

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS E
CITOTÓXICOS DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS

Orientanda: Mariana Alcântara Araújo Vieira – 13/0014397

Orientadora: Profa. Dra. Mariana de Souza Castro

Brasília - DF

2018

MARIANA ALCÂNTARA ARAÚJO VIEIRA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS E
CITOTÓXICOS DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE ANUROS

Monografia apresentada ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito
parcial de obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana de Souza Castro

Brasília - DF

2018

Dedico à minha avó, Angelita; ao meu namorado,
Matheus e à minha mãe, Marly.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Alcântara Araújo Vieira

Avaliação dos efeitos antiproliferativos e citotóxicos de peptídeos sintéticos derivados de peptídeos antimicrobianos de anuros

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro (Presidente)

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart (Avaliador)

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, especialmente à minha mãe, Marly, por toda demonstração de orgulho e preocupação e à minha avó materna Angelita, por todo o carinho, sabedoria e incentivo prestados, por me ensinar o valor da serenidade e por inspirar meu aperfeiçoamento como ser humano.

Ao meu namorado, Matheus, por toda a paciência, motivação e amor que me ampararam nessa trajetória. Pelos conselhos valiosos e por ser meu porto-seguro em momentos de angústia.

Às minhas amigas Camila e Heidi pelo companheirismo, ensinamentos e suporte ao longo de todo o curso. Pela inestimável vivência de alegria, amizade e divertimento que me proporcionaram.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mariana de Souza Castro, por toda dedicação, compreensão, orientação e por ser um modelo profissional a ser seguido.

Aos meus colegas de laboratório por toda a ajuda e solicitude, principalmente ao MSc. Carlos Santana, por todo o auxílio fornecido.

Aos meus queridos professores do curso, que me prepararam para a vida acadêmica e profissional.

RESUMO

VIEIRA, M. A. A. Avaliação dos efeitos antiproliferativos e citotóxicos de peptídeos sintéticos derivados de peptídeos antimicrobianos de anuros. Brasília, 2018. Monografia (Bacharelado em Farmácia). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Resistências microbiana e tumoral estão entre um dos mais sérios problemas de saúde pública globais. Antibióticos e agentes quimioterápicos convencionais perdem rapidamente sua eficácia uma vez iniciado o processo de seleção de subpopulações celulares insensíveis a esses tratamentos. Sendo assim, peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como potenciais alternativas terapêuticas, que não só ampliam o leque de medicamentos disponíveis, como também são menos propensos à indução de resistência. O presente trabalho se propõe a investigar as atividades biológicas de 5 análogos do PAM dendropsofina 1 (Dc1), bem como caracterizar sua estrutura secundária e seu perfil de toxicidade. Os ensaios antimicrobianos foram realizados contra as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e contra a levedura *Candida albicans* ATCC 14053. Os análogos 1, 2 e 4 se mostraram os mais ativos, principalmente contra bactérias Gram-negativas, sendo a menor Concentração Inibitória Mínima (CIM) observada igual a 8 μ M (para o análogo 4 contra a bactéria *E. coli*). O ensaio antitumoral foi realizado com células de melanoma murino da linhagem B16F10 e não foi detectada atividade antiproliferativa significativa para nenhum dos peptídeos avaliados. A análise por dicroísmo circular revelou que todos os peptídeos foram capazes de adotar conformação em alfa-hélice quando em presença de micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS), criando um ambiente que mimetiza as membranas biológicas dos microrganismos. Os resultados encontrados sugerem ganho de potência antimicrobiana dos análogos 1, 2 e 4 em comparação ao peptídeo selvagem, o PAM dendropsofina 1.

Palavras-chave: resistência microbiana, resistência tumoral, peptídeos antimicrobianos, dendropsofina 1, análogos sintéticos.

ABSTRACT

Microbial and tumoral resistance are one of the most serious problems of public world health. Conventional antibiotics and chemotherapeutic agents lose rapidly their efficacy once initiated the selection process of cell subpopulations that are insensitive to these treatments. Thus, antimicrobial peptides (AMPs) emerge as potential therapeutic alternatives that not only enhance the variety of available drugs, but also demonstrate less chances to cause resistance. This study intends to investigate the biological activities of 5 synthetic analogues derived from the PAM dendropsophin 1, as well as, characterize their secondary structures contents and their toxicity profile. The antimicrobial essays were performed against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Enterobacter hormaechei* ATCC 700323; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Escherichia coli* ATCC 25922 and yeast *Candida albicans* ATCC 14053. The synthetic analogues 1, 2 and 4 were the most active compounds, mainly against Gram-negative bacteria, the smallest Minimum Inhibitory Concentration (MIC) recorded was 8 μM (for analogue 4 tested against *E. coli*). The antitumoral essays were performed against B16F10 murine melanoma cells and none of the tested peptides showed significant antiproliferative activity. Circular dichroism analysis revealed that all peptides were able to adopt α -helix conformation in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles, a membrane-mimetic environment. These results suggest enhanced antimicrobial potency of analogues 1, 2 and 4, comparing to the wild-type peptide, the PAM dendropsophin 1.

Keywords: microbial resistance, tumoral resistance, antimicrobial peptides, dendropsophin 1, synthetic analogues.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos que governam as resistências intrínseca e adquirida.	6
Figura 2. Linha do tempo das descobertas de distintas classes de drogas antibacterianas.	8
Figura 3. Interações diferenciais de PAMs com membranas eucarióticas e procarióticas.	19
Figura 4. Mecanismos de ruptura de membranas propostos para PAMs.(a) <i>barrel-stave</i> (b) <i>carpet-like</i> (c) poro toroidal	22
Figura 5. As três ordens de lissanfíbios, com seus respectivos números de espécies	25
Figura 6. Anuro <i>Dendropsophus columbianus</i>	28
Figura 7. Espectros dicróticos dos peptídeos a 50 µM em água (linha contínua) e em SDS 35 mM (linha tracejada). (a) 4; (b) 1; (c) 2; (d) 3; (e) Dc1; (f) 5.....	37
Figura 8. Conversão da molécula de MTT em formazan.....	41
Figura 9. Viabilidade celular da linhagem B16F10 nas diferentes concentrações testadas de cada peptídeo.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Panorama mundial da resistência observada para bactérias causadoras de infecções na comunidade e em hospitais. Seis regiões foram avaliadas: Africana, das Américas, Mediterrânea Oriental, Européia, Sudeste Asiática e Ocidental do Pacífico....	12
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos de Dc1 e seus análogos.	34
Tabela 3. Percentuais de helicidade dos peptídeos em água e em SDS 35 mM.....	38
Tabela 4. Efeitos antiproliferativos (MICs, μM) sobre microrganismos patogênicos dos análogos mais ativos do peptídeo selvagem (Dc1).....	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(v/v)	volume/volume
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Dc1	Dendropsolina 1
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESBL	Enzimas betalactamases de espectro estendido
Fmoc	9-fluorenil-metoxicarbonil
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeos
LTA	Ácido lipoteicóico
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Peptídeo antimicrobiano
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
UFCs	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Radiação Ultravioleta
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina
WT	Variante selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1. RESISTÊNCIA	4
3.1.1. MICROORGANISMOS	7
3.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	10
3.1.1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
3.1.1.4. <i>Candida albicans</i>	12
3.1.1.5. <i>Enterococcus faecalis</i>	14
3.1.1.6. <i>Enterobacter hormaechei</i>	15
3.1.2. MELANOMA	16
3.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	18
3.2.1. VANTAGENS E SUPERAÇÕES	22
3.2.2. PAMs DE ANUROS	25
4. METODOLOGIA	29
4.1. SÍNTESE QUÍMICA E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	29
4.2. DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS	29
4.3. ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROÍSMO CIRCULAR	29
4.4. ENSAIOS ANTIPROLIFERATIVOS SOBRE MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS	30
4.5. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR SOBRE CÉLULAS TUMORAIS	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. DESENHO RACIONAL DE ANÁLOGOS	34
5.2. ENSAIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR	35
5.3. ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	38
5.4. ENSAIOS TUMORAIS	41
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de microorganismos resistentes aos tratamentos convencionais representa uma séria ameaça à saúde pública e tem gerado preocupação ao redor de todo o mundo. Tal cenário tem sido moldado por uma combinação de fatores, dentre eles está a excessiva confiança dirigida às tradicionais drogas antimicrobianas, mesmo que estas possuam limitações ainda não superadas (NARAYANA e CHEN, 2015).

Além disso, o uso inadequado de antibióticos na prática clínica e na indústria pecuária representam atividades humanas capazes de acelerar o processo evolutivo natural de resistência, ao ponto de já existirem patógenos considerados intratáveis, situação particularmente preocupante no contexto das infecções hospitalares. Contribui também o crescente desinteresse das indústrias farmacêuticas na pesquisa de novos agentes anti-infecciosos, devido aos grandes investimentos necessários e baixa perspectiva de lucro, de modo que companhias menores e institutos acadêmicos têm desempenhado uma atuação mais efetiva nessa área (NARAYANA e CHEN, 2015; CONLON, 2004).

Os problemas de resistência enfrentados no tratamento de bactérias e fungos também estão presentes em doenças causadas por vírus, parasitas, protozoários e até mesmo no câncer (CONLON et al., 2014a).

Câncer permanece sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade ao redor do mundo, apesar dos recentes avanços nos tratamentos. A eficácia das atuais abordagens quimioterápicas é limitada pela sua baixa especificidade, visto que seu mecanismo de ação afeta também as células normais, resultando em efeitos adversos e limitações de dosagem (JANGA et al, 2011). Adicionalmente, as drogas convencionais falham em eliminar os tumores por completo devido a resistência por parte das células cancerígenas, sendo essa a principal causa de recorrências tumorais (YANG et al, 2013). Além disso, células neoplásicas quiescentes ou que se proliferam lentamente são refratárias aos fármacos que afetam a divisão celular (LIBÉRIO et al, 2013).

Em vista dessa conjuntura, torna-se necessária a busca por novos tipos de drogas que não só ampliem o arsenal de combate a essas patologias, como também apresentem propriedades toxicológicas superiores aos atuais tratamentos. Outras características desejáveis para as novas terapias seriam a elevada potência de ação, mecanismos que limitem a seleção de cepas resistentes e ausência de contato prévio entre os patógenos e essas moléculas (CONLON et al, 2012; SANI et al, 2015).

Nesse sentido, algumas das inovações mais promissoras e que atendem aos critérios citados são os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Esses compostos estão abundantemente distribuídos na natureza e possuem amplo espectro de ação contra uma grande variedade de patógenos (NARAYANA e CHEN, 2015). A pele de anfíbios é particularmente rica em PAMs farmacologicamente ativos, despertando um crescente interesse clínico (MANGONI et al, 2015). O estudo da relação estrutura-atividade desses PAMs permite o desenho racional e síntese de peptídeos análogos, com realce de suas propriedades mais satisfatórias (MAI et al, 2015).

Dessa forma, o presente trabalho se propõe a contribuir para a ampliação do leque de conhecimentos acerca de PAMs oriundos de anuros e seus análogos, avaliando seu potencial terapêutico frente a diferentes microorganismos e células, bem como elucidando seu perfil de toxicidade e características estruturais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos de análogos do PAM dendropsófina 1 (Dc1) sobre bactérias e fungos patogênicos, bem como células tumorais, de modo a investigar seu potencial terapêutico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a capacidade inibitória do PAM Dc1 e de seus análogos sobre a proliferação de bactérias e fungos patogênicos por meio da determinação da CIM (concentração inibitória mínima);
- Avaliar *in vitro* a capacidade inibitória do PAM Dc1 e de seus análogos sobre a proliferação de células tumorais por meio da determinação do percentual de viabilidade celular;
- Determinar a composição de elementos de estrutura secundária dos peptídeos testados com o emprego de dicroísmo circular.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. RESISTÊNCIA

A seleção de resistência é um acontecimento comum a qualquer organismo. Mutações provocam variações genéticas em um grupo, de modo que o surgimento de genes que conferem resistência a doenças é um processo natural. Contudo, pressões seletivas externas podem acelerar a propagação desses genes, provocando um grande aumento na proporção de indivíduos resistentes e assim perpetuando a característica que os favorece (ROY and KIRCHNER, 2000; OMS, 2014; HERSHBERG, 2015).

Dessa forma, a resistência às drogas pode ser classificada em primária (intrínseca) ou secundária (adquirida), como ilustrado na Figura 1. A resistência primária é de ocorrência natural em uma população, ou seja, mesmo sem prévia exposição à droga em questão alguns indivíduos já possuíam fatores pré-existentes que os permitem sobreviver à terapia aplicada. Já a resistência adquirida se desenvolve durante um tratamento a alvos inicialmente sensíveis, devido a mutações que ocorreram nesse período de exposição (HOLOHAN et al, 2013; PERLIN et al, 2017).

A ocorrência de resistência a drogas está presente não apenas em microorganismos, como também em células cancerígenas, que costumam ser geneticamente instáveis. Isso porque ambos compartilham características como a rápida divisão celular e a elevada frequência de mutações, fatores que propiciam a seleção natural de indivíduos resistentes (MANSOORI et al, 2017).

