



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Viviane Pereira Marques Dos Santos

**Avaliação da Atividade Antibiofilme do Peptídeo Catiônico
PCDAMP-5 Contra *Klebsiella pneumoniae* Multirresistente
a Antibiótico**

**Campo Grande- Mato Grosso do Sul
Julho- 2017**

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Avaliação Da Atividade Antibiofilme Do Peptídeo Catiônico
PCDAMP-5 Contra *Klebsiella pneumoniae* Multirresistente
a Antibiótico**

Autora: Viviane Pereira Marques Dos Santos

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientadora: Dra. Suzana Meira Ribeiro

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde "

**Campo Grande- Mato Grosso do Sul
Julho- 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

S237a Santos, Viviane Pereira Marques dos

Avaliação da atividade antibiofilme do peptídeo catiônico pcdamp-5
contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente a antibiótico./ Viviane
Pereira Marques dos Santos; orientador Octávio Luiz Franco;
coorientadora Suzana Meira Ribeiro. -- 2017
66 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande , 2017.
Inclui bibliografias.

1.Antibióticos 2.Biologia computacional 3.Peptídeos 4. Biotecnologia
I. Franco, Octávio Luiz II. Ribeiro, Suzana Meira III. Título

CDD: 660.6

**Avaliação da Atividade Antibiofilme do Peptídeo Catiônico PCDAMP-5
contra *Klebsiella pneumoniae* Multirresistente a Antibiótico**

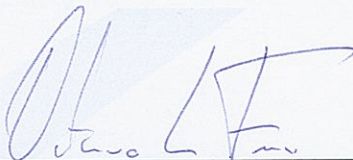
Autora: Viviane Pereira Marques dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

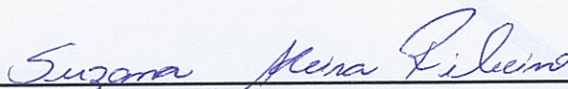
Coorientadora: Profa. Dra. Suzana Meira Ribeiro

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

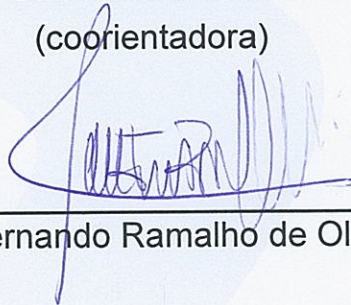
APROVADA em 12 de julho de 2017.



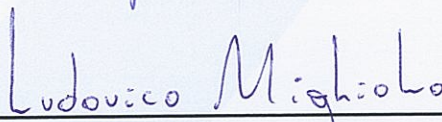
Prof. Dr. Octavio Luiz Franco - UCDB
(orientador)



Profa. Dra. Suzana Meira Ribeiro - UCDB
(coorientadora)



Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira - UFMS



Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB

“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado”

Isaac Newton

Dedico este trabalho aos meus pais Iná Pereira Matias e Manoel Marques dos Santos, que sempre me incentivaram na busca pelo conhecimