, *L. syphax*, *L. validus* e *L. pustulatus* (König; Binindaemonds; Shaw, 2015). Diversos PAMs foram isolados dessas espécies e constituem uma família conhecida como Ocelatinas, dos quais a Pentadactilina e a Falaxina fazem parte e que apresentam semelhanças em sua estrutura.

O PAM Falaxina foi, inicialmente, isolado a partir da secreção cutânea de *L. fallax* (Rollins-Smith *et al.*, 2005), e isolado da secreção de *L. pentadactylus* (King *et al.*, 2005), espécie da qual também foi isolado o peptídeo Pentadactilina. Posteriormente a esses estudos, Libério (2008) também isolou esses mesmos dois peptídeos a partir da secreção de *L. labyrinthicus*.

Os parâmetros utilizados no fracionamento da secreção bruta de *L. labyrinthicus* foram adequados ao comparar com o perfil cromatográfico obtido em outros estudos, como o realizado por Libério (2011). Nosso perfil cromatográfico apresentou 20 frações e permitiu analisar seu comportamento hidrofóbico sendo eluidas a partir de 40% de acetonitrila (Figura 7), onde todas as frações foram analisadas por espectrometria de massas a fim de identificar as frações correspondentes aos peptídeos de interesse. Os espectros resultantes dessa análise (Figuras 8 e 9) permitiram confirmar a presença dos peptídeos nessa secreção, comparando a massa molecular experimental obtida com o referencial citado (2541 Da e 2547 Da para a Pentadactilina e Falaxina, respectivamente). Em geral, os PAMs são bastante hidrofóbicos e esse comportamento está de acordo com o registrado por Castro *et al.* (2009) que indicam uma relação de hidrofobicidade das frações que eluem com um maior tempo de retenção, apresentando uma carga líquida positiva menor com conseqüente perda da atividade antimicrobiana.

O peptídeo Pentadactilina não apresentou, inicialmente, um grau de pureza aceitável (Figura 9), sendo necessário a aplicação de novos parâmetros para uma nova etapa de cromatografia que, por meio desta, resultou em um grau de pureza satisfatório (Figura 11).

Esse resultado está de acordo com o obtido por Libério (2011) que também encontrou o peptídeo Pentadactilina contaminado com outro peptídeo na etapa inicial de purificação.

O ensaio antibacteriano realizado nesse estudo buscou avaliar o efeito inibitório dos peptídeos contra a bactéria Gram-negativa resistente KPC. Essa bactéria foi descrita primeiramente por Carl Friedlander, em 1882, como uma bactéria isolada dos pulmões de pacientes que morreram de pneumonia (Martin, 2018), consistindo-se em uma das principais bactérias que exibiram um dramático aumento na resistência a antibióticos das últimas décadas. É considerada como a Enterobacteriaceae mais comum resistente aos carbapenêmicos. Essa resistência é um grave problema de saúde pública causando impacto no mundo todo, devido a altas taxas de mortalidade e ao reduzido arsenal de opções terapêuticas (Nordmann; Cornaglia, 2012). Logo as buscas por novas opções terapêuticas eficazes são necessárias.

Esses peptídeos apresentam semelhanças de massa molecular, carga líquida e de perfil de atividade antimicrobiana. A CIM de 128 μM para ambos os peptídeos contra a bactéria KPC (Tabela 4) é semelhante às CIMs encontradas nos trabalhos de KING *et al.* (2005) e Rollins-Smith *et al.* (2005) para a bactéria *K. pneumoniae* (CIMs de 100 μM e 80 μM para a Pentadactilina e Falaxina, respectivamente). Nesses mesmos trabalhos e no realizado por Libério (2008), outras bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa* foram sensíveis a esses peptídeos em CIMs menores que 128 μM . A atividade antibacteriana desses peptídeos contra a bactéria resistente KPC é promissor, uma vez que ela possui vários mecanismos de resistência associados e a administração de combinação de drogas pode ser eficiente, podendo diminuir a concentração desses peptídeos ao serem administrados contra essa bactéria.

