

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CHRISTINE FACCO SATURNINO

**ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS DO G-CSF
HUMANO COMO ANTIBACTERIANOS**

VITÓRIA

2013

CHRISTINE FACCO SATURNINO

**ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS DO G-CSF
HUMANO COMO ANTIBACTERIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

VITÓRIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,

Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Saturnino, Christine Facco, 1986-

S254e Estudo in silico de derivados do G-CSF humano como
antibacterianos / Christine Facco Saturnino. – 2013.

97 f. Ilus.

Orientador: Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Peptídios. 2. Antibacterianos. 3. Fator estimulador de
colônias de granulócitos. I. Guimarães, Marco Cesar Cunegundes.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61

CHRISTINE FACCO SATURNINO

**ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS DO G-CSF
HUMANO COMO ANTIBACTERIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 31 de julho de 2013.

**Prof. Dr. Marco Cesar
Cunegundes Guimarães**

**Universidade Federal do Espírito
Santo - UFES**

Orientador

VITÓRIA

2013

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães, orientador desta dissertação, pelo empenho e compreensão.

Ao Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira, chefe do departamento de Morfologia da UFES, pela sua colaboração e paciência na rotina laboratorial.

À Profa. Dra. Kênia Valéria dos Santos, por sua ajuda, interesse e sábias ideias no desenvolvimento dos ensaios *in vitro*.

Ao Prof. Ricardo que cedeu as cepas utilizadas no experimento.

Ao Jairo de Oliveira, técnico do laboratório e grande amigo, por todos os valiosos conselhos.

Aos colegas de laboratório, em especial, Gabriela, Nataly, Vinicius e Isabela, pelo apoio e amizade durante todo o trajeto.

Aos professores da banca por aceitarem participar da defesa desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Ao meu esposo, Thierry, companheiro ideal em todas as horas, por toda ajuda, força e dedicação.

Aos familiares, pelo apoio, carinho e paciência nos períodos difíceis e pela compreensão nos momentos de ausência, especialmente à minha mãe.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta dissertação, em especial à Neosa, que me acompanhou durante todo o processo.

Essa dissertação teve o apoio financeiro do Edital Universal 14/2011 CNPq (nº processo: 483036/2011-0) e do Edital PROEX nº 04/2011.

RESUMO

Na tentativa de obter novas substâncias com atividade antibacteriana, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano de quatro peptídeos sintetizados, dos quais dois possuem sequência derivada da fragmentação *in silico* do G-CSF humano, enquanto os outros dois foram planejados teoricamente, verificando, assim, seu interesse como novos agentes terapêuticos na saúde humana. A avaliação foi realizada em duas etapas: análise *in silico*, que consistiu em predições de propriedades e parâmetros associados à ação antibacteriana, por meio de ferramentas computacionais; e o experimento *in vitro* para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos peptídeos contra bactérias Gram positivas e negativas. A maioria das predições foi favorável para os quatro peptídeos, pois os resultados determinados para hidrofobicidade, anfipaticidade, tamanho, estrutura secundária, carga líquida, potencial de ligação em membrana, meia-vida e índice de Boman encontram-se dentro de valores desejados para o potencial antibacteriano. Na análise *in silico*, apenas a predição algorítmica da atividade antimicrobiana gerou resultados desfavoráveis para os peptídeos com sequências derivadas do G-CSF (peptídeos 1 e 2), porém essa mesma predição foi positiva para os outros dois. O ensaio *in vitro* demonstrou que até a concentração mais alta utilizada dos quatro peptídeos (500 µg/mL) foi insuficiente para a determinação de sua concentração inibitória mínima, porém, observou-se considerável diminuição no crescimento de *E. coli* (58,7%) pelo peptídeo 4 e de *E. fecalis* (86,1%) e *E. coli* (54,9%) pelo peptídeo 3, em comparação com o controle de viabilidade. Esses valores indicam a presença de ação antibacteriana por parte dos peptídeos planejados teoricamente (peptídeos 3 e 4), corroborando com as predições computacionais. Dessa forma, é possível concluir que a análise *in silico* foi de suma importância para a seleção dos peptídeos a serem sintetizados, os quais apresentaram nos ensaios *in vitro* resultados e concordância com a predição computacional de atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Peptídeos antibacterianos. Análise *in silico*. Atividade antimicrobiana. G-CSF.

ABSTRACT

In attempt to obtain new substances with antibacterial activity, the aim of this study was to evaluate the antibacterial potential of four synthesized peptides, where two of them have sequence derived from human G-CSF in silico fragmentation, while the other two were theoretically planned, allowing the verification of their interest as new therapeutic agents at human health. The evaluation was performed in two stages: *in silico* analysis, consisting of predictions of properties and parameters associated with antibacterial effect, through computational tools; and the *in vitro* experiment for determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the peptides against Gram positive and negative bacteria. Most predictions was favorable for all four peptides, showed by determined results of hydrophobicity, amphipathicity, size, secondary structure, net charge, membrane binding potential, half-life and Boman Index, considered as desirable values for antibacterial potential. In the *in silico* analysis, only algorithmic prediction of antimicrobial activity revealed unfavorable results for peptides with sequences derived from G-CSF (peptides 1 and 2), nonetheless, the predictions were positive for the other two. The *in vitro* assay showed that up to the highest concentration used of the four peptides (500 µg/mL) was insufficient for determination of minimum inhibitory concentration, however it was possible to observe significant growing decrease of *E. coli* (58.7%) by peptide 4 and *E. fecalis* (86.1%) and *E. coli* (54.9%) by peptide 3, when compared with the viability control. These values indicate the presence of antibacterial activity in the theoretically planned peptides (peptides 3 and 4), confirming the computational predictions. Thus, it is possible to conclude that the *in silico* analysis was very important for the selection of the peptides to be synthesized, which showed results of *in vitro* assays in agreement with the computational prediction of antimicrobial activity.

Key words: Antibacterial peptides. *In silico* analysis. Antimicrobial activity. G-CSF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais infecções bacterianas	15
Figura 2 – Mecanismos de resistência em bactérias a antibacterianos	29
Figura 3 – Estruturas secundárias de peptídeos antimicrobianos	36
Figura 4 – Mecanismos de ação de PAMs propostos para explicar o rompimento de membrana	37
Figura 5 – Esquematização da microdiluição em caldo para cada um dos peptídeos	49
Figura 6 – Estrutura tridimensional da molécula isolada de G-CSF em quatro planos diferentes.....	52
Figura 7 – Estrutura tridimensional do G-CSF com os Peptídeos 1 e 2 realçados em verde e azul, respectivamente.....	57
Figura 8 – Predição de estrutura secundária das sequências.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enzimas e reagentes utilizados na clivagem <i>in silico</i> do G-CSF	44
Tabela 2 – Fragmentos de G-CSF com tamanho entre 16 e 30 aminoácidos	53
Tabela 3 – Composição de aminoácidos de fragmentos derivados do G-CSF	55
Tabela 4 – Valores de Ponto Isoelétrico (pI) e carga líquida dos quatro peptídeos ..	60
Tabela 5 – Valores de Hidrofobicidade Média e Momento Hidrofóbico Médio de acordo com a escala Eisenberg, obtidos através da ferramenta HydroMCalc	64
Tabela 6 – Predições da atividade antimicrobiana dos quatro peptídeos através dos métodos SVM (Support vector machines), RF (Random Forest) e DA (Discriminant Analysis)	74

LISTA DE SIGLAS

APD2	Banco de Dados de Peptídios Antimicrobianos (do inglês <i>Antimicrobial Peptide Database-2</i>)
ATCC	(do inglês <i>American Type Culture Collection</i>)
BHI	Infusão de cérebro e coração (do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>)
BLAST	(do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CLSI	(do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
DA	(do inglês <i>Discriminant Analysis</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos (do inglês <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>)
HM	Hidrofobicidade média
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICMR	Conselho Indiano de Pesquisa Médica (do inglês <i>Indian Council of Medical Research</i>)
INAF	Instituto de Nutracêuticos e Alimentos Funcionais (do inglês <i>Institute of Nutraceuticals and Functional Foods</i>)
ISSBAT	Instituto de Ciências Biológicas Aplicadas da Tunísia (do inglês <i>Institute of Applied Biological Sciences Tunis</i>)
LBU	Unidade Lítica Básica (do inglês <i>Lytic Base Unit</i>)
LPS	Lipopolissacarídeos
MH	Momento Hidrofóbico
MIC	Concentração Inibitória Mínima (Minimum Inhibitory Concentration)

MRSA	Staphylococcus aureus resistente à meticilina (do inglês <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
NIRRH	Instituto Nacional de Pesquisas em Saúde Reprodutiva (do inglês <i>National Institute for Research in Reproductive Health</i>)
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PDB	Banco de Dados de Proteínas (do inglês <i>Protein Data Bank</i>)
pI	Ponto Isoelétrico
PSI-BLAST	(do inglês <i>Position Specific Iterated – BLAST</i>)
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro (do inglês <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
RF	(do inglês <i>Random Forest</i>)
SVM	(do inglês <i>Support Vector Machine</i>)

LISTA DE AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteina
D	Aspartato ou Ácido aspártico
E	Glutamato ou Ácido glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Principais Bactérias Causadoras de Infecção	14
1.2 Histórico dos Antibacterianos	17
1.2.1 Sulfonamidas.....	18
1.2.2 Penicilina e Outros β-lactâmicos	18
1.2.3 Principais inibidores da síntese de proteínas	20
1.2.4 Outros agentes antibacterianos de uso clínico.....	22
1.2.4.1 Glicopeptídeos.....	22
1.2.4.2 Rifamicinas	23
1.2.4.3 Quinolonas.....	23
1.3 Resistência bacteriana	24
1.3.1 Origem e Classificação.....	25
1.3.2 Mecanismos de Resistência.....	28
1.3.3 Resistência Bacteriana Atualmente.....	29
1.4 Novas Terapias Antibacterianas.....	31
1.5 Peptídeos Antibacterianos.....	33
1.5.1 Mecanismos de ação dos Peptídeos Antimicrobianos.....	36
1.5.2 Análise In Silico de Peptídeos Antimicrobianos	39
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos Específicos.....	42

3 METODOLOGIA.....	43
3.1 Análise <i>In Silico</i>	43
3.1.1 Obtenção das Sequências de Aminoácidos	43
3.1.2 Análise das Características Fisicoquímicas e Estruturais	45
3.1.3 Busca de Anterioridade	46
3.1.4 Análise do Potencial Antibacteriano	46
3.2 Análise <i>In Vitro</i>.....	46
3.2.1 Descrição dos Peptídeos.....	47
3.2.2 Linhagens Bacterianas	47
3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - MIC	48
3.2.3.1 Inóculo Estoque	48
3.2.3.2 Soluções de Peptídeo.....	48
3.2.3.3 Microdiluições	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Análise <i>In Silico</i>	51
4.1.1 Obtenção das Sequências de Aminoácidos	51
4.1.2 Análise das Características Fisicoquímicas e Estruturais	52
4.1.2.1 Tamanho do Peptídeo	53
4.1.2.2 Composição de Aminoácidos	54
4.1.2.3 Probabilidade de Formação de α -hélice	56
4.1.2.4 Ponto Isoelétrico e Carga Líquida.....	60
4.1.2.5 Hidrofobicidade Média	63
4.1.2.6 Anfipaticidade e Momento Hidrofóbico Médio.....	65

4.1.3 Busca de Anterioridade.....	67
4.1.4 Análise do Potencial Antibacteriano	69
4.1.4.1 Índice de Instabilidade e Meia-vida.....	70
4.1.4.2 Índice de Boman.....	71
4.1.4.3 Potencial de Ligação em Membranas.....	72
4.1.4.4 Atividade Antimicrobiana	73
4.2 Análise In Vitro.....	75
5 CONCLUSÕES	78
6 REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Ainda que muitas doenças contagiosas tenham sido efetivamente contidas, as infecções bacterianas permanecem como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento. Além disso, o risco de infecções bacterianas graves tem aumentado tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, devido principalmente à alta incidência de indivíduos com sistema imunológico debilitado como, por exemplo, pacientes com infecções por HIV ou em tratamento quimioterápico para câncer (WHO, 2001; NAVARINI *et al.*, 2009).

Várias espécies de bactérias são encontradas na microbiota normal do homem, onde convivem de forma harmônica. A maioria delas oferece efeito protetivo para o organismo, no entanto, algumas espécies podem causar processos infecciosos em hospedeiros debilitados (DAVIS, 1996; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.*, 2011). Existem ainda, bactérias naturalmente patogênicas, com maior virulência e capazes de causar infecções individuais ou epidêmicas, independentemente do estado imunológico do indivíduo, representando maior risco para a população (TORTORA *et al.*, 2005). De maneira geral, as infecções bacterianas podem ser sistêmicas ou localizadas, podendo afetar praticamente qualquer parte do corpo humano, como, por exemplo, os tratos respiratório, gastrointestinal e urinário, pele, ossos, sistema nervoso e órgãos genitais, como demonstrado na Figura 1 (WHO, 2001; TANDON; GARCIA-TSAO, 2008).

1.1 Principais Bactérias Causadoras de Infecção

Dentre as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* são as principais causadoras de infecções, podendo estas acometer tecido cutâneo, ossos, pulmões e vias respiratórias superiores, e também causar endocardites (BUNCE *et al.*, 1992). O *S. pyogenes* ganha destaque como agente

etiológico de mais de 15% das faringoamigdalites, e é predominante quando essas infecções são de origem bacteriana (MATOS *et al.*, 2007). Cabe ressaltar outra bactéria do mesmo gênero, a *S. pneumoniae*, principal responsável por pneumonias adquiridas na comunidade, consideradas infecções graves, com índices significativos de morbimortalidade que acomete principalmente crianças menores de cinco anos, idosos e alguns grupos de risco (BANTAR *et al.*, 2011; MATTEI *et al.*, 2008).

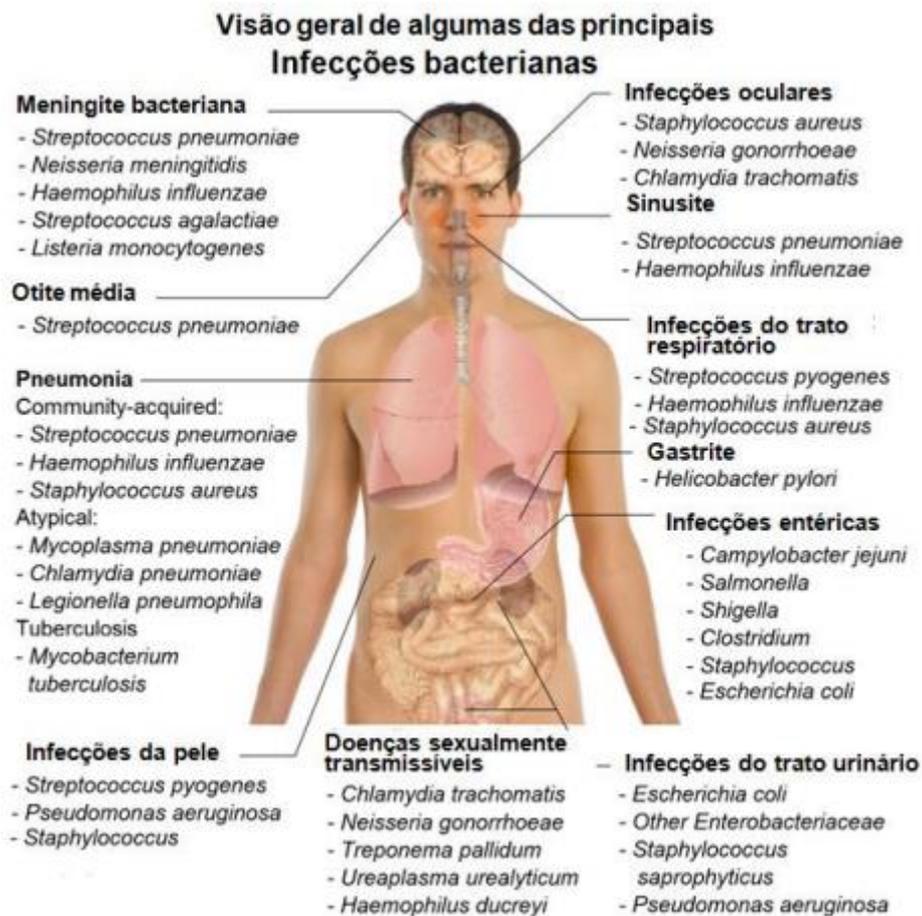


Figura 1: Principais infecções bacterianas. Adaptado de http://www.healthype.com/wp-content/uploads/Bacterial_infections.png

Por outro lado, o *S. aureus* é frequentemente encontrado na pele de pessoas saudáveis e, com isso, está intimamente relacionado a afecções cutâneas simples como espinhas e furúnculos. Entretanto, em situações de desequilíbrio ou baixa imunidade, ele pode tornar-se patogênico e originar infecções de maior gravidade como, por exemplo, meningites, septicemias, endocardites, infecções pós-cirúrgicas e pneumonias. Atualmente, esse micro-organismo apresenta relevância devido à

alta recorrência em infecções comunitárias e nosocomiais, além de sua capacidade de resistência aos antimicrobianos e de adaptação ao ambiente (SANTOS *et al.*, 2007; GELATTI *et al.*, 2009).

Outro gênero de Gram-positivas que tem emergido rapidamente como patógenos nosocomiais e na comunidade é o *Enterococcus sp* (MURRAY, 2000; ASLANGUL *et al.*, 2005). Os enterococos são colonizadores normais do trato gastrointestinal, mas capazes de causar endocardites, síndromes diarreicas em recém-nascidos, infecções do trato urinário e infecções pós-cirúrgicas. Sua frequência em isolamentos de amostras clínicas tem aumentado, sendo *E. fecalis* a espécie predominante (HÖRNER *et al.*, 2005; DESHPANDE *et al.*, 2007).

No caso de bactérias Gram-negativas causadoras de infecções, destacam-se as enterobactérias, especialmente *Escherichia coli* e *Klebsiella sp* e a espécie *Pseudomonas aeruginosa* (FARMER *et al.*, 1985). Bactérias da espécie *E. coli* pertencem à microbiota intestinal tanto de seres humanos como de outros animais, contudo, em torno de 10% são patogênicas, causadoras de infecções intestinais e até mesmo extra-intestinais (RUSSO; JOHNSON, 2000; KAPER *et al.*, 2004; JOHNSON; RUSSO, 2005). Essas bactérias são os principais agentes etiológicos de bacteremias causadas por bacilos Gram negativos e são, frequentemente, isoladas de infecções do trato urinário, meningites, infecções intra-abdominais, entre outras (SADER *et al.*, 2001). O gênero *Klebsiella* é encontrado no solo, água e intestino de humanos e outros animais; tem como principal representante a *K. pneumoniae*, associada a pneumonias, septicemias, meningites e infecções cirúrgicas de pacientes hospitalizados (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Do gênero *Pseudomonas*, o patógeno mais importante é a *P. aeruginosa*, presente no solo, na água e na microbiota da pele humana. Em pacientes saudáveis, essa bactéria raramente causa infecções, no entanto, torna-se um agente infeccioso importante em ambientes hospitalares, sobretudo em pacientes com quebra de barreiras físicas e imunossupressão (THUONG *et al.*, 2003). Por essa razão, essa espécie é considerada oportunista e está associada a infecções de queimaduras, feridas cirúrgicas e trato urinário, sendo também frequentemente isoladas em casos de pneumonias hospitalares e septicemias (SANTUCCI *et al.*, 2003; GALES *et al.*, 2002; SADER *et al.*, 1999).

Comprovadamente, agentes antibacterianos são eficazes em reduzir a morbidade e aumentar a taxa de sobrevivência de pacientes com infecções bacterianas, permanecendo como componentes essenciais no tratamento de diversas doenças causadas por esses micro-organismos (WHO, 2001; RODRÍGUEZ et al., 2007).

1.2 Histórico dos Antibacterianos

Em 1889, Vuillemin criou o termo antibiose para qualificar o processo natural de seleção através do qual um ser vivo destrói o outro para assegurar sua própria existência. Tempos depois, surgia o conceito atual de antibióticos, referindo-se às substâncias de origem biológica que em pequenas quantidades são capazes de inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (BELTER, 1985). Dessa forma, os antibacterianos foram descobertos e desenvolvidos para o tratamento de infecções causadas por bactérias, sendo esses divididos em três grupos incluindo não só antibióticos, mas também semi-sintéticos e quimioterápicos (TORTORA *et al.*, 2005)

Os semi-sintéticos constituem uma classe de substâncias originadas a partir de modificações em laboratório de moléculas naturais, com a finalidade de melhorar sua atividade antibacteriana. Foram desenvolvidos como opção de tratamento de infecções desencadeadas por bactérias resistentes à ação dos antibióticos. Em contraste, os quimioterápicos são moléculas inteiramente sintetizadas em laboratório desde o início do século XX, dando origem a uma nova classe de antibacterianos (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005).

A identificação e produção dessas moléculas capazes de matar bactérias claramente beneficiou a sociedade, pois são responsáveis por salvar incontáveis vidas. Os primeiros agentes antibacterianos descobertos foram as sulfonamidas, penicilina e estreptomicina, seguidos rapidamente por cefalosporina, tetraciclina, macrolídeos e glicopeptídeos (PROJAN; SHLAES, 2004).

1.2.1 Sulfonamidas

Com o desenvolvimento dos quimioterápicos, foi possível a demonstração em 1930 da atividade terapêutica das sulfonamidas em infecções bacterianas. Essas substâncias são derivadas do ácido sulfanílico (ácido paminobenzenosulfônico) e são denominados comumente de sulfas. Experimentos *in vitro* demonstram que as sulfonamidas possuem ação bacteriostática e não bactericida, pois quando culturas bacterianas inibidas por sulfas são semeadas em outros meios sem qualquer antibacteriano, observa-se crescimento, indicando que as bactérias estão vivas e se multiplicando (JONES, 1983; HIRSCH, 1944).

As sulfonamidas oferecem ação contra bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos, clamídias, *Toxoplasma sp*, *Fusobacterium* e actinomicetos, possuindo diversas aplicações desde sua descoberta (ANDRADE, 2002; WILKINSON *et al.*, 2007). Antes da identificação da penicilina, as sulfonamidas consistiam na principal escolha para tratamento de infecções bacterianas e, atualmente, são utilizadas como aditivos de alimentos animais e contra infecções causadas por micro-organismos sulfonamido-sensíveis (FAZOLARO *et al.*, 2009).

1.2.2 Penicilina e Outros β -lactâmicos

A descoberta da penicilina iniciou-se com Alexander Fleming em 1928, que observou em cultura de *S. aureus* que as bactérias não cresciam ao redor de uma colônia contaminante de fungos, posteriormente, identificados como sendo de uma espécie rara de *Penicillium*. Dez anos depois, a substância foi isolada e testada clinicamente com grande sucesso, sendo denominada de penicilina; em 1942, tornou-se o primeiro antibiótico disponível para uso clínico (PATRICK, 2001).

Diferentemente da ação bacteriostática das sulfonamidas (HIRSCH, 1944), a penicilina em cultura bacteriana ocasiona morte de certa proporção das bactérias em

divisão celular, sendo considerada, portanto, um agente bactericida (HOBBY *et al.*, 1942; LEE *et al.*, 1944). Atualmente, existem diversas variedades de penicilinas que podem ser classificadas como naturais (ex. penicilinas G, K, F e X) ou semi-sintéticas, como é o caso da ampicilina e amoxicilina. As naturais geralmente possuem espectro de ação curta, principalmente contra bactérias Gram positivas, e sua variedade mais potente é a penicilina G ou benzilpenicilina, usada na forma de sais sódico ou potássico (HOLTEN; ONUSKO, 2000).