Atualmente a espécie humana é forçada a enfrentar um dos maiores problemas de saúde pública da história: a resistência múltipla a antibióticos (BRAGG et al, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que a resistência microbiana alcançou níveis alarmantes em muitas partes do globo, indicando que muitos dos disponíveis tratamentos para infecções comuns estão se tornando inefetivos. A OMS já foi notificada sobre a ocorrência de resistência a antibióticos em mais de 500.000 pessoas em 22 países, sendo importante ressaltar que a maioria dos dados são oriundos de pacientes em severas

condições, de modo que infecções adquiridas na comunidades encontram-se sub-representadas, o que gera lacunas nos dados epidemiológicos (OMS, 2014).

Para cada nova descoberta de terapia antibacteriana prevê-se o surgimento de resistência clinicamente relevante em um período de meses ou anos. Quando bactérias sofrem mutações que lhes conferem resistência ao antibiótico empregado, todas as bactérias sensíveis são mortas, enquanto que as resistentes se proliferam e passam a ocupar o espaço deixado, tornando-se a variedade dominante da população. Se um antibiótico é administrado em doses subterapêuticas esse processo torna-se ainda mais acentuado (WALSH, 2000).

Uma única mutação espontânea já pode ser o gatilho, mas para a maioria dos antibióticos são necessárias múltiplas mutações para atingir-se relevante resistência. Frequentemente, tais alterações genéticas envolvem um aumento na expressão de bombas de efluxo, de modo a expulsar da célula uma variedade de drogas. O principal mecanismo pelo qual ocorre a rápida disseminação de genes de resistência entre bactérias é a transferência horizontal de plasmídeos, os quais se replicam de forma independente e são passados de uma célula para outra e até mesmo para outras espécies (WALSH, 2000; TOPRAK et al, 2012; NARAYANA e CHEN, 2015).

O uso frequente e profilático de antifúngicos também conduziu a um cenário de resistência para essa classe de fármacos. Vários mecanismos de resistência fúngica já foram identificados, incluindo alterações do alvo farmacológico, superexpressão de múltiplos transportadores de drogas, ativação de respostas de estresse que resultam em adaptação, degradação de drogas e barreiras de permeabilidade associadas a biofilmes. (PERLIN et al, 2017; PARENTE-ROCHA, 2017; REVIE et al, 2018).

A resistência também é um problema encontrado no tratamento de câncer, tanto frente a agentes quimioterápicos quanto em relação a terapias que envolvem alvos moleculares específicos. Ambas abordagens tornam-se limitadas devido a mecanismos de resistência comuns a muitos tumores, como ativação de vias de sobrevivência, modificação dos alvos celulares, superexpressão de proteínas responsáveis por resistência a múltiplas

drogas (MDR), inibição da morte celular por meio da supressão da apoptose, alteração no metabolismo da droga e intensificação no reparo de DNA e na amplificação de genes (JANGA et al, 2011; MANSOORI et al, 2017).

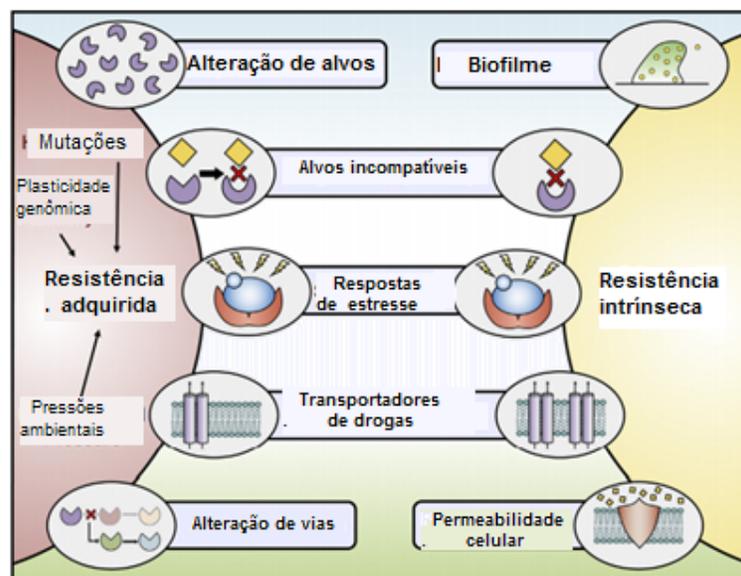


Figura 1. Mecanismos que governam as resistências intrínseca e adquirida (Fonte: adaptado de REVIE et al, 2018).

Além disso, é bem reconhecida a particular heterogenicidade molecular de certos tipos tumorais, de modo que a resistência surge devido a seleção de subpopulações resistentes, que passam a ser o subtipo predominante (HOLOHAN et al, 2013).

A resistência por si só não é uma doença, visto que não existe diferença na severidade dos danos causados por microorganismos e células cancerígenas resistentes em comparação com seus equivalentes suscetíveis. A resistência normalmente não se trata de um problema relacionado à patologia e sim às limitadas opções terapêuticas existentes, dependendo-se de um número restrito de tratamentos. Por isso, o desenvolvimento de terapias alternativas é essencial, visto que assim a resistência não será eliminada, mas deixará de ser um aspecto tão prejudicial à saúde global (OMS, 2018e).

3.1.1. MICROORGANISMOS

Microorganismos possuem uma notável capacidade de apresentar resistência a agentes antimicrobianos, o que ameaça as limitadas opções de tratamento disponíveis e prenuncia uma futura crise na saúde pública (REVIE et al, 2018). A resistência antimicrobiana impacta de forma abrangente em terapias antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias e antivirais (OMS, 2014).

Dentre as bactérias resistentes mais comumente reportadas encontram-se *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (OMS, 2018c). *E. coli* e *S. aureus* são encontradas tanto na comunidade quanto em infecções hospitalares, de modo que no contexto hospitalar geralmente se apresentam em sua forma mais perigosa, como *E. coli* produtora de enzimas betalactamases de espectro estendido (ESBL) e *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). A variante de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) também predomina em ambientes hospitalares, bem como *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (VRE) (OMS, 2018e). *Enterobacter hormaechei* tem sido reportado como um dos patógenos nosocomiais mais associados a surtos infecciosos em unidades neonatais (MEZZATESTA et al, 2012). No que concerne às leveduras resistentes, merece destaque o fungo *Candida albicans* (OMS, 2018e).

O surgimento de resistência antimicrobiana tem sido acelerado pelo uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos, tanto na saúde humana quanto na pecuária. A automedicação muitas vezes incorre em uso profilático desnecessário, uso divergente da indicação terapêutica do medicamento e uso incompleto, sem que se cumpra a dosagem ou duração do tratamento requerida, além de não contar com o acompanhamento de um profissional da saúde (OMS, 2018d).

Essa situação se torna particularmente emergencial quando se nota a ausência de inovações terapêuticas recentes (Figura 2). Até os anos 70 muitas drogas antibacterianas foram descobertas, às quais os patógenos mais comuns eram inicialmente sensíveis. Porém, a última nova classe de antibacterianos surgiu ainda na década de 80, evidenciando um grande hiato na evolução das terapias, que permanece até hoje (OMS,

2014). Drogas antifúngicas também geram especial preocupação, visto que o tratamento de infecções fúngicas invasivas se restringe a apenas 3 grandes classes de fármacos (REVIE et al, 2018).

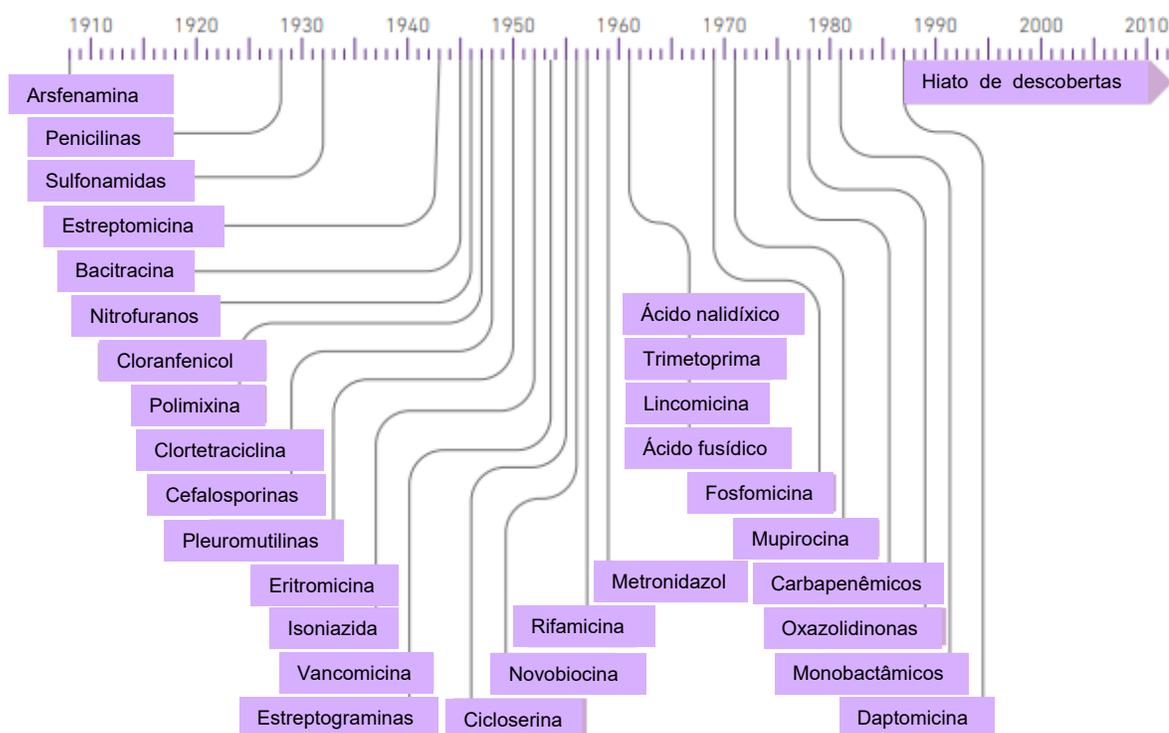


Figura 2. Linha do tempo das descobertas de distintas classes de drogas antibacterianas. (Fonte: adaptado de OMS, 2014)

O cenário resultante desse panorama caracteriza-se principalmente pelos prejuízos trazidos aos doentes. Pacientes portadores de infecções resistentes estão mais sujeitos a desfechos clínicos negativos e morte, quando comparados a pacientes infectados por patógenos suscetíveis. Além disso, demandam maiores gastos em cuidados de saúde devido ao prolongado tempo de internação, necessidade de exames adicionais e de drogas mais caras (OMS, 2018d).

Reflexos graves são notados na terapia de pacientes particularmente vulneráveis, como os imunocomprometidos, os que recebem quimioterapia e os transplantados, visto

que quando o tratamento da infecção falha nesses frágeis indivíduos as consequências costumam ser fatais (OMS, 2014).

3.1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da flora natural da pele e do nariz, considerado um dos mais importantes patógenos humanos. Esse microorganismo pode causar uma variedade de infecções dérmicas e ósseas, além de pneumonia e septicemia. Consiste também na causa mais comum de infecções pós-operatórias e na terceira maior causa de doenças de origem alimentar, visto que algumas cepas são capazes de produzir toxinas potencialmente fatais, causadoras de intoxicação alimentar severa (OMS, 2014; BEYENE et al, 2017).

A resistência às drogas de primeira linha que tratam infecções causadas por *S. aureus* já encontra-se largamente difundida e o principal motivo é a emergência de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Estima-se que pacientes com MRSA são 64% mais propensos a morrer do que pessoas infectadas pelo mesmo patógeno em sua forma não-resistente (GOULDA et al, 2012; OMS, 2018d).

A resistência de cepas MRSA foi resultado de mutações em um gene que codifica proteínas do sítio de ligação envolvido na ação de todos os fármacos betalactâmicos, o que significa uma resistência cruzada a penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (OTTO, 2012; OMS, 2014).

Algumas cepas de MRSA encontradas em hospitais também se tornaram resistentes a antibióticos adicionais como eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino e tetraciclina. Dessa forma, em muitos casos, só é possível o tratamento com vancomicina, antibiótico com considerável menor eficácia que betalactâmicos. Outra opção é a teicoplanina, a qual pode ser administrada apenas por injeções, além de exigir monitoramento de efeitos colaterais. Contudo, raros casos de cepas vancomicina-resistentes (VRSA) já foram relatados (OTTO, 2012; OMS, 2014).

3.1.1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa comumente encontrada na flora intestinal de animais e humanos. A maioria das cepas de *E. coli* são inofensivas, mas algumas podem causar séria intoxicação alimentar. Esse tipo de infecção costuma ser transmitida pelo consumo de água e alimentos contaminados, resultando em sintomas como cólicas abdominais, diarreia, febre e vômitos. A maioria dos pacientes se recupera em um período de 10 dias, mas, em certos casos, a doença pode representar perigo de vida (OMS, 2018a; OMS, 2018b).

Por outro lado, *E. coli* é também a causa mais frequente de infecções renais e do trato urinário, tanto adquiridas em hospitais quanto na comunidade. Além disso, é o mais comum patógeno associado a infecções da corrente sanguínea, assim como está muito presente em infecções intra-abdominais e em meningite neonatal (OMS, 2014).

A resistência em *E. coli* é alcançada diversamente, seja por mutações, sendo essa geralmente a causa para a ineficácia de fluoroquinolonas, seja por aquisição de elementos genéticos móveis, que explica a resistência a penicilinas de amplo espectro (ampicilina, amoxicilina) e a cefalosporinas de terceira geração (OMS, 2014).

Fluoroquinolonas compõem tratamentos orais antibacterianos largamente utilizados na comunidade, sendo uma das principais classes usadas para tratar infecções urinárias. Cepas de *E. coli* resistentes a esses fármacos ocorrem em proporções variadas ao redor do mundo, mas existem países nos quais o tratamento com ciprofloxacino já se mostra inefetivo em mais da metade da população (OMS, 2014; OMS, 2018d).

Cefalosporinas de terceira geração costumam ser utilizadas em tratamentos intravenosos de severas infecções hospitalares. A resistência à cefalosporinas de terceira geração é primordialmente conferida por enzimas conhecidas como betalactamases de espectro estendido (ESBLs), as quais são capazes de impedir a ação de vários antibióticos betalactâmicos e se propagam entre diferentes espécies de bactérias. (OMS, 2014).

Infecções severas causadas por *E. coli* portadora de ESBL necessitam ser tratadas com terapias mais amplas, sendo que a classe dos carbapenêmicos costuma ser a única

opção disponível nesses casos. Isso implica em custos elevados e em estímulo ao surgimento de resistência da *E. coli* a antibióticos carbapenêmicos (OMS, 2014)

Dessa forma, é bastante preocupante a emergência recente de cepas produtoras de metalo-betalactamases, que virtualmente seriam capazes de conferir à *E. coli* resistência a todos os fármacos betalactâmicos existentes (OMS, 2014).

3.1.1.3. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, assim como *E. coli*, é um frequente colonizador do intestino de humanos e de outros vertebrados. Esse patógeno é a principal causa de infecções de origem hospitalar, colonizando indivíduos vulneráveis como crianças, imunossuprimidos, diabéticos e pacientes de UTI. As mais comuns infecções causadas por *K. pneumoniae* são urinárias e respiratórias, além de bacteremias em neonatos (OMS, 2014). A taxa de mortalidade para pneumonias nosocomiais causadas por esse patógeno pode exceder 50% em pacientes vulneráveis, mesmo quando tratados com antibacterianos adequados (OMS, 2014; OMS, 2018d).

De forma similar à *E. coli*, *K. pneumoniae* também revela ampla resistência a fluoroquinolonas, além disso, ambos compartilham o principal mecanismo pelo qual adquirem resistência: transferência horizontal de plasmídeos (OMS, 2014).

K. pneumoniae foi o primeiro microorganismo no qual identificou-se a presença de ESBL, apenas posteriormente essa característica foi transferida à *E. coli*. Para os microorganismos dotados dessas enzimas, muitos betalactâmicos de amplo espectro são inefetivos, restando apenas os fármacos carbapenêmicos como opção viável de tratamento. *K. pneumoniae* é a principal causa de infecções geradas por bactérias resistentes a carbapenem em todo o mundo, visto que todos os mais importantes genes envolvidos na produção de enzimas carbapenemases estão presentes nesse microorganismo (OMS, 2014).

De forma análoga às opções disponíveis para *E. coli*, cefalosporinas de terceira geração são o tratamento intravenoso padrão de infecções nosocomiais severas causadas

por *K. pneumoniae*, mas tornam-se ineficazes para cepas ESBL positivas. A segunda opção é o emprego de antibióticos carbapenêmicos, que por sua vez são inviabilizados para cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC) (OMS, 2014).

Em alguns países, antibióticos carbapenêmicos já não funcionam em mais da metade dos pacientes acometidos por infecções causadas por *K. pneumoniae*. Os reflexos de tal cenário são semelhantes aos relatados para *E. coli*, com um agravante: após esgotadas as opções discutidas, restam ao tratamento de KPC apenas as drogas tigeciclina e colistina. Ambas são menos efetivas, provocam maior toxicidade, são de difícil acesso e altamente suscetíveis ao surgimento de resistência se usadas como monoterapia (OMS, 2018d; OMS, 2014; PETROSILLO et al, 2013).

Tabela 1. Panorama mundial da resistência observada para bactérias causadoras de infecções na comunidade e em hospitais. Seis regiões foram avaliadas: Africana, das Américas, Mediterrânea Oriental, Européia, Sudeste Asiática e Ocidental do Pacífico (Fonte: adaptado de OMS, 2014).

Bactéria/ Resistência	Exemplos de doenças típicas	Nº de Estados membros que forneceram dados (total= 194)	Nº de Regiões que reportaram 50% ou mais de resistência
<i>Escherichia coli</i> / - vs 3ª ger. cefalosporinas - vs fluoroquinolonas	Infecções do trato urinário e da corrente sanguínea	86	5/6
		92	5/6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / - vs 3ª ger. cefalosporinas - vs 3ª ger. carbapenêmicos	Pneumonia, infecções do trato urinário e da corrente sanguínea	87	6/6
		71	2/6
<i>Staphylococcus aureus</i> / - vs meticilina	Infecções na corrente sanguínea e feridas	85	5/6

3.1.1.4. *Candida albicans*

Fungos são eucariotos primitivos que, em sua maioria, comportam-se como microorganismos oportunistas, ou seja, apenas causam doenças quando as defesas imunes do hospedeiro encontram-se deficientes. A mortalidade global atribuída a infecções

fúngicas é estimada em 1,5 milhão de mortes anuais (SANGLARD et al, 2009; REVIE et al 2018).

Candida albicans, além de ser o fungo patogênico mais frequente, é também o principal de sua classe a causar infecções nosocomiais, com taxas de mortalidade que excedem 40%, ainda que tratando-se o processo infeccioso (REVIE et al, 2018). A principal patologia associada a esse microorganismo é a candidíase, considerada a infecção fúngica mais comum em todo mundo, bem como um dos principais problemas para pacientes de UTI (OMS, 2014).

Dependendo do grau de vulnerabilidade do hospedeiro, a candidíase pode se manifestar tanto na forma de infecções superficiais quanto em sua forma invasiva na corrente sanguínea, chamada candidemia (OMS, 2014).

Existem mais de 20 espécies de *Candida*, de modo que a resposta à terapia antifúngica difere entre tais subtipos. Alguns países reportam o surgimento de resistência entre organismos causadores de candidemia, situação observada principalmente entre os tratamentos antifúngicos empreendidos com azóis (OMS, 2014).

Atualmente a medicina dispõe de apenas três classes de antifúngicos capazes de tratar sérias infecções: azóis, equinocandinas e polienos. Azóis são as drogas mais comuns usadas em infecções por *Candida*, contudo algumas espécies são inerentemente menos sensíveis a essa opção de tratamento e outras apresentam resistência ao longo de tratamentos prolongados. Quando disponíveis, as equinocandinas são o tratamento de escolha empírico, visto que o fármaco anfotericina B é um polieno que exhibe maior toxicidade quando comparado às duas outras classes (OMS, 2014).

Apesar de muitas infecções por *Candida* resistentes a azóis poderem ser tratadas com drogas de outras classe, é necessário levar em consideração a ausência de formulações orais e o fato de muitos países subdesenvolvidos disporem apenas dos azóis como tratamento antifúngico. A variabilidade geográfica causa diferenças em dados de incidência de resistência fúngica, porém em certos lugares metade das infecções causadas

por *Candida* são insensíveis às terapias de primeira linha, despertando a necessidade de novas drogas (OMS, 2014).

3.1.1.5. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus spp. são bactérias comensais Gram-positivas vastamente distribuídas em aves e mamíferos, incluindo seres humanos. *Enterococcus faecalis* provoca essencialmente infecções gastrointestinais, mas em menor extensão é capaz também de colonizar pele, trato genitourinário e cavidade oral (SABOUNI et al, 2016; BRAGA et al, 2018).

Enterococos constituem a segunda maior causa de infecções nosocomiais do trato urinário e a terceira mais importante fonte de infecções bacterianas na corrente sanguínea. Esses patógenos tem ganhado resistência a quase todo o espectro de antimicrobianos, incluindo vancomicina (VRE), considerada o mais potente agente que pode ser empregado no combate de infecções enterocócicas (EMANEINI et al, 2016).

E. faecalis é capaz de obter resistência através de transferências de plasmídeos, mudanças cromossômicas e mutações. *E. faecalis* funciona também como fonte de resistência antimicrobiana para outras espécies de patógenos, é o caso da transferência de genes envolvidos na resistência à vancomicina para *S. aureus*, resultando em cepas de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) (JAKOVAC et al, 2017; BRAGA et al, 2018).

A elevada ocorrência de VRE traz consigo uma preocupação global e seu destaque como um dos principais patógenos envolvidos em infecções nosocomiais se deve à sua elevada propensão a habitar o trato gastrointestinal, persistência em ambientes hospitalares, plasticidade de seu genoma, posse de elementos genéticos móveis e aumentada mortalidade (SABOUNI et al, 2016).

A epidemiologia de VRE varia bastante entre hospitais, uma vez que depende de diferentes aspectos, como o tipo de população de pacientes, padrões de uso de antibióticos e localização geográfica (SABOUNI et al, 2016). Isso dificulta o real dimensionamento do problema, importante para a elaboração de novas abordagens terapêuticas.

3.1.1.6. *Enterobacter hormaechei*

Bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* são microorganismos anaeróbios facultativos Gram-negativos. São saprofíticos, sendo encontrados no solo e em esgotos, além de comporem a flora comensal endógena do trato gastrointestinal humano, o que dificulta estratégias de controle e prevenção (MEZZATESTA et al, 2012).

Espécies que integram o complexo *Enterobacter cloacae* são amplamente encontradas na natureza e podem atuar como patógenos. Existe uma heterogeneidade genômica nesse grupo, que comporta seis espécies: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* e *Enterobacter nimipressuralis* (TOWNSEND et al, 2008; MEZZATESTA et al, 2012).

Dentre esses, *E. hormaechei* é um dos patógenos mais clinicamente encontrados em humanos. As cepas pertencentes ao complexo *E. cloacae* estão entre as mais comuns causa de bacteremias nosocomiais provocadas por espécies *Enterobacter*, que por sua vez encontram-se entre os dez patógenos mais frequentes em UTIs. As espécies desse complexo também são responsáveis, em menor grau, por causar infecções urinárias, dérmicas e intra-abdominais, além de endocardite, artrite séptica e osteomielite (MEZZATESTA et al, 2012).

São patógenos que possuem a tendência a contaminar materiais hospitalares, como equipamentos cirúrgicos e soluções de heparina utilizadas para irrigar dispositivos intravasculares, por isso esses microorganismos são frequente causa de bacteremias nosocomiais associadas a cateteres. *E. hormaechei* tem sido associado a infecções sépticas em unidades neonatais, podendo ser transmitido a recém-nascidos por meio de fluidos intravenosos contaminados, soluções de nutrição parenteral e equipamentos médicos (MEZZATESTA et al, 2012).

Estudos recentes revelam elevada prevalência de ESBL em *E. hormaechei*, o que inviabiliza o tratamento com penicilinas e todas as gerações de cefalosporinas, restando apenas cefamicinas e carbapenêmicos. Colistina é o último recurso disponível para tratar

infecções de risco de vida quando a cepa *Enterobacter* infectante é resistente a carbapenêmicos. Dessa maneira, a recente detecção de resistência a colistina em certas regiões é bastante alarmante, visto que configura uma infecção intratável (MEZZATESTA et al, 2012; OMS, 2018d).

3.1.2. MELANOMA

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças, caracterizadas pelo crescimento anormal e irregular de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou se espalhar para outros órgãos. As causas são mutações genéticas oriundas de fatores herdados ou de estímulos ambientais, confluindo em um conjunto de alterações bastante características, como: ativação de proto-oncogenes, desativação de genes supressores de tumor, inativação de mecanismos de apoptose, angiogênese intensa, evasão ao sistema imunológico e ilimitado potencial replicativo (LIBÉRIO et al, 2013; MULDER et al, 2013; SARKAR et al, 2013; OMS, 2018f).

Câncer pode afetar quase todas as partes do corpo e possui muitos subtipos anatômicos e moleculares. Consiste na segunda principal causa de mortalidade global, responsável pela morte de 8,8 milhões de pessoas apenas em 2015 (OMS, 2018f).

Apesar dos recentes avanços na área, câncer de pele ainda é considerado uma das mais devastadoras doenças do mundo moderno e estima-se que sua incidência é de um em cada três cânceres diagnosticados. Melanomas representam apenas um dos tipos de câncer de pele, um pequeno subconjunto de grande impacto na saúde pública, visto que é considerado o neoplasma cutâneo mais fatal e uma crescente malignidade entre a população mais jovem. Prova disso é o fato de 80% das mortes atribuídas a câncer de pele serem causadas por melanoma, além de possuírem risco de metástase aumentado (EVANS et al, 2013; GORANTLA e KIRKWOOD, 2014; CARVALHO et al, 2015; OMS, 2018g).

Melanoma afeta células da epiderme chamadas melanócitos, os quais produzem o pigmento melanina, responsável por proteger a pele da radiação ultravioleta (UV).

Alguns dos fatores de risco que tornam o indivíduo mais suscetível a esse tipo de câncer são: excessiva exposição ao sol, histórico de queimaduras solares, pele clara, histórico familiar de melanoma e imunossupressão decorrente de envelhecimento (SOMASUNDARAM et al, 2013; GORANTLA e KIRKWOOD, 2014; OMS, 2018g).