Semelhante ao observado no presente trabalho, Costa (2012) demonstrou em seu trabalho que dois PAMs análogos do PAM Hylina a1 de *Boana albopunctata* apresentaram atividade inibidora em KPC com CIM de 128 μM . Outro resultado de atividade contra a bactéria KPC foi obtido por Silva (2018), onde análogos do peptídeo Ocelatina 4 (da mesma família dos peptídeos desse estudo) foram eficientes ao inibir o crescimento dessa bactéria em concentrações abaixo de 128 μM . Nesse mesmo trabalho, um peptídeo análogo denominado S5;K7;A10;N12, o qual foi proposto com base no PAM Pentadactilina, foi capaz de inibir o crescimento da KPC com CIM de 16 μM .

Ainda no intuito de avaliar os efeitos dos peptídeos contra a bactéria KPC, um ensaio realizado consistiu em avaliar as alterações morfológicas que essas bactérias sofreram após o tratamento com os peptídeos por meio de inspeção empregando MEV, que é uma técnica capaz de avaliar as mudanças morfológicas de uma bactéria, com foco principalmente na avaliação

da integridade da parede celular e da membrana plasmática associada às alterações morfológicas das células (Li *et al.*, 2021).

As bactérias que sofreram o tratamento com os dois peptídeos na concentração da CIM (128 μM) apresentaram deformações e irregularidades na superfície celular (Figuras 12B e C) quando comparadas às bactérias do grupo controle (Figura 12A), que por sua vez apresentaram integridade morfológica ao passarem por um processo de incubação sem estresse no meio em que estavam. Esse resultado está de acordo com o observado por Mangoni *et al.* (2004) que, em seu trabalho com MEV, verificaram deformações morfológicas da bactéria Gram-Negativa *E. coli* quando submetidas ao tratamento com PAMs extraídas de anuros. Gusmão *et al.* (2017) realizaram ensaio de ruptura de membrana testando peptídeos da família das Ocelatinas, incluindo a Falaxina. Os seus efeitos foram investigados por ensaios de vazamento de corante em vesículas POPC. Nesse estudo foi possível observar o efeito disruptivo da Falaxina em baixas concentrações (1,57 e 7 μM). As propriedades antimicrobianas da Ocelatinas, em especial a Falaxina, estão relacionadas diretamente com suas interações de membrana mais fortes, maiores propensões helicoidais e capacidade de formação de poros (Gusmão *et al.*, 2017). Esses resultados reforçam a ideia de que os peptídeos, devido a sua carga positiva, atuam no desmembramento da integridade da membrana das bactérias ao se ligarem seletivamente à membrana carregada negativamente, levando ao consequente extravasamento do seu conteúdo citoplasmático. (Zhang; Gallo, 2016).

O ensaio de combinação de drogas permitiu avaliar o potencial antibacteriano dos peptídeos em conjunto com o antibiótico Polimixina B e avaliar se o efeito foi sinérgico, aditivo, indiferente ou antagônico (Azzam, 2020). Devido aos mecanismos de resistência de bactérias frente aos antibióticos convencionais, drogas que tiveram seu uso anteriormente abandonado, voltaram a ser utilizadas. A Polimixina B é um medicamento que tem seu mecanismo de ação relacionado com a interação com o LPS de bactérias Gram-negativas. No entanto, seu uso causa efeitos adversos no organismo, devido seu intenso efeito nefrotóxico (Lima *et al.*, 2021).

Ambos os peptídeos apresentaram valores de CIM de 128 μM isoladamente. A CIM da Polimixina B foi de 5,77 μM (8 $\mu\text{g/mL}$) frente a KPC, o que, de acordo com o corte estabelecido pelo CLSI (2018) caracteriza essa bactéria como resistente a Polimixina B (CIM > 2 $\mu\text{g/mL}$).