Na busca por antibacterianos mais eficientes, surgiram as penicilinas semi-sintéticas, moléculas transformadas quimicamente e que apresentam ação de espectro ampliado. Dessas, a primeira a ser empregada como terapia antibacteriana foi a ampicilina, efetiva contra cocos Gram positivos e negativos e a maioria de gêneros de bacilos Gram negativos (GREENBERGER, 1996). De maneira geral, as penicilinas são indicadas para tratamento de infecções cutâneas, ósseas e urinárias, sendo também frequentemente utilizadas em casos de faringite, meningite, bronquite, pneumonia, gonorreia e até mesmo endocardite (PATRICK, 2001).

O impacto da descoberta da penicilina foi além da área científica, pois proporcionou fortes implicações sociais e econômicas. Isso porque, além de propiciar a cura de patologias infecciosas para as quais não havia qualquer terapêutica medicamentosa eficaz e, conseqüentemente, diminuir o número de óbitos em todos os níveis etários, a penicilina foi responsável por estimular novos estudos e investimentos tecnológicos de produção industrial de antibacterianos e, acima de tudo, incentivar a descoberta de novos antibióticos (PEREIRA; PITA, 2005).

Além das penicilinas, existem outros agentes antibacterianos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos, como por exemplo, as cefalosporinas, os carbapenêmicos e o ácido clavulânico. Todos os antimicrobianos desse grupo possuem um anel β -lactâmico em sua estrutura e são largamente utilizados de forma sistêmica, devido principalmente à baixa toxicidade e grande variedade de compostos disponíveis para uso clínico (LIVERMORE, 1991). Geralmente, sua ação antibacteriana consiste na interferência da síntese do peptidoglicano, componente fundamental da parede celular bacteriana, através de sua ligação com proteínas ligadoras de penicilina. Como consequência, esses agentes prejudicam o alongamento da parede e,

portanto, a divisão celular, além de promoverem a liberação de autolisinas bacterianas (SPRATT; CROMIE, 1988; BIDNENKO *et al.*, 1998).

A primeira cefalosporina descoberta foi a cefalosporina C, isolada em 1948 por Brutzo, a partir do fungo *Cephalosporium acremonium*. A classe das cefalosporinas possui forte atividade contra algumas bactérias Gram negativas e é formada por diversos análogos da cefalosporina C, permitindo a classificação em primeira, segunda, terceira e quarta gerações (DEMAIN; ELANDER, 1999). Outras classes de β -lactâmicos são os carbapenêmicos (ex. imipenem) e os monobactâmicos, que junto com cefalosporinas de terceira e quarta gerações, constituem os β -lactâmicos mais utilizados contra infecções por enterobactérias (MENDES *et al.*, 2000).

Desde o desenvolvimento desses fármacos, outros derivados β -lactâmicos com atividade antibacteriana superior foram disponibilizados no mercado. Entretanto, a eficiência desses compostos tem sido prejudicada pelo crescente número de bactérias capazes de inativá-los através da hidrólise do anel β -lactâmico por enzimas denominadas β -lactamases (PELCZAR *et al.*, 1997). Sendo assim, em 1967 foram realizados experimentos de triagem na tentativa de identificar inibidores de β -lactamase de origem natural, o que permitiu a descoberta do ácido clavulânico. Essa substância foi isolada de *Streptomyces clavuligerus* e mesmo não apresentando ação antibiótica significativa, é um poderoso inibidor irreversível da maioria das β -lactamase, produzidas por bactérias resistentes à penicilinas e cefalosporinas (ROLINSON, 1991). Administrado juntamente com outro β -lactâmico, mesmo em baixas concentrações, o ácido clavulânico torna as bactérias produtoras de β -lactamase sensíveis a esses fármacos, permitindo, dessa forma, que o outro antibiótico atue na infecção (BAGGALEY *et al.*, 1997).

1.2.3 Principais inibidores da síntese de proteínas

Dentre os fármacos antibacterianos que apresentam como mecanismo de ação a inibição da síntese de proteínas dentro da bactéria, destacam-se os grupos de

aminoglicosídeos, anfenicois, tetraciclinas, macrolídeos e lincosamidas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Os aminoglicosídeos são assim nomeados devido à sua estrutura composta por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à uma hexose central, denominada aminociclitol (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Apresentam ação bactericida por se ligarem à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos e impedirem o movimento destes ao longo do RNA mensageiro, interrompendo a síntese proteica (PATRICK, 2001; DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009). Esse grupo de fármacos é efetivo contra bactérias Gram negativas aeróbicas (ex. *P. aeruginosa*), alguns estafilococos e *M. tuberculosis*, oferecendo efeito sinérgico com antibióticos β -lactâmicos (WALSH, 2003). O principal representante dos aminoglicosídeos é a estreptomicina, isolada em 1944 de uma cepa de *Streptomyces griseus* por Waksman e colaboradores (TAVARES, 2001). A partir de então, foram descobertas diversas outras substâncias com potencial antibacteriano, derivadas dos actinomicetos (GILBERT *et al.*, 1995).

O cloranfenicol é o antibacteriano da classe dos anfenicois mais utilizado, foi isolado da espécie *Streptomyces venezuela*, mas atualmente é produzido por síntese. Seu mecanismo de ação é ligar-se à subunidade 50S do ribossomo e impedir seu movimento ao longo do RNAm, provavelmente pela inibição da peptidil transferase, responsável pela extensão da cadeia peptídica. Como essa região de ligação é a mesma que a dos macrolídeos e das lincosamidas, esses não podem ser utilizados em associação (PATRICK, 2001; VON NUSSBAUM *et al.*, 2006). O cloranfenicol apresenta amplo espectro de ação; é largamente utilizado contra bactérias anaeróbicas e é o fármaco de escolha para o tratamento da febre tifoide (POTRYKUS *et al.*, 2002), além de ser indicado para casos de meningite por *H. influenzae*, especialmente se for resistente à ampicilina (SMITH *et al.*, 2007).

O grupo das tetraciclinas foi descoberto na década de 40 e possui amplo uso na prática clínica. Sua nomenclatura está relacionada à presença de quatro anéis fusionados com um sistema de duplas ligações conjugadas em sua estrutura (NELSON, 1998). São compostos derivados de várias espécies de *Streptomyces* e apresentam ação bacteriostática ao se ligarem à subunidade 30S e impedir a ligação do aminoacil-RNA transportador, bloqueando, então, a adição de novos aminoácidos à cadeia proteica. Esses fármacos possuem largo espectro de ação e boa difusão

para o interior da célula; são utilizados para o tratamento da Doença de Lyme e contra infecções por clamídeas, riquetsias, micoplasmas, brucelas, dentre outras (CHOPRA; ROBERTS, 2001; PATRICK, 2001; GARRELT; SCHROEDER, 2006).

Outra classe de antibacterianos capazes de inibir a síntese proteica bacteriana é a dos macrolídeos, caracterizados pela presença de lactonas macrocíclicas de origem policetídica, ligadas a um açúcar e um amino-açúcar. Seu maior representante é a eritromicina, isolada pela primeira vez em 1952 da espécie *Streptomyces erythreus*, e permanece um dos mais seguros antibióticos de uso clínico. Os macrolídeos são agentes bacteriostáticos com mecanismo de ação similar ao do cloranfenicol. Sua indicação é para o tratamento de infecções respiratórias causadas por bactérias como, por exemplo, pneumonia, bronquite, sinusite aguda, otites médias, tonsilites e faringites (PATRICK, 2001; VON NUSSBAUM *et al.*, 2006).

Finalmente, as lincosamidas apresentam propriedades antibacterianas similares aos dos macrolídeos com o mesmo mecanismo de ação de inibição da síntese proteica de bactérias. A primeira substância dessa classe a ser isolada foi a lincomicina, produzida por *Streptomyces lincolnensis* em 1962 (MASON *et al.*, 1962), sucedida por seu derivado semi-sintético, a clindamicina, amplamente utilizada no tratamento de infecções periféricas por *Bacillus fragilis* ou causadas por outras bactérias anaeróbias resistente à penicilina (KASTEN, 1999; MUKHTAR; WRIGHT, 2005).

1.2.4 Outros agentes antibacterianos de uso clínico

1.2.4.1 Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos possuem ação antibacteriana através da inibição da síntese da parede celular da bactéria pela complexação com o resíduo dipeptídico terminal D-Ala-D-Ala das cadeias peptídicas que constituem essa camada. Esse mecanismo

impede a disponibilidade do substrato para a ação da transpeptidase, bloqueando, portanto, a reação de síntese (VON NUSSBAUM *et al.*, 2006). O antimicrobiano de maior importância desse grupo é a vancomicina, isolada de *Amycolatopsis orientalis* e introduzida na clínica em 1959. Esse fármaco apresenta alta toxicidade e é incapaz de penetrar as bactérias Gram negativas, sendo utilizados apenas no tratamento de infecções por Gram positivos resistentes a outros antibióticos, como é o caso do *S. aureus* resistente à metilina e espécies de *Enterococcus* (PACE; YANG, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

1.2.4.2 Rifamicinas

As rifamicinas possuem em sua estrutura um grupamento aromático com uma longa cadeia macrocíclica alifática, similar a uma ponte, entre duas posições não adjacentes do núcleo aromático. A rifamicina B, isolada a partir da espécie atualmente denominada *Nocardia mediterranei*, deu origem a um fármaco semi-sintético, a rifampicina, introduzida na prática clínica em 1968. A rifampicina apresenta atividade bactericida através de sua ligação de alta afinidade com a RNA polimerase dependente de DNA da bactéria; é, atualmente, o único fármaco bloqueador da transcrição bacteriana em utilização. Com isso, consiste em um potente antimicrobiano de amplo espectro de ação contra bactérias patogênicas, utilizada, inclusive, no tratamento de doenças por *Mycobacterium spp* (CAMPBELL *et al.*, 2001; WALSH, 2003; BRÖTZ-OESTERHELT; BRUNNER, 2008).

1.2.4.3 Quinolonas

As quinolonas são fármacos bactericidas sintetizados a partir de 1962 e podem ser subdivididos em fluorados ou não. As quinolonas fluoradas diferem dos demais por

possuírem um átomo de flúor na posição 6, o que facilita sua entrada na célula bacteriana e está associado a um aumento da atividade. Os antibacterianos quinolônicos agem inibindo a topoisomerase das bactérias, enzima responsável pela iniciação da síntese de DNA, resultando em bloqueio da replicação e reparo do DNA bacteriano. São utilizadas na terapia de infecções do trato urinário e contra bactérias resistentes a antibacterianos mais usuais, como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* (PATRICK, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2010)

Todos esses agentes com atividade antibacteriana contribuíram significativamente para a redução da morbidade das doenças causadas por bactérias, bem como para melhores taxas de sobrevivência. No entanto, o aumento da prevalência de linhagens bacterianas resistentes a esses fármacos ameaçam sua eficácia no controle das infecções, importando constante preocupação nas áreas de saúde e terapêutica (WHO, 2001).

1.3 Resistência bacteriana

Um aumento na frequência de resistência a antimicrobianos em bactérias é observado desde 1950 em todas as principais classes de antibacterianos utilizados no tratamento de grande variedade de doenças respiratórias, urinárias, cutâneas e sexualmente transmissíveis (CRISWELL, 2004). Com o melhoramento da produção em larga escala e a crescente utilização sem prescrição médica, somados a muitos anos de uso em excesso ou de forma inadequada, os agentes antibacterianos contribuíram significativamente com o desenvolvimento de resistência bacteriana por pressão seletiva. Por isso, mesmo que esses antimicrobianos tenham revolucionado a história da medicina e salvado incontáveis vidas, a sua utilização vem sendo acompanhada por um rápido aparecimento de linhagens bacterianas resistentes. (DAVIES, DAVIES, 2010)

Sabe-se que a resistência bacteriana é determinada por genes que codificam a expressão de mecanismos bioquímicos neutralizadores da ação dos antibacterianos

(OBATA *et al.* 2010). Contudo, uma cepa bacteriana é considerada resistente a um determinado fármaco quando, *in vitro*, é capaz de sobreviver e multiplicar-se em concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pela substância no local da infecção (TORTORA *et al.* 2005; HOIBY *et al.* 2010). Isso torna o conceito de resistência relativo, pois depende das concentrações terapêuticas atingidas no sítio infeccioso. Dessa forma, uma bactéria pode ser resistente à concentração do fármaco no sangue, que atinge valores inferiores à de outros fluidos e tecidos, mas sensível à essa mesma droga se a infecção estiver, por exemplo, nas vias respiratórias. (ANG *et al.*, 2004).

1.3.1 Origem e Classificação

Desde a introdução em 1930 das Sulfonamidas, o desenvolvimento de mecanismos específicos de resistência tem acompanhado seu uso terapêutico, os quais se mantiveram presentes por mais de 70 anos depois (KASHIMIRI; HOTCHKISS, 1975). A primeira linhagem resistente à Sulfonamidas foi da espécie *Streptococcus pyogenes* que surgiu em meados da década de 30 em um hospital militar (LEVY, 1982). Algum tempo depois, infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à Penicilina foram constatadas em hospitais civis de Londres nos anos 40 (BARBER; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, 1948). Da mesma forma, *Mycobacterium tuberculosis* com resistência à estreptomicina emergiu na população logo após a descoberta deste antibiótico (CROFTON; MITCHISON, 1948).

Em 1967 foi observado na Austrália o aparecimento da primeira *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina e, sete anos depois, foi documentado um caso de meningite pneumocócica nos Estados Unidos com essa mesma linhagem bacteriana. Em 1980 foi estimado que 3-5% de *S. pneumoniae* era resistente à penicilina, valor que continuou a aumentar e alcançou 34% em 1998 (DOERN *et al.*, 2001). Segundo Shoemaker *et al.* (2001) a resistência a antibióticos por outras bactérias seguiu a mesma tendência, demonstrada pela microbiota intestinal humana,

que possuía 2% de resistentes à tetraciclina em 1950 e atingiu número alarmante de 80% na década de 90.

A presença de resistência em linhagens bacterianas pode ser devido a vários fatores genéticos e ambientais, permitindo sua classificação, quanto à origem, em natural ou adquirida (FREITAS *et al.*, 1989). Algumas espécies de bactéria são naturalmente resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos, condição em que todas as linhagens dessa espécie são igualmente resistentes a essas substâncias. Nesse caso, o micro-organismo possui em seu material genético genes codificadores de produtos que de alguma forma são capazes de neutralizar os efeitos dos antimicrobianos e prevenir seu ataque aos componentes da célula. No entanto, a preocupação maior são os casos de resistência adquirida, em que populações inicialmente sensíveis tornam-se resistentes a um agente antibacteriano e conseguem se proliferar e dispersar devido à pressão seletiva (CHOPRA; ROBERTS, 2001; TENOVER, 2006). Isso pode ser observado em muitas espécies de bactérias, que adquirem a capacidade de adaptar-se rapidamente à introdução de agentes antimicrobianos em seu ambiente, condição genética proveniente de mutação ou mecanismos de troca de genes (McMANUS, 1997).

Ainda que uma única mutação em determinado gene bacteriano tenha como consequência apenas leve redução de sua susceptibilidade a um antimicrobiano, ela pode ser suficiente para permitir a sobrevivência da bactéria até que esta adquira mutações adicionais, resultando em resistência completa ao antimicrobiano. Além disso, existem raros casos em que uma única mutação genética é suficiente para conferir altos níveis de resistência frente a um fármaco, como é o caso de cepas de *S. aureus* resistentes à rifampicina e *Campylobacter jejuni* resistentes à fluoroquinolonas (TENOVER, 2006).

Um exemplo comum de resistência adquirida por mutação é quando esta modifica o sítio de ligação do agente antibacteriano, como é o caso de alterações no ribossomo bacteriano capazes de impedir a ligação de fármacos inibidores da síntese proteica, tornando estes sem função (RECHT *et al.*, 1999). No entanto, mesmo que esse tipo de mutação seja aparentemente benéfica, sempre propicia alguma desvantagem. No caso do exemplo anterior, mutações no ribossomo causam, além de resistência à antibióticos, redução na síntese proteica e na capacidade da bactéria em competir

em ambientes livres desses antibióticos (ZENDEL *et al.*, 1977; GREGORY *et al.*, 2001). Além do mais, existem algumas situações em que determinada bactéria apresenta uma mutação capaz de conferir resistência a um antibiótico, mas que pode torná-la mais susceptível a outro agente antibacteriano (RECHT; PUGLISI, 2001).

Níveis maiores de resistência são obtidos através da associação das mutações com a seleção natural, oferecida pelo uso de antibacteriano ao qual a bactéria seja resistente. Isso porque, durante o tratamento, a bactéria sofre exposição a altas concentrações do fármaco por longos períodos, criando forte pressão seletiva entre as diferentes linhagens de bactérias presentes no local (DAVIES; DAVIES, 2010). De todo jeito, populações bacterianas normalmente sensíveis podem tornar-se resistentes a antimicrobianos não somente através de mutações e seleção, mas também por aquisição de genes de outras bactérias que codifiquem resistência (TENOVER, 2006).

Outra condição responsável pelo desenvolvimento de cepas resistentes a antibacterianos é a transferência de genes de resistência entre bactérias, denominada transferência horizontal, que pode ocorrer entre linhagens da mesma espécie ou de diferentes espécies e gêneros. Esse processo consiste na incorporação de genes de resistência, provenientes de um micro-organismo resistente a determinado fármaco, no genoma ou plasmídeo de uma bactéria sensível, o que pode ser facilitado pela presença de transposons. Existem mecanismos através dos quais os micro-organismos conseguem efetivar essa transferência genética, incluindo transdução, transformação e conjugação (McMANUS, 1997).

Na transdução, os genes de resistência são transferidos de uma bactéria para outra de mesma espécie por meio de vírus do tipo bacteriófagos. Esse evento é considerado relativamente raro, sendo mais comum entre *Staphylococcus spp*, como, por exemplo, o *S. aureus*. Ainda assim, existem relatos da identificação de bacteriófagos carreadores de genes de resistência ou de virulência no meio ambiente e em hospitais (SKURRAY; FIRTH, 1997; SEPUTIENE *et al.*, 2010).

A transformação ocorre quando uma bactéria adquire genes através de captação do material genético de outra bactéria liberado no ambiente devido à lise celular (JACOBY, 2005). A transformação possui menor importância clínica, pois para que a transferência de genes de resistência seja efetiva, é necessário haver competência suficiente por parte do micro-organismo receptor, além de condições ambientais adequadas (ROUVEIX, 2007). Esse é o principal mecanismo de troca de genes de patogenicidade e virulência entre *Streptococcus spp*, *Neisseria spp* e *Acinetobacter spp* (SPRINGMAN *et al.*, 2009; FEIL *et al.*, 1999; BARBE *et al.*, 2004).

Por fim, a transferência genética por conjugação é feita diretamente entre duas bactérias viáveis. Em Gram negativas, a conjugação ocorre com o auxílio de uma estrutura proteica alongada denominada pili sexual, que transfere o material genético a uma bactéria adjacente. No caso da transferência entre Gram positivas, a conjugação inicia-se por produção de feromônios sexuais que facilitam o acoplamento entre as bactérias doadora e receptora, permitindo a troca de genes (TENOVER, 2006). Esse mecanismo é bastante frequente na natureza e ocorre livremente entre enterobactérias no trato intestinal de humanos e de outros animais (SORENSEN *et al.*, 2005; SHOEMAKER *et al.*, 2001).

1.3.2 Mecanismos de Resistência

Os mecanismos de defesa adotados por algumas bactérias têm a finalidade de conferir sua sobrevivência à ação dos antibacterianos, podendo resultar em tolerância ou até mesmo resistência (FREITAS *et al.*, 1989; HOIBY *et al.*, 2010). No caso da resistência ocorre total fracasso da terapia antibacteriana, restando apenas a substituição do medicamento por outro ao qual a bactéria apresente sensibilidade (LI *et al.*, 2007).

Esses mecanismos consistem em propriedades estruturais ou bioquímicas presentes na célula bacteriana. Os mais frequentemente encontrados são: produção de enzimas específicas capazes de degradar o antibacteriano (ex. β -lactamases) ou de

modificá-lo quimicamente, neutralizando-o (ex. adição de grupos acetil ou fosfato); alteração do sítio de ligação do fármaco e consequente perda da sensibilidade, tornando-o sem efeito; diminuição da permeabilidade do fármaco para o interior da célula (ex. regulação negativa de genes de porinas); síntese de proteínas protetoras de ribossomos que alteram sua conformação, impedindo a ligação do antimicrobiano; e efluxo das moléculas de antibacteriano por meio de transporte ativo (bombas de efluxo), reduzindo sua concentração dentro da bactéria sem qualquer modificação química na estrutura da droga (TENOVER, 2006; CRISWELL, 2004; WRIGHT, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

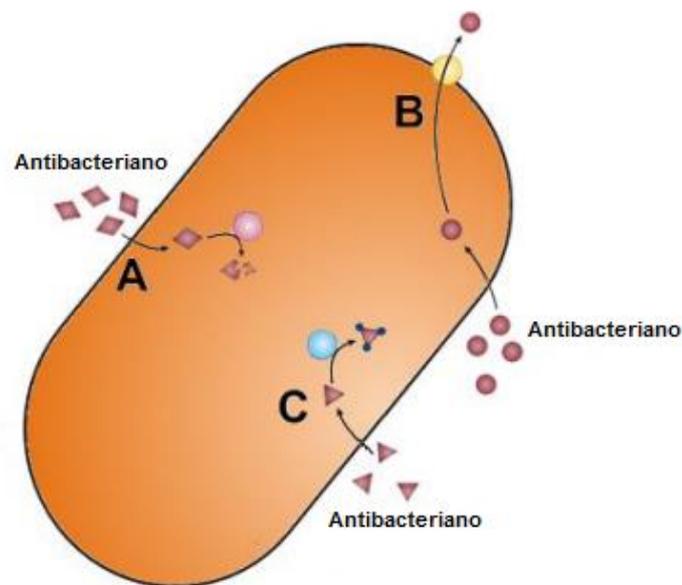


Figura 2: Mecanismos de resistência em bactérias à antibacterianos. A) Degradação do antibacteriano por enzimas específicas. B) Redução na concentração do antibacteriano por bombas de efluxo. C) Modificação química do antibacteriano por enzimas. Adaptada de Furuya e Lowy (2006)

1.3.3 Resistência Bacteriana Atualmente

Em pleno século XXI, o desafio frente à resistência bacteriana está cada vez mais crítico, devido ao crescente surgimento de bactérias resistentes a vários antibacterianos, sendo denominadas multirresistentes. Os casos mais comuns de

multirresistência identificados são de espécies de *S. aureus*, *E. fecalis*, *M. tuberculosis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (ANDERSSON; HUGHES, 2010). Um dos principais micro-organismos multirresistentes de importância clínica é o *S. aureus*, que rapidamente desenvolveu resistência à penicilina. A partir de 1959, era indicado o uso de meticilina para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno, no entanto, três anos depois, houve o surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes também a esse antibiótico, denominadas MRSA (do inglês Methicillin-resistant *S. aureus*). Essa bactéria apresenta elevada virulência e está associada a diversas doenças comunitárias e hospitalares (ENRIGHT *et al.*, 2002; OKUMA *et al.*, 2002). Vários anos depois, a situação torna-se ainda mais preocupante com o aparecimento de cepas MRSA também resistentes à vancomicina, antimicrobiano de escolha contra essas bactérias (WEIGEL *et al.*, 2003).

Dos patógenos Gram negativos, os mais prevalentes em infecções são *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, e *Klebsiella pneumoniae*, todos fortemente associados a casos de resistência contra os antimicrobianos utilizados no tratamento de doenças causadas por essas enterobactérias (DAVIES; DAVIES, 2010). Várias linhagens são resistentes a diversas classes de β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, provavelmente pela produção de enzimas β -lactamases (RUPP; FEY, 2003). No entanto, algumas cepas apresentam também resistência a outros fármacos que não os β -lactâmicos, provavelmente por outros mecanismos, como, por exemplo, diminuição da permeabilidade da membrana celular (MARTINEZ-MARTINEZ, 2000).

Outro Gram negativo de grande interesse clínico é a *Pseudomonas aeruginosa*, que inicialmente causava apenas infecções oportunistas de feridas e queimaduras, mas, atualmente, representa grande ameaça em infecções hospitalares (KARLOWSKY *et al.*, 2005). Esse patógeno é persistente e apresenta mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos. Através da diminuição de permeabilidade e de sistemas de efluxo de fármacos, a *P. aeruginosa* apresenta resistência a inúmeros grupos de antibacterianos, incluindo os β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, macrolídeos e aminoglicosídeos (SCHWEIZER, 2003; POOLE; SRIKUMAR, 2001).

Por fim, observa-se que o desenvolvimento desses e de muitos outros micro-organismos resistentes é também resultado de vários anos de uso inadequado de

agentes antimicrobianos, responsável por significativa pressão seletiva entre populações bacterianas que favorecem a disseminação das linhagens resistentes (DAVIES; DAVIES, 2010). Isso permanece um dos maiores problemas na área da saúde humana e demanda aumento de esforços na procura por novas terapias antibacterianas (LEVY; MARSHALL, 2004).

1.4 Novas Terapias Antibacterianas

Buscando alternativas aos antibacterianos convencionais, várias pesquisas foram desenvolvidas, algumas com resultados bastante promissores, como, por exemplo, as estratégias antivirulência, a terapia de fagos, a administração de anticorpos monoclonais e, finalmente, o uso peptídeos antibacterianos (FERNEBRO, 2011).

O sistema imunológico de um hospedeiro é capaz de combater e eliminar diversos micro-organismos infectantes, sem causar qualquer dano aparente à microbiota normal, no entanto, enfrenta dificuldades na defesa contra algumas bactérias que apresentam propriedades específicas responsáveis por torná-las mais virulentas, como, por exemplo, formação de biofilme e produção de moléculas de adesão, toxinas, secreções ou substâncias relacionadas ao *quorum sensing* (RASKO; SPERANDIO, 2010). As estratégias de terapias antivirulência possuem como alvo algumas dessas características; atualmente existem vários inibidores de virulência em desenvolvimento, como o INP0007, que inibe o sistema de secreção do tipo III de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (HUDSON *et al.*, 2007), os pilicidas, que evitam a formação da pili e impedem a adesão de *E. coli* (CEGELSKI *et al.*, 2009), e os derivados de furanona, inibidores do *quórum sensing* de *P. aeruginosa* (HENTZER *et al.*, 2003).

A pesquisa da terapia com fagos teve origem no início do século XX, porém, na década de 40, com a descoberta dos antibióticos, houve redução de esforços nos estudos dessa área e, apenas nos anos 80, a fagoterapia foi revitalizada como alternativa terapêutica para as infecções bacterianas devido ao aparecimento de

cepas multirresistentes aos antibióticos (CAMPBELL, 2007). Os bacteriófagos, também denominados apenas de fagos, são vírus capazes de infectar bactérias. A maioria dos fagos descritos infecta espécies de bactérias do grupo das enterobactérias, como *E. coli* e *S. typhimurium*. (MADIGAN *et al.*, 2008). Esses vírus são classificados como líticos, pois após se replicarem dentro da célula, promovem a eliminação das bactérias de forma lítica direta durante o processo de liberação (LU *et al.*, 2011).

A terapia com fagos para o controle microbiológico é um método promissor, que apresenta vantagens como caráter autolimitante, ou seja, os vírus possuem ação somente na presença de bactérias, administração em dose única e ausência de efeitos secundários indesejáveis, além de ser considerado um tratamento de baixo custo (ATTERBURY *et al.*, 2007). Em contrapartida, Sulakvelidze *et al.*, (2001) ressaltam como desvantagens dessa terapia o risco de desenvolvimento de resistência pelas bactérias e a possibilidade de neutralização dos vírus pelo sistema imunológico do hospedeiro. Dentre os fagos utilizados em experimentos destacam-se o *Biophage PA*, ativo contra *P. aeruginosa* (WRIGHT *et al.*, 2009), o fago T4, testado em casos de diarreia aguda causados por *E. coli* (BRUTTIN *et al.*, 2005), e o coquetel de fagos, BFC-1, ativo principalmente contra *S. aureus*, incluindo MRSA (JIKIA *et al.*, 2005).

Há algum tempo os anticorpos demonstram sucesso no tratamento de diversos tipos de câncer, doenças autoimunes e ainda como terapia para evitar rejeições de tecidos ou órgãos transplantados. Isso despertou interesse em anticorpos como candidatos para o tratamento de infecções; esses podem ser divididos em dois grupos: os que possuem ação direta contra os micro-organismos patogênicos e os capazes de neutralizar toxinas e/ou fatores de virulência (BEBBINGTON *et al.*, 2008). Sua introdução na clínica terapêutica é favorecida pelo grande conhecimento sobre sua farmacocinética e farmacodinâmica, contudo, existem algumas desvantagens nessa terapia, como o alto custo de produção e a necessidade de prévia identificação do patógeno alvo (WEISMAN *et al.*, 2009).

Existem estudos envolvidos com o uso de anticorpos com propriedade de reagir com antígenos de diversas espécies e sorotipos de bactérias Gram negativas, indicando um possível tratamento de bacteremia causada por enterobactérias ou outros

bacilos Gram negativos (BERMUDEZ, 1987). Recentemente, alguns outros anticorpos também se encontram em testes, como é o caso do Anthin, com alta especificidade contra *Bacillus anthracis* (SUBRAMANIAN *et al.*, 2005); o pagibaximab, testado para a prevenção de doenças causadas por *S. aureus* (WEISMAN *et al.*, 2009); e o KB001, capaz de inibir o sistema de secreção do tipo III, associado à virulência, de *P. aeruginosa* (BAER *et al.*, 2009).

De acordo com Toke (2005), uma outra alternativa aos antibióticos para o tratamento de doenças infecciosas é a utilização de cadeias peptídicas naturais ou sintéticas com atividade contra uma variedade de micro-organismos. Essas moléculas são denominadas peptídeos antimicrobianos (PAMs), os quais serão discutidos em seguida.

1.5 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) naturais são componentes do sistema imunológico inato de praticamente todas as formas de vida; contribuem significativamente contra a invasão de patógenos e no combate de infecções já instaladas (NIZET *et al.*, 2001). São moléculas codificadas por genes e sintetizadas pelos ribossomos de forma constitutiva ou em resposta a eventos patológicos, de modo que muitos deles são sintetizados como precursores que apenas tornam-se ativos após serem processados por clivagem proteolítica (GALLO *et al.*, 2002).

A presença de peptídeos na linfa de insetos, pele de sapos e grânulos de neutrófilos humanos, com capacidade de matar bactérias em culturas, foi relatada há algumas décadas. A partir de então, milhares de peptídeos antimicrobianos de diferentes origens vêm sendo identificados (HAMMAMI; FLISS, 2010), podendo ser isolados em espécies de bactérias, fungos, insetos, anfíbios, crustáceos, aves, peixes, plantas e mamíferos, incluindo os seres humanos (HANCOCK, 2001). A expressão dos PAMs é variável e depende do tipo da célula ou tecido, entretanto, na maioria dos casos, essas moléculas são expressas concomitantemente em grupos, como

por exemplo, a pele, com mais de 20 tipos de PAMs, incluindo catelicidinas e β -defensinas (BRAFF; GALLO, 2006).

Nos mamíferos, as funções naturais desses peptídeos estão relacionadas à defesa do organismo contra patógenos, pois são capazes não só de matar os micro-organismos, mas também de modular as respostas do sistema imunológico inato, atenuando as respostas inflamatórias exacerbadas e estimulando outros processos mais benéficos. De maneira geral os PAMs são responsáveis por induzir respostas de várias células do organismo, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais, além de alterar a expressão gênica para aumentar a produção de quimiocinas e citocinas e recrutar leucócitos para o local da infecção. Toda essa modulação imunológica resulta em proteção contra infecções, controle seletivo da inflamação, promoção de cicatrização de feridas e início da resposta adaptativa (LAI; GALLO, 2009).

Em animais invertebrados, os peptídeos antimicrobianos podem ser encontrados principalmente no corpo gorduroso, células da hemolinfa e epitélios do tubo digestório, traqueia, entre outros (BULET *et al.*, 2004). Entretanto, os peptídeos com ação antimicrobiana produzidos por bactérias, geralmente, mostram-se mais potentes que aqueles produzidos por células eucarióticas, pois apresentam boa atividade mesmo em baixas concentrações (FIMLAND *et al.*, 2005). De qualquer forma, os peptídeos antimicrobianos, independentemente de sua origem, apresentam composição variada de aminoácidos, resultando em diferentes características e conformações, associadas à sua função (BOMAN, 2003).

Apesar de exibir uma enorme variedade de sequências e estruturas, geralmente os PAMs compartilham algumas propriedades similares, associadas à atividade antimicrobiana (HANCOCK; LEHRER, 1998). A presença de diferentes cadeias laterais dos aminoácidos oferecem distintas propriedades químicas para cada PAM, sendo que essa diversidade é dada, provavelmente, pela capacidade de cada peptídeo em exercer sua função num determinado ambiente contra certos tipos de micro-organismos patogênicos (DESLOUCHES *et al.*, 2004).

Mesmo com essas variações de sequência, os PAMs possuem algumas características em comum, como o tamanho da cadeia, geralmente entre 12-50 aminoácidos, presença substancial de 50% ou mais de resíduos hidrofóbicos e,

ainda, a capacidade de formar estruturas secundárias anfipáticas, induzidas pela interação com membranas (HANCOCK, 2001). Essa última propriedade é proveniente do fato da maioria dos peptídeos antimicrobianos serem moléculas altamente anfipáticas com as porções hidrofóbicas e hidrofílicas separadas em diferentes padrões pela superfície da cadeia. De forma geral, todas essas características estão associadas à atividade antimicrobiana dos PAMs, pois conferem a capacidade de romper ou atravessar membranas lipídicas (TOKE, 2005).

A grande maioria dos PAMs possui carga líquida positiva, devido ao excesso de resíduos do tipo lisina e arginina em comparação aos resíduos ácidos. Essa propriedade ajuda na interação dos peptídeos com a membrana celular bacteriana, composta por lipídios com grupamentos externos hidrofílicos e negativos (DATHE *et al.*, 1999; HANCOCK, 2001). Ainda assim, existem também peptídeos aniônicos, identificados no sistema imunológico de eucariotos, ricos em aminoácidos do tipo glutamato e aspartato, conferindo-lhe carga líquida negativa (HARRIS *et al.*, 2009). Esses peptídeos também possuem atividade contra bactérias, com a diferença de atravessar a membrana sem danificá-la, para então agir em alvos intracelulares, como por exemplo, os ribossomos (BRODGEN *et al.*, 2003; SELA, 1962). A desvantagem dos peptídeos aniônicos em relação aos catiônicos é a sua necessidade de íons positivos (ex. Zn^{2+}) como co-fatores para a atividade biocida. Entretanto, sabe-se que, independentemente da carga líquida, os PAMs são capazes de adotar estruturas secundárias anfipáticas e interagir com a membrana do micro-organismo (LAVERTY *et al.*, 2011).

As estruturas conformacionais dos PAMs permitem dividi-los em dois grupos principais, peptídeos lineares e peptídeos com ligação dissulfeto. Os peptídeos lineares podem ser subdivididos em formadores de α -hélice (ex. magaininas) ou ainda em peptídeos sem estrutura secundária clássica, ricos em resíduos prolina, glicina e/ou triptofano (ex. indolicidina). Os peptídeos com ligação dissulfeto possuem essa propriedade pela presença de resíduos cisteínas; seus principais representantes são os formadores de estruturas β -folhas antiparalelas, como por exemplo, a tachyplesina (TOKE 2005; POWERS; HANCOCK, 2003). Existem também peptídeos antimicrobianos com estrutura mista ou diferente dessas citadas anteriormente, porém, dos PAMs identificados e cadastrados até o momento e com estrutura tridimensional conhecida, a maioria é linear e formadora de α -hélice

anfipática (WANG; WANG, 2004; WANG *et al.*, 2009), apresentando suas cadeias laterais polares voltadas para um lado e as apolares para o lado oposto, permitindo uma interação ótima do peptídeo com a estrutura biológica da membrana (DEGRADO; LEAR, 1985; DATHE *et al.*, 1999).

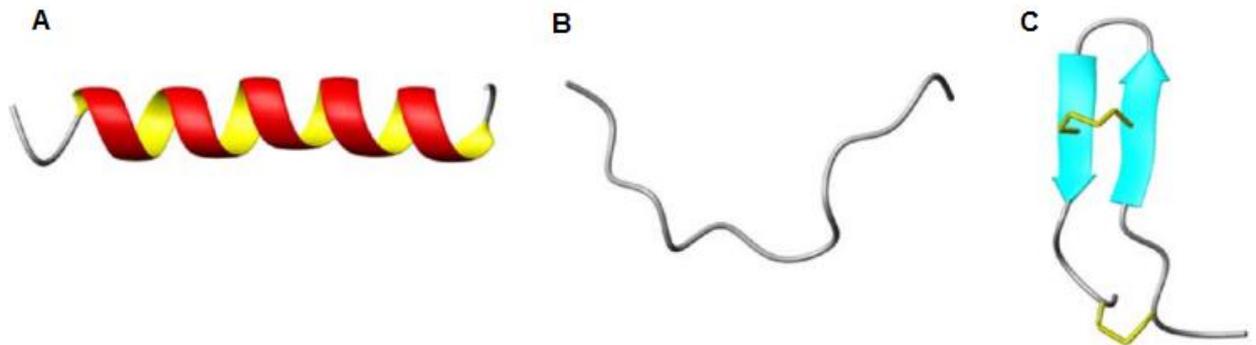


Figura 3: Estruturas secundárias de peptídeos antimicrobianos. A) α -hélice da magainina 2; B) conformação sem estrutura clássica da indolicidina; C) β -folhas antiparalelas da tachyplesina, com ligações dissulfeto em amarelo. Adaptada de Power e Hancock (2003).

1.5.1 Mecanismos de ação dos Peptídeos Antimicrobianos

Os PAMs possuem múltiplas atuações nos componentes celulares, desde a permeabilização de membrana até efeitos na parede celular e nos elementos intracelulares, de forma que sua atividade efetiva varia de uma bactéria a outra, sendo também diferente para cada peptídeo (FRIEDRICH *et al.*, 2000). Portanto, todos os peptídeos antimicrobianos são capazes de interagir com membranas, porém, quanto ao mecanismo de ação antibacteriana podem ser divididos em dois grupos: os que têm como alvo o rompimento da membrana celular; e os que atuam em alvos intracelulares (YEAMAN; YOUNT, 2003; POWERS; HANCOCK, 2003).

Peptídeos com a capacidade de romper membranas são geralmente relatados como sendo formadores de α -hélice. Ao longo dos anos, foram desenvolvidos quatro modelos diferentes na tentativa de explicar o processo de rompimento de

membranas por PAMs, os quais foram denominados: modelo por agregação, poro toroidal, feixes de barril e carpete, conforme Figura 4 (LAVERTY *et al.*, 2011).

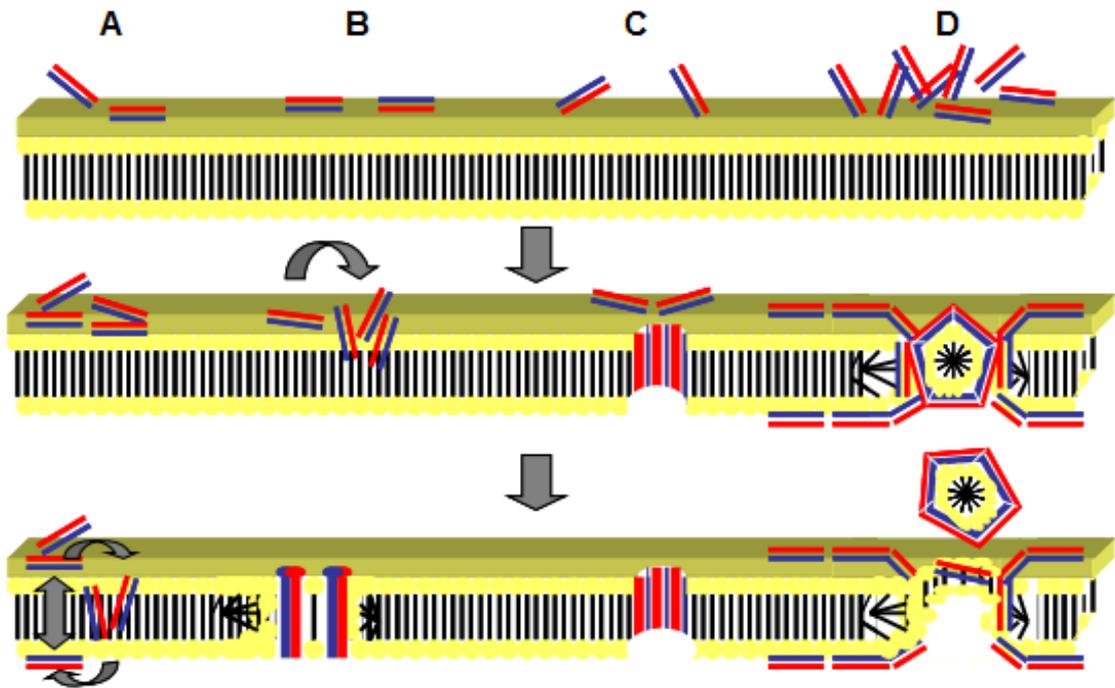


Figura 4: Mecanismos de ação de PAMs propostos para explicar o rompimento de membrana. A) Agregação; B) Poro toroidal; C) Feixes de barril; D) Carpete. (LAVERTY *et al.*, 2011).

O modelo por agregação propõe um evento em que os peptídeos antimicrobianos se reorientam para formar agregados que se associam à membrana formando espaços que contêm peptídeos sem orientação específica e micelas de lipídios, resultando em desmoronamento da membrana e passagem dos peptídeos para o interior da célula (POWERS *et al.*, 2005).

No mecanismo do poro toroidal, os peptídeos se inserem de forma perpendicular ao plano da bicamada graças às interações entre as porções hidrofílicas da cadeia com os grupamentos externos dos fosfolípidos e também entre as regiões hidrofóbicas do peptídeo com as caudas dos lípidos, forçando a membrana a curvar-se para o interior e a formar um poro linear (HALLOCK *et al.*, 2003).

Similarmente, no modelo de feixes de barril os peptídeos também se inserem perpendicularmente através da membrana celular, contudo, vários peptídeos unidos nessa orientação ficam alinhados e formam um canal, que lembra os feixes de um

barril, onde as cadeias laterais hidrofílicas ficam voltadas para o interior do canal, enquanto as hidrofóbicas, para os lipídeos da membrana. Supõe-se que esse canal seja capaz de permitir o extravasamento dos componentes citoplasmáticos e de interromper a diferença de potencial da membrana (EHRENSTEIN; LECAR, 1977).

Por último, o modelo carpete sugere que os peptídeos ficam alinhados paralelamente à superfície da membrana e permanecem em contato com os grupamentos externos dos lipídeos, de forma a cobrir áreas adjacentes, similar à um carpete. Isso causaria perturbação na estabilidade da bicamada com formação de rachaduras e extravasamento do conteúdo celular e, finalmente, a desintegração da membrana (OREN; SHAI, 1998).

O resultado final de qualquer que seja o mecanismo de ação antimembrana é a despolarização da célula bacteriana e, conseqüentemente, a morte dentro de cinco minutos para a maioria dos peptídeos. Cabe ressaltar que todos os modelos descritos podem ser verdadeiros, pois sabe-se que os PAMs apresentam mecanismos de ação diferentes (POWERS; HANCOCK, 2003).

O outro grupo de PAMs compreende peptídeos sem aparente ação antimembrana, capazes de atravessar a bicamada sem causar grandes perturbações e atingir alvos intracelulares. Uma vez dentro da célula bacteriana, os PAMs são capazes de interagir com moléculas de DNA, RNA e proteínas, impedindo, assim, sua síntese (PARK *et al.*, 1998; YONEZAWA *et al.*, 1992; PATRZYKAT *et al.*, 2002). Existem ainda relatos de peptídeos que se ligam a alvos específicos como, por exemplo, proteínas de choque térmico, impedindo o dobramento de proteínas dependentes de chaperonas (KRAGOL *et al.*, 2001), ou ainda lipídeos específicos da parede celular, inibindo a síntese de peptidoglicano (BROTZ *et al.*, 1998). Em todo caso, peptídeos com alvos intracelulares demandam maior tempo para exercer seu efeito nas células bacterianas do que aqueles capazes de causar rompimento na membrana citoplasmática (POWERS; HANCOCK, 2003).

Logo, os PAMs podem atuar sobre múltiplos alvos na célula bacteriana, desde a membrana plasmática até em processos intracelulares como síntese de macromoléculas, vias enzimáticas e divisão celular, apresentando atividade bactericida extremamente rápida se comparados com os antibióticos convencionais (BROGDEN, 2005). Com isso, os PAMs poderiam ser utilizados individualmente na

terapia de infecções bacterianas ou em associação com outros antibióticos, a fim de obter efeito sinérgico (ZASLOFF, 2002; MARR *et al.*, 2006).

Entendendo o mecanismo de ação dos PAMs juntamente com sua importante função na defesa mediada pela resposta imunológica inata, percebe-se seu grande potencial como agentes terapêuticos no controle de doenças (LAI; GALLO, 2009). Na verdade, existem diversos relatos experimentais da atividade de PAMs, não somente contra bactérias Gram negativas e positivas, mas também contra fungos, protozoários e alguns vírus, como, por exemplo, causadores da influenza A (MOHAMMAD *et al.*, 1995; ALEY *et al.*, 1994; MURAKAMI *et al.*, 1991).

Finalmente, o potencial de peptídeos naturais ou sintéticos serem usados na terapia humana vai além do tratamento de infecções comuns, pois alguns estudos demonstram a possibilidade de sua utilização na cicatrização de feridas (GALLO *et al.*, 1994), na terapêutica contra o câncer (BAKER *et al.*, 1993; JOHNSTONE *et al.*, 2000; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008) e até na erradicação de doenças transmitidas sexualmente como, por exemplo, infecções pelo HIV (SAMBRI *et al.*, 2002; MORIMOTO *et al.*, 1991; MASUDA *et al.*, 1992; ROBINSON *et al.*, 1998). Isso demonstra a expectativa dos peptídeos antimicrobianos nos próximos anos, em que cada vez mais, pesquisas demonstrarão a eficiência dessas moléculas como agentes terapêuticos seguros (LAVERTY *et al.*, 2011).