Atualmente, cerca de 132.000 casos de melanoma ocorrem globalmente a cada ano, com crescente incidência na ordem de 3% a 8% anualmente. Projeta-se uma elevação ainda maior nesse número devido ao comprometimento da camada de ozônio, responsável por filtrar os raios solares ultravioletas. Acredita-se que um decréscimo de 10% nos níveis de ozônio resultará em 4.500 casos de melanoma adicionais (CARVALHO et al, 2015; OMS, 2018g).

O tratamento de melanoma normalmente requer cirurgia e para os tumores em estágio mais avançado a combinação de terapias quimioterápicas, adjuvantes, imunológicas e alvo-direcionadas tem se mostrado a melhor abordagem. Isso porque monoterapias com dacarbazina, fotemustina e temozolomida demonstram baixa efetividade e rápido desenvolvimento de resistência por parte do tumor (ASCIERTO et al, 2014; GORANTLA e KIRKWOOD, 2014; SONDAK e GIBNEY, 2014; CARVALHO et al, 2015).

A necessidade de politerapias se deve principalmente ao fato de melanomas serem neoplasmas altamente heterogênicos, compostos por subpopulações de células com distintos fenótipos moleculares e biológicos. Tal diversidade colabora para a ocorrência de autorrenovação, diferenciação, iniciação, progressão e manutenção tumoral, bem como para a resistência aos tratamentos (SOMASUNDARAM et al, 2013).

Monoterapias normalmente afetam apenas algumas subpopulações tumorais, permitindo que as demais sobrevivam e repopulem o tumor apenas com clones resistentes. Em vista disso, fica clara a necessidade de constante pesquisa e descoberta de novas drogas antitumorais, compondo assim um rico arsenal para a escolha da melhor combinação de fármacos no tratamento de melanomas (SOMASUNDARAM et al, 2013).

3.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são compostos naturais evolutivamente conservados que estão presentes em muitas formas de vida, integrando a imunidade inata dos organismos, ou seja, atuando como primeira linha de defesa imediata. Servem tanto como barreiras de defesa constitutivas (substâncias naturalmente produzidas) quanto induzidas (ativadas após exposição à ameaça). Mais de 2000 PAMs de fontes diversas têm sido listados como moléculas dotadas de amplo espectro de atividades, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e até mesmo imunomodulatória (RAHNAMAEIAN, 2011; MULDER et al, 2013; ANGÉLIQUE et al, 2015).

PAMS normalmente possuem entre 12 e 50 aminoácidos. Apesar das diferenças em suas estruturas secundárias, a grande maioria dessas moléculas compartilha certas características. São majoritariamente catiônicos, a presença de resíduos básicos como lisina, arginina e histidina lhes confere carga positiva em pH neutro; costumam ser hidrofóbicos, possuindo entre 50 a 70% de sua estrutura formada por aminoácidos desse tipo; são comumente anfipáticos e muitos apresentam conformação alfa-hélice quando em contato com membranas (ABRAHAM et al, 2014; CONLON et al, 2014a; MANGONI et al, 2015; TRIANA-VIDAL et al, 2017).

Apesar da ausência de um consenso definitivo a respeito de sequências de aminoácidos associadas à atividade biológica de PAMs, certos parâmetros estão diretamente correlacionados ao seu mecanismo de ação, potência e seletividade (NARAYANA e CHEN, 2015; ANGÉLIQUE et al, 2015).

A cationicidade está relacionada à distribuição de cargas positivas na estrutura primária dos peptídeos e representa um importante fator na atração e ligação de PAMs a alvos microbianos e tumorais (MULDER et al, 2013; MANGONI et al, 2015; GUIMARÃES et al, 2016). Diferenças entre as composição das membranas de células eucarióticas saudáveis, tumorais e células procarióticas explicam a seletividade observada na ação citolítica de PAMs, tanto no âmbito microbicida quanto anticancerígeno (MULDER et al, 2013; MALMSTEN et al, 2014).

PAMs positivamente carregados são eletrostaticamente atraídos por lipídios aniônicos existentes na superfície de microorganismos, como lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias Gram-negativas e ácido lipoteicóico (LTA) existente em Gram-positivas, como ilustrado na Figura 3 (MALMSTEN et al, 2014; MANGONI et al, 2015).

Atração similar ocorre com a membrana celular de células tumorais, que expressam uma quantidade acima do normal de moléculas de carga negativa, como fosfatidilserina, heparan sulfato e glicoproteínas enriquecidas com ácido siálico. Em adição, células tumorais possuem colesterol em quantidade reduzida, o que facilita a desestabilização dessa membrana mais fluida. Além disso, a superfície dessas células é dotada de muitas microvilosidades, ampliando a área de superfície disponível para ancoragem de peptídeos (MULDER et al, 2013; COSTA, 2012).

Em contraste, células saudáveis eucarióticas possuem membrana predominantemente composta por elementos de carga neutra, tais como colesterol e lipídeos zwitteriônicos, resultando em fraca interação com PAMs e reduzida toxicidade contra essas células (MULDER et al, 2013; MALMSTEN et al, 2014; MANGONI et al, 2015).

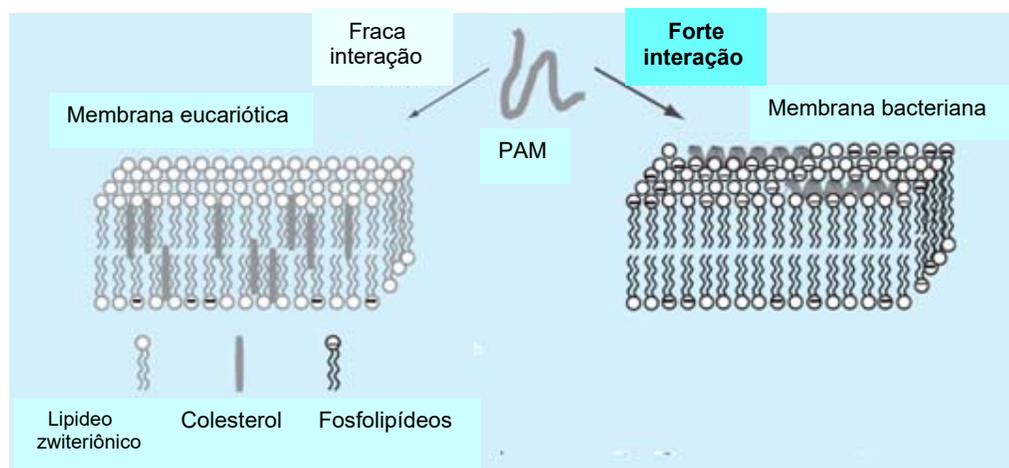


Figura 3. Interações diferenciais de PAMs com membranas eucarióticas e procarióticas. A atração eletrostática dessas moléculas é mais intensa contra membranas aniônicas e mais fraca contra membranas neutras (Fonte: adaptado de KANG et al, 2014).

O mecanismo de ação de PAMs se baseia primariamente na ruptura física de membranas celulares aniônicas e consequente extravasamento de seu conteúdo citosólico (MANGONI et al, 2015). Porém alguns desses peptídeos também são capazes de adentrar as células alvo sem provocar danos em seu envoltório, interferindo apenas em processos intracelulares como síntese de proteínas, de RNA mensageiro, de ácidos nucleicos e de parede celular, além do recrutamento de células imunes e ativação de atividade enzimática (KANG et al, 2014; AHMAD et al, 2012; TRIANA-VIDAL et al, 2017).

Características como tamanho, hidrofobicidade, anfipaticidade e conformação estrutural de PAMs estão intrinsecamente relacionadas à permeação dessas moléculas na bicamada lipídica de membranas biológicas, com consequências deletérias para as células envolvidas (MANGONI et al, 2015, SANI e SEPAROVIC, 2016).

A lise celular pode se dar de dois possíveis modos, dependendo da extensão da cadeia peptídica, que é um dos fatores que prediz a capacidade de penetração dos PAMs. A formação de poros transmembrânicos é uma ação característica de peptídeos maiores, capazes de atingir o centro hidrofóbico da membrana lipídica. Já a miscelização é um modo de agir comum entre peptídeos menores, que provocam solubilização inespecífica da membrana via ação detergente (MANGONI et al, 2015; SANI e SEPAROVIC, 2016).

A hidrofobicidade se refere à habilidade de um composto em se posicionar entre uma fase aquosa e uma fase hidrofóbica, de modo que essa variável regula a extensão da estrutura primária peptídica envolvida na interação com membranas (GUIMARÃES et al, 2016). Elementos hidrofóbicos permitem aos PAMs sua inserção na cadeia acil de membranas fosfolipídicas, evento relacionado à permeabilização dessa estrutura e ao alcance de seu centro hidrofóbico da maneira penetrante necessária à formação de poros, contribuindo para definir a potência do peptídeo (BI et al, 2013; MALMSTEN et al, 2014; SANI e SEPAROVIC, 2016).

A anfipaticidade de PAMs lhes confere características de polaridade importantes para seu contato com membranas celulares, permitindo que esses compostos interajam

tanto com as extremidades negativamente carregadas de fosfolípídeos quanto com cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos, resultando na formação de poros via oligomerização (NAKATSUJI et al, 2012; KANG et al, 2014). Além disso, a frequência ótima de resíduos aminoácidos polares e apolares é determinante para o arranjo molecular em alfa-hélice, conformação favorável à estabilidade e à ação citolítica de PAMs (GUIMARÃES et al, 2016).

Análises por dicroísmo circular revelam que PAMs normalmente carecem de estrutura secundária estável em ambientes aquosos, mas quando em contato com membranas lipídicas assumem configuração em alfa-hélice (CONLON et al, 2014a). Três principais modelos descrevem o surgimento de poros em membranas biológicas pela ação de peptídeos em alfa-hélice: *barrel-stave*, poro toroidal e *carpet-like* (Figura 4). O mecanismo de perturbação da membrana depende de sua composição, do tipo e concentração do peptídeo, da temperatura e pH do meio (SANI e SEPAROVIC, 2016).

Segundo o modelo *barrel-stave*, peptídeos monoméricos aderem à membrana de forma perpendicular e unem-se uns aos outros de modo a circundar um poro aquoso, o que provoca um aumento progressivo do seu tamanho e liberação do conteúdo celular (KANG et al, 2014). No modelo poro toroidal, por sua vez, peptídeos inserem-se também perpendicularmente na bicamada fosfolipídica e mantêm ligações com lipídios adjacentes ao longo de toda a sua estrutura helicoidal. Isso ocasiona rearranjos e dobras na membrana, levando à alteração de sua espessura e surgimento de poros transitórios (ANGÉLIQUE et al, 2015).

Contrastando com os modelos anteriores, que se baseiam em interações hidrofóbicas e de maior profundidade, no modelo *carpet-like*, as ligações são mais superficiais e eletrostáticas. As moléculas de peptídeo distribuem-se paralelamente à membrana como um tapete e ao atingir certo limiar de concentração sua atividade detergente provoca a formação de poros e micelas (ANGÉLIQUE et al, 2015).

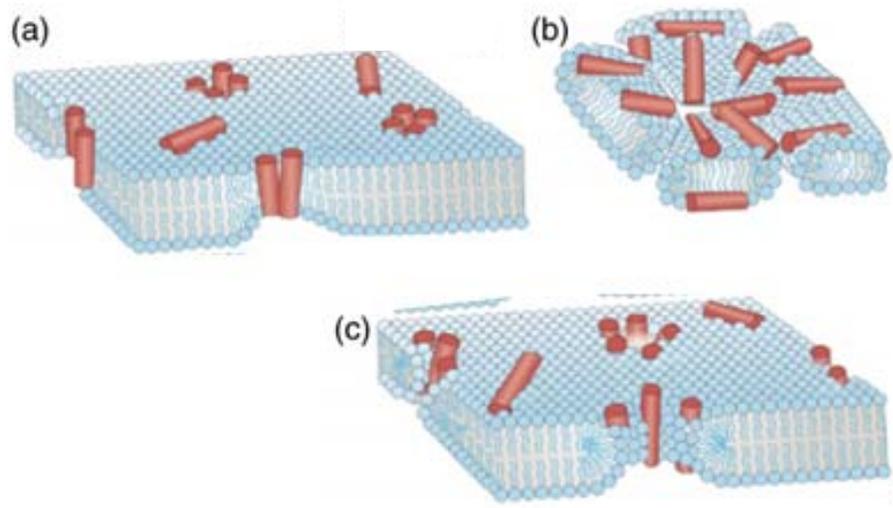


Figura 4. Mecanismos de ruptura de membranas propostos para PAMs. (a) *barrel-stave* (b) *carpet-like* (c) poro toroidal (Fonte: adaptado de ONG et al, 2014).

Apesar da compreensão do impacto desses parâmetros na atividade de PAMs ter crescido exponencialmente, ainda existem limitações ao entendimento das influências isoladas de cada uma dessas variáveis. Isso porque os fatores fisicoquímicos descritos estão intimamente correlacionados, ou seja, mudanças em um interferem na resposta causada pelo outro (GUIMARÃES et al, 2016).

3.2.1. VANTAGENS E SUPERAÇÕES

As vantagens do uso clínico de PAMs em comparação às terapias atuais incluem seu potencial para atividade de amplo espectro, ação mais rápida, reduzida toxicidade e menor propensão para a seleção de resistência, tanto em tratamentos antimicrobianos quanto antitumorais (MULDER et al, 2013; ABRAHAM et al, 2014).