O ensaio de combinação de drogas serve para avaliar se é possível a redução na dosagem de medicamentos, reduzindo consequentemente os efeitos adversos resultantes do emprego de doses mais altas da(s) droga(s). Ao serem combinados os peptídeos Pentadactilina e Falaxina com a Polimixina B (lembrando que cada peptídeo foi testado isoladamente com o antibiótico),

observamos um valor de CIM de 4 μM para ambos os peptídeos e um valor de CIM de 1,44 μM (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para a Polimixina B. Com isso houve uma redução de 32x e 4x nas concentrações dos peptídeos e do antibiótico, respectivamente. Essa variação indica atividade sinérgica entre eles e a combinação do peptídeo com a Polimixina B pode promover uma redução dos efeitos nefrotóxicos desse antibiótico, além de reduzir a concentração do peptídeo a um valor que se for considerado isoladamente era incapaz de inibir o crescimento da bactéria KPC.

Costa (2015) obteve um resultado similar, onde a associação de análogos da hilina a1 com a Polimixina B resultou em efeitos sinérgicos, com inibição do crescimento da bactéria *P. aeruginosa* multirresistente em baixas concentrações. Sabe-se que promover terapias de combinações antimicrobianas, além de melhorar a efetividade, previnem o aparecimento de microrganismos resistentes (Drago *et al.*, 2007).

Os peptídeos também foram analisados quanto aos seus efeitos no sistema imune inato, por meio da avaliação da modulação dos mecanismos de ação dos neutrófilos humanos como sua capacidade fagocítica, produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e sua capacidade quimiotática por meio do ensaio de migração.

A fagocitose é um dos mecanismos utilizados pelos neutrófilos para neutralização e destruição de organismos invasores que foram capazes de ultrapassar as barreiras epiteliais. Referente à capacidade fagocitária, no presente estudo, foram analisados dois parâmetros: (1) número de neutrófilos realizando fagocitose da levedura *S. cerevisiae*; (2) número de leveduras (*S. cerevisiae*) fagocitadas por cada neutrófilo (Figura 14).

Ambos os peptídeos, nas concentrações utilizadas (16 μM), quando usados como ativadores, não promoveram diferenças significativas na atividade fagocitária dos neutrófilos quando comparados aos neutrófilos quiescentes (grupo controle) (Figuras 15 e 17). Também se avaliou a capacidade de modulação dos peptídeos em neutrófilos já ativados (nesse caso, os neutrófilos sofreram uma ativação prévia com o fMLP e, posteriormente, foi adicionado o peptídeo, como descrito no tópico 4.8.3). Ao analisar os testes realizados com os dois peptídeos, os neutrófilos estimulados com a dupla ativação (fMLP+Peptídeo) apresentaram um pequeno aumento de sua atividade fagocitária quando comparados ao grupo de neutrófilos ativados apenas com o fMLP, no entanto, esse resultado não foi significativo. Ainda nesse mesmo ensaio, foi realizado um teste estatístico comparativo entre os grupos controle, fMLP e dupla ativação (fMLP+Peptídeo). Assim, foi possível constatar que não houve diferenças estatisticamente significativas ao comparar o grupo controle com o grupo fMLP, apesar da diferença dos números de neutrófilos fagocitando ser grande entre eles. O grupo de neutrófilos

com dupla ativação apresentou diferenças significativas quando comparados com o grupo controle, porém, não se pode atribuir esse resultado aos peptídeos Pentadactilina e Falaxina e sim, que foi possivelmente um efeito ocasionado pelo estímulo do fMLP. Esses resultados são diferentes dos obtidos por Souza (2021) e Silva (2021), onde é possível observar que a ativação por fMLP foi significativa quando comparada com o grupo controle. No mesmo trabalho realizado por Souza (2021), com os PAMs Dermaseptina B2 e Dermatoxina isolados da pele do anuro *Phyllomedusa bicolor*, foi possível observar a capacidade imunomodulatória da atividade fagocítica promovida por esses PAMs.