1.5.3 Análise *In Silico* de Peptídeos Antimicrobianos

A análise *in silico* consiste em um procedimento baseado em ferramentas computacionais utilizado para testar uma hipótese, buscar padrões, demonstrar um fato conhecido, entre outros (STEVENS *et al.*, 2003). Na tentativa de aumentar a possibilidade de planejamento de peptídeos como agentes terapêuticos com ótima atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, foram criados diversos métodos computacionais capazes de avaliar e quantificar várias propriedades associadas a essas características (SIGURDARDOTTIR *et al.*, 2006; TORRENT *et al.*, 2012).

O estabelecimento desses métodos foi permitido pela prévia criação de banco de dados de PAMs, divididos em dois grupos principais: bancos gerais, como, por exemplo, o APD, que contém informações sobre todos os tipos de PAMs (WANG; WANG, 2004); e bancos específicos (ex. BACTIBASE), com dados de uma quantidade limitada de peptídeos pertencentes à determinada classe ou de origem específica (HAMMAMI *et al.*, 2007). A criação dos arquivos contidos nesses bancos de dados provém do rápido aumento da quantidade de peptídeos contendo atividade contra micro-organismos, e possui a finalidade de reunir, classificar e avaliar todas as informações acerca dessas moléculas.

Apesar do grande número de PAMs identificados atualmente e dos esforços em caracterizar seu mecanismo de ação, a relação entre a estrutura e a atividade dessas moléculas não está inteiramente compreendida, provavelmente devido à grande variedade de sequências e estruturas (KINDRACHUK; NAPPER, 2010). Entretanto, existem métodos *in silico* que, através de arquivos de diversas sequências de PAMs, juntamente com suas propriedades e efeitos biológicos, são capazes de estimar algumas características para um determinado peptídeo, como é o caso do APD2 (WANG *et al.*, 2009). Além disso, encontram-se disponíveis algumas ferramentas computacionais que utilizam informações conhecidas de PAMs para desenvolver previsões de atividade antimicrobiana, incluindo avaliações estatísticas, cabendo ressaltar o *server* CAMP, que utiliza três algoritmos distintos e atinge cerca de 80% de exatidão em suas previsões (THOMAS *et al.*, 2010).

O maior obstáculo para a padronização das diversas metodologias *in silico* disponíveis ainda é a variedade de propriedades associadas aos PAMs, além de baixa homologia entre suas sequências e a presença de estruturas não definidas (TORRENT *et al.*, 2012). Todavia, embora as ferramentas de modelagem, avaliação de parâmetros e previsão de atividade de PAMs sejam limitadas, elas permitem uma análise relativamente confiável, tornando-se métodos acessíveis e práticos para a identificação de PAMs como potenciais fármacos no tratamento de doenças (SIGURDARDOTTIR *et al.*, 2006).

Diversos PAMs estão contidos em moléculas peptídicas maiores e são liberados somente após hidrólise enzimática ou clivagem proteica, como é o caso de PAMs isolados da pele de sapos, derivados de moléculas precursoras maiores (VANHOYE

et al., 2003) e de vários PAMs derivados das proteínas do leite (FADAEI, 2012). Dessa forma, a análise *in silico* torna possível a identificação de potenciais peptídeos com atividade antimicrobiana contidos em moléculas ainda não analisadas, como, por exemplo, o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) humano.

O G-CSF é uma citocina produzida por monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células mesoteliais (CALHOUN; CHRISTENSEN, 2000). Essa proteína consiste no principal fator de crescimento regulador da maturação, proliferação e diferenciação das células precursoras dos granulócitos neutrófilos e tem, portanto, a função de manter a quantidade basal de neutrófilos, além de estimular neutrofilia em resposta a uma infecção (METCALF, 1989; KAUSHANSKY, 2006). Seu efeito direto nos neutrófilos é aumentar a divisão celular e diminuir o tempo na medula, bem como atuar na atração e localização dessas células nos sítios de infecção, aumentar fagocitose e diminuir apoptose (PRICE *et al.*, 1996; VARKI *et al.*, 2009).

Por fim, a molécula do G-CSF apresenta estrutura tridimensional composta majoritariamente por conformações α -hélice (HILL *et al.*, 1993). Essa característica torna o G-CSF candidato capaz de gerar, após clivagem, peptídeos formadores de α -hélice anfipática, que, de acordo com Scheller *et al.*, (1999) e Nielsen *et al.*, (2007), é uma propriedade importante para atividade antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antibacteriano de quatro peptídeos sintetizados, dos quais dois possuem sequência derivadas da fragmentação do G-CSF humano e outros dois são planejados teoricamente, verificando, assim, seu interesse como novos agentes terapêuticos na saúde humana.

2.1 Objetivos Específicos

- Verificar características associadas ao potencial antibacteriano;
- Avaliar parâmetros *in silico* relacionados com a atividade antibacteriana, através de predições qualitativas ou quantitativas;
- Comparar resultados das predições com valores descritos na literatura;
- Associar as características apresentadas pelos peptídeos com a ação esperada;
- Identificar possíveis similaridades das sequências com peptídeos previamente cadastrados em banco de dados;
- Determinar o potencial antibacteriano *in vitro* contra cepas de bactérias Gram positivas e negativas;
- Comparar resultados da análise *in silico* com o experimento *in vitro*.

3 METODOLOGIA

Para avaliar a atividade antibacteriana dos peptídeos foi realizada primeiramente a análise *in silico*, para a obtenção das sequências peptídicas e predição de atividade antibacteriana e, posteriormente, foi realizado o ensaio bacteriano *in vitro* de determinação da concentração inibitória mínima.

3.1 Análise *In Silico*

A análise *in silico* do potencial antibacteriano dos peptídeos foi realizada através de ferramentas computacionais disponíveis em *websites* de acesso gratuito e consistiu de várias etapas: desde a obtenção das sequências de aminoácidos até a investigação de sua possível atividade antibacteriana.

3.1.1 Obtenção das Sequências de Aminoácidos

As sequências de aminoácidos dos peptídeos foram obtidas através de fragmentação *in silico* de moléculas proteicas humanas e planejamento teórico. O primeiro método considerou a fácil acessibilidade da molécula, bem como sua estrutura secundária e terciária, consistindo em várias tentativas de clivagens do G-CSF humano. Por outro lado, a criação de uma sequência peptídica através de planejamento teórico foi elaborada através da análise de parâmetros estabelecidos por Deslouches *et al.* (2004), Boman (2003), Lata *et al.* (2007), Toke (2005), Nielsen *et al.* (2007) e Scheller *et al.* (1999), os quais são descritos no item 4.1.2.

A sequência de aminoácidos do G-CSF foi adquirida através do RCSB *Protein Data Bank* (BERMAN *et al.*, 2000). Sua estrutura tridimensional, também adquirida nesse mesmo banco de dados, foi visualizada pelo *RasMol* (SAYLE; MILNER-WHITE, 1995). Foi também necessária a realização de modelagem molecular para obtenção da estrutura tridimensional da molécula de G-CSF isolada, o que pôde ser feito por comparação com outras moléculas disponíveis no server SWISS MODEL (SCHWEDE *et al.*, 2003; ARNOLD *et al.*, 2006).

A clivagem *in silico* do G-CSF foi realizada no server *Protein Cutter* (SEBELA *et al.*, 2009), consistindo em várias predições de corte com opções disponíveis no *site*. A escolha das enzimas, reagentes ou combinações de mais de uma enzima/reagente baseou-se na facilidade de obtenção dos mesmos para uma futura clivagem *in vitro*. A Tabela 1 mostra as predições realizadas com os reagentes selecionados e seus respectivos locais de corte.

Tabela 1: Enzimas e reagentes utilizados na clivagem *in silico* do G-CSF

Enzima/ Reagente/ Combinação	Locais de corte*
Tripsina	Depois de K e R
Endoproteinase Arg-C	Depois de R
Quimiotripsina	Depois de F, L, W e Y
CNBr (Brometo de Cianogênio)	Depois de M
CNBr + Tripsina	Depois de M, R e K
Ácido Fórmico	Antes de D; Depois de D
Endoproteinase Lys-C	Depois de K
Pepsina	Depois de F e L
Tripsina + Quimiotripsina	Depois de F, K, L, R, W e Y
Prolil endoprotease	Depois de P e A

*Os locais de corte estão descritos por aminoácidos em códigos de uma letra.

O outro procedimento de obtenção de sequência peptídica foi feito por revisão bibliográfica e levou em consideração apenas propriedades e parâmetros de aminoácidos e estruturas secundárias relatados em diversas pesquisas científicas. As sequências de resíduos foram, então, criadas de forma arbitrária, baseando-se

em resultados empíricos e informações fornecidos por estudos e banco de dados (BOMAN, 2003; LATA *et al.*, 2007; TOKE, 2005; GIACOMETTI *et al.*, 1998; FRIEDRICH *et al.*, 2000; TOSSI *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2007; SCHELLER *et al.*, 1999).

3.1.2 Análise das Características Fisicoquímicas e Estruturais

Cada fragmento gerado das clivagens do G-CSF foi analisado separadamente ponderando-se alguns aspectos importantes para a atividade antibacteriana. As principais características avaliadas para a escolha dos melhores fragmentos foram as mesmas consideradas para a síntese teórica dos outros peptídeos: número de aminoácidos (tamanho do fragmento) presença de determinados resíduos em posições específicas no peptídeo (N-terminal, segunda posição e C-terminal), capacidade de formar α -hélice, ponto isoelétrico, hidrofobicidade e momento hidrofóbico.

A avaliação de estrutura primária, incluindo tamanho do peptídeo e verificação de posições específicas e frequência de certos resíduos, foi baseada em levantamento de dados de várias pesquisas da área (BOMAN, 2003; LATA *et al.*, 2007; TOKE, 2005; GIACOMETTI *et al.*, 1998; FRIEDRICH *et al.*, 2000; TOSSI *et al.*, 2000; NIELSEN *et al.*, 2007; SCHELLER *et al.*, 1999). As propriedades físico-químicas dos peptídeos foram adquiridas através dos websites *ProtParam* (WILKINS *et al.*, 1999) e *Compute pI/Mw* (BJELLQVIST *et al.* 1993; BJELLQVIST *et al.*, 1994), enquanto que a análise da estrutura secundária foi realizada de acordo com o método de Jones (1999) disponível no server *PSIPRED* (BUCHAN *et al.*, 2010). Finalmente, o momento hidrofóbico e a hidrofobicidade foram calculados na escala Eisenberg (EISENBERG *et al.*, 1982) pela ferramenta analítica de sequência fornecida por *HydroMCalc* (TOSSI; SANDRI, 2002).

3.1.3 Busca de Anterioridade

Após a escolha dos peptídeos com as características físicoquímicas e estruturais mais favoráveis ao potencial antibacteriano, foram feitas diversas pesquisas em bancos de dados de peptídeos antimicrobianos, a fim de verificar a existência de algum registro dessas sequências selecionadas ou mesmo outras com alta similaridade. Para essa investigação foi utilizada a ferramenta BLAST de alinhamento por similaridade disponível em BACTIBASE (HAMMAMI *et al.*, 2007; HAMMAMI *et al.*, 2010), APD2 (WANG *et al.*, 2009) e CAMP (THOMAS *et al.*, 2010).

3.1.4 Análise do Potencial Antibacteriano

Alguns índices e probabilidades foram observados, a fim de avaliar o potencial antibacteriano dos peptídeos selecionados. Primeiramente, foi obtido o índice de instabilidade pelo método de dipeptídeo segundo Guruprasad *et al.* (1990) acessível em *Periyannan Research Group* (GOPAL *et al.*, 1998), bem como os valores de meia-vida *in vivo* de cada sequência. Em seguida, tanto o índice de Boman (BOMAN, 2003) como o potencial de ligação em membranas foram estimados no *server* APD2 (WANG *et al.*, 2009), enquanto que a predição de atividade antimicrobiana foi finalmente avaliada em CAMP (THOMAS *et al.*, 2010) pelos algoritmos *Support Vector Machine* (SVM), *Random Forest* e *Discriminant Analysis*.

3.2 Análise *In Vitro*

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia Geral e Clínica da Universidade Federal do Espírito Santo e consistiu em ensaios bacterianos de

Concentração inibitória Mínima-MIC (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) dos quatro peptídeos selecionados na análise *in silico*.

3.2.1 Descrição dos Peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados pela empresa FastBio Ltda. Os quatro peptídeos não possuem modificações estruturais e apresentam certificado de análise dos controles de qualidade por espectrometria de massa e HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), com pureza superior a 95%.

3.2.2 Linhagens Bacterianas

Na avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas cinco linhagens bacterianas padrão cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Geral e Clínica e, Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES. Três linhagens são Gram positivas e consistem em cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina-MRSA ATCC 33591 e *Enterococcus faecalis*, caracterizada através de técnicas de identificação e classificação bioquímicas e moleculares. As outras duas cepas utilizadas nos ensaios são Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

As linhagens foram descongeladas em meio sólido BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 37°C por 24 horas. Logo após, foram feitos pré-cultivos das bactérias através de dois repiques em ágar BHI, cada um também incubado a 37°C por 24 horas. Em seguida procedeu-se o pré-inóculo, que consistiu em incubação de cada linhagem em caldo BHI durante 24 horas a 37 °C.

3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - MIC

O teste de MIC exhibe a máxima concentração do peptídeo onde ainda se observa crescimento bacteriano, bem como a menor concentração do peptídeo capaz de causar total inibição do crescimento (adaptado de CASTEELS *et al.*, 1993). Esse ensaio foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo, com base no documento CLSI/NCCLS M100-S21 para bactérias (CLSI, 2011).

3.2.3.1 Inóculo Estoque

A partir do pré-inóculo foi realizada a padronização das bactérias em solução salina de forma a atingir o equivalente a 0,5 na escala Mc Farland (10^8 UFC/mL). Com as bactérias padronizadas foi possível obter o inóculo estoque de cada linhagem, no qual foi utilizado caldo Mueller-Hinton duas vezes mais concentrado. Cada inóculo continha 10^6 UFC/mL, para que, ao ser diluído com a solução de peptídeo, pudesse chegar a uma concentração final de $5 \cdot 10^5$ UFC/mL.

3.2.3.2 Soluções de Peptídeo

Cada peptídeo liofilizado foi pesado em balança analítica em condições assépticas e diluído em água estéril de acordo com as especificações do fabricante. As soluções estoque de peptídeo estavam com concentração de 2 mg/mL.

3.2.3.3 Microdiluições

Os testes foram efetuados em duplicata e cada microplaca continha os controles de esterilidade do caldo, da vancomicina, de validação do teste e de viabilidade de cada uma das linhagens, além das diluições seriadas de um dos peptídeos com cada uma das linhagens bacterianas. Para o controle de validação foram inoculadas cepas padronizadas de *S. aureus* ATCC 29213 em diluições seriadas de vancomicina, que apresentam valores de MIC conhecidos. As diluições seriadas dos peptídeos ficaram com concentrações finais de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; e 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ e, finalmente, as microplacas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

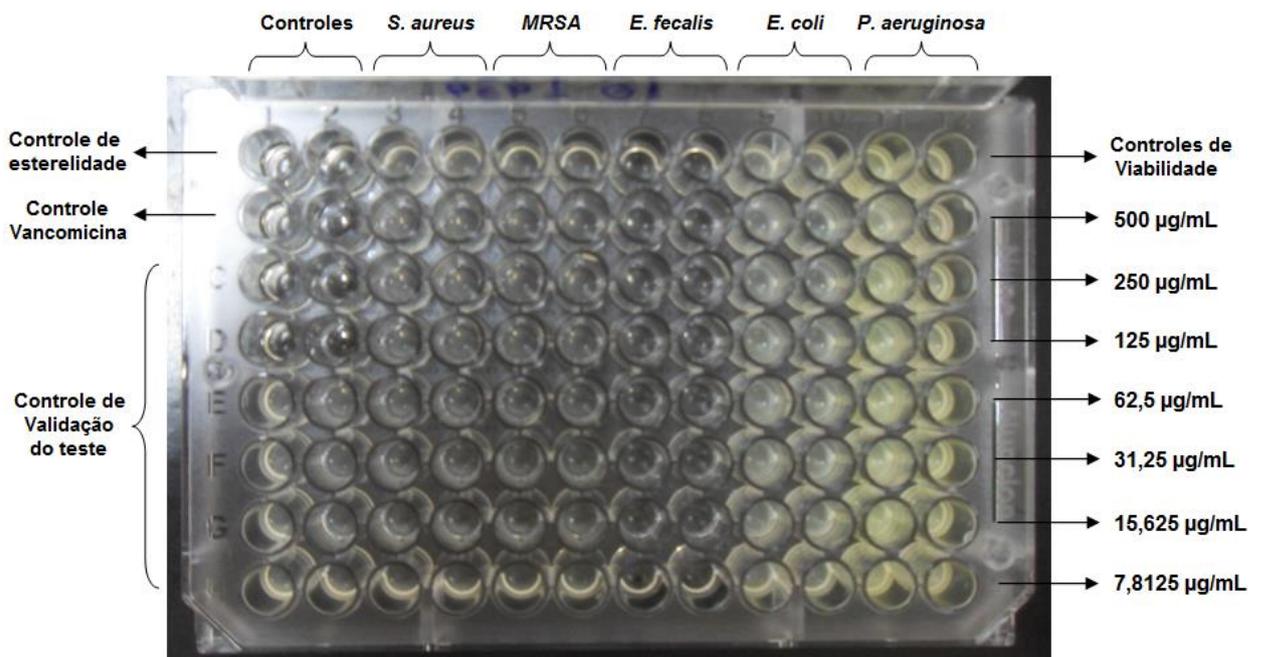


Figura 5: Esquematização da microdiluição em caldo para cada um dos peptídeos. Os valores demonstrados na figura referem-se às diluições seriadas do peptídeo.

Os resultados foram obtidos através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro de microplacas. Foram feitos os cálculos da média dos valores correspondentes à leitura dos controles e das diluições dos peptídeos. Posteriormente, foram calculadas as variações de absorbância desses resultados em comparação com o controle da vancomicina, que representa ausência

de crescimento bacteriano. Finalmente, foi possível calcular a porcentagem de crescimento de cada linhagem bacteriana nas diluições seriadas do peptídeo em comparação com seu respectivo controle de viabilidade, representativo de 100% de crescimento. Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95%, usando o software MINITAB.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise *In Silico*

4.1.1 Obtenção das Sequências de Aminoácidos

Os dois primeiros peptídeos selecionados para o experimento foram derivados da fragmentação *in silico* do G-CSF, uma proteína composta por 175 aminoácidos dispostos na seguinte sequência em código de uma letra: MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGI PWAPLSSCPSQALQLAGCLSLSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADF ATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVL RHLAQP. Com esta sequência no formato FASTA foi possível realizar 10 clivagens *in silico*, resultando em um total de 166 fragmentos a serem avaliados. Desse número, apenas dois fragmentos foram escolhidos para posterior síntese em laboratório e, finalmente, as experimentações *in vitro*.

Os arquivos referentes ao G-CSF encontrados no RCSB PDB apenas ofereciam estruturas tridimensionais de várias unidades proteicas unidas ou do G-CSF como parte de um complexo com outras moléculas. Para a obtenção de uma molécula isolada de G-CSF, foi realizada a modelagem molecular, que permitiu uma melhor visualização tridimensional da proteína. Em sua estrutura pôde-se verificar formação de estruturas α -hélices intercaladas por regiões de *coil* (figura 6).

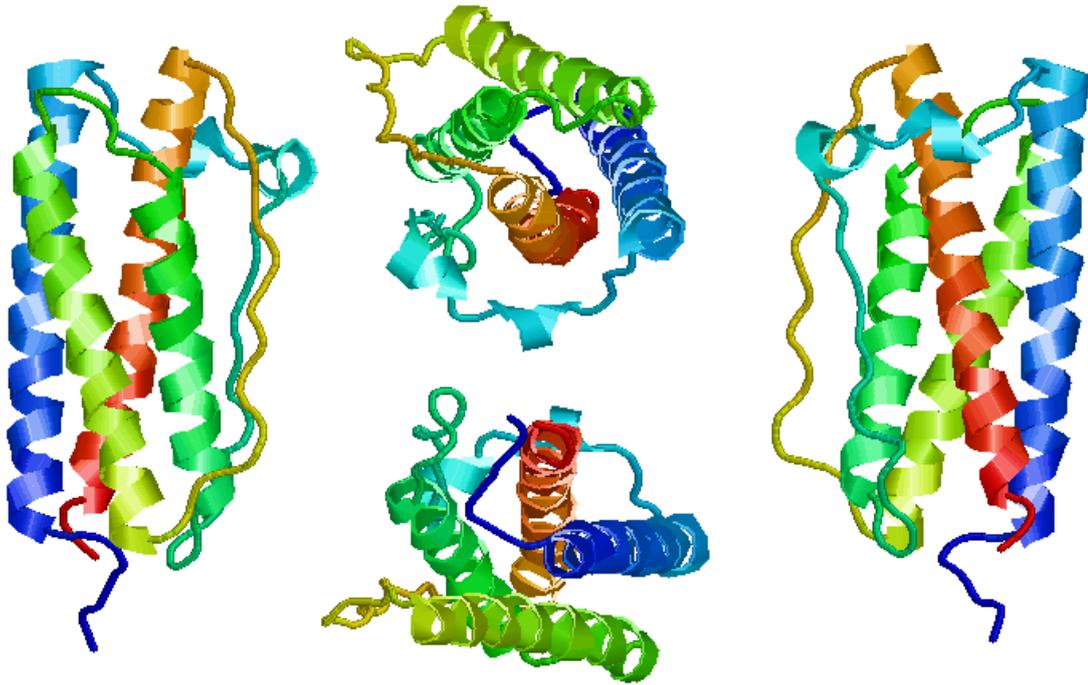


Figura 6: Estrutura tridimensional da molécula isolada de G-CSF em quatro planos diferentes.

Os outros dois peptídeos também sintetizados foram delineados arbitrariamente e ambos possuem 20 resíduos arranjados na mesma sequência, com a única diferença de um ser composto por L-aminoácidos e o outro por D-aminoácidos. Tanto a seleção dos dois peptídeos derivados da clivagem do G-CSF, bem como o planejamento dos outros dois, baseou-se nas informações e análises descritas a seguir.

4.1.2 Análise das Características Físicoquímicas e Estruturais

As características consideradas para a escolha dos peptídeos foram: número de aminoácidos (tamanho do fragmento) presença de determinados resíduos em posições específicas do peptídeo, capacidade de formar α -hélice, ponto isoelétrico e carga líquida em pH neutro, hidrofobicidade e anfipaticidade.

4.1.2.1 Tamanho do Peptídeo

Primeiramente, para serem analisados, os fragmentos deviam conter de 16 a 30 aminoácidos. De acordo com McLean *et al.* (1991) peptídeos com mais de 10 resíduos são capazes de interagir e causar ruptura em lipossomos, formando micelas menores, enquanto que peptídeos com menor quantidade de aminoácidos possuem menos ou nenhum efeito nessas estruturas. Scheller *et al.* (1999) complementa que uma redução no comprimento do peptídeo abaixo de 16 resíduos anula a passagem dessa molécula pela membrana plasmática e, conseqüentemente, sua entrada no interior das células. Isso pode ser confirmado por um estudo realizado por Deslouches *et al.* (2004) que, testando a capacidade antimicrobiana de peptídeos LBU (*lytic base unit*) projetados em laboratório, observou início de atividade antimicrobiana a partir de derivados com 15 resíduos, dos quais a atividade ótima foi apresentada por aqueles com 24 aminoácidos, permitindo ainda concluir que os peptídeos tornavam-se mais potentes com o aumento do tamanho de sua cadeia.