Uma das maiores qualidades antimicrobianas dos PAMs é a possibilidade de um único composto poder ser usado contra alvos múltiplos e diversos simultaneamente. Enquanto antibioticoterapias não são indicadas para tratamentos antivirais e apresentam pouca eficácia contra parasitas, muitos PAMs demonstram atividade contra tais patógenos, complementarmente à sua ação antibacteriana (ANGÉLIQUE et al, 2015).

PAMs demonstram boa penetração tecidual e dinâmica atuação na inserção e ruptura de membranas alvos, de modo que requerem pouco tempo de contato para provocar morte celular (CONLON et al, 2014a; CARVALHO et al, 2015). São excelentes candidatos para terapias que envolvem a combinação de múltiplas drogas, visto que têm demonstrado ação sinérgica com antibióticos e quimioterápicos tradicionais (MULDER et al, 2013; ANGÉLIQUE et al, 2015).

São moléculas normalmente ativas em concentrações micromolares, ou seja, desempenham significativa potência em baixas concentrações inibitórias mínimas (CIMs), além de serem bastante seletivas. Por conseguinte, observa-se diminuída toxicidade para as células saudáveis e menos efeitos adversos, quando comparados aos tratamentos padrão (MULDER et al, 2013; ANGÉLIQUE et al, 2015).

Em virtude da ação citolítica não-específica de PAMs, os microorganismos expostos a esses compostos tendem a exibir resistência em taxas muito menores do que quando em contato com antibióticos convencionais, o mesmo se observa para células tumorais tratadas com PAMs ao invés de quimioterápicos. Isso porque o mecanismo que provoca lise celular não envolve a ligação desses peptídeos em receptores específicos, que são altamente suscetíveis a mutações e, por consequência, à resistência (MANGONI et al, 2015; TRIANA-VIDAL et al, 2017).

O que ocorre na verdade é uma interação não-específica e destrutiva com a membrana fosfolipídica, sendo esse um modo de ação bastante diverso dos fármacos atuais e que portanto não sofre com as resistências já existentes às classes terapêuticas em vigência (MANGONI et al, 2015; TRIANA-VIDAL et al, 2017). Além disso, é bastante difícil para uma célula mudar radicalmente a organização de sua membrana plasmática, de forma que estudos laboratoriais e clínicos confirmam que o surgimento de resistência a PAMs é bastante improvável (AMISHE et al, 2011).

No que diz respeito à aplicação clínica antitumoral de PAMs existem benefícios farmacológicos adicionais, visto que além de induzirem a morte de células tumorais pelo rompimento de suas membranas plasmáticas, alguns são capazes de instigar apoptose

pela via mitocondrial, atuar como fatores antiangiogênicos e prevenir metástases (CONLON et al, 2014a; CARVALHO et al, 2015).

Mesmo sendo considerada uma das mais promissoras classes de novas drogas, PAMs ainda possuem certas limitações que, contudo, podem ser superadas pelo desenvolvimento de análogos, sintetizados a partir das sequências originais de peptídeos selvagens (AHMAD et al, 2012).

A primeira geração de PAMs de ocorrência natural forneceu importantes informações sobre a relação estrutura-atividade desses compostos, servindo de base para o desenho racional de análogos com características otimizadas e compatíveis com seu emprego clínico na realidade prática (ONG et al, 2014). No que concerne à viabilidade comercial e terapêutica de PAMs, algumas modificações em sua estrutura primária são reconhecidamente benéficas, porém certos parâmetros devem ser manipulados na medida correta (BROGDEN e BROGDEN, 2011; SUN et al, 2014).

A propriedade catiônica de peptídeos pode ser realçada pela amidação do domínio carboxi-terminal ou pela inserção de resíduos de aminoácidos de carga positiva, o que confere melhoria na atividade biológica e na capacidade de discriminar alvos. No entanto, tais alterações devem ser feitas na devida proporção, de modo a não comprometer a estabilidade da estrutura peptídica com interações eletrostáticas excessivas (FJELL et al, 2011; GUIMARÃES et al, 2016).

Um aumento na hidrofobicidade está associado a uma maior capacidade de perturbação de membranas, potência de ação aumentada e impedimento da inativação peptídica em condições fisiológicas. Contudo, se essa propriedade é exacerbada acima de certo grau, pode causar elevação da toxicidade hemolítica e perda da seletividade (SUN et al, 2014; MALMSTEN et al, 2014; GUIMARÃES et al, 2016).

A extensão da cadeia peptídica também é um fator a ser manipulado com moderação. O custo de produção de peptídeos é reduzido quando esses apresentam sequências mais curtas, aspecto relevante para que PAMs se tornem drogas acessíveis e rentáveis em escala industrial, porém, moléculas peptídicas muito pequenas demonstram

diminuída ligação a membranas, reduzido potencial destrutivo e menor tendência à formação de alfa-hélice (ONG et al, 2014; MALMSTEN et al, 2014).

Modificações estruturais de peptídeos selvagens por meio de inserção, substituição, deleção e embaralhamento de resíduos aminoácidos consiste, portanto, em eficaz maneira de obtenção de análogos melhorados, finalmente aproximando PAMs de seu real emprego clínico (AHMAD et al, 2012).

3.2.2. PAMs DE ANUROS

Lissanfíbios representam os descendentes modernos do mais antigo grupo tetrápode e abrangem todos os anfíbios vivos. Distribuem-se por todos os continentes, exceto Antártida, e são muito diversos, visto que na transição do ambiente aquático para o terrestre foram capazes de se adaptar a habitats bastante extremos e variados (KÖNIG et al, 2015).

Um total de 7.302 espécies de anfíbios já foram descritas e classificadas em três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata (salamandras) e Ápoda (cecílias), sendo que 88% desse total são compostos por anuros, como mostra a Figura 5 (KÖNIG et al, 2015).

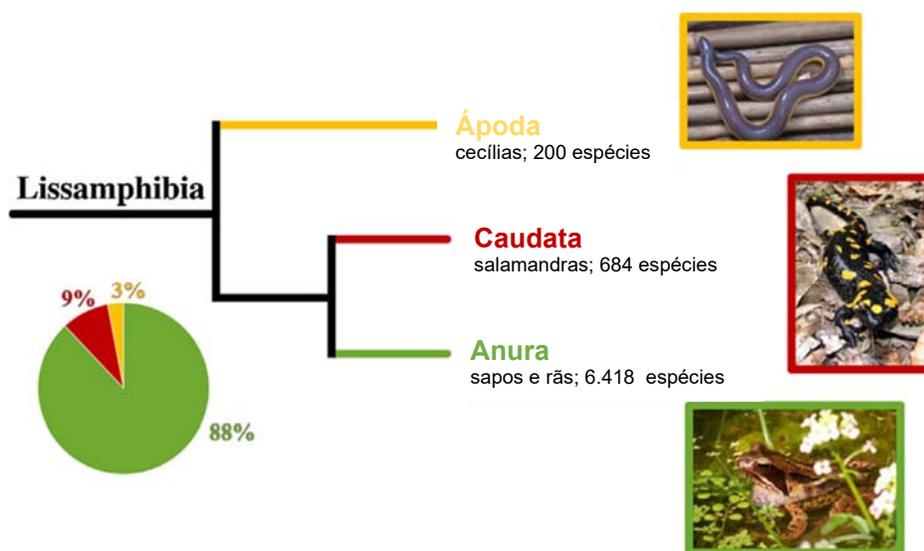


Figura 5. As três ordens de lissanfíbios, com seus respectivos números de espécies.

(Fonte: adaptado de KÖNIG et al, 2015)

No Brasil existem 1026 espécies – a maior riqueza mundial em anfíbios – sendo 988 espécies pertencentes à ordem Anura (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2015).

A mudança para o meio terrestre exigiu dos anfíbios drásticas alterações, principalmente fisiológicas, como a melhor manutenção do balanço hídrico, reajuste da respiração em resposta a uma diferente saturação de oxigênio e aclimatação às grandes variações de temperatura. Em face disso, algumas características foram evolutivamente conservadas nesse grupo, tais como as radicais adaptações sofridas pela pele desses animais (KÖNIG et al, 2015).

Anfíbios possuem uma pele bastante permeável, expondo-os aos riscos de desidratação e entrada de constituintes hostis. Uma dessas ameaças resulta da poluição ambiental provocada pelos seres humanos, fator que explica os recentes declínios e extinções populacionais, que comprometem quase 1/3 das espécies de anfíbios (KÖNIG et al, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2015).

A pele de anfíbios é um órgão altamente especializado, responsável por funções como respiração, osmorregulação e termorregulação, além de ser particularmente caracterizado por seu impressionante aparato exócrino, com numerosas glândulas mucosas e granulosas. Enquanto as secreções mucosas representam discretas quantidades de mucopolissacarídeos, liberadas constitutivamente para manter a natureza úmida da pele, as secreções granulosas são compostas por substâncias nocivas excretadas em resposta a um estímulo estressor, como o ataque de predadores (KÖNIG et al, 2015).

Durante parte de seu ciclo de vida, anuros são confinados, por necessidade, em um ambiente úmido e aquecido que favorece o crescimento de bactérias e fungos prejudiciais, portanto não é surpresa que esses animais tenham desenvolvido mecanismos de defesa bastante sofisticados em sua pele, como os PAMs, sintetizados em suas glândulas granulosas. A secreção cutânea de anuros tem sido vastamente estudada em função de

sua rica composição, dotada de compostos bioativos de interesse, como aminas biogênicas, bufadienolídeos, alcaloides, esteroides, proteínas e peptídeos (CONLON et al, 2007; TRIANA-VIDAL et al, 2017).

Ao se examinar as diversas fontes naturais de PAMs, observa-se que anfíbios são responsáveis por 40% de todas as sequências peptídicas descobertas até então, o que representa mais de 600 compostos, destacando a pele desse grupo como estoque particularmente rico em PAMs (AMISHE et al, 2011). O potencial farmacológico de compostos cutâneos de anuros já era conhecido pela medicina tradicional chinesa e egípcia, tendo sido empregados na regulação interna de funções corporais, fertilidade, analgesia e no combate à diarreia (XU e LAI, 2015).

Cada espécie de anuro produz um repertório único de PAMs, composto por peptídeos completamente diversos entre si (NACIF-MARÇAL et al, 2015). A família Hylidae é responsável pela produção de um grande conjunto de PAMs lineares e encontra-se largamente distribuída entre Europa, Ásia, Austrália e América, com cerca de 870 espécies conhecidas (TRIANA-VIDAL et al, 2017). Hylidae se divide em várias subfamílias, como a Hylinae, que até recentemente abrangia cerca de 43 gêneros (CONLON et al, 2014b).

Um dos gêneros mais representativos e pouco estudados é o *Dendropsophus*, grupo bastante complexo taxonomicamente devido à grande similaridade morfológica entre as espécies pertencentes. Esse grupo é atualmente composto por 96 espécies endêmicas de florestas e áreas abertas da América Central e América do Sul (ORRICO et al, 2014; FERREIRA et al, 2015; TRIANA-VIDAL et al, 2017).

A espécie *Dendropsophus columbianus* (Figura 6) possui alta capacidade de adaptação e distribui-se amplamente pelo território colombiano. É comum encontrá-la em áreas de forte intervenção antrópica e ambientes bastante contaminados, mas seu habitat natural consiste em lagos, pastagens e bordas de florestas. Seu tamanho varia entre 25 e 36 mm de comprimento, possui costas amarelas com diagramas amarronzados. Machos diferem de fêmeas por serem menores e possuírem coloração mais clara na barriga

(TRIANA-VIDAL et al, 2017; RAMÍREZ-CHAVES et al, 2018). Não é considerada uma espécie ameaçada de extinção (IUCN, 2017).



Figura 6. Anuro *Dendropsophus columbianus* (Fonte: BATRACHIA, 2013).

Triana-Vidal e colaboradores (2017) isolaram e descreveram o primeiro peptídeo oriundo da pele de *Dendropsophus columbianus*, chamado de dendropsofina 1 (Dc1), um PAM com baixa e limitada potência antimicrobiana, abrindo caminho para a busca por análogos de potência otimizada.

Desse modo, os resultados obtidos no presente trabalho colaboram para uma maior elucidação da atividade biológica, estrutura secundária e toxicidade de análogos de Dc1, contribuição essa que configura mais um passo em direção ao futuro uso terapêutico de PAMs de anuros.

4. METODOLOGIA

4.1. SÍNTESE QUÍMICA E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE INTERESSE

O peptídeo Dc1 e os seus análogos sintéticos propostos pelo Grupo de Tecnologia de Peptídeos Biologicamente Ativos da UnB foram produzidos por síntese química pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil) empregando-se a química Fmoc (9-fluorenil-metoxicarbonil). O resultado foi a obtenção de 5 análogos diferentes (1, 2, 3, 4 e 5), além do peptídeo selvagem (Dc1). O controle de qualidade foi realizado mediante análises por espectrometria de massas para se determinar se foram corretamente sintetizados.

4.2. DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS

O material foi dosado no espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51). A leitura das absorbâncias foi realizada nos comprimentos de onda 205 nm, 215 nm e 225 nm, sendo esse protocolo resultante do que foi preconizado por Aitken e Learmonth (2002), e pela *Experimental Bioscience* (2015) em relação aos métodos de dosagem de proteínas. O cálculo que permite obter a concentração protéica em µg/mL a partir das medidas de absorbância está descrito abaixo:

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

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

O volume total do estoque de cada peptídeo foi alíquotado em eppendorfs de 1 mL, que posteriormente foram secos em SpeedVac (Modelo SC 100, Savant).