Ao se analisar o número de leveduras fagocitadas por cada neutrófilo (Figuras 16 e 18), observa-se não ter havido mudanças significativas que podem ser atribuídas aos peptídeos, reforçando a constatação de que, nas condições realizadas, os peptídeos Pentadactilina e Falaxina não possuem capacidade de modular a atividade fagocitária dos neutrófilos.

A produção e liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) consiste em um dos mecanismos de ação empregados pelos neutrófilos contra organismos invasores. No entanto, situações em que a produção de EROs ultrapassa a capacidade oxidante das células, acaba ocasionando um estresse oxidativo que pode causar danos moleculares às estruturas celulares (Zeng *et al.*, 2017). Essas situações de exacerbado acúmulo de EROs estão correlacionadas com o aparecimento e progressão de muitas doenças através de mutações de DNA, oxidação de proteínas e perda de funções vitais em vários tecidos ou órgãos (Sousa *et al.*, 2020).

Os ensaios de NBT foram realizados para avaliar a produção de EROs, por meio dos testes de NBT em lâmina (microscopia óptica) e NBT colorimétrico (análise por espectrofotometria). Nesses ensaios, foram avaliados os cristais de formazan resultantes da reação do NBT com as EROs gerados pelos neutrófilos (Figura 19). Apesar da microscopia óptica permitir avaliar detalhes da célula, trata-se de uma metodologia subjetiva estando, assim, propensa ao viés do usuário. Por isso, os resultados obtidos pelo teste em microscopia foram confirmados pela análise por espectrofotometria.

Ao se analisar os efeitos da Pentadactilina na produção de EROs pelos neutrófilos, foi constatado que esse PAM não promoveu resultados significativos na modulação desse mecanismo de ação dos neutrófilos (Figuras 22 e 23). Em contrapartida, o PAM Falaxina foi capaz de reduzir de maneira significativa a produção de EROs, pois o grupo de neutrófilos ativado com o estímulo duplo (fMLP + Falaxina) mostrou uma redução do número de EROs quando comparado aos neutrófilos ativados apenas com o fMLP (este por sua vez, promoveu um aumento da produção de EROs) (Figuras 20 e 21).

Sousa *et al.* (2020) investigaram os efeitos biológicos dos peptídeos extraídos da secreção cutânea do anfíbio *L. vastus* e constataram que dois peptídeos, denominados Ocellatin-K1(1–16) e a Ocellatin-K1(1–21), foram eficazes em prejudicar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e a ativação de NF-κB na microglia viva de camundongos. Eles incubaram neurônios do hipocampo com meio microglial tratado com LPS (no qual observaram um aumento significativo na produção de EROs) na presença de Ocellatin-K1(1–16) e Ocellatin-K1(1–21). Ambos os peptídeos reduziram o estresse oxidativo nos neurônios do hipocampo.

Com isso, a existência de mecanismos capazes de proteger e manter o equilíbrio das células durante explosão respiratória se torna importante, uma vez que promove a manutenção das funções e da vida dos neutrófilos, de outras células imunitárias e do endotélio (Luz, 2021).

O último ensaio realizado nesse estudo consistiu em avaliar o potencial quimiotático dos peptídeos, por meio do ensaio de RTCA que demonstra a migração direcional dos neutrófilos. Nesse estudo foi possível avaliar se essa influência poderia ser exercida pelos PAMs Pentadactilina e Falaxina na concentração de 16 μM. No entanto nossos resultados mostraram que ambos os peptídeos não exibiram atividade quimioatraente nas condições realizadas (Figuras 24 e 25), uma vez que a migração dos neutrófilos para os peptídeos se mostrou similar ao grupo controle.

Alguns estudos mostram a capacidade que peptídeos extraídos de anuros tem de influenciar na atração dos neutrófilos para um sítio específico. Dourado (2021) e Santos (2023) detectaram potencial quimiotático dos PAMs Dermaseptina PR-1 e Dermaseptina B2. Outros trabalhos com resultados semelhantes mostram a atividade quimiotática de outros PAMs, como a Temporina A (Radzishovsky *et al.*, 2005) e LL-37 (Bravo, 2016).