Com essas informações, do total de 166 fragmentos gerados nas clivagens do G-CSF, apenas oito possuíam tamanho considerado adequado para a atividade antibacteriana e foram, então, selecionados para continuar as análises (Tabela 2). Os Pep 3 e 4 já foram planejados com 20 resíduos cada, a fim de estar de acordo com os experimentos citados anteriormente.

Tabela 2: Fragmentos de G-CSF com tamanho entre 16 e 30 aminoácidos

Fragmento	Enzima(s) utilizada para clivagem	Sequência de aminoácidos	Tamanho*
1	Tripsina ou Lys-C	MTPLGPASSLPQSFLLK	17
2	Tripsina ou Arg-C	AGGVLVASHLQSFLEVSYSR	19
3	Arg-C	MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVR	23
4	CNBr + Tripsina	TPLGPASSLPQSFLLK	16
5	Ácido fórmico	GPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQG	23
6	Prolyl endoprotease	QSFLLKCLEQVRKIQGDGA	19
7	Prolyl endoprotease	GCLSQLHSGFLYQGLLQA	19
8	Prolyl endoprotease	SHLQSFLEVSYRVLRLHLA	18

*O tamanho foi dado em quantidade de resíduos

4.1.2.2 Composição de Aminoácidos

A segunda característica, bastante apreciada, levou em consideração certos aminoácidos presentes nas posições N-terminal, segunda posição e C-terminal, bem como a frequência de alguns resíduos ao longo do peptídeo. Ambas as extremidades do peptídeo apresentam grande importância para a atividade antibacteriana, pois o C-terminal é responsável pela interação com a membrana e a formação de poro, ao passo que o N-terminal está associado ao processo de interação bacteriana específica (OTVOS, 2005).

A composição de aminoácidos de PAMs difere significativamente da dos não-antibacterianos, o que pode ser verificado pela disparidade entre eles nas frequências de cada tipo de resíduo. O N-terminal de peptídeos com atividade antibacteriana apresenta maior frequência de glicina e fenilalanina, seguido por valina e arginina, enquanto que na segunda posição são mais abundantes os aminoácidos leucina, isoleucina, triptofano e fenilalanina. Por outro lado, o C-terminal dessas moléculas tem preferência pelos resíduos positivos lisina e arginina, além de glicina e cisteína, pois facilita sua interação com a membrana celular da bactéria, carregada negativamente. De maneira geral, PAMs possuem predominância de alguns resíduos ao longo de toda cadeia, como glicina, arginina, lisina, leucina e isoleucina, com o contraste de baixas proporções de aminoácidos carregados negativamente (aspartato e glutamato), a fim de não interferir no processo de penetração da membrana bacteriana (LATA *et al.*, 2007).

Dos oito fragmentos analisados, apenas dois possuíam um dos resíduos almejados na posição N-terminal, uma glicina, propriedade muito favorável, evidenciada pelos resultados de um estudo realizado por Nielsen *et al.* (2007), os quais revelaram que a substituição da glicina no N-terminal por uma alanina reduz a estabilidade da hélice e, conseqüentemente, a atividade antibacteriana, tendo como provável causa a ocorrência de instabilidade do capeamento da hélice.

Por outro lado, cinco outros fragmentos possuíam um C-terminal igual aos tipos mencionados como vantajosos, restando a observação da frequência de aminoácidos glicina, arginina, lisina, leucina e isoleucina ao longo da cadeia, bem

como a presença dos resíduos carregados negativamente. A quantidade desses aminoácidos em cada fragmento está demonstrada na Tabela 3, mas vale ressaltar a alta frequência de leucinas, que apresentam significativa importância para a atividade antibacteriana. Isso pode ser comprovado pelo experimento com peptídeos falaxina, que tiveram seus três resíduos de leucina substituídos por alaninas, resultando em diminuição da sua atividade antibacteriana (NIELSEN *et al.* 2007).

Tabela 3: Composição de aminoácidos de fragmentos derivados do G-CSF .

	Sequência	N-term.	C-term.	Quantidade de					Total de	
				G	R	K	L	I	Total	D e E
1	MTPL LG PASSLPQS FLLK	M	K	1	0	1	4	0	6	0
2	AGG VLVASHLQSF LEV SYR	A	R	2	1	0	3	0	6	1
3	MTPL LG PASSLPQS FLLKCLE QVR	M	R	1	1	1	5	0	8	1
4	TPL LG PASSLPQS FLLK	T	K	1	0	1	4	0	6	0
5	GPASSLPQSFLLKCLEQVRKI QG	G	G	2	1	2	4	1	10	1
6	QSF LKCLE QVR KIQGD GA	Q	A	2	1	2	3	1	9	2
7	GCL SQLHS GFLYQGLL QA	G	A	3	0	0	6	0	9	0
8	SHLQSF LEV SYR VL RHLA	S	A	0	2	0	4	0	6	1

Em verde, N-terminal ou C-terminal considerados vantajosos para a atividade antibacteriana; Em azul estão os aminoácidos associados a uma boa atividade quando presentes ao longo da cadeia e em vermelho, os resíduos ácidos D e E, associados a baixa atividade.

Unindo todos esses dados a respeito da composição de peptídeos antibacterianos, foram selecionados dois dos fragmentos derivados do G-CSF, que a partir de agora serão denominados Pep 1 e Pep 2. O primeiro corresponde à sequência número 5, derivada da clivagem com ácido fórmico; contém 23 aminoácidos dispostos na sequência GPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQG, dos quais 10, incluindo o N-terminal e o C-terminal, estão associados a uma boa atividade antibacteriana. O segundo peptídeo é resultante da fragmentação com Prolyl endoprotease e é o número 7 desse estudo, com 19 resíduos na ordem GCLSQLHSGLFLYQGLLQA, com presença de 9 aminoácidos vantajosos à ação antibacteriana.

A sequência formulada teoricamente com base nesses mesmos estudos possui em sua composição 20 aminoácidos, onde o N-terminal corresponde a glicina e o C-terminal a uma lisina, ambas são condições propícias para a atividade antibacteriana. Ao todo na cadeia existem três glicinas, duas argininas, três lisinas,

três leucinas e uma isoleucina, somando um valor de 12 resíduos favoráveis, como pode ser conferido na sequência completa: GLRSVIKTAGNHLGKHALRK. Essa sequência foi utilizada para a síntese dos outros dois peptídeos (Pep 3 e Pep 4), com única diferença na atividade óptica, pois são formados por L-aminoácidos ou D-aminoácidos, respectivamente.

A ocorrência de D-aminoácidos em peptídeos eucarióticos é relatada em diversas ocasiões (MOR *et al.* 1992; KREIL, 1997), e no caso de peptídeos com atividade antimicrobiana, essa modificação ocorre naturalmente apenas em bombininas do sapo *Bombina variegata*. Sua presença na posição 2 da cadeia peptídica é atribuída à epimerização pós-traducional do seu L-aminoácido correspondente, e sua provável função seria a proteção contra aminopeptidases, não oferecendo qualquer influência direta na ação antibiótica (MIGNONA *et al.* 1993).

Geralmente, peptídeos antibacterianos sintéticos compostos por D-enantiômeros exibem as mesmas capacidade permeabilizante e atividade biológica que seus análogos naturais com L-aminoácidos. Isso sugere que o mecanismo de ação dos peptídeos em geral envolve uma interação direta de sua cadeia com a membrana celular, independente de interações estereo-específicas com receptores ou enzimas (WADE *et al.* 1990). A principal razão de empregar peptídeos inteiramente sintetizados com D-aminoácidos é a sua capacidade de oferecer resistência contra diversas enzimas proteolíticas produzidas por algumas linhagens de bactérias (ANDREU, RIVAS, 1998). Dessa forma, os resultados obtidos em cada predição *in silico* realizada com a sequência planejada correspondem, na verdade, a ambos os Peptídeos 3 e 4, porque a diferença entre estes só poderia ser revelada com os resultados dos experimentos *in vitro*.

4.1.2.3 Probabilidade de Formação de α -hélice

O potencial em adotar a conformação de α -hélice é uma propriedade comum de múltiplos peptídeos antimicrobianos e, independentemente da estrutura secundária,

o dobramento tridimensional da cadeia polipeptídica resulta da presença de resíduos hidrofílicos separados por resíduos hidrofóbicos, consistindo, portanto, em uma estrutura anfipática (BECHINGER *et al.* 1993; MALOY; KARI, 1995; SABERWAL; NAGARAJ 1994). Enquanto peptídeos antimicrobianos com ligações dissulfeto frequentemente formam estruturas do tipo *hairpin* (DIMARCQ *et al.* 1998), a grande maioria de PAMs lineares são propensos a apresentar conformação de α -hélice em ambientes hidrofóbicos ou anfipáticos, como, por exemplo, a camada bilipídica. O caráter anfipático dessas estruturas facilita a interação com membranas, pois os resíduos polares interagem com o grupamento fosfato dos fosfolípidos, enquanto que os resíduos apolares ficam em contato com as caudas hidrofóbicas desses lipídios (TOKE 2005).

Os dois fragmentos derivados do G-CSF escolhidos para as análises são equivalentes a posições com estruturas conformacionais em α -hélice, como pode ser observado na Figura 7. As três sequências utilizadas no presente estudo possuem em sua composição tanto resíduos polares como apolares, sendo, portanto, moléculas anfipáticas, e possuem resultados de alta probabilidade de formação de α -hélice nas predições obtidas no PSIPRED (Figura 8). Esse *server* utiliza o método de Jones (1999) de predição de estrutura secundária, o qual baseia-se em posições de valores matriciais específicos gerados pelo PSI-BLAST (*Position Specific Iterated – BLAST*), além de ser configurado com base em 187 diferentes dobramentos e possuir o critério de similaridade estrutural, resultando em acurácia de predição em torno de 80% (BUCHAN *et al.*, 2010).

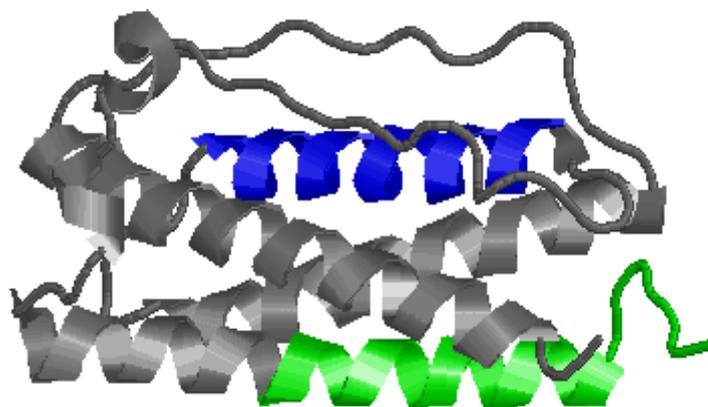


Figura 7: Estrutura tridimensional do G-CSF com os Peptídeos 1 e 2 realçados em verde e azul, respectivamente. RasMol (SAYLE; MILNER-WHITE, 1995)

Vários estudos demonstraram certa associação da capacidade em formar α -hélice com a atividade antimicrobiana de peptídeos. Dentre os vários parâmetros avaliados por Scheller *et al.*, (1999), apenas a formação de uma hélice anfipática mostrou-se como requerimento essencial para a entrada dos peptídeos no interior das células. Outro estudo, realizado por Nielsen *et al.*, (2007), comprovou que, ao substituir duas glicinas presentes ao longo da cadeia de falaxinas por duas alaninas, resultava em maior estabilidade da hélice, o que evidenciou aumento na atividade antibacteriana.

Embora esses estudos demonstrem a importância da estrutura de α -hélice anfipática para o efeito biológico dos peptídeos, é difícil obter uma correlação específica da capacidade de formar hélice com a atividade antimembrana. Isso porque, as modificações na estrutura secundária do peptídeo por substituição de resíduos diferentes também acarretam mudanças em outros parâmetros da cadeia, como carga, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e área de contato das cadeias laterais. Sendo assim, é importante atentar para resultados de estudos com substituições de aminoácidos por seus respectivos enantiômeros, pois os D-aminoácidos possuem as mesmas características que seus respectivos L-aminoácidos, com a única diferença de formar hélices com sentido de giro para a esquerda e não para direita, tornando possível obter perturbação da hélice sem alterar os demais parâmetros (DATHE *et al.*, 1999).

Experimentos com modificações na estrutura do peptídeo por substituições intercaladas com D-resíduos evidenciam que a consequente perturbação da hélice reduz sua permeabilização em membranas neutras (ex. membranas de células eucarióticas) mas não naquelas carregadas negativamente, como, por exemplo, as membranas plasmáticas de bactérias (POUNY *et al.*, 1992; DATHE *et al.*, 1996; SONG *et al.*, 2004). Consequentemente, ocorre notável diminuição da capacidade hemolítica do peptídeo, sem gerar qualquer influência em sua atividade antibacteriana contra Gram-positivas ou Gram-negativas, como observado nos estudos com melitina (DEGRADO *et al.*, 1981; OREN; SHAI, 1997), pardaxina (SHAI; OREN, 1996), magainina 2 (KRISHNAKUMARI; NAGARAJ, 1997) e crabrolina (WIEPRECHT *et al.*, 1997b).

Com isso, a associação da estrutura α -hélice com a atividade antibacteriana de peptídeos torna-se muito complexa, de forma que a distribuição entre resíduos

carregados positivamente e resíduos hidrofóbicos ao longo da cadeia peptídica é o fator determinante para a atividade antimembrana (DATHE *et al.*, 1996; OREN *et al.*, 2002). A análise estrutural de Eiriksdóttir *et al.*, (2010) corrobora com essa informação, pois demonstrou que mesmo os peptídeos α -hélice apresentarem maior potencial de interação com lipídios do que aqueles com estrutura β -folha, a maioria dos peptídeos foi capaz de interagir espontaneamente com as membranas biológicas através de forças eletrostáticas, ressaltando a importância da carga líquida do peptídeo.

4.1.2.4 Ponto Isoelétrico e Carga Líquida

Assim como o ponto isoelétrico (pI), é possível determinar a carga líquida (tradução livre do inglês net charge) de um peptídeo, em determinado pH, através de sua sequência de aminoácidos. O ponto isoelétrico de uma molécula corresponde ao valor de pH no qual sua carga líquida é igual a zero, e caso essa molécula se encontre em pH abaixo do seu ponto isoelétrico, esta apresentará carga líquida positiva, sendo denominada catiônica (LEHNINGER *et al.*, 2000).

Assim como pode ser observado na Tabela 4, o Pep 1 possui pI igual a 9,31, conferindo-lhe uma carga líquida positiva em torno de 2 em pH 7. O Pep 2 com seu pI de 6,73 ficaria com carga líquida de aproximadamente zero nesse mesmo pH, o que lhe atribui caráter neutro nessa condição. Assim como o Pep 1, os Pep 3 e 4 também são catiônicos em pH neutro, já que apresentam carga líquida positiva em volta de 5, considerando seu pI de 12,02.

Tabela 4: Valores de Ponto Isoelétrico (pI) e carga líquida dos quatro peptídeos.

	Ponto Isoelétrico (pI)	Carga líquida*	Caráter*
Peptídeo 1	9,31	+2	Catiônico
Peptídeo 2	6,73	0	Neutro
Peptídeos 3 e 4	12,02	+5	Catiônico

* O pH considerado para o cálculo da carga líquida e caráter foi 7.

Peptídeos catiônicos naturais com atividade antimicrobiana possuem carga líquida positiva entre +2 e +9, devido ao excesso de aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) em relação aos resíduos ácidos (aspartato e glutamato) (HANCOCK, 2001; HANCOCK, BROWN, 2006). Essa classe de peptídeos apresenta diversidade estrutural e amplo espectro antimicrobiano, influenciado sobretudo pela constituição de aminoácidos na estrutura primária (THOMAS *et al.*, 2010). Um estudo com peptídeos fallaxina mostrou que sua atividade bacteriana é dependente da carga líquida positiva, pois a substituição de seus dois aspartatos por duas alaninas resultou em aumento da atividade, enquanto que a troca das três lisinas por alaninas reduziu o efeito antibacteriano, resultado provável do aumento ou diminuição da atração eletrostática entre o peptídeo e a membrana bacteriana, respectivamente. (NIELSEN *et al.*, 2007)

A presença de resíduos com carga positiva é uma propriedade importante para a ação lítica da maioria dos peptídeos, pois os ajuda a alcançar seu alvo, incluindo especialmente moléculas aniônicas, como a membrana plasmática e ácidos nucléicos (DNA e RNA) (HANCOCK, ROZEK, 2002). Além disso, peptídeos catiônicos conseguem se ligar aos lipopolissacarídeos (LPS), moléculas carregadas negativamente que consistem no principal componente da parede celular das bactérias Gram-negativas. A ligação desses peptídeos em LPS envolve o deslocamento de cátions bivalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) essenciais para a estabilidade da superfície celular, o que resulta em rompimento da camada e facilita a entrada do peptídeo na célula bacteriana. Um mecanismo similar também é capaz de favorecer a passagem desses peptídeos pela parede celular das bactérias Gram-positivas (HANCOCK 1997; PIERS; HANCOCK, 1994).

Pode-se também dizer que cada peptídeo possui um valor ótimo de carga positiva líquida para sua maior atividade lítica. Enquanto que o acréscimo da carga positiva proporciona aumento da afinidade de interação entre o peptídeo e a membrana plasmática devido à crescente atração eletrostática, a eficiência de permeabilização atinge um nível máximo. Isso é observado pela diminuição da ação antibacteriana acima de determinada carga positiva, possivelmente como consequência da instabilidade e da reduzida vida útil dos poros formados na membrana pelos peptídeos (MATSUZAKI *et al.* 1997).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o padrão de distribuição dos aminoácidos básicos ao longo da cadeia peptídica também influencia na atividade antibacteriana. A síntese de análogos de peptídeos com resíduos positivos bem distribuídos permitiu observar que esta característica aumenta a força de ligação do peptídeo com os componentes negativos da parede celular bacteriana, reduzindo sua eficiência em atravessá-la e alcançar a membrana celular (UNGER *et al*, 2001). O resultado é a redução da atividade antibacteriana tanto pela diminuição da travessia pela parede celular como por uma provável supressão da capacidade de reorientação dos peptídeos na membrana plasmática, o que dificultaria a formação de poros bem definidos e interferiria, portanto, em sua ação lítica (LADOKHIN, WHITE, 2001; PAPO, SHAI, 2003).

Ao contrário dos demais, o Pep 2 apresenta-se neutro em pH 7, o que necessariamente não o exclui da classe de antibacterianos. Primeiramente, mesmo que o caráter catiônico seja importante, o número de cargas positivas não parece ser muito significativo em alguns casos, como, por exemplo, as temporinas, que apresentam apenas um resíduo carregado positivamente em sua sequência, suficiente para conferir ação antibiótica (MANGONI *et al*, 2000). Por isso, ainda que o Pep 2 esteja neutro, ele possui em sua cadeia um resíduo positivo, a histidina, e isso não sendo suficiente, um experimento constatou que a passagem de peptídeo pela membrana plasmática e consequente entrada na célula somente é anulada com a introdução de carga líquida negativa em sua cadeia (SCHELLER *et al*, 1999). Finalmente, diversos estudos verificaram ausência de correlação direta entre a carga do peptídeo e sua atividade antibacteriana (BLONDELLE, HOUGHTEN, 1992; KIYOTA *et al*, 1996), além de existir vários peptídeos antimicrobianos neutros registrados em bancos de dados internacionais (WANG *et al.*, 2010).

O consenso existe apenas em relação à seletividade de interação dos peptídeos catiônicos com a membrana bacteriana em comparação à membrana celular eucariótica. A carga positiva desses peptídeos está associada ao aumento da seletividade de sua interação com os fosfolípidios carregados negativamente, componentes majoritários da membrana plasmática da bactéria (TOKE, 2005). Por outro lado, a membrana das células eucarióticas, como por exemplo os eritrócitos, é composta principalmente por fosfolípidios zwitteriônicos, detentores de carga resultante nula, atribuindo-lhe, por tanto, caráter neutro (VERKLEIJ *et al* 1973). De

acordo com Boman (2003), a membrana eucariótica possui, ainda, outro componente essencial para a proteção celular contra atividade lítica dos peptídeos, o colesterol, um lipídio com capacidade comprovada de prevenir danos à membrana. Enfim, um experimento realizado por Zelezetsky *et al.* (2005) foi capaz de demonstrar alterações na seletividade de peptídeos antimicrobianos através de modificações sutis da carga e também do equilíbrio de hidrofobicidade.

4.1.2.5 Hidrofobicidade Média

Vários estudos da influência da anfipaticidade e da hidrofobicidade nas atividades antimicrobiana e hemolítica sugerem que as interações do peptídeo com membranas são determinadas por um equilíbrio delicado tanto das interações eletrostáticas como das hidrofóbicas (EPAND; VOGEL, 1999; CHEN *et al.* 2005). Dathe *et al.* (1997) revelam que a hidrofobicidade e o momento hidrofóbico, medida quantitativa da anfipaticidade, são efetivos moduladores da ação antibacteriana e da capacidade hemolítica e, portanto, muito úteis para o melhoramento de peptídeos potenciais formadores de α -hélice e com atividade antimembrana.

Pode-se dizer que a hidrofobicidade é a capacidade intrínseca de uma molécula em ir de uma fase aquosa para uma hidrofóbica (EISENBERG *et al.*, 1982), enquanto que a hidrofobicidade média (Hm) de um peptídeo é uma escala quantitativa definida pela soma dos valores de afinidade apolar de cada aminoácido da sequência, dividido pelo número total de resíduos (EISENBERG *et al.*, 1984). Quanto a essa característica, dois requerimentos devem ser considerados no caso de peptídeos antimicrobianos: Primeiramente, o peptídeo deve ser solúvel em água o suficiente para permitir o armazenamento em altas concentrações e também o rápido deslocamento até o alvo bacteriano, o que demanda uma baixa hidrofobicidade; em segundo lugar, o peptídeo deve ser capaz de interagir com a região hidrofóbica da membrana, a fim de perturbar a estrutura da bicamada e aumentar sua permeabilidade, exigindo, portanto, uma hidrofobicidade alta. No entanto, deve-se considerar que uma hidrofobicidade muito alta resultaria em associação entre os

próprios peptídeos e até mesmo precipitação em água, dificultando seu deslocamento na solução. Por outro lado, peptídeos com hidrofobicidade muito baixa apresentam afinidade insuficiente com lipídeos, impedindo-os de desempenhar sua função (DATHE *et al.*, 1999)

O valor da hidrofobicidade média foi calculado para cada uma das sequências deste estudo de acordo com a escala Eisenberg, através da ferramenta computacional de análise de sequência peptídica HydroMCalc, desenvolvida por Tossi e Sandri (2002). Como podem ser observados na Tabela 5, os valores de Hm obtidos foram -0,12 para o Pep 1, 0,08 para o Pep 2, e -0,24 correspondente aos Pep 3 e 4. Nessa escala utilizada, valores de Hm desejados para interação com membranas encontram-se entre -0,3 e 0,3, permitindo, dessa forma, concluir que todos os peptídeos avaliados apresentam números vantajosos de quantificação de hidrofobicidade para atividade antibacteriana. (EISENBERG *et al.*, 1982).