4.3. ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROÍSMO CIRCULAR

As análises por dicróismo circular foram realizadas no espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão), na temperatura constante de 25°C e

utilizando-se cubeta de quartzo de caminho óptico igual a 0,1 cm. Os espectros UV foram analisados nos comprimentos de onda entre 190 nm e 260 nm, resultando da média de cinco medidas consecutivas.

A partir de soluções peptídicas a 50 µM em água e a 50 µM em dodecilsulfato de sódio (SDS, Amershan Biosciences) a 35 mM, foram gerados os espectros dicróicos em água e em SDS dos 6 peptídeos analisados. As elipticidades observadas foram convertidas em elipticidade molar utilizando a seguinte equação:

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

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

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

4.4. ENSAIOS ANTIPROLIFERATIVOS SOBRE MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS

Linhagens referenciais de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Enterobacter hormaechei* ATCC 700323; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; *Escherichia coli* ATCC 25922) foram obtidas do Banco de Culturas do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília. Já as cepas de *Candida albicans* (ATCC 14053), foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do LACEN – DF.

As cepas de bactérias foram cultivadas em 7 mL de meio Mueller-Hinton (Vetec Química Fina LTDA), enquanto que o inóculo de levedura foi cultivado em mesmo volume de meio BHI (Brain Heart Infusion, Acumedia), ambos os meios previamente autoclavados. Para todos os microorganismos o processo que se seguiu foi o mesmo: cultivo *overnight* sob agitação constante e a 37°C em incubadora *shaker* de bancada (Cientec, CT-712). O crescimento foi considerado satisfatório quando os meios de cultivo atingiram densidade

óptica igual a 1 em 595 nm, fato averiguado em espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51).

Os microorganismos, em fase logarítmica, foram diluídos em seus respectivos meios de crescimento nas proporções 1:50 para as bactérias Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas e para a levedura, de modo a se obter suspensões de volume final de 12 mL.

Amostras na concentração de 256 μM foram esterilizadas por filtração em filtro Millex GV 0,22. A partir de 100 μL do material filtrado de cada amostra, foram preparadas diluições seriadas em placa de microtitulação estéril (96 poços, fundo chato), resultando em um volume de 50 μL de amostra por poço. Os peptídeos foram então incubados com 50 μL de suspensão bacteriana/fúngica, contendo aproximadamente entre 2 a 7×10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFCs), no caso das bactérias, e 2×10^3 UFCs para a levedura. Isso significa a obtenção de um volume final de 100 μL em cada poço, com concentrações finais de amostra que variam de 128 μM a 1 μM , testadas contra cada um dos 6 patógenos em questão mediante uma incubação em estufa (Retilínea, Fanem LTDA, Brasil) por 22 horas a 37°C.

Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído na concentração final de 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados também com 50 μL das suspensões microbianas. O crescimento foi determinado pela leitura da densidade óptica a 595 nm com uma leitora de placas (Multiskan[®]FC, Thermo Scientific, EUA). A concentração inibitória mínima (CIM) para cada análogo foi assumida como sendo a menor concentração onde não houve crescimento detectável espectrofotometricamente. Todos os ensaios foram realizados em capelas de fluxo laminar (VECO, Brasil) esterilizadas com álcool 70% e luz UV.

4.5. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS TUMORAIS

Células tumorais de melanoma murino da linhagem B16F10 foram retiradas do freezer de armazenamento e rapidamente descongeladas por homogeneização com meio

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) completo, preparado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de antibiótico. A solução resultante foi centrifugada de maneira padrão, por 5 minutos a 2000 rotações por minuto (rpm), a fim de se eliminar o dimetilsulfóxido (DMSO) presente no sobrenadante formado, que foi descartado.

O *pellet* de células obtido foi ressuscitado em meio e transferido para garrafas de cultura de células. As células foram incubadas em estufa (incubadora de CO₂ TE-399, Tecnal) nas condições padrão, a 37°C e com saturação de CO₂ de 5%. Trocas de meio e "passagens" foram realizadas sempre que necessário.

Ao atingir o estágio de confluência, as células foram removidas das garrafas de cultura por tripsinização, sendo centrifugadas em seguida. O sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas em 1 mL de meio de cultura. Para a determinação do número de células, 10 µL da suspensão obtida foi adicionada a 90 µL de solução de azul tripan. Uma alíquota de 10 µL dessa mistura foi depositada em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio óptico. O número de células por mL foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados (=4)}} \times \text{fator de diluição (=10)} \times 10^4$$

Sabendo-se o número de células/poço necessário para ensaios com essa linhagem (7 x 10³ células), calculou-se a correta proporção em que células e meio de cultura devem ser misturados. A suspensão celular resultante foi incubada *overnight* em estufa, almejando-se completa adesão celular no fundo da microplaca.

Amostras a 512 µM passaram por filtração estéril em filtro Millex GV 0,22. A partir desse material filtrado, foram feitas as diluições seriadas em microplaca estéril. Depois disso, todos os poços receberam meio de cultura, resultando em concentrações de peptídeo de 128 µM a 1 µM e em controles compostos apenas por água Milli-Q e meio.

Todo o volume existente nos poços da microplaca de células preparada no dia anterior foi retirado e substituído pelas diluições seriadas de peptídeo em meio e controles,

situados em outra placa. Dessa forma, as células permanecem aderidas no fundo dos poços e são incubadas com as amostras e controles em estufa por 24 horas.

Após ser completado o período de incubação, as placas tiveram novamente todo o volume de seus poços retirado e substituído, fileira por fileira, agora por uma solução de MTT 10% (p/v) preparado em meio de cultura. Um volume de 150 μ L dessa solução foi colocado em cada poço e as placas retornaram à estufa por 1 hora e meia. Concluído esse intervalo, o conteúdo líquido das placas foi descartado e substituído por 100 μ L de DMSO em cada poço, de modo que alguns minutos depois avaliou-se por espectrofotometria a 595 nm (Multiskan[®]FC, Thermo Scientific, EUA).

Os dados espectrofotométricos obtidos foram convertidos em percentuais de viabilidade celular por meio do software GraphPad Prism. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENHO RACIONAL DE ANÁLOGOS

O peptídeo dendropsofina 1 (Dc1) foi descrito por Triana-Vidal e colaboradores (2017) como um composto de atividade antibacteriana moderada e sem significantes efeitos hemolíticos e citotóxicos em células de mamíferos. Com o intuito de otimizar sua potência sem proporcional ganho de toxicidade, o presente trabalho propôs o desenho racional de análogos segundo a abordagem *Template*. De acordo com essa metodologia, modificações na estrutura primária (adição, deleção e substituição de aminoácidos; alteração nas porções N- e C-terminal) são realizadas de forma sistemática, avaliando-se os impactos nas propriedades do peptídeo por meio de diferentes testes (GUIMARÃES et al, 2016).

Os análogos abordados no trabalho de Triana-Vidal e colaboradores (2017) estão entre os peptídeos analisados no presente projeto, de modo que correspondem aos análogos 4 e 5 aqui descritos. Além desses, três análogos inéditos (1, 2, 3) também foram avaliados. Alguns parâmetros físico-químicos dos seis peptídeos avaliados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos do peptídeo selvagem Dc1 e seus análogos.

Peptídeo	Carga	Hidrofbicidade (%)
Dc1	0	41
1	+4	46
2	+3	50
3	+3	50
4	+4	52
5	+2	41

Em relação ao peptídeo selvagem Dc1, o análogo 5 foi desenhado de modo a aumentar a carga positiva da molécula, que deixou de ser neutra e passou a ser +2,

buscando melhoria da atividade por meio do favorecimento de ligações eletrostáticas com membranas alvo. Já para o análogo 4, as modificações implementadas impactaram em um aumento da carga para +4 e no ganho de percentual hidrofóbico de 41 para 52%.

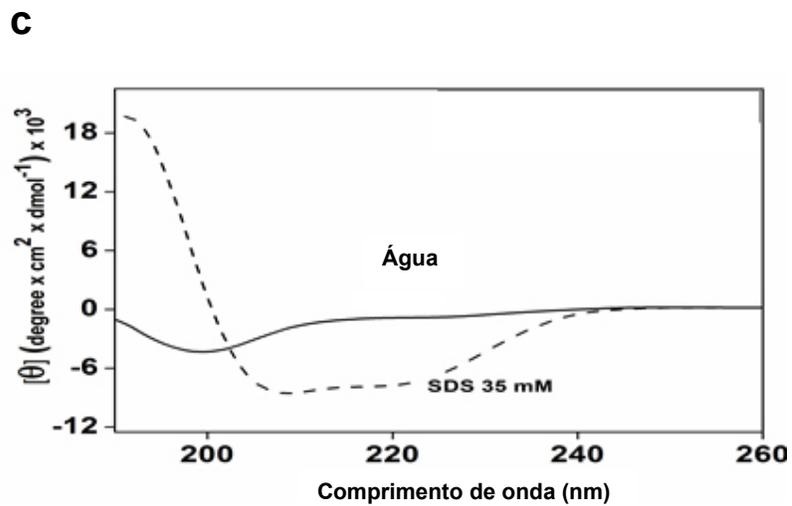
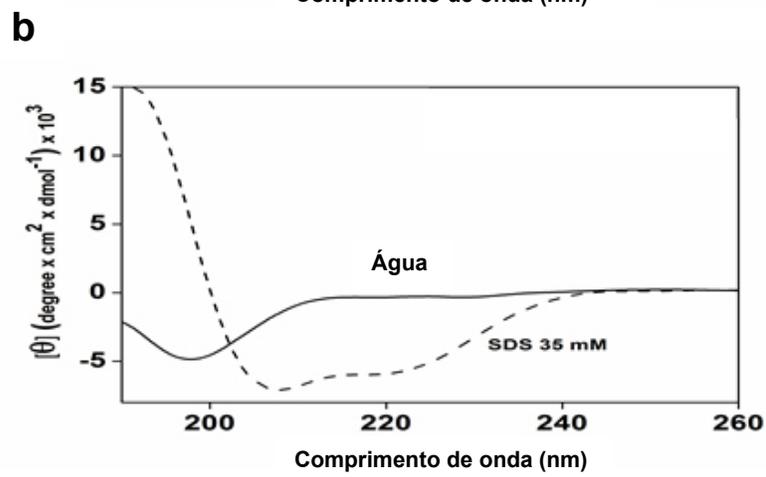
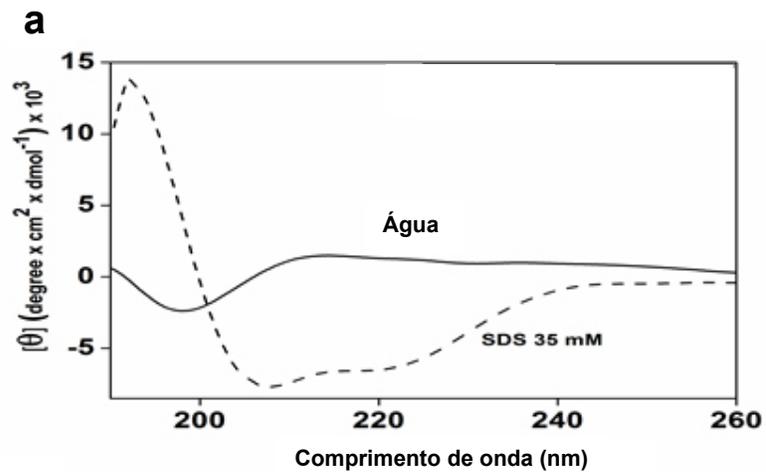
As alterações implementadas no análogo 1 resultaram em carga +4 e percentual de hidrofobicidade de 46%, índices esses aumentados em relação ao composto *wild-type*. A manipulação do análogo 2 representou um decréscimo na carga positiva para +2 e um ganho de hidrofobicidade para 50%, comparando-se com o análogo 1.

Por fim, o peptídeo 3 foi pensado de modo a ampliar-se a face apolar da alfa-hélice, além de reduzir-se ao máximo sua extensão peptídica, testando assim os limites com que esses tipos de modificações podem ser efetuadas e até que ponto são benéficas para a atividade da molécula. O saldo final das alterações implementadas foi uma carga de +3 e um percentual de hidrofobicidade de 50%.

5.2. ENSAIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR

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

Os peptídeos foram avaliados em solução aquosa e na presença de SDS, solvente comumente usado para mimetizar o ambiente hidrofóbico de membranas. Todos os peptídeos apresentaram estrutura desordenada em água, sem preferências conformacionais, fato evidenciado pela presença característica de um mínimo em 198 nm em seus espectros. Já quando em contato com as micelas de SDS, os mesmos peptídeos adquiriram conformação em alfa-hélice bem definida, visto que produziram bandas dicróicas negativas próximas a 208 e 222 nm, padrão espectral típico de peptídeos antimicrobianos lineares nesse arranjo estrutural (Figura 7) (GUSMÃO et al, 2017).