7. CONCLUSÃO

A secreção cutânea da rã *L. labyrinthicus* tem se revelado uma rica fonte de PAMs, das quais a Pentadactilina e Falaxina apresentaram diversas atividades de interesse biológico para possíveis aplicações terapêuticas.

Ambos os peptídeos apresentaram resultados promissores frente a bactéria KPC quando combinados com o antibiótico Polimixina B, onde essa administração concomitante de agentes antibacterianos em baixas concentrações promoveu uma eficiente inibição do crescimento dessa bactéria. Esta é uma importante ferramenta para estudos envolvendo bactérias resistentes, ampliando o leque de atividades e os diferentes mecanismos de ação a serem explorados, além de promover a redução de possíveis efeitos adversos causados por esses medicamentos.

Além disso, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o PAM Falaxina possui atividade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo dos neutrófilos ativados com fMLP. Essas observações sugerem a possibilidade de PAMs da família das Ocelatinas poderem formar a base para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes que possam controlar a produção de EROs em situação de descontrole do sistema imune.

Esses resultados apresentam grandes possibilidades na utilização dos peptídeos Pentadactilina e Falaxina como agentes antibacterianos frente a crescente resistência a antibióticos exibida pelas bactérias; além da possibilidade de estudar esses PAMs como agentes imunomodulatórios do sistema imune humano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. **Imunologia celular e molecular 7a edição**. Elsevier Brasil, 2012.

Afzal, M. M.; Jeshtadi, A.; Mohmmmed, A. K. Study of neutrophilic function by nitroblue tetrazolium test in septicemias and immuno deficiency diseases. **Journal of Research in Health Sciences International**, v. 2, n. 2, p. 581-590, 2014.

Aitken, A.; Learmonth, M. Protein determination by UV absorption. **The protein protocols handbook**, p. 3-6, 1996.

Alford, M. A. *et al.* Cathelicidin host defense peptides and inflammatory signaling: Striking a balance. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1902, 2020.

Alves, A. S. *et al.* Utilização da etologia e da biogeografia para compreensão das relações interespecíficas entre *Leptodactylus labyrinthicus* (rã-pimenta) e *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) e conservação de biodiversidade. **Revista geonorte**, v. 3, n. 4, p. 306-317, 2012.

Amulic, B. *et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review Of Immunology**, v. 30, p. 459-489, 2012.

Aoki W.; Ueda M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. **Pharmaceuticals**. n. 6, p. 1055- 1081, 2013.

Aponte C. A. H. *et al.* Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. **Toxicon**. n. 57, p. 84–92, 2011.

Aquino, E. N. *et al.* Proteomic analysis of neutrophil priming by PAF. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, n. May 2016, p. 142–151, 2016.

Azzam, N. F. A. E. M. Antibacterial Effect of Eucalyptus Essential Oil. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 13, n. 07, p. 799–804, 2020.

Bahar, A. A.; Ren, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013.

Barros, A. L. *et al.* The arsenal of bioactive molecules in the skin secretion of urodele amphibians. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 810821, 2022.

Berglund, N. A. *et al.* Interaction of the Antimicrobial Peptide Polymyxin B1 with Both Membranes of *E. coli*: A Molecular Dynamics Study. **PLoS Computational Biology**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2015.

Bravo, M. **O Efeito do peptídeo catelicidina LL-37 sobre a propriedade imunossupressora das células-tronco mesenquimais.** Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Brinkmann, V; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? **Journal of cell biology**, v. 198, n. 5, p. 773-783, 2012.

.

Büyükkiraz, M. E.; Kesmen, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 1573-1596, 2022.

Cano, P. M.; Vargas, A.; Lavoie, J.-P. A real-time assay for neutrophil chemotaxis. **Biotechniques**, v. 60, n. 5, p. 245-251, 2016.

Cardoso, M. H. *et al.* Computer-aided design of antimicrobial peptides: are we generating effective drug candidates? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 3097, p. 1-15, 2020.

Castro, M. S. *et al.* Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (“spotted treefrog”). **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 291-296, 2009.