Tabela 5: Valores de Hidrofobicidade Média e Momento Hidrofóbico Médio de acordo com a escala Eisenberg, obtidos através da ferramenta HydroMCalc.

	Hidrofobicidade Média (Hm)	Momento Hidrofóbico Médio (MHm)
Peptídeo 1	-0,12	0,18
Peptídeo 2	0,08	0,1
Peptídeos 3 e 4	-0,24	0,18

Vários estudos demonstram a influência da hidrofobicidade na capacidade antibacteriana de peptídeos e, enquanto Zhong *et al.* (1995) afirmam que a maioria dos peptídeos antimicrobianos possuem valores baixos de Hm, algumas pesquisas ressaltam que, geralmente, um aumento da hidrofobicidade até um certo ponto ajuda os peptídeos a alcançar a membrana hidrofóbica das bactérias, o que leva a um aprimoramento da ação antibacteriana (MARASSI *et al.*, 1999; SHAI, 1999; SALGADO *et al.*, 2001). Entretanto, acréscimos adicionais na hidrofobicidade, além de determinado valor, aumentam a probabilidade de formação de dímeros na solução. Ao contrário dos monômeros, peptídeos α -hélice em conformação de dímeros não são capazes de atravessar a parede celular bacteriana e, conseqüentemente, não conseguem interagir com a membrana plasmática ou

qualquer outro alvo intracelular. Ou seja, no que diz respeito à atividade antimicrobiana, observa-se que os peptídeos α -hélice possuem um limiar de hidrofobicidade, sendo possível obter o valor ótimo de atividade, mas também de ultrapassar esse valor e perder a funcionalidade da molécula (CHEN *et al* 2007).

Além disso, a hidrofobicidade oferece diferentes efeitos na atividade biológica de peptídeos contra células eucarióticas e procarióticas. Existe forte correlação entre esse parâmetro e a atividade hemolítica do peptídeo (OHMORI *et al.*, 1998; TACHI *et al.* 2002), como demonstrado por Kwon *et al* (1998), que evidenciaram aumento de hemólise por análogos do peptídeo brevinina 1E que tiveram seus valores de hidrofobicidade aumentados através de deleções nos resíduos N-terminal. Da mesma forma, Blondelle e Houghten (1992) relataram que a substituição de uma lisina por uma leucina na região hidrofílica da hélice resultou tanto em aumento da hidrofobicidade do peptídeo como em uma maior ação hemolítica. Finalmente, o experimento de Dathe *et al.* (1999) revelou que a ação antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi maior com os peptídeos que tiveram sua hidrofobicidade aumentada, porém, a influência na atividade hemolítica foi preponderante, resultando em diminuição da especificidade do peptídeo.

Outras pesquisas corroboram com esses resultados (MALOY; KARI, 1995) e propõem que a redução na especificidade dos peptídeos está associada à diferença do seu potencial em atravessar as membranas neutras e negativas. Isso porque, no caso desta última, a interação eletrostática do peptídeo com os grupos polares, presentes na face externa da bicamada, reduz a contribuição da hidrofobicidade no efeito antimembrana (DATHE *et al.* 1996; WIEPRECHT *et al.* 1997a).

4.1.2.6 Anfipaticidade e Momento Hidrofóbico Médio

O potencial em adotar uma estrutura de α -hélice anfipática é uma característica bastante comum entre diversos peptídeos antimicrobianos. A conformação anfipática permite que o peptídeo se incorpore na membrana, de forma que seus resíduos

polares façam interações com os grupamentos fosfatos da bicamada, enquanto os aminoácidos apolares penetram através das cadeias hidrofóbicas dos lipídeos (CORNUT *et al.*, 1993; LOHNER; EPAND, 1997).

Como observado na Figura 8, os quatro peptídeos deste estudo possuem alta probabilidade de formar α -hélice, e, por possuírem periodicidade dos resíduos polares e apolares em sua sequência, podem ser considerados como propensos a formar hélices anfipáticas (DEGRADO; LEAR, 1985). A estrutura tridimensional dessa classe de peptídeos geralmente consiste em cadeias laterais polares alinhadas de um lado e os resíduos hidrofóbicos do lado contrário. Essa conformação permite uma ótima interação do peptídeo com a estrutura anfipática das membranas biológicas (DATHE *et al.* 1999), além de ser considerada por alguns pesquisadores como o único requerimento crucial para a entrada do peptídeo no interior das células (SCHELLER *et al.*, 1999).

A importância da anfipaticidade de peptídeos α -hélice para sua atividade antimicrobiana é demonstrada por diversos outros experimentos (CORNUT *et al.*, 1994; MALOY; KARI, 1995; PATHAK *et al.*, 1995). Esse parâmetro pode ser expresso quantitativamente pelo momento hidrofóbico médio (MH), definido pela soma vetorial dos valores de hidrofobicidade de cada resíduo presente na sequência polipeptídica (EISENBERG *et al.*, 1982). Sendo assim, seu valor reflete a separação espacial entre as cadeias laterais hidrofílicas e hidrofóbicas dentro do peptídeo, consistindo em uma medida de assimetria de hidrofobicidade ou, em outras palavras, de anfipaticidade (EISENBERG *et al.*, 1984; NIELSEN *et al.*, 2007).

Os valores do MH para as três sequências também foram calculados de acordo com a escala de Eisenberg e obtiveram os seguintes resultados: 0,18 para os peptídeos 1, 3 e 4; e 0,1 para o Pep 2 (Tabela 5). Pode-se considerar que as quatro cadeias apresentam valores de MH moderados, pois são valores positivos e menores que 0,25. (EISENBERG *et al.* 1982). Os peptídeos naturais ou sintéticos com capacidade lítica possuem grande variedade de valores de momento hidrofóbico, e mesmo que muitos autores associem altos valores desse parâmetro com boa capacidade antimicrobiana (ZHONG *et al.*, 1995), sabe-se que um MH elevado acompanha uma grande capacidade hemolítica (WIEPRECH *et al.*, 1997a), tornando os valores

moderados escolhas mais seguras para o planejamento de potenciais agentes antibacterianos.

Existem vários experimentos que, através de substituições de resíduos da cadeia peptídica, foram capazes de correlacionar um aumento no momento hidrofóbico médio com o melhoramento da atividade antibacteriana, como é caso dos peptídeos melittina (SUBBALAKSHMI *et al.*, 1999), magainina 2 (PATHAK *et al.*, 1995) entre outros (DESLOUCHES *et al.*, 2004). No entanto, esses mesmos estudos observaram considerável efeito citotóxico desses peptídeos modificados, pois demonstraram capacidade de hemólise consideravelmente superior a dos respectivos análogos com valores menores de momento hidrofóbico. Além disso, várias outras pesquisas similares confirmaram a perda tanto da ação hemolítica como da antibacteriana como consequência da diminuição do MH (PEREZ-PAYA *et al.*, 1994; MALOY; KARI, 1995), ressaltando que a influência desse parâmetro é mais pronunciada nas membranas neutras, como, por exemplo, a dos eritrócitos (DATHE *et al.*, 1999).

Assim como a hidrofobicidade, a relação entre o momento hidrofóbico médio e as atividades antimicrobiana e hemolítica é devido às modificações do potencial de interação das regiões hidrofóbicas da α -hélice com os lipídeos da membrana de bactérias e eritrócitos, de forma que um aumento do HM significa maior anfipaticidade e melhor potencial de interação com membranas (WIEPRECH *et al.*, 1997a). Contudo, o efeito desse parâmetro na atividade lítica do peptídeo é regulado pelos valores de hidrofobicidade média, pois existe um limite de hidrofobicidade, dentro do qual o momento hidrofóbico é capaz de modular a capacidade de permeabilização do peptídeo (DATHE *et al.*, 1997; DESLOUCHES *et al.*, 2004).

4.1.3 Busca de Anterioridade

Com a finalidade de comprovar a originalidade das sequências utilizadas nesse estudo como possíveis candidatos antibacterianos, foram examinados vários

arquivos e coleções de peptídeos antimicrobianos, todos acessíveis gratuitamente em páginas da internet. De modo geral, essa análise consistiu em várias tentativas de busca de cada uma das sequências através da ferramenta BLAST (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*), método automático de combinações de alinhamentos estatisticamente significante, disponível nos bancos de dados detalhados a seguir.

As pesquisas realizadas nos websites BACTIBASE e CAMP não encontraram resultados para as sequências envolvidas neste estudo, o que indica que os fragmentos escolhidos possuem sequência de aminoácidos ainda não registrada nesses sistemas. BACTIBASE é um banco de dados de bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos naturais, desenvolvido pelo ISSBAT (*Institute of Applied Biological Sciences Tunis*) na Tunísia, em colaboração com o INAF (*Institute of Nutraceuticals and Functional Foods*) no Canadá. Seus arquivos contam com 177 sequências de bacteriocinas, das quais 156 são produzidas por bactérias Gram-positivas e 18 por Gram-negativas, além das três provenientes do domínio *Archaea*. Todos esses peptídeos abrangem 31 gêneros diferentes, no entanto, as bactérias da ordem *Lactobacillales* são predominantes, com 113 bacteriocinas (HAMMAMI *et al*, 2007; HAMMAMI *et al*, 2010).

Da mesma forma, CAMP (*Collection of Anti-Microbial Peptides*) é um server criado pelo Centro de Informática Biomédica (tradução livre do inglês *Biomedical Informatics Centre*) do NIRRH (*National Institute for Research in Reproductive Health*), vinculado ao Conselho Indiano ICMR (*Indian Council of Medical Research*), e permanece empreendido em desenvolver pesquisas de peptídeos antimicrobianos direcionadas ao entendimento da relação estrutura-função de diversas moléculas proteicas envolvidas na saúde humana. Sua coleção contém 4.020 sequências antimicrobianas, incluindo 1.216 validadas experimentalmente, 1.153 com predições e 1.651 patentes. A origem dos peptídeos é diversa e abrange desde animais, plantas, bactérias e fungos, até aqueles provenientes do domínio *Archeae*, de vírus ou mesmo de formulações sintéticas. Ainda assim, CAMP inclui informações relacionadas à sequência, definição proteica e predição de atividade, além de dados relacionados aos valores de MIC para organismos alvo e atividade hemolítica do peptídeo (THOMAS *et al*. 2010).

Outro local para buscas, APD2 (*Antimicrobial Peptide Database-2*), contém cadastrados 2.239 peptídeos antimicrobianos, em que a grande maioria apresenta atividade antibacteriana (1825 - 81,5%), antifúngica (804 - 35,9%), anticancerígena (148 - 6,61%) ou antiviral (137 - 6,11%). Esse banco de dados foi originalmente criado como uma tese de mestrado de um aluno sob direção do Dr Guangshun Wang, com a finalidade de promover pesquisas e troca de informações nessa área. Desde então, o sistema vem sendo expandido e atualizado, e atualmente contém dados completos acerca dos peptídeos registrados, bem como ferramentas de busca e alinhamento e outros meios de determinação de propriedades estruturais e outros valores como, por exemplo, o índice de Boman (WANG *et al.* 2009).

Assim como os demais, o APD2 também não encontrou as sequências em questão cadastradas em seus arquivos, demonstrando apenas similaridades com outros peptídeos anteriormente registrados. O máximo de similaridade encontrada para o peptídeo 1 foi de 37,93% com o peptídeo C55, extraído do veneno do escorpião *Centruroides suffusus suffusus*, no México. A busca feita para o Pep 2 resultou em maior similaridade (42,85%) com um peptídeo presente no sapo australiano *Litoria infrafrenata*, denominado Frenatina 3. Esse mesmo anfíbio também é detentor de outro peptídeo registrado, Frenatina 2, o qual apresenta a mais alta similaridade com a terceira sequência avaliada, com valor de 50%.

Como não existe qualquer registro prévio das sequências utilizadas neste estudo, procedeu-se o seguimento das análises *in silico*.

4.1.4 Análise do Potencial Antibacteriano

De maneira geral, para a averiguação da possível utilização dos peptídeos selecionados como agentes antibacterianos foram feitos os cálculos de índice de instabilidade, meia-vida e índice de Boman, a avaliação do potencial de ligação em membranas e, finalmente, as predições da atividade antimicrobiana para cada uma das sequências.

4.1.4.1 Índice de Instabilidade e Meia-vida

Um dos principais determinantes da estabilidade de uma proteína encontra-se em sua estrutura primária, porque existe forte correlação da presença de alguns dipeptídeos com a sensibilidade de uma proteína à degradação *in vivo*. Observando a frequência de ocorrência de determinados dipeptídeos em grupos de ambos os tipos de proteínas, estáveis e não-estáveis, foi possível identificar quais deles são predominantes em cada um dos grupos. Com esse método, pôde-se calcular um índice de estabilidade para cada proteína, revelando relação direta entre esses valores e as meia-vidas dessas moléculas. Dessa forma, o índice de estabilidade pode ser usado diretamente para prever se determinada proteína é estável ou não, considerando que valores acima de 40 representam menor meia-vida e caráter instável (GURUPRASAD *et al*, 1990).

De forma geral, os índices de instabilidade dos quatro peptídeos consistiram em atributos desfavoráveis para o experimento. Esses valores, resultantes do cálculo realizado automaticamente pela ferramenta computacional disponibilizada por *Periyannan Research Group*, foram de 68,25 para o Pep 1, 46,91 para Pep 2 e 38,00 para os Pep 3 e 4. Embora esse último valor seja considerado como estável, a proximidade com o limite é preocupante. Os dois primeiros peptídeos, derivados da clivagem do G-CSF, encontram-se fora dos números estimados como estáveis, provavelmente por se tratarem de fragmentos de uma molécula maior com presença de ligações dissulfeto, característica também associada à estabilidade proteica. De todo modo, não é aconselhado apoiar-se inteiramente nesses valores, pois, a sequência de aminoácidos é apenas um dentre diversos outros fatores envolvidos na estabilidade *in vivo* de uma proteína, como, por exemplo, interação com ligantes e mecanismos de reconhecimento de proteases (RECHSTEINER *et al.*, 1987).

Por outro lado, a avaliação da meia-vida *in vivo* ofereceu valores otimistas para a análise. Esse parâmetro corresponde ao tempo necessário para que, desconsiderando o processo de síntese, a quantidade de moléculas de uma determinada proteína se reduza à metade. A estimativa procedeu-se no *server* ProtParam (WILKINS *et al.*, 1999) e baseia-se na regra do N-terminal, devido à sua importância em determinar a estabilidade *in vivo*, porém não é aplicável para

peptídeos com modificações nessa extremidade. O estabelecimento dessa regra deu-se por experimentos com proteínas beta-galactosidase sintetizadas com diferentes N-terminais, que apresentaram surpreendentes variações nos valores de meia-vida *in vivo* (de menos de dois minutos até acima de 100 horas), dependendo apenas do tipo de resíduo na posição N-terminal e do modelo experimental (reticulócitos humanos *in vitro*, *Escherichia coli* e leveduras *in vivo*). Como as três sequências avaliadas em nosso experimento continham uma glicina no N-terminal, seus valores de meia-vida foram iguais, correspondendo a 30 horas para células humanas, o segundo maior tempo de acordo com a tabela de valores de todos os aminoácidos (BACHMAIR *et al.*, 1986; GONDA *et al.*, 1989; TOBIAS *et al.*, 1991; VARSHAVSKY, 1997).

4.1.4.2 Índice de Boman

Esse índice é capaz de prever o potencial de interação de um determinado peptídeo com outras proteínas. O cálculo do índice de interação é baseado em propriedades termodinâmicas de solubilidade das cadeias laterais dos aminoácidos (RADZEKA; WOLFENDEN, 1988), de maneira que a soma dos valores da solubilidade dos resíduos (desconsiderando amidações e resíduos prolina) de um peptídeo representa uma estimativa geral do seu potencial em se ligar com outras proteínas, inclusive a diferentes receptores celulares. O índice de Boman não está, portanto, relacionado com a atividade antibacteriana, já que esta envolve interação do peptídeo com lipídios ao invés de proteínas. Contudo, pode-se afirmar que esse cálculo consiste em um modo simples e eficiente de distinguir a atividade bactericida (antimembrana) da possível ação hormonal de um peptídeo (BOMAN, 2003).

Índices menores que 1,5 kcal/mol são considerados baixos e como as duas primeiras sequências do presente estudo apresentam valores menores que este, 1,0 (Pep 1) e -0,53 (Pep 2), conclui-se que eles têm probabilidade reduzida de interagir com receptores e, portanto, são potenciais candidatos antibacterianos sem muitos efeitos adversos (BOMAN, 2003). A terceira sequência, no entanto, possui um índice

de 1,91, considerado moderado para o potencial de interação com proteínas. Mesmo assim, existem vários peptídeos com índices em torno desse valor, que são inteiramente capazes de exercer sua atividade antimicrobiana sem apresentar outras funções aparentes, como é o caso da cecropina P1 (NIZET *et al.* 2001).

4.1.4.3 Potencial de Ligação em Membranas

Considerando princípios básicos e algumas características comprovadas, relacionados à capacidade de determinado peptídeo apresentar atividade antimicrobiana, foi possível realizar a predição do potencial de interação com membranas das três sequências selecionadas por meio da ferramenta computacional disponível em APD2. As propriedades consideradas para essa análise foram quantidade e composição de aminoácidos e probabilidade conformacional da cadeia, as quais apresentam confiabilidade estatística adquirida através da avaliação de 2.239 peptídeos verdadeiramente antimicrobianos, registrados previamente nesse mesmo banco de dados (WANG *et al.*, 2009).

A predição permite peptídeos com até 50 resíduos, pois esse é o tamanho de 97% das cadeias cadastradas no banco de dados, com uma média de 28 resíduos. A composição de aminoácidos é listada em porcentagem, de modo que os resíduos hidrofóbicos são definidos de acordo com a escala Kyte e Doolittle (KYTE; DOOLITTLE, 1982), e incluem o triptofano, devido à sua importância para a interação com lipídeos (WANG, 2002; WIMLEY; WHITE, 1996). Quanto à probabilidade conformacional, a predição relaciona alta porcentagem de resíduos cisteínas com estruturas β -folha, e da mesma forma, elevada frequência de leucina, alanina, glicina e lisina no peptídeo, bem como a presença de resíduos hidrofóbicos em grupos de dois ou três entre aminoácidos polares, resulta em grande probabilidade de formação de α -hélice anfipática (WANG; WANG, 2004).

O peptídeo 1 do presente estudo obteve a proporção de 39% de aminoácidos hidrofóbicos, com no mínimo cinco desses resíduos dispostos na mesma face da

molécula, implicando provável formação de α -hélice com potencial de interagir com membranas e ter ação antimicrobiana. O peptídeo 2 apresentou 47% de hidrofobicidade, com a presença de no mínimo sete resíduos hidrofóbicos na mesma superfície, o que também lhe atribui provável estrutura de hélice com possível capacidade de interação com membranas. Por fim, a terceira sequência, correspondente aos dois últimos peptídeos avaliados, resultou em 35% de aminoácidos hidrofóbicos, dos quais seis estavam preditos estar dispostos no mesmo lado de uma provável estrutura α -hélice com potencial de interagir com membranas, possuindo, portanto, boa chance de ser antimicrobiana.

4.1.4.4 Atividade Antimicrobiana

A última avaliação *in silico* foi a determinação da capacidade antimicrobiana dos peptídeos, realizada através de três algoritmos diferentes, *Random Forest* (RF), *Discriminant analysis* (DA) e *Support vector machines* (SVM), disponíveis no *website* CAMP-Collection of Anti-Microbial Peptides (THOMAS *et al.*, 2010). O algoritmo RF utiliza a combinação de diversas árvores para a classificação e para regressão de problemas (BREIMAN, 2001), diferente do DA, que tem sua classificação baseada em combinações lineares de variáveis independentes (NORUSIS, 1988). O SVM é uma classe de algoritmos que efetua padrões de reconhecimento e regressão e, por ser muito eficiente para conjuntos extensos de informações, é bastante utilizado em classificações de dados biológicos (VAPNIK, 2000; MULLER *et al.*, 2001). O desempenho de cada um desses métodos de predição foi avaliado pelo Coeficiente de Correlação de Matthews (tradução livre do inglês *Matthews Correlation Coefficient* - MCC), que gerou valores de 0,86 (RF), 0,82 (SVM) e 0,74 (DA), o que indica que os três métodos possuem boa sensibilidade e especificidade.

Esse mesmo coeficiente também foi usado para a seleção das propriedades a serem avaliadas na predição, considerando os resultados de vários peptídeos com 10-80 resíduos, classificados como antimicrobianos (grupo com 2578 amostras) ou não-antimicrobianos (conjunto com 1200 sequências). Desse modo, foram

selecionadas 64 propriedades para uma melhor exatidão de resultados, nas quais estão incluídas a composição físico-química e estrutural do peptídeo e características de cada aminoácido. Desse total, as propriedades consideradas mais importantes foram proporção e distribuição dos resíduos carregados e dos hidrofóbicos, pois consistiram no principal determinante da atividade antimicrobiana. Além dessas, são avaliados diversos outros parâmetros, como, por exemplo, similaridade conformacional, hidrofobicidade, carga, polaridade, estrutura secundária, frequência de dipeptídeos e tripeptídeos, entre outros (THOMAS *et al.*, 2010).

De acordo com esta predição, os peptídeos 1 e 2 foram classificados como não-antimicrobianos nos três algoritmos usados, com probabilidade alta da análise estar correta. Por outro lado, a terceira sequência avaliada obteve resultados satisfatórios nos três métodos de predição, o que significa que os peptídeos 3 e 4 foram considerados como detentores de atividade antimicrobiana. Os resultados das predições e os valores da probabilidade de acerto estão listados na Tabela 6.

Tabela 6: Predições da atividade antimicrobiana dos quatro peptídeos através dos métodos SVM (*Support vector machines*), RF (*Random Forest*) e DA (*Discriminant Analysis*).

Métodos de Predição	Peptídeo 1	Peptídeo 2	Peptídeos 3 e 4
<i>Support vector machines</i> (SVM)	Não-AMP *Probabilidade: 0,804	Não-AMP *Probabilidade: 0,796	AMP *Probabilidade: 0,911
<i>Random Forest</i> (RF)	Não-AMP *Probabilidade: 0,562	Não-AMP *Probabilidade: 0,574	AMP *Probabilidade: 0,904
<i>Discriminant Analysis</i> (DA)	Não-AMP ** Score: 0,460	Não-AMP ** Score: -0,002	AMP ** Score: -1,911

* Os valores de probabilidade dos algoritmos SVM e RF variam de 0 a 1 e indicam a possibilidade da predição estar correta.

** Para o score do DA são considerado antimicrobianos peptídeos com valores menor que -0,251.

Considerando todas as avaliações realizadas anteriormente com os resultados dessa predição, foi decidido sintetizar os quatro peptídeos descritos, a fim de comparar as informações obtidas nessas análises com os resultados encontrados nos experimentos *in vitro*.

4.2 Análise *In Vitro*

A atividade antibacteriana *in vitro* de um peptídeo é comumente expressa pela concentração a partir da qual o crescimento bacteriano é inibido, sendo que os valores variam dependendo da linhagem de bactéria testada. Essa avaliação é feita pelo ensaio de Concentração Inibitória Mínima – MIC (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) que, no caso desse estudo, foi realizada através de microdiluição em caldo de acordo com o CLSI/NCCLS M100-S21 (CLSI, 2011).