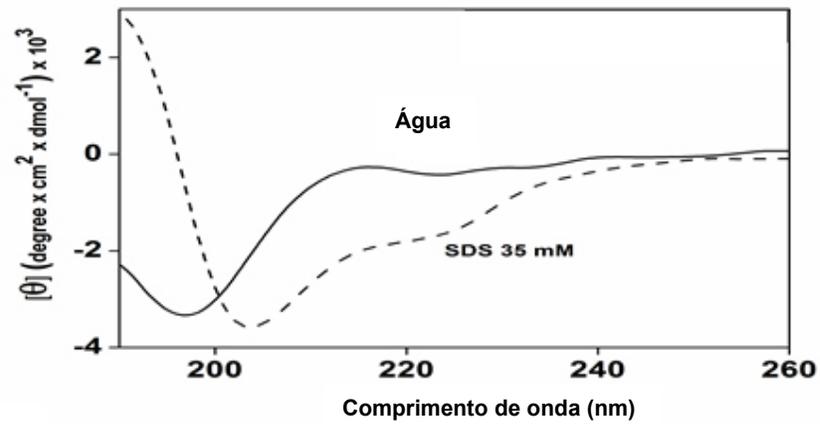
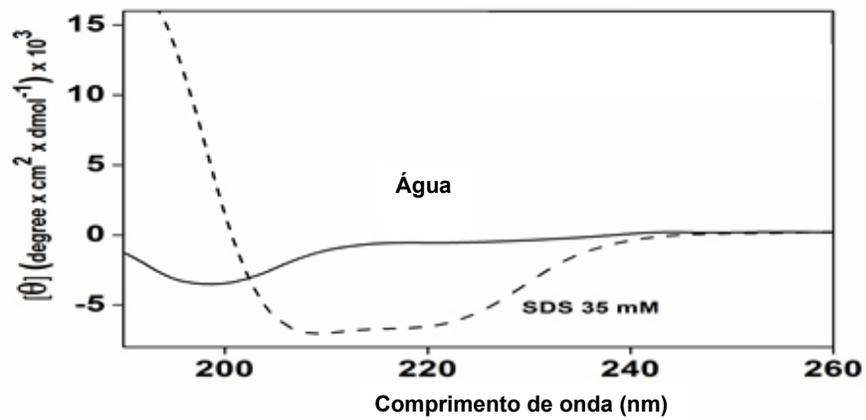
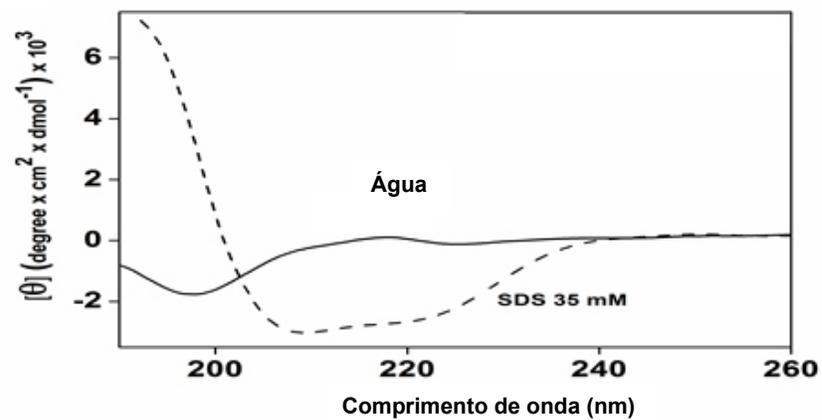
d**e****f**

Figura 7. Espectros dicróicos dos peptídeos a 50 μ M em água (linha contínua) e em SDS 35 mM (linha tracejada). (a) 4; (b) 1; (c) 2; (d) 3; (e) Dc1; (f) 5.

Tais resultados estão em consonância com o que foi descrito por Triana-Vidal e colaboradores (2017) a respeito das tendências estruturais do peptídeo Dc1 e dos análogos 4 e 5.

O percentual de helicidade dos peptídeos (Tabela 3) foi calculado considerando-se a elipticidade molar $[\theta]$ a 208 nm. Os análogos 1, 2 e 4 foram os que apresentaram conformação alfa-hélice em SDS com maior intensidade, por outro lado, as menores porcentagens foram observadas para os análogos 3 e 5.

A capacidade dos peptídeos de sofrerem mudanças em sua estrutura secundária em resposta a condições ambientais tem sido associada a um maior poder de lise de membranas (SUN et al, 2014). A integridade conformacional da alfa-hélice se correlaciona fortemente com propriedades biológicas e biofísicas de peptídeos, o que é consistente com o fato dessa configuração estrutural ser a mais comum dentre os PAMs de ocorrência natural (MAI et al, 2015).

Tabela 3. Conteúdo de estruturas em α -hélice (%) dos peptídeos em água e em SDS 35 mM.

Peptídeo	Solvente	Estrutura α -hélice (%)
Dc1	Água	14.8
	SDS 35mM	29.6
1	Água	14.7
	SDS 35mM	29.9
2	Água	16.5
	SDS 35mM	33.8
3	Água	13.5
	SDS 35mM	19.0
4	Água	9.7
	SDS 35mM	31.5
5	Água	11.8
	SDS 35mM	18.8

5.3. ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

A avaliação do potencial antiproliferativo das amostras sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas (*E. faecalis*, *S. aureus*), Gram-negativas (*E. coli*, *E. hormaechei*,

K. pneumoniae) e levedura (*C. albicans*) foi o ensaio que mais evidenciou comportamentos diversificados entre os peptídeos, fato atribuído tanto às suas características intrínsecas quanto à interação com membranas de diferentes composições (COSTA, 2012).

Os peptídeos Dc1 (*wild-type*) e 5 mostraram-se inativos contra todos os microorganismos testados, em contraponto aos resultados de moderada atividade contra *E. coli* e *S. aureus* encontrados por Triana-Vidal e colaboradores (2017). Apesar da metodologia dos ensaios antimicrobianos ser a mesma, tal diferença possivelmente pode ser atribuída ao uso de divergentes protocolos para dosagem dos peptídeos e devido ao emprego de cepas diferentes de *S. aureus*.

O análogo 3 também não apresentou atividade significativa contra nenhum dos patógenos testados, uma hipótese que pode justificar esse comportamento relaciona-se ao reduzido tamanho de sua cadeia peptídica, visto que peptídeos pequenos possuem menor tendência a formação de estruturas secundárias anfífilas e menor capacidade de penetração em membranas (MALMSTEN et al, 2014).

Tabela 4. Efeitos antiproliferativos (MICs, μM) sobre microorganismos patogênicos dos análogos mais ativos derivados do peptídeo selvagem Dc1.

Microorganismo	Análogo 1	Análogo 2	Análogo 4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	32	16	8
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	128	64	32
<i>E. hormaechei</i> ATCC 700323	64	32	64
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	n.a.	128	n.a.
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	n.a.	n.a.	n.a.
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	16	32	32

n.a.: não apresentou atividade antiproliferativa mesmo na maior concentração empregada.

Já os peptídeos 1, 2 e 4 revelaram diferentes capacidades antiproliferativas para as cepas alvo (Tabela 4), excetuando-se *S. aureus*, para o qual nenhum composto obteve ação inibitória nas concentrações testadas. Esses três análogos também produziram efeito nulo ou mínimo sobre *E. faecalis*, evidenciando que suas ações contra bactérias Gram-positivas são mais modestas, visto que todos os menores MICs foram obtidos contra as bactérias Gram-negativas e a levedura avaliadas.

Uma possível explicação para tal comportamento reside nas diferenças encontradas nas membranas desses dois tipos bacterianos. Gram-positivas possuem uma camada de peptidoglicano mais espessa do que Gram-negativas, o que resulta em uma rígida rede de proteção que lhes confere melhor integridade estrutural, fato que pode torná-las menos suscetíveis a certos PAMs (HEYS et al, 2014).

O análogo 4 foi o responsável pelo menor MIC encontrado (8 μ M contra *E. coli*) e, de maneira geral, foi também o peptídeo mais ativo. Esse satisfatório desempenho provavelmente se correlaciona com desejáveis propriedades desse peptídeo.

Cationicidade, razão hidrofóbica e momento anfipático se correlacionam com a capacidade de PAMs em permeabilizarem bicamadas lipídicas negativas (TRIANA-VIDAL et al, 2017). O análogo em questão mostrou-se dotado da maior carga positiva, do maior percentual de hidrofobicidade e de um dos mais elevados percentuais de helicidade dentre os compostos testados.

Quando analisado por Triana-Vidal e colaboradores (2017), o peptídeo 4 também se destacou positivamente nos parâmetros citados e na atividade antimicrobiana. Contudo, os MICs relatados por esses pesquisadores nos testes contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* e *S. aureus* divergiram dos valores encontrados nesse trabalho para o análogo em questão, normalmente significando atividades menos proeminentes do que as registradas aqui. Essa discrepância pode ser novamente atribuída aos modos de dosagem peptídica e diferentes cepas de *C. albicans* e *S. aureus* empregadas nos ensaios.

Demonstrou-se assim que determinadas modificações na estrutura primária do peptídeo selvagem mostraram-se mais promissoras do que outras, no que se refere ao

efeito antimicrobiano. Isso representa um ganho no conhecimento das relações estrutura-função desses peptídeos e impulsiona a investigação dos análogos 1, 2 e 4 como potenciais drogas seletivas para bactérias Gram-negativas e fungos, uma vez que todos os MICs apresentados por esses análogos encontram-se dentro da faixa de viabilidade terapêutica.

5.4. ENSAIOS TUMORAIS

A atividade antitumoral dos peptídeos em análise foi avaliada por meio de ensaios de MTT com células de melanoma murino da linhagem B16F10. O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é metabolizado pelas enzimas mitocondriais das células sobreviventes em formazan, composto arroxeadado (Figura 8), de modo que a intensidade da coloração detectada pela leitora de placa é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (SITTAMPALAM e COUSSENS, 2013).

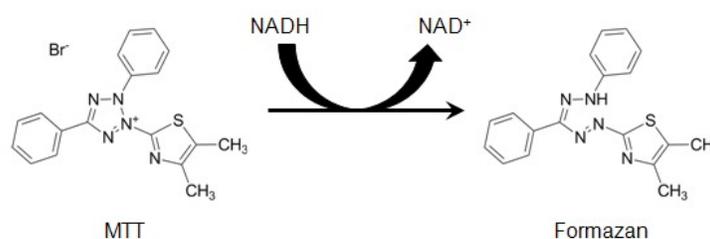


Figura 8. Conversão da molécula de MTT em formazan (Fonte: adaptado de SITTAMPALAM e COUSSENS, 2013).

Nesse experimento, observou-se similar grau de sensibilidade celular frente às incubações com as amostras (análogos e *wild-type*) em diferentes concentrações, o que indica que as modificações implementadas na estrutura primária não surtiram grande efeito em relação à já baixa atividade anticâncer da molécula original. Além disso, apenas as curvas dos peptídeos 1, 2 e 4 revelam um sutil comportamento dose-resposta coerente com o que se espera de análogos de inibição tumoral.

Os testes efetuados resultaram em elevados percentuais de viabilidade celular (Figura 9), constatando-se assim que as células tumorais não foram intensamente afetadas por nenhuma das amostras. Prova disso é o fato do valor de IC_{50} ser superior ao da maior concentração testada (128 μ M).

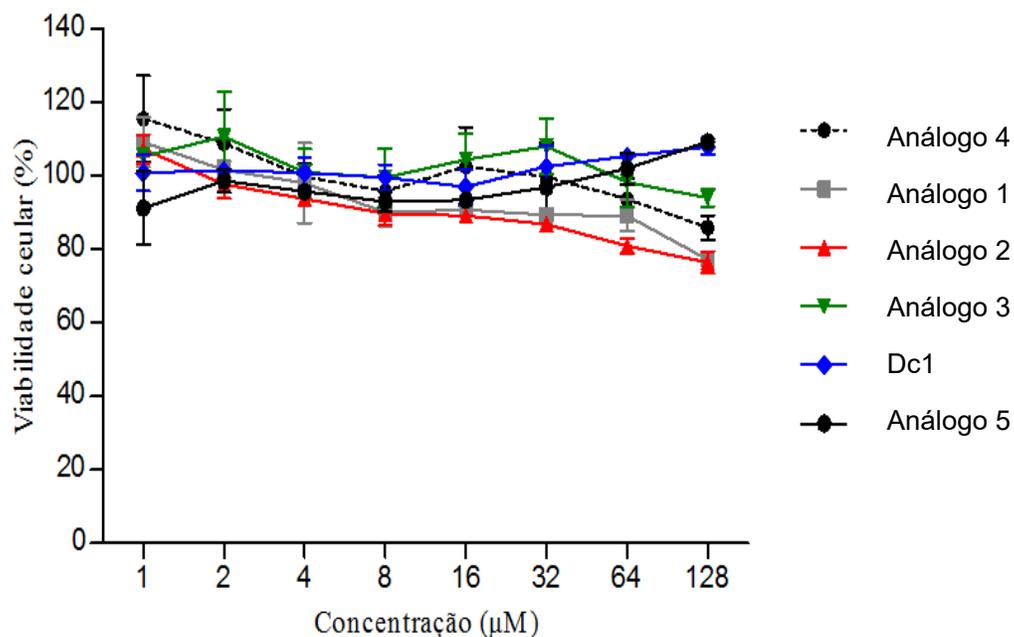


Figura 9. Viabilidade celular da linhagem B16F10 nas diferentes concentrações testadas de cada peptídeo.