Chagas, A. S. **Efeitos antiproliferativos sobre células tumorais das secreções cutâneas dos anuros *Leptodactylus Labyrinthicus* e *Phyllomedusa azurea* e de seus peptídeos biologicamente ativos sobre o fungo *Candida albicans*.** Dissertação (Mestrado em Biologia

Animal) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2014.

Clark, G. J. *et al.* The role of dendritic cells in the innate immune system. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 3, p. 257-272, 2000.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 10. ed.2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Edition. 2018.

Conlon, J. M. *et al.* Purification and properties of laticiptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the South American frog *Leptodactylus laticeps*. **Protein and Peptide Letters**, v. 13, n. 4, p. 411-415, 2006.

Conlon, J. M. A proposed nomenclature for antimicrobial peptides from frogs of the genus *Leptodactylus*. **Peptides**, v. 29, n. 9, p. 1631-1632, 2008.

Costa, A. L. P.; Junior, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p.45-57, 2017.

Costa, F. J. **Avaliação dos efeitos citolíticos de análogos de peptídeos antimicrobianos**. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, 2015.

Costa, F. J. **Desenho racional e produção de análogos do peptídeo antimicrobiano Hylina a1 com maior potencial terapêutico**. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2012.

Costa, V. F. **Expressão de desoxirribonucleases endógenas envolvidas na degradação das armadilhas extracelulares de neutrófilos em camundongos com sepse experimental.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2022.

Džidić, S. *et al.* Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

Dourado, C. **Avaliação dos peptídeos Dermaseptina B2 e Dermatoxina isolados da pele do anuro *Phyllomedusa bicolor* na modulação da imunidade inata.** Dissertação (Mestrado Biologia Animal) Universidade de Brasília. Brasília. 2021.

Dourado, F. S. *et al.* Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. **Toxicon**, v. 50, n. 4, p. 572-580, 2007.

Drago, L. *et al.* In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 1–7, 2007.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians.** New York: McGraw-Hill, 1986.

Dupré-Crochet, S.; Erard, M.; Nüße, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 657–670, 2013.

Flannagan, R. S.; Jaumouillé, V.; Grinstein, S. The cell biology of phagocytosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 61-98, 2012.

Fonseca, M. P. **Proteômica abrangente de alta resolução na análise de neutrófilos humanos ativado pelo peptídeo formyl Methyl Leucyl Phenylalanine (fMLP).** Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2017.

Frost, D. **Amphibian species of the world 6.1: Na online reference.** American Museum of Natural History, 2023. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/Amphibia>. Acesso em: 14 jun. 2023

Gaspar, D. A.; Veiga, S. A.; Castanho, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. **Rev Front Microbiol**, v. 4, p. 294, 2013.

Ge, L. *et al.* AcT-2: a novel myotropic and antimicrobial type 2 tryptophyllin from the skin secretion of the Central American red-eyed leaf frog, *Agalychnis callidryas*. **The Scientific World Journal**, 2014.

Glennon-Alty, L. *et al.* Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. **Free Radical Biology and Medicine**, Elsevier Inc., 1 set. 2018.

Golkar, Z.; Bagasra, O.; Gene Pace, D. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 2, p. 129–136, 2014.

Gomes, A. *et al.* Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 7, p. 579-593, 2007.

Guardabassi, L. *et al.* Optimization of antimicrobial treatment to minimize resistance selection. **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, v. 6, n. 3, p. 637–673, 2018.

Guardabassi, L.; Prescott, J. F. Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 45, n. 2, p. 361–376, 2015.

Guimarães, D. O.; Momesso, L. D. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, 33, 667-679, 2010.

Gusmão, K. A. G *et al.* Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and

membrane interactions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, 2017.

Hazam, P. K.; Goyal, R.; Ramakrishnan, V. Peptide based antimicrobials: Design strategies and therapeutic potential. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 142, p. 10-22, 2019.

Honorato, C. T. M. Análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos. 2009.