Os ensaios dos quatro peptídeos foram feitos em duplicata e os resultados lidos através de leitura em espectrofotômetro de microplacas. Pelos valores de absorvância, verificou-se que os testes foram válidos, pois os controles de validação apresentaram MIC dentro do esperado. No entanto, não foi possível identificar os valores de MIC dos quatro peptídeos para as cinco linhagens bacterianas testadas, pois houve crescimento até na concentração mais alta utilizada nos testes, conforme indicado no gráfico 1.

Os resultados foram calculados pela variação da absorvância em relação ao controle da vancomicina, que representa ausência de crescimento. Além disso, foram calculadas as porcentagens de crescimento bacteriano em comparação com os controles de viabilidade respectivos para cada linhagem, que representam 100% de crescimento no meio sem qualquer antimicrobiano.

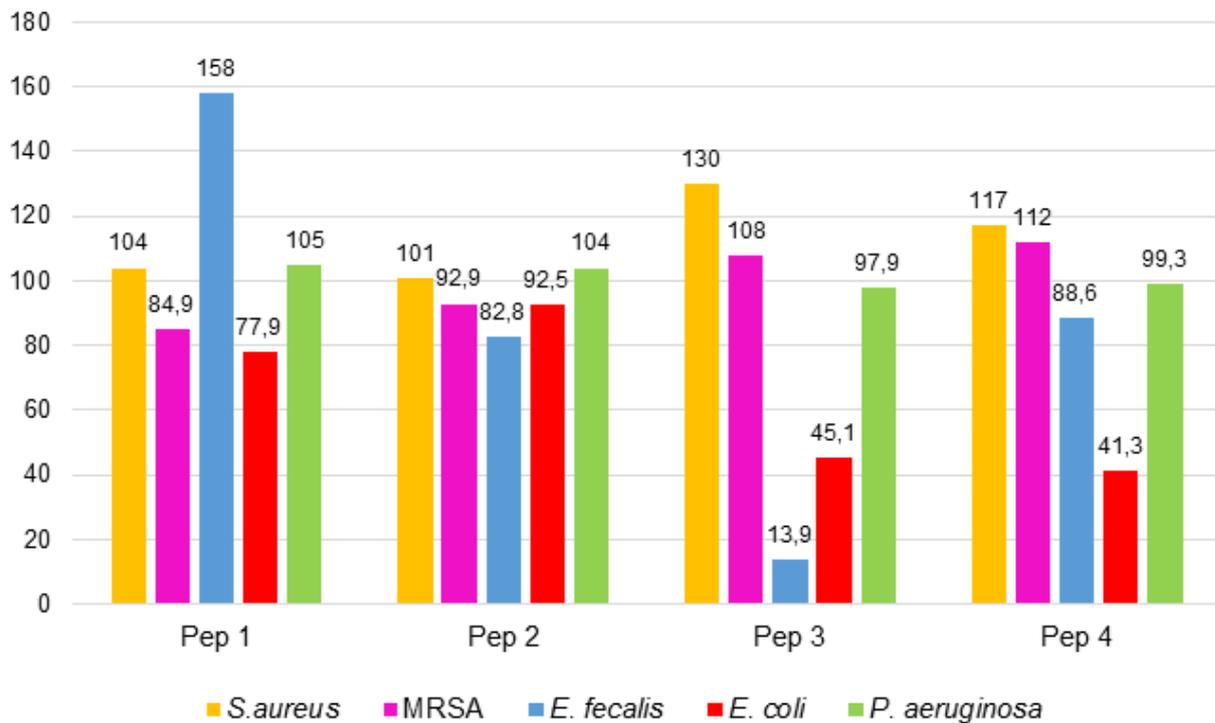


Gráfico 1: Resultados da maior concentração (500 µg/mL) dos peptídeos nos ensaios antibacterianos de concentração inibitória mínima (MIC). Os valores correspondem à porcentagem de crescimento em comparação ao respectivo controle de viabilidade.

Considerando que os valores de concentração inibitória mínima devem apresentar no máximo 5% de crescimento em relação ao controle de viabilidade, pode-se observar que os quatro peptídeos testados não apresentaram ação antibacteriana contra as linhagens testadas, mesmo na concentração mais alta utilizada nos ensaios (500 µg/mL). Em outras palavras, os dados não apresentaram diferença significativa quando analisados há um nível de significância de 95%. No entanto, como existem poucos peptídeos experimentalmente comprovados como não-antimicrobianos, acredita-se que o resultado negativo dos testes seja devido à concentração utilizada (BALS, 2000).

De fato, existem alguns peptídeos que possuem atividade antimicrobiana apenas em concentrações mais altas do que a utilizada nesses ensaios, como é o caso do peptídeo OH-CATH, uma cathelicidina isolada da cobra-real, o qual apresenta valor de MIC de 2 g/mL contra *E. coli* ATCC 25922, sem apresentar atividade hemolítica mesmo em concentrações superiores a 200 g/mL (CHEN *et al.*, 2009). Isso demonstra a possibilidade em utilizar altas concentrações de peptídeos antibacterianos.

Além disso, mesmo não inibindo completamente o crescimento bacteriano, o Pep 3 foi capaz de reduzir o crescimento de *E. fecalis* em 86,1% e de *E. coli* em 54,9%, indicando, portanto, a presença de alguma atividade antibacteriana. O mesmo pode ser observado para o Pep 4, que reduziu o crescimento de *E. coli* em 58,7% se comparado com o controle de viabilidade.

Existe também a questão do pH em que o teste foi desenvolvido, pois a carga líquida do peptídeo altera de acordo com o pH. Em todo caso, o teste foi desenvolvido em pH 7 em consideração ao pH fisiológico da maioria dos tecidos biológicos. Porém, alguns órgãos ou tecidos são naturalmente mais ácidos, como, por exemplo, a pele, com pH em torno de 5 (RODRIGUES, 1995). Se os peptídeos fossem utilizados nesses locais ocorreria aumento de sua carga líquida positiva, condição geralmente associada com melhoramento da atividade antibacteriana (NIELSEN *et al.*, 2007). Por isso existem vários peptídeos antimicrobianos naturais que possuem ação bactericida contra infecções na pele, como é o caso da β -defensina humana 3 (HBD3), produzida no epitélio e bastante efetiva contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (HARDER *et al.*, 2001).

Considerando esses resultados, é provável que os peptídeos selecionados para o experimento possuam atividade antibacteriana em condições de pH diferentes e/ou concentrações mais altas. No entanto, antes de cogitar um aumento na quantidade de peptídeo para inibir crescimento bacteriano, deve-se relevar o alto custo de síntese dessas cadeias, que constitui, atualmente, uma das principais desvantagens para o uso clínico dessa classe de agentes antibacterianos (ZHANG; FALLA, 2006).

5 CONCLUSÕES

As informações obtidas com a análise *in silico* mostraram grande possibilidade das três sequências selecionadas possuírem potencial antibacteriano. Foi constatado que a maioria das propriedades avaliadas influencia não somente na ação antibacteriana, mas também na especificidade e citotoxicidade do peptídeo. A predição algorítmica da atividade antimicrobiana, capaz de combinar várias dessas propriedades em um único resultado, definiu os peptídeos 1 e 2 como não-antimicrobianos, mesmo estes apresentando resultados adequados para as propriedades avaliadas anteriormente em separado. Por outro lado, a terceira sequência foi definida como antimicrobiana, de acordo com o esperado.

Na análise *in vitro* não foi possível verificar evidente ação antibacteriana dos peptídeos derivados do G-CSF (1 e 2), contudo, pôde-se constatar notável redução no crescimento de *E. coli* pelo peptídeo 4 e de *E. fecalis* e *E. coli* pelo peptídeo 3. Embora os resultados desse experimento sejam compatíveis com a predição *in silico* de atividade antimicrobiana, não foi possível determinar a concentração inibitória mínima dos peptídeos testados, o que também não descarta a possibilidade destes possuírem ação antibacteriana. Possivelmente, os valores de MIC consigam ser identificados com a utilização de concentrações maiores dos peptídeos selecionados, no entanto, deve-se ponderar o uso de grandes quantidades, devido ao alto custo de síntese dessas cadeias.

De todo modo, as avaliações consideradas na análise *in silico* foram de suma importância para a seleção dos peptídeos a serem sintetizados, pois apresentaram *in vitro* resultados em concordância com a predição algorítmica de atividade antimicrobiana.

6 REFERÊNCIAS

- ALEY, S. B. *et al.* Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5397-403, 1994.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 260-71, 2010.
- ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**, 2. ed. Editoria Rocca. São Paulo, 2002.
- ANDRE, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415-33, 1998.
- ANG, J. Y.; EZIKE, E.; ASMAR, B. I. Antibacterial resistance. **Indian J Pediatr**, v. 71, n. 3, p. 229-39, 2004.
- ARNOLD, K. *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006.
- ASLANGUL, E. *et al.* Relationship between the Level of Acquired Resistance to Gentamicin and Synergism with Amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 49, n. 10, p. 4144-8, 2005.
- ATTERBURY, R. J. *et al.* Bacteriophage Therapy To Reduce Salmonella Colonization of Broiler Chickens. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 14, p. 4543-9, 2007.
- BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. **Science**, v. 234, n. 4773, p. 179-86, 1986.
- BAER, M. *et al.* An engineered human antibody fab fragment specific for *Pseudomonas aeruginosa* PcrV antigen has potent antibacterial activity. **Infec Imm**, v. 77, n. 3, p. 1083-90, 2009.
- BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Nat Prod Rep**, v. 14, n. 4, p. 309-33, 1997.
- BAKER, M. A. *et al.* Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides. **Cancer Res**, v. 53, n. 13, p. 3052-7, 1993.
- BALS, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. **Respir Res**, v. 1, n. 3, p. 141-50, 2000.
- BANTAR, C. *et al.* Neumonía aguda adquirida en la comunidad en adultos: Actualización de los lineamientos para el tratamiento antimicrobiano inicial basado en la evidencia local del Grupo de Trabajo de Sudamérica. **Rev Chil Infectol**, v. 27, s. 1, p. 9-38, 2011.
- BARBE, V. *et al.* Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 19, p. 5766-79, 2004.

BARBER, M.; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M. Infection by penicillin resistant Staphylococci. **Lancet**, v. 2, n. 6530, p. 641-4, 1948.

BEBBINGTON, C. *et al.* Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects. **Curr Opin Bio**, v. 19, n. 6, p. 613-9, 2008.

BECHINGER, B.; ZASLOJ, M.; OPELLA, S. J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Protein Sci**, v. 2, n. 12, p. 2077-84, 1993.

BELTER, P. Em: MOO-YOUNG, M. A. **Comprehensive Biotechnology**. Pergamon Press. New York, 1985, v. 2, p. 473-80.

BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 235-42, 2000.

BERMUDEZ, L. E. M. Uso de anticorpos monoclonais no diagnóstico e tratamento de infecções em pacientes imunossuprimidos. **Rev Paul Med**. v. 105, n. 6, p. 341-6, 1987.

BIDNENKO, E. *et al.* Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent situ hybridization. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 8, p. 3059-62, 1998.

BJELLQVIST, B. *et al.* Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. **Electrophoresis**, v. 15, n. 1, p. 529-39, 1994.

BJELLQVIST, B. *et al.* The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. **Electrophoresis**, v. 14, n. 1, p. 1023-31, 1993.

BLONDELLE, S. E.; HOUGHTEN, R. A. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. **Biochemistry**, v. 31, n. 50, p. 12688-94, 1992.

BOMAN, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **J Intern Med**, v. 254, n. 3, p. 197-215, 2003.

BRAFF, M. H.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. **Microbiol Immunol**, v. 306, p. 91-110, 2006.

BREIMAN, L. Random forests. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5-32, 2001.

BRODGEN, K. A. *et al.* Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. **Int J Antimicrob**, v. 22, n. 5, p. 465-78, 2003.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 238-50, 2005.

BROTZ, H. *et al.* The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. **Antimicrob Agents Ch**, v. 42, n. 1, p. 154-60, 1998.

BROTZ-OESTERHELT, H.; BRUNNER, N. A. How many modes of action should an antibiotic have? **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 5, p. 564-73, 2008.

- BRUTTIN, A. *et al.* Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrob Agents Ch**, v. 49, n. 7, p. 2874-8, 2005.
- BUCHAN, D. W. *et al.* Protein annotation and modelling servers at University College London. **Nucl. Acids Res**, v. 38, p. W563-8, 2010.
- BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol Rev**, v. 198, p. 169-84, 2004.
- BUNCE, C. *et al.* Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. **Infect Immun**, v. 60, n. 7, p. 2636-40, 1992.
- CALHOUN, D. A.; CHRISTENSEN, R. D. Human developmental biology of granulocyte colony-stimulating factor. **Clin Perinatol**, v. 27, n. 3, p. 559-76, 2000.
- CAMPBELL, A. M. Bacteriophages History. In: KINIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Filds Virology**, 5. ed., v. 1, n. 23, p. 771-72, 2007.
- CAMPBELL, B. J. *et al.* Interaction between bacterial peptides, neutrophils and goblet cells: a possible mechanism for neutrophil recruitment and goblet cell depletion in colitis. **Clin Sci**, v. 101, n. 4, p. 395-402, 2001.
- CASTEELS P. *et al.* Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). **J Biol Chem**, v. 268, n. 10, p. 7044-54, 1993.
- CEGELSKI, L. *et al.* Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formatrion. **Nat Chem Bio**, v. 5, n. 12, p. 913-19, 2009.
- CHEN, X. *et al.* Effects of the Antimicrobial Peptide OH-CATH on *Escherichia coli*. **Zool Res**, v. 30, n. 2, p. 171-7, 2009.
- CHEN, Y. *et al.* Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **J Biol Chem**, v. 280, n. 13, p.12316-29, 2005.
- CHEN, Y. *et al.* Role of Peptide Hydrophobicity in the -Helical α Mechanism of Action of Antimicrobial Peptides. **Antimicrob Agents Ch**, v. 51, n. 4, p. 1398-1406, 2007.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 65, n. 2, p. 232-60, 2001.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2011.
- CORNUT, I. *et al.* The amphipathic α -helix concept: Application to the de novo design of ideally amphipathic Leu, Lys peptides with hemolytic activity higher than that of melittin. **FEBS Lett**, v. 349, n. 1, p. 29-33, 1994.
- CORNUT, I.; THIAUDIÈRE, E.; DUFOURCQ, J. The Amphipathic Helix in Cytotoxic Peptides. Em: EPAND, R. M. **The Amphipathic Helix**, CRC Press, p. 173-219, 1993.

CRISWELL, D. The "Evolution" of Antibiotic Resistance. **Acts Facts**, v. 33, n. 12, 2004.

CROFTON, J.; MITCHISON, D. A. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. **Br Med J**, v. 2, n. 4588, p. 1009-15, 1948.

DATHE, M. *et al.* Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Lett**, v. 403, n. 2, p. 208-12, 1997.

DATHE, M. *et al.* Peptide Helicity and Membrane Surface Charge Modulate the Balance of Electrostatic and Hydrophobic Interactions with Lipid Bilayers and Biological Membranes. **Biochemistry**, v. 35, n. 38, p. 12612-22, 1996.

DATHE, M. *et al.* The influence of structural motifs of amphipathic peptides on the permeabilization of lipid bilayers and the antibacterial and hemolytic activity. **Peptide Science Present and Future**, p. 684-6, 1999.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microb Mol Bio Ver**, v. 74, n. 3, p. 417-33, 2010.

DAVIS, C. P. Normal flora. In: BARON, S. **Medical Microbiology**. 4 ed. Galveston, 1996.

DEGRADO, W. F.; KEZDY, F. J.; KAISER, E. T. Design, synthesis and characterization of a cytotoxic peptide with milittin-like activity. **J Amer**, v. 103, n. 3, p. 679-81, 1981.

DEGRADO, W. F.; LEAR, J. D. Induction of peptide conformation at apolar water interfaces: A study with model peptides of defined hydrophobic periodicity. **J Am Chem Soc**, v. 107, n. 25, p. 7684-9, 1985.

DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, n. 1-2, p. 5, 1999.

DESHPANDE, L. M. *et al.* Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagn Micr Infec Dis**, v. 58, n. 2, p. 163-70, 2007.

DESLOUCHES, B. *et al.* De novo Generation of Cationic Antimicrobial Peptides: Influence of Length and Tryptophan Substitution on Antimicrobial Activity. **Antimicrob Agents Ch**, v. 49, n. 1, p. 316-22, 2004.

DIMARCQ, J. L. *et al.* Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. **Biopolymers Pep Sci**, v. 47, n. 6, p. 465-78, 1998.

DOERN, G. V. *et al.* Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999–2000, including a comparison of resistance rates since 1994–1995. **Antimicrob Agents Ch**, v. 45, n. 6, p. 1721-9, 2001.

DURANTE-MANGONI, E. *et al.* Do we still need the aminoglycosides?. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, n. 3, p. 201-5, 2009.

- EHRENSTEIN, G.; LECAR, H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. **Q Rev Biophys**, v. 10, n. 1, p. 1-34, 1977.
- EIRIKSDÓTTIR, E. *et al.* Secondary Structure of Cell-Penetrating Peptides Controls Membrane Interaction and Insertion. **Biochim Biophys Acta**, v. 1798, n. 6, p.1119-28, 2010.
- EISENBERG, D. *et al.* Hydrophobic Moments and Protein Structure. **Faraday Symp Chem Soc**, v. 299, p. 371-4, 1982.
- EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. **Proc Natl Acad Sci**, v. 81, n. 1, p. 140-4, 1984.
- ENRIGHT, M. C. *et al.* The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n. 11, p. 7687-92, 2002.
- EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 11-28, 1999.
- FADAEI, V. Milk Proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food ingredients. **Ann Biologic Res**, v. 3, n. 5, p. 2520-6, 2012.
- FARMER, J. J. *et al.* Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **J Clin Microbiol**, v. 21, n. 1, p. 46-76, 1985.
- FEIL, E. J. *et al.* The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. **Mol Biol Evol**, v. 16, n. 11, p. 1496-502, 1999.
- FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections-future treatment options. **Drug Resist Update**, v. 14, n. 2, p. 125-39, 2011.
- FIMLAND, G. *et al.* Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. **J Peptide Sci**, v. 11, n. 11, p. 688-96, 2005.
- FREITAS, C. C. *et al.* O fenômeno da tolerância bacteriana aos antibióticos. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 1, n. 3, p. 103-8, 1989.
- FRIEDRICH, C. L. *et al.* Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. **Antimicrob Agents Ch**, v. 44, n. 8, p. 2086-92, 2000.
- FURUYA, E. Y.; LOWY, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 1, p. 36-45, 2006.
- GALES, A. C.; SADER, H. S.; JONES, R. N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagn Micr Infec Dis**, v. 44, n. 3, p. 301-11, 2002.

GALLO, R. L. *et al.* Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **J All Clin Imm**, v. 110, n. 6, p. 823-31, 2002.

GALLO, R. L. *et al.* Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. **Proc Natl Acad Sci**, v. 91, n. 23, p. 11035-9, 1994.

GARRELTS, J. C.; SCHROEDER, T. Tigecycline: place in therapy and important considerations. **Am J Health Syst Pharm**, v. 63, n. 13, p. 1233, 2006.

GELATTI, L. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 5, p. 501-6, 2009.

GIACOMETTI, A. *et al.* *In vitro* activities of membraneactive peptides against gram-positive and gram-negative aerobic bacteria. **Antimicrob Agents Ch**, v. 42, n. 12, p. 3320-4, 1998.

GILBERT, D. N. *et al.* Aminoglycosides. Em: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**, 4. ed., New York, 1995. p. 279-306.

GONDA, D. K. *et al.* Universality and structure of the N-end rule. **J Biol Chem**, v. 264, n. 28, p. 16700-12, 1989.

GOPAL, I. *et al.* Peptide Coated Quantum Dots for Biological Applications. **IEEE Trans Nanob**, v. 5, n. 4, p. 231-8, 1998.

GREENBERGER, P. A. Drug allergies. Em: RICH, R. R. **Clinical immunology principles and practice**, Saint Louis : Mosby, 1996, p.988-99.

GREGORY, S. T.; CATE, J. H.; DAHLBERG, A. E. Streptomycin-resistant and streptomycin-dependent mutants of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. **J Mol Biol**, v. 309, n. 2, p. 333-8, 2001.

GUIMARÃES, D. O. *et al.* Antibióticos: Importancia terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-79, 2010.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W.. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. **Protein Eng**, v. 4, n. 2, p. 155-61, 1990.

HALLOCK, K. J.; LEE, D. K.; RAMAMOORTHY, A. MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain. **Biophys J**, v. 84, n. 5, p. 3052-60, 2003.

HAMMAMI, R. *et al.* BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. **BMC Microb**, v. 10, n. 1, p. 22-8, 2010.

HAMMAMI, R. *et al.* BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. **BMC Microb**, v. 7, p. 89-92, 2007.

- HAMMAMI, R.; FLISS, I. Current trends in antimicrobial agent research: chemo- and bioinformatics approaches. **Drug Discov**, v. 15, n. 13-14, p. 540-6, 2010.
- HANCOCK, R. E. W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lan Infect Dis**, v. 1, n. 3, p. 155-64, 2001.
- HANCOCK, R. E. W. Peptide antibiotics. **Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 418-22, 1997.
- HANCOCK, R. E. W.; BROWN K. L. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 1, p. 24-30, 2006.
- HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrob Agents Ch**, v. 43, n. 6, p. 1317-23, 1999.
- HANCOCK, R. E. W.; ROZEK, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. **FEMS Microbiol**, v. 206, n. 2, p. 143-9, 2002.
- HANCOCK, R.; LEHRER, R. I. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 2, p. 82-8, 1998.
- HARDER, J. *et al.* Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. **J Biol Chem**, v. 276, n. 8, p. 5707-13, 2001.
- HARRIS, F.; DENNISON, S. R.; PHOENIX, D. A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. **Curr Protein Pept Sci**, v. 10, n. 6, p. 585-606, 2009.
- HENTZER, M. *et al.* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **Embo J**, v. 22, n. 15, p. 3803-15, 2003.
- HILL, C. P.; OSSLUND, T. D.; EISENBERG, D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n. 11, p. 5167-71, 1993.
- HIRSCH, J. The velocities of inhibition of bacterial growth by sulfonamide and of the antagonistic effect by p-amino-benzoic acid. **J Immunol**, v. 48, n. 3, p. 199-201, 1944.
- HOBBY, G. L.; MEYER, K.; CHAFFEE, E. Observations on the mechanism of action of penicillin. **Proc Soc Exptl Biol Med**, v. 50, n. 2, p. 281-5, 1942.
- HOIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-32, 2010.
- HOLTEN, K. B.; ONUSKO, E. M. Appropriate Prescribing of Oral Beta-Lactam Antibiotics. **Am Fam Physician**, v. 62, n. 3, p. 611-20, 2000.
- HORNER, R. *et al.* Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, n. 6, p. 391-5, 2005.
- HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, n. 2, p. 357-75, 2008.