Os peptídeos 1 e 2 provocaram os menores percentuais de viabilidade dentre as moléculas testadas, atingindo valores próximos a 80%. O resultado negativo registrado para esse teste é um indício da provável baixa toxicidade dos compostos sobre células de mamíferos, o que corrobora os achados de Triana-Vidal e colaboradores (2017) sobre a ausência de citotoxicidade das moléculas Dc1, 4 e 5 contra mieloblastos murinos.

Os MICs encontrados nos ensaios antimicrobianos são menores do que os valores de IC_{50} , o que indica que os compostos testados desempenham atividade discriminatória entre as membranas de patógenos e de células eucarióticas (TRIANA-VIDAL et al, 2017). Futuramente, poderão ser propostos outros análogos com enfoque no desempenho

anticancer, as novas sequências devem ser sugeridas após extensa revisão da literatura pertinente.

6. CONCLUSÃO

O desenho racional de análogos de PAMs mostrou-se uma estratégia satisfatória no atual cenário de busca por moléculas bioativas. Dentre os cinco análogos testados, três (1, 2 e 4) demonstraram considerável atividade antiproliferativa contra alguns patógenos de grande relevância para a saúde pública mundial. Todos os compostos avaliados foram capazes de adotar o arranjo conformacional de alfa-hélice quando em presença de solvente que mimetiza membranas, capacidade estreitamente relacionada a suas atividades biológicas.

Nenhuma molécula analisada demonstrou potência antitumoral significativa, o que levantou a hipótese de baixa toxicidade contra células de mamíferos.

Peptídeos antimicrobianos oriundos de anuros revelaram-se promissores como futuras alternativas aos tratamentos antimicrobianos atuais, compondo um arsenal de drogas essencial à superação dos casos de resistência.

Este projeto possui a perspectiva de investigar patógenos e linhagens tumorais adicionais, bem como se aprofundar na elucidação do mecanismo de ação desses PAMs e de suas interações sinérgicas com drogas convencionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, P. et al. Structure-activity relationship and mode of action of a frog accreted antibacterial o peptide B1CTcu5 using synthetically and modularly modified or deleted (SMMD). PLoS One. v. 10, n. 5, p. e0124210, 2015.

AHMAD, A. et al. Identification and design of antimicrobial peptides for therapeutic applications. Current Protein and Peptide Science, v. 13, p.211-223, 2012.

AITKEN A.; LEARMONTH, M. P. The Protein Protocols Handbook. 2^a ed. Humana Press Inc. Ottawa, N.J., 2002. Chapter: Protein Determination by UV Absorption. (p.3-6).

AMICHE, M.; GALANTH, C. Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. Current Pharmaceutical Biotechnology, v.12, p. 1184-1193, 2011.

ANGÉLIQUE, L. et al. The potential use of natural and structural analogues of antimicrobial peptides in the fight against neglected tropical diseases. Molecules, v. 20, p.15392-15433, 2015.

ASCIERTO, P. A. et al. Future perspectives in melanoma research: meeting report from the "Melanoma Bridge". Journal of Translational Medicine, v. 12, p. 277, 2014.

BATRACHIA. Lista de los anfibios de Colombia. *Dendropsophus columbianus*. 2013. Disponível em : <<https://www.batrachia.com/orden-anura/hylidae/dendropsophus-columbianus/>>. Acesso em: 25 mai. 2018.

BEYENE, T. et al. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. BMC Research Notes, v. 10, n. 1, p.171, 2017.

BI, X. et al. Investigation of the role of tryptophan residues in cationic antimicrobial peptides to determine the mechanism of antimicrobial action. Journal of Applied Microbiology, v. 115, n. 3, p. 663-672, 2013.

BRAGA, J. F. V. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance profile of *Enterococcus faecalis* isolated from broilers with vertebral osteomyelitis in Southeast Brazil. Avian Pathology, v. 47, n. 1, p. 14-22, 2018.

BRAGG, R. R. et al. Potential treatment options in a post-antibiotic era. Advances in Experimental Medicine and Biology. v. 1052, p. 51-61, 2018.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A.. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. International journal of antimicrobial agents, v. 38, n. 3, p. 217-225, 2011.

CARVALHO, A. C. et al, 2015. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of crude skin secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in vitro Melanoma Cells. Toxins, v. 7, p. 3989-4005, 2015.

CONLON, J. M. The therapeutic potential of antimicrobial peptides from frog skin. Reviews in Medical Microbiology, v. 15, p.17–25, 2004.

CONLON, J. M. et al. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods*, v. 42, p. 349–357, 2007.

CONLON, J. M. et al. Analogues of the frog skin peptide alyteserin-2a with enhanced antimicrobial activities against Gram-negative bacteria. *Journal of Peptide Science*, v.18, n. 4, p. 270-275, 2012.

CONLON, J. M. et al. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti- cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides*, v. 57, p. 67-77, 2014a.

CONLON, J. M. et al. A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae). *Peptides*. v. 56, p. 132-140, 2014b.

COSTA, F. J. Q. Desenho racional e produção de análogos do peptídeo antimicrobiano Hyliina a1 com maior potencial terapêutico. 93f. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2012.

EMANEINI, M. et al. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* in Iran: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of clinical microbiology & infectious diseases*. v. 35, n. 9, p. 1387-1392, 2016.

EVANS, M. S. et al. Current and future trials of targeted therapies in cutaneous melanoma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 779, p. 223–255, 2013.

EXPERIMENTAL BIOSCIENCE. Quantifying protein using absorbance at 205 nm. 2015. Disponível em: <<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs205.html>>. Acesso em: 19 mai. 2018.

FERREIRA, R. B. et al. The first bromeligenous species of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) from Brazil's Atlantic Forest. *PLoS One*. v.10, n. 12, e0142893, 2015.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*. v. 11, n. 1, p. 37-51, 2011.

GOULDA, I. M. et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 39, p. 96–104, 2012.

GORANTLA, V. C.; KIRKWOOD, J. M. State of Melanoma: an historic overview of a field in transition. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 28, n. 3, p. 415-435, 2014.

GUIMARÃES, A. B. et al. The amazing world of peptide engineering: the example of antimicrobial peptides from frogs and their analogues. *Protein & Peptide Letter*, v.23, p. 722-737, 2016.

GUSMÃO, K. A. G. et al. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 23, n. 4, 2017.

HERSHBERG, R. Mutation — The Engine of Evolution: Studying Mutation and Its Role in the Evolution of Bacteria. Cold Spring Harbor Perspective in Biology, v. 7, n. 9, 2015.

HEYS, K. A. et al. Mid-infrared spectroscopic assessment of nanotoxicity in Gram-negative vs. Gram-positive bacteria. Analyst. v. 139, n. 5, p.896-905, 2014.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nature Reviews: Cancer. v. 13, n. 10, p.714-726, 2013.

IUCN. The IUCN Red List of threatened species. *Dendropsophus columbianus*. 2018. Disponível em:<<http://www.iucnredlist.org/details/55454/0>>. Acesso em: 21 mai. 2018.

JAKOVAC S. et al. Characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus* strains in the West Balkans: a first report. Microbial Drug Resistance.v. 23, n. 1, p. 122-126, 2017.

JANGA, J. H. et al. Enhancement of the cancer targeting specificity of buforin IIb by fusion with an anionic peptide via a matrix metalloproteinases-cleavable linker. Peptides, v. 32, p. 895–899, 2011.

KANG, S.J. et al. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. Expert Review of Anti-infective Therapy, v.12, n.12, p. 1477–1486, 2014.

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

LIBÉRIO M. S. et al. Anticancer peptides and proteins: a panoramic view. Protein & Peptide Letters, v. 20, n. 4, p. 380-91, 2013.

MAI, X.T. et al. Effects and mechanisms of the secondary structure on the antimicrobial activity and specificity of antimicrobial peptides. Journal of Peptide Science, v. 21, n. 7, p.561-568, 2015.

MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides. Upsala Journal of Medical Sciences, v. 119, p. 199–204, 2014.

MANGONI, M. L.; LUCA, V.; MCDERMOTT, A. M. Fighting microbial infections: A lesson from amphibian skin-derived esculentin-1 peptides. Peptides, v. 71, p.286–295, 2015.

MANSOORI, B. et al. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. Advanced Pharmaceutical Bulletin. v. 7, n. 3, p. 339–348, 2017.

MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiology. v. 7, n. 7, p. 887-902, 2012.

MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 112, n. 24, E3095–E3103, 2015.

MULDER, K. C. L. et al. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. Frontiers in microbiology, v.4, p. 321, 2013.

NACIF-MARÇAL, L. et al. Identification and characterization of an antimicrobial peptide of *Hypsiboas semilineatus* (Spix, 1824) (Amphibia, Hylidae). Toxicon, v. 99, p. 16-22, 2015.

NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides: Old Molecules with New Ideas. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 132, n. 3, p. 887–895, 2012.

NARAYANA, J. L.; CHEN, JY. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides*, v.72, p. 88-94, 2015.

ONG, Z. Y.; WIRADHARMA, N.; YANG, Y. Y. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 78, p. 28–45, 2014.

ORRICO, V. G. D. et al.. A new “Bat-Voiced” species of *Dendropsophus* Fitzinger, 1843 (Anura, Hylidae) from the Amazon Basin, Brazil. *Zootaxa*, v. 3881, n.4, p.341-361, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Escherichia coli*. 2018a. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> />. Acesso em: 15 mai. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Escherichia coli* infections. 2018b. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ecoli/en/>. Acesso em: 15 mai. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. High levels of antibiotic resistance found worldwide, new data shows. 2018c Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>>. Acesso em: 15 mai. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Antimicrobial resistance . 2018d. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 15 mai. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Drug Resistance. 2018e. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/>. Acesso em: 17 mai. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer. 2018f. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 15 mai. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Ultraviolet Radiation (UV) . 2018g. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>>. Acesso em: 15 mai. 2018.

OTTO, M. MRSA virulence and spread. *Cellular microbiology*, v. 14, n. 10, p. 1513-1521. 2012.

PARENTE-ROCHA, J. A. et al. Antifungal resistance, metabolic routes as drug targets, and new antifungal agents: an overview about endemic dimorphic fungi. *Mediators of Inflammation*, v. 2017, p. 16, 2017.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 12, p.e383-e392, 2017.

PETROSILLO, N. et al. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 11, n. 2, p. 159–177, 2013.

PRATES, M. V et al. The NMR-derived solution structure of a new cationic Antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. The Journal Of Biological Chemistry, v. 279, n. 13, p. 13018–13026, 2004.

RAHNAMAEIAN, M. Antimicrobial peptides: Modes of mechanism, modulation of defense responses. Plant Signaling & Behavior, v. 6, n. 9, p. 1325-1332, 2011.

RAMÍREZ-CHAVES, H. E. et al. On the distribution of the endemic Boettger's Colombian Treefrog, *Dendropsophus columbianus* (Anura: Hylidae) with distribution extension in southwestern Colombia. Herpetology Notes, v. 11, p. 49-58, 2018.

REVIE, N. M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. Current Opinion on Microbiology, v. 45, p. 70-76, 2018.

ROY, B. A.; KIRCHNER, J. W. evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. Evolution, v. 54, n. 1, p. 51-63, 2000.

SABOUNI, F. et al. High frequency of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* in children: an alarming concern. Journal of Preventive Medicine and Hygiene, v. 57, n. 4, p. e201–e204, 2016.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research, v. 9, p. 1029–1050, 2009.

SANI, MA. et al. Proline-15 creates an amphipathic wedge in maculatin 1.1 peptides that drives lipid membrane disruption. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1848, p. 2277–2289, 2015.

SANI, MA.; SEPAROVIC, F. How membrane-active peptides get into lipid membranes. Accounts of Chemical Research, v. 49, p. 1130–1138, 2016.

SARKAR, S. et al. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n. 10, p. 21087-21113, 2013.

SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD). Chapter: Cell Viability Assays, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/anfibios>>. Acesso em 12 mai. 2016.

SOMASUNDARAM, R.; VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations. Advances in Pharmacology, v. 65, p. 335-359, 2013.

SONDAK, V. K.; GIBNEY, G. T. Indications and options for systemic therapy in melanoma. Surgical Clinics North America. v.94, n. 5, p. 1049-1058, 2014.

SUN, J. et al. Relationship between peptide structure and antimicrobial activity as studied by de novo designed peptides. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1838, p. 2985–2993, 2014.

TOPRAK, E. et al. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. Nature Genetics, v. 44, p. 101–105, 2012.

TOWNSEND, S. M. et al. Characterization of an extended-spectrum betalactamase *Enterobacter hormaechei* nosocomial outbreak, and other *Enterobacter hormaechei* misidentified as *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. *Microbiology*.v. 154, n. 12, p. 3659-3667, 2008.

TRIANA-VIDAL, L. E. et al. Dendropsophin 1, a novel antimicrobial peptide from the skin secretion of the endemic Colombian frog *Dendropsophus columbianus*. *Natural Product Research*, v. 32, n. 12, p. 1383-1389, 2017.

XU, X.; LAI, R. The chemistry and biological activities of peptides from amphibian skin secretions. *Chemical Reviews*, v. 115, p. 1760-1846, 2015.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, v. 406, p. 775–781, 2000.

YANG, QZ. et al. Design of potent, non-toxic anticancer peptides based on the structure of the antimicrobial peptide, temporin-1CEa. *Archives of Pharmacal Research*, v. 36, n. 11, p. 1302–1310, 2013.