Hopman, N. E. M. *et al.* Quantifying antimicrobial use in Dutch companion animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. 158, p. 1-9, 2019.

Huan, Y. *et al.* Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2559, 2020.

Izadpanah, A.; Gallo, R. L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 381–389, 2005.

Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

Jolivet-Gougeon, A.; Bonnaure-Mallet, M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 49–56, 2014.

Karaoglan, I. *et al.* In vitro synergistic activity of colistin with tigecycline or β -lactam antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 6, p.1830-1837, 2013.

Kaur, B. P.; Secord, E. Innate immunity. **Pediatric Clinics**, v. 66, n. 5, p. 905-911, 2019.

King, J. D. *et al.* Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 141, n. 4, p. 393-397, 2005.

King, J. D. et al. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the Caribbean frog, *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae). **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1287-1292, 2008.

Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

König, E.; Bininda-Emonds, O. R. P.; Shaw, C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. **Peptides**, v. 63, p. 96–117, 2015.

Kumar, P.; Kizhakkedathu, J. N.; Straus, S. K. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, p. 4, 2018.

Kumar, S.; Singh, B. R. An overview of mechanisms and emergence of antimicrobials drug resistance. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, n. 2, p. 7–14, 2013.

Ladram, A.; Nicolas, P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 21, n. 7, p. 1341-1371, 2016.

Langeveld, W. T.; Veldhuizen, E. J. A.; Burt, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76–94, 2014.

Leite J. M. A. Jr. *et al.* *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia): mechanism of defense in the skin and molecular phylogenetic relationships. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 313, n. 1, p. 1-8, 2010.

León-Buitimea, A. *et al.* The demand for new antibiotics: Antimicrobial peptides, nanoparticles, and combinatorial therapies as future strategies in antibacterial agent design. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p.1669, 2020.

Li, S. *et al.* The structure- mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 109, n.3, 103-115, 2021.

Libério, M. S. **Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2008.

Libério, M. S. *et al.* Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino acids**, v. 40, p. 51-59, 2011.

Lima, S. G.; Lima, N. P.; Brito, M. A. M. Nephrotoxicity associated with the use of Polymixin B: A systematic review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 11839-11858, 2021.

Luca, V. *et al.* Esculentin(1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 15, p. 2773-2786, 2013.

LUEPKE, K. H. *et al.* Past, present, and future of antibacterial economics: Increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 1, p. 71–84, 2017.

Luz, I. S. **Análise proteômica e funcional das diferenças sexo-específicas de neutrófilos quiescentes e ativadas**. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2021.

Machado A.; Lória C.W.; Proti P.B.; Remuzgo C.; Miranda M. T. M. Síntese química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

Macêdo, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v. 2, n. 7, p. 19-24, 2000.

Mangoni, M. L. *et al.* (2001) The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. **The FASEB J.**, 2001.

Mangoni, M. L. *et al.* Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 380, n. 3, p. 859-865, 2004.

Marani, M. M. *et al.* Characterization and biological activities of ocellatin peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. **Journal of natural products**, v. 78, n. 7, p. 1495-1504, 2015.

Marasco, W. A. *et al.* Purification and identification of formyl-methionyl leucylphenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5430–5439, 1984.

Martens, E.; Demain, A. L. An Overview of the Industrial Aspects of Antibiotic Discovery. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2017.

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

Mayadas, T. N.; Cullere, X.; Lowell, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p.181-218, 2013.

Mendes, C. A. C.; Burdmann, E. A. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 55, 752-759, 2009.

Mcgowan Junior, J. E. Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1033–1048, 1983.

Moretta, A. *et al.* Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–26, 2021.

Mittal, M. *et al.* Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, 2014.

Nascimento, A. C. C. *et al.* Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, n. 3, p. 227–238, 2003.

Nascimento, A. C. C. *et al.* Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **The Protein Journal**, v. 23, p. 501-508, 2004.

Nascimento, A. C. C. **Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: peptídeos citolíticos e proteases**. Tese (Doutorado em Biologia Animal), - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2007.

Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 375-388, 2020.

Nordmann, P.; Cornaglia, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 411–2, 2012.

Oliveira, A. G.; Silveira, D. Resistência microbiana a antibióticos: quo vadis? **Intrafarma**, v. 33, n. 3, p. 215-216, 2021.

Orhan, G. *et al.* Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 140–143, 2005.

Panaro, M. A.; Mitolo, V. Cellular responses to FMLP challenging: A mini-review. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, n. 3, p. 397–419, 1999.

Patocka, J. *et al.* Antimicrobial peptides: Amphibian host defense peptides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 32, p. 5924-5946, 2019.

Pedroca, M. N. **Avaliação das propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e citolíticas de análogos do peptídeo antimicrobiano Pentadactilina**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2008.

Peters, B. M.; Shirtliff, M. E.; Jabra-Rizk, M. A. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. 4–7, 2010.

Pletzer, D.; Coleman, S. R.; Hancock, R. E. W. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. **Current opinion in microbiology**, v. 33, p. 35-40, 2016.

Porcino, R. A. **Avaliação da atividade combinatória de antimicrobianos contra *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*** Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Quinn, M. T.; Gauss, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 4, p. 760-781, 2004.

Radzishovsky, I. S. *et al.* Effects of acyl versus aminoacyl conjugation on the properties of antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49 n.6. p.2412–2420, 2005.

Rollins-Smith, L. A. *et al.* An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). **Regulatory Peptides**, v. 124, n. 1, p. 173-178, 2005.

Santos, J. S. **Caracterização das propriedades biológicas de uma dermaseptina isolada da secreção cutânea de *Pithecopus rohdei* (Anura: Phyllomedusinae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2023.

Sato, H.; Feix, J. B. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1245-1256, 2006.

Schröder, J. M. Epithelial Peptide Antibiotics. **Biochemical Pharmacology**. 57:121–134, 1999.

Segalla, M. V. *et al.* Lista de Anfíbios Brasileiros. **Herpetologia Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 121–216, 2021.

Silva, F. F. M. **Avaliação dos efeitos antimicrobianos, antivirais e citolíticos de análogos do PAM Ocelatina 4**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2018.

Silva, J. L. E.; Finotti, L. F. T. Armadilhas extracelulares dos neutrófilos: descrição e envolvimento em processos autoimunes. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 3, n. 1, p. 18-24, 2019.

Sousa, N. A. *et al.* Novel ocellatin peptides mitigate LPS-induced ROS formation and NF- κ B activation in microglia and hippocampal neurons. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2696, 2020.

Teles, L. M. B. *et al.* Comparison of the neutrophil proteome in trauma patients and normal controls. **Protein & Peptide Letters**, 2012.

Toledo, R. C.; Jared C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 111, n. 1, p. 1-29, 1995.

Toleman, M. A. *et al.* Aminoglycoside Modifying Enzymes. **Sci. York**, v.13, p.151–171, 2011.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Peptide Science: Original Research on Biomolecules**, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.

Ulfig, A.; Leichert, L. I. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021.

Van Kessel, K. P. M.; Bestebroer, J.; Van Strijp, J. A. G. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 467, 2014.

Wang, G. **Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies**. Cabi, 2nd. Edition, USA, 2017.

Wimley, W. C.; Hristova, K. Antimicrobial peptides: Successes, challenges and unanswered questions. **The Journal of Membrane Biology**, v. 239, n.1, p. 27–34, 2011.

Xu, X.; Lai, R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. **Chemical reviews**, v. 115, n. 4, p. 1760-1846, 2015.

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

Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5449-5453, 1987

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

Zeng, W. *et al.* Antioxidant activity in vivo and biological safety evaluation of a novel antioxidant peptide from bovine hair hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 193-198, 2017.

Zhang, L.; Gallo, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14-R19, 2016.

Zhu, Y. *et al.* Antimicrobial peptides, conventional antibiotics, and their synergistic utility for the treatment of drug-resistant infections. **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 4, p. 1377-1422, 2022.