- HUDSON, D. L. *et al.* Inhibition of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by small-molecule inhibitors. **Antimicrob Agent Ch**, v. 54, n. 9, p. 3625-9, 2007.
- JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin Infect Dis**, v. 41, s. 2, p. 120-6, 2005.
- JIKIA, D. *et al.* The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. **Clin Exp Derm**, v. 30, n. 1, p. 23-6, 2005.
- JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int J Med Microbiol**, v. 295, n. 6-7, p. 383-404, 2005.
- JOHNSTONE, S. A. *et al.* *In vitro* characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines. **Anticancer Drug Des**, v. 15, n. 2, p. 151-60, 2000.
- JONES, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J Mol Biol**, v. 292, n. 2, p. 195-202, 1999.
- JONES, L. M. **Farmacologia e Terapêutica Veterinária**. 4ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1983.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123-40, 2004.
- KARLOWSKY, M. E. *et al.* Stable antimicrobial susceptibility rates for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the 2001-2003 Tracking Resistance in the United States Today Surveillance studies. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 2, p. 89-98, 2005.
- KASHMIRI, S. V. S.; HOTCHKISS, R. D. Evidence of tandem duplication of genes in a merodiploid region of pneumococcal mutants resistant to sulfonamide. **Genetics**, v. 81, n. 1, p. 21, 1975.
- KASTEN, M. J. Clindamycin, metronidazole and chloramphenicol. **Mayo Clin Proc**, v. 74, n. 8, p. 825, 1999.
- KAUSHANSKY, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. **N Engl J Med**, v. 354, n. 19, p. 2034-45, 2006.
- KINDRACHUK, J.; NAPPER, S. Structure-activity relationships of multifunctional host defence peptides. **Mini-Rev Med Chem**, v. 10, n. 7, p. 596-614, 2010.
- KIYOTA, T.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Design and synthesis of amphiphilic alpha-helical model peptides with systematically varied hydrophobic-hydrophilic balance and their interaction with lipid- and bio-membranes. **Biochemistry**, v. 35, n. 40, p. 13196-204, 1996.

- KRAGOL, G. *et al.* The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. **Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3016-26, 2001.
- KREIL, G. D-Amino acids in animal peptides. **Ann Ver Biochem**, v. 66, p. 337-45, 1997.
- KRISHNAKUMARI, V.; NAGARAJ, R. Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. **J Pept Res**, v. 50, n. 2, p. 88-93, 1997.
- KWON, M. Y.; HONG, S. Y.; LEE, K.H. Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1387, n. 1-2, p. 239-48, 1998.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **J Mol Biol**, v. 157, n. 1, p. 105-32, 1982.
- LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. "Detergent-like" permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1514, n. 2, p. 253-60, 2001.
- LAI, Y.; GALLO, L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends Immunol**, v. 30, n. 3, p. 131-41, 2009.
- LATA, S.; SHARMA, B. K.; RAGHAVA, G. P. Analysis and prediction of antibacterial peptides. **BMC Bioinform**, v. 8, p. 263, 2007.
- LAVERTY, G. *et al.* The potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 10, p. 6566-96, 2011.
- LEE, S. W.; FOLEY, E. J.; EPSTEIN, J. A. Mode of action of penicillin. I. Bacterial growth and penicillin activity - *Staphylococcus aureus* FDA. **J Bact**, v. 48, n. 4, p. 393-9, 1944.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. Sarvier, São Paulo, 2000, 839 p.
- LEVY, S. B. Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. **Lancet**, v. 2, n. 8289, p. 83-8, 1982.
- LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Med**, v. 10, n. 12, p. 122-9, 2004.
- LI, M. *et al.* Gram Positive Three-component Antimicrobial Peptide-sensing System. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, n. 22, p. 9469-74, 2007.
- LIVERMORE, D. M. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. **Scand J Infect Dis**, v. 78, p. 7-16, 1991.
- LOHNER, K.; EPAND, R. M. Membrane interactions of hemolytic and antibacterial peptides. **Adv Biophys Chem**, v. 6, p. 53-66, 1997.
- LU, T, K. *et al.* The next generation of bacteriophage therapy. **Curr Opin Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 105-116, 2011.

- MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 10. ed., Artmed, Porto Alegre, 2008.
- MALOY, W. L.; KARI, U. P. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. **Biopolymers**, v. 37, n. 2, p. 105-22, 1995.
- MANGONI, M. L. *et al.* Structure-function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 5, p. 1447-54, 2000.
- MARASSI, F. M. *et al.* Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by solidstate. **NMR Spectroscopy Biophys J**, v. 77, n. 6, p. 3152-5, 1999.
- MARR, A. K. *et al.* Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Curr Opin Pharm**, v. 6, n. 5, p. 468-72, 2006.
- MARTINEZ-MARTINEZ, L. *et al.* Activities of imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles. **Antimicrob Agents Ch**, v. 44, n. 9, p. 2534 -6, 2000.
- MASON, D. J.; DEIETZ, A.; DEBOER, C. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Sylvester, American Society for Microbiology, Miami, 1962.
- MASUDA, M. *et al.* A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr^{5,12},Lys⁷]-polyphemusin II). **Biochem Bioph Res Co**, v. 189, n. 2, p. 845-50, 1992.
- MATOS, F. S. *et al.* Uso de antibióticos na faringoamigdalite estreptocócica. **GMBahia**, v. 76, n. 3, p. 23-7, 2007.
- MATSUZAKI, K. *et al.* Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. **Biochemistry**, v. 36, p. 2104-11, 1997.
- MATTEI, S. M.; FALLEIROS-CARVALHO, L. H.; CAVALCANTE, N. J. Invasive Pneumococcal disease in HIV seropositive children and adolescents. **J Pediatr**, v. 84, n. 3, p. 276-80, 2008.
- MCLEAN, L. R. *et al.* Minimal peptide length for interaction of amphipathic alpha-helical peptides with phosphatidylcholine liposomes. **Biochem**, v. 30, n. 1, p. 31-7, 1991.
- MCMANUS, M. C. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Am J Health Syst Pharm**, v. 54, n. 12, p. 1420-33, 1997.
- MCPHEE, J. B.; HANCOCK, R. E. Function and therapeutic potential of host defence peptides. **J Pept Sci**, v. 11, n. 11, p. 677-87, 2005.
- MENDES, C. *et al.* Evaluation of the *in vitro* activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis**, v. 4, n. 5, p. 236-44, 2000.
- METCALF, D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. **Nature**, v. 339, n. 6219, p. 27-30, 1989.

- MIGNONA, G. *et al.* Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. **EMBO J**, v. 12, n. 12, p. 4829-32, 1993.
- MOHAMMAD, F. V. *et al.* Bidesmosidic triterpenoidal saponins from the roots of *Symphytum officinale*. **Planta Med**, v. 61, n. 1, p. 94, 1995.
- MOR, A. *et al.* Enter a new post-translational modification: d-amino acids in peptides chains. **Trends Biochem Sci**, v. 17, n. 12, p. 481-5, 1992.
- MORMIMOTO, M. *et al.* Inhibitory effect of tachyplesin I on the proliferation of human immunodeficiency virus in vitro. **Chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 206-11, 1991.
- MUKHTAR, T. A.; WRIGHT, G. D. Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. **Chem Rev**, v. 105, n. 2, p. 529-42, 2005.
- MULLER, K. R. *et al.* An introduction to kernel-based learning algorithms. **IEEE T Neural Networ**, v. 12, n. 2, p. 181-201, 2001.
- MURAKAMI, T. *et al.* Direct virus inactivation of tachyplesin I and its isopeptides from horseshoe crab hemocytes. **Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 327-34, 1991.
- MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **New Engl J Med**, v. 342, n. 10, p. 710-21, 2000.
- NAVARINI, A. A. *et al.* Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. **P Natl Acad Sci USA**, v. 106, n. 17, p. 1707-12, 2009.
- NELSON, M.L. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. **Adv Dent Res**, v. 12, n. 2, p. 5-11, 1998.
- NIELSEN, S.L. *et al.* Structure-activity study of the antibacterial peptide fallaxin. **Protein Sci**, v. 16, n. 9, p. 1969-76, 2007.
- NIZET, V. *et al.* Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. **Nature**, v. 414, n. 6862, p. 454-7, 2001.
- NORUSIS, M. J. **SPSS/PC Advanced Statistics™ V2.0**. ISBN 0-918469-57-0, SPSS Inc, 1988.
- OBATA, F. Influence of *Escherichia coli* shiga toxin on the mammalian central nervous system. **Adv Appl Microbiol**, v. 71, p. 1-19, 2010.
- OHMORI, N. *et al.* Interaction of alpha-helical peptides with phospholipid membrane: effects of chain length and hydrophobicity of peptides. **J Pept Res**, v. 51, n. 2, p. 103-9, 1998.
- OKUMA, K. *et al.* Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 11, p. 4289-94, 2002.
- OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz J Cardiovasc Surg**, v. 21, n. 4, p. 444-52, 2006.

OREN, Z. *et al.* Structures and mode of membrane interaction of a short alpha helical lytic peptide and its diastereomer determined by NMR, FTIR, and fluorescence spectroscopy. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 16, p. 3869-80, 2002.

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 451-63, 1998.

OREN, Z.; SHAI, Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. **Biochem**, v. 36, n. 7, p. 1826-35, 1997.

OTVOS, L. J. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. **J Peptide Sci**, v. 11, n. 11, p. 697-706, 2005.

PACE, J. L.; YANG, G. Glycopeptides: Update on an old successful antibiotic class. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 7, p. 968-80, 2006.

PAPO, N.; SHAI, Y. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 446-58, 2003.

PARK, C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochem Bioph Res Co**, v.244, n. 1, p.253–257, 1998.

PATHAK, N. *et al.* Comparison of the Effects of Hydrophobicity, Amphiphilicity, and Alpha-Helicity on the Activities of Antimicrobial Peptides . **Proteins**, v. 22, n. 2, p. 182-6, 1995.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, 2. ed., University Press. Oxford, 2001.

PATRZYKAT, A. *et al.* Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 46, n. 3, p. 605-14, 2002.

PELCZAR, J. R.; CHAN, M. J.; KRIEG, E. C. S. **Microbiologia Conceitos e Aplicações**, 2. ed., Makron Books do Brasil Ltda, São Paulo, 1997.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Da descoberta da penicilina (1928) ao Premio Nobel (1945). **Rev Fac Let**, v. 6, p. 129-51, 2005.

PEREZ-PAYA, E.; HOUGHTEN, R. A.; BLONDELLE, S. E. Determination of the secondary structure of selected melittin analogues with different haemolytic activities. **Biochem J**, v. 299, p. 587-91, 1994.

PIERS, K. L.; HANCOCK, R. E. The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol Microbiol**, v. 12, n. 6, p. 951-8, 1994.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy typing methods, and pathogenicity factors. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

- POOLE, K.; SRIKUMAR, R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms, and clinical significance. **Curr Top Med Chem**, v. 1, n. 1, p. 59-71, 2001.
- POTRYKUS, J.; BARANSKA, S.; WEGRZYN, G. Inactivation of the *acra* gene is partially responsible for chloramphenicol sensitivity of *E. coli* CM2555 strain expressing the chloramphenicol acetyltransferase gene. **Microb Drug Resist**, v. 8, n. 3, p. 179-85, 2002.
- POUNY, Y. *et al.* Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. **Biochemistry**, v. 31, n. 49, p. 12416-23, 1992.
- POWERS, J. P. *et al.* Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. **Biochemistry**, v. 44, n. 47, p.15504-13, 2005.
- POWERS, J. P.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681-91, 2003.
- PRICE, T. H.; CHATTA, G. S.; DALE, D. C. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. **Blood**, v. 88, n. 1, p. 335-40, 1996.
- PROJAN, S. J.; SHLAES, D, M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clin Microbiol Infect**, v. 10, s. 4, p. 18-22, 2004.
- RADZEKA, A.; WOLFENDEN, R. Comparing the polarities of amino acids: side-chain distribution coefficients between vapor phase, cyclohexane, 1-octanol and neutral aqueous solution. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1664-70, 1988.
- RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Ver Drug Disc**, v. 9, n. 2, p. 117-28, 2010.
- RECHSTEINER, M.; ROGERS, S.; ROTE, K. Protein structure and intracellular stability. **Trends Biochem Sci**, v. 12, p. 390-4, 1987.
- RECHT, M. I, *et al.* Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. **EMBO J**, v. 18, n. 11, p. 3133-8, 1999.
- RECHT, M. I.; PUGLISINI, J. D. Aminoglycoside resistance with homogeneous and heterogeneous populations of antibiotic-resistant ribosomes. **Antimicrob Agents Ch**, v. 45, n. 9, p. 2414-9, 2001.
- ROBINSON, W. E. *et al.* Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 63, n. 1, p. 94-100, 1998.
- RODRIGUES, L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Rev Port Farm**, v. 45, n. 1, p. 52-9, 1995.
- RODRIGUEZ, A. *et al.* Combination antibiotic therapy improves survival in patients with community-acquired pneumonia and shock. **Crit Care Med**, v. 35, n. 6, p. 1493-8, 2007.

ROLINSON, G. N. Evolution of beta-lactamase inhibitors. **Rev Infect Dis**, v. 13, ns. 9, p. 727-32, 1991.

ROUVEIX, B. Clinical implications of multiple drug resistance efflux pumps of pathogenic bacteria. **J Antimicrob Chemoth**, v. 59, n.6, p. 1208-9, 2007.

RUPP, M. E.; FEY, P. D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs**, v. 63, n. 4, p. 353-65, 2003.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J Infect Dis**, v. 181, n. 5, p. 1753-4, 2000.

SABERWAL, G.; NAGARAJ, R. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: Facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. **Biochim Biophys Acta**, v. 1197, n. 2, p. 109-31, 1994.

SADER, H. S. *et al.* Bacterial Pathogens Isolated from Patients with Bloodstream Infections in Latin America. Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility Patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 97-110, 1999.

SADER, H. S. *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz J Infect Dis**, v. 5, n. 4, p. 200-14, 2001.

SALGADO, J. *et al.* Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial beta-sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state 19F-NMR. **J Biomol**, v. 21, n. 3, p. 191-208, 2001.

SAMBRI, V. *et al.* Comparative *in vitro* activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema Pallidum*. **J Antimicrob Chemoth**, v. 50, n. 6, p. 895-902, 2002.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-23, 2007.

SANTUCCI, S. *et al.* Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. **J Hosp Infect**, v. 53, n. 1, p. 6-13, 2003.

SAYLE, R. A.; MILNER-WHITE, E. J. M. RasMol: Biomolecular graphics for all. **Trends Biochem Sci**, v. 20, n. 9, p. 374, 1995. Disponível em <http://www.rasmol.org/>

SHELLER, A. J. *et al.* Structural requirements for cellular uptake of alpha-helical amphipathic peptides, **J Pept Sci**, v. 5, n. 4, p. 185-94, 1999.

SCHWEDE, T. *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 13, p. 3381-5, 2003.

SCHWEIZER, H. P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 1, p. 48-62, 2003.

- SEBELA, M. *et al.* Identification of N-glycosylation in prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and evaluation of the enzyme for its possible application in proteomics. **J Mass Spectrom**, v. 44, n. 11, p.1587-95, 2009. Disponível em <http://biochemie.upol.cz/software/proteincutter/>
- SELA, M. Inhibition of ribonuclease by copolymers of glutamic acid and aromatic amino acids. **J Biol Chem**, v. 237, p. 418-21, 1962.
- SEPUTIENE, V. *et al.* Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* using Double Duplex Real-Time PCR and Dye Syto 9. **Folia Microbiol**, v. 55, n. 5, p. 502-7, 2010.
- SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell nonselective membrane-lytic peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 55-70, 1999.
- SHAI, Y.; OREN, Z. Diastereoisomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides. **Biol Chem**, v. 271, n. 13, p. 7305-8, 1996.
- SHOEMAKER, N. B. *et al.* Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteriodes* spp. and among *Bacteriodes* of other genera in the human colon. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 2, p. 561-8, 2001.
- SIGURDARDOTTIR, T. *et al.* *In Silico* identification and biological evaluation of antimicrobial peptides based on human Cathelicidin LL-37. **Antimicrob Agents Ch**, v. 50, n. 9, p. 2983-9, 2006.
- SKURRAY, R. A.; FIRTH, N. Molecular evolution of multiply-antibiotic-resistant staphylococci. **Ciba Found Symp**, p. 167-83, 1997.
- SMITH, A. L. *et al.* Chloramphenicol is a substrate for novel nitroreductase pathway in *Haemophilus influenzae*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 9, n. 8, p. 601-12, 2007.
- SONG, Y. M. *et al.* Effects of L- or D-Pro incorporation into hydrophobic or hydrophilic helix face of amphipathic α -helical model peptide on structure and cell selectivity. **Biochem Bioph Res Co**, v. 314, n. 2, p. 615-21, 2004.
- SORENSEN, S. J. *et al.* Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 9, p. 700-10, 2005.
- SPRATT, B. G.; CROMIE, K. D. Penicillin binding proteins of Gram-negative bacteria. **Rev Infect Dis**, v. 10, n. 4, p. 699-771, 1988.
- SPRINGMAN, A. C. *et al.* Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. **J Bacteriol**, v.191, n. 17, p. 5419-27, 2009.
- STEVENS, R. *et al.* Performing *in silico* experiments on the grid: A users perspective. Em: COX, S. J. **Proceedings of the UK e-science All Hands Meeting**, Nottingham, UK, 2003, p. 43-50.
- SUBBALAKSHMI, C.; NAGARAJ, R.; SITARAM, N. Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. **FEBS Lett**, v. 448, n. 2, p. 62-6, 1999.

- SUBRAMANIAN, G. M. *et al.* A phase 1 study of PAmAb, a fully human monoclonal antibody against Bacillus anthracis protective antigen, in healthy volunteers. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 1, p. 12-20, 2005.
- SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. Bacteriophage therapy. **Antimicrob Agents Ch**, v. 45, n. 3, p. 649-59, 2001.
- TACHI, T. *et al.* Position dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity. **Biochemistry**, v. 41, n. 34, p. 10723-31, 2002.
- TANDON, P.; GARCIA-TSAO, G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. **Semin Liver Dis**, v. 28, n. 1, p. 26-42, 2008.
- TAVARES, W. Aminociclítóis aminoglicosídeos. Em: **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**, 3. ed., Atheneu, São Paulo, 2001, p. 573-626.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 5, p. 3-10, 2006.
- THOMAS, S. *et al.* CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Res**, v. 38, p. D774-80, 2010. Disponível em <http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/>
- THUONG, M. *et al.* Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. **J Hosp Infect**, v. 53, n. 4, p. 274-82, 2003.
- TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. *et al.* The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. **Cell Mol Immunol**, v. 8, n. 2, p. 110-20, 2011.
- TOBIAS, J. W. *et al.* The N-end rule in bacteria. **Science**, v. 254, n. 5036, p. 1374-7, 1991.
- TOKE, O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, n.6, p. 717-35, 2005.
- TORRENT, M.; NOGUES, M. V.; BOIX, E. Discovering new *in silico* tools for antimicrobial peptide prediction. **Curr Drug Targets**, v. 13, p. 1148-57, 2012.
- TORTORA, G. J.; FUNKE R. B.; CASE C. L. **Microbiologia**, 6. ed., Atheneu, São Paulo, 2005.
- TOSSI, A.; SANDRI, L. **HydroMCalc**. 2002. Disponível em: <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, n. 1, p. 4-30, 2000.
- TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**, 4. ed., Atheneu, São Paulo, 2005.

- UNGER, T.; OREN, Z.; SHAI, Y. The effect of cyclization of magainin 2 and melittin analogues on structure, function, and model membrane interactions: implication to their mode of action. **Biochemistry**, v. 40, n. 21, p. 6388-97, 2001.
- VANHOYE, D. *et al.* Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 9, p. 2068-81, 2003.
- VAPNIK, V. **The Nature of Statistical Learning Theory**. 2. ed. Springer-Verlag, 2000.
- VARKI, R. *et al.* A glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in a novel protein production system (AVI-014) in healthy subjects: a first-in human, single dose, controlled study. **BMC Clin Pharmacol**, v. 9, p. 2, 2009.
- VARSHAVSKY, A. The N-end rule pathway of protein degradation. **Genes Cells**. v. 2, n. 1, p.13-28, 1997.
- VERKLEIJ, A. J. *et al.* Freeze-etch electron microscopy of erythrocytes, *Acholeplasma laidlawii* cells and liposomal membranes after the action of filipin and amphotericin B **Biochim Biophys Acta**, v. 291, n. 2, p. 577-81, 1973.
- VON NUSSBAUM, F. *et al.* Medicinal Chemistry of Antibacterial Natural Products – Exodus or Revival?. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 45, n. 31, p. 5072-129, 2006.
- WADE, D. *et al.* All D-amino acid containing channel-forming antibiotic peptides. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87, n. 12, p.4761-5, 1990.
- WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. ASM Press, Washington, DC, 2003, 335 p.
- WANG, G, LI, X, WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Res**, v. 37, p. D933-7, 2009.
- WANG, G. How the lipid-free structure of the N-terminal truncated human apoA-I converts to the lipid-bound form: new insights from NMR and X-ray structural comparison. **FEBS Lett**, v. 529, n. 2-3, p.157-161, 2002.
- WANG, Y. Y.; CHANG, R. B.; LIMAN, E. R. TRPA1 is a component of the nociceptive response to CO₂. **J Neurosci**, v. 30, N. 39, p.12958-63, 2010.
- WANG, Z, WANG, G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Res**, v.32, S. 1, p. D590-2, 2004.
- WEIGEL, L. M. *et al.* Genetic analysis of a highlevel vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 302, n. 5650, p.1569-71, 2003.
- WEISMAN, L. *et al.* Phase ½ double-blind, placebo-controlled, dose escalation, safety, and pharmacokinetic study of pagibaximab (BSYX-A110), an anti staphylococcal monoclonal antibody for the prevention of staphylococcal bloodstream infections, in very-low-birth-weight neonates. **Antimicrob Agents Ch**, v. 53, n. 7, p. 2876-86, 2009.

WHO. World Health Organization. **WHO Model Prescribing Information: Drugs used in Bacterial Infections**. 2001. p.179, 2001.

WIEPRECHT, T. *et al.* Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. **FEBS Lett**, v. 417, n. 1, p. 135-40, 1997a.

WIEPRECHT, T. *et al.* Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes. **Biochemistry**. v. 36, n. 20, p.6124-32, 1997b.

WILKINS, M. R. *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods Mol Biol**, v. 112, p. 531-52, 1999.

WILKINSON, B. L. *et al.* Anti-Mycobacterial Activity of a Bis-Sulfonamide. **Bioorg Med Chem Lett**, v.17, n.5, p.1355-7, 2007.

WIMLEY, W. C.; WHITE, S. H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. **Nature Struct Biol**, v. 3, n. 10, p. 842-848, 1996.

WRIGHT, A. *et al.* A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a preliminary report of efficacy. **Clin Otolaryngol**, v. 34, n. 4, p. 349-57, 2009.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 10, p.1451-70, 2005.

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

YONEZAWA, A. *et al.* Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. **Biochemistry**, v. 31, n. 11, p. 2998-3004, 1992.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p.389-95, 2002.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 84, n. 15, p. 5449-53, 1987.

ZELEZESKY, I. *et al.* Tuning the biological properties of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides: Rational use of minimal amino acid substitutions. **Peptides**, v. 26, n. 12, p. 2368-76, 2005.

ZENGEL, J. M. *et al.* Role of ribosomal protein S12 in peptide chain elongation: analysis of pleiotropic, streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 129, n. 3, p. 1320-9, 1977.

ZHANG, L.; FALLA, T. J. Antimicrobial peptides: therapeutic potential. **Expert Opin Pharmacol**, v. 7, n. 6, p. 653-63, 2006.

ZHONG, L. *et al.* Design and synthesis of amphipathic antimicrobial peptides. **Int J Pept Protein Res**, v. 45, n. 4, p. 337-47, 1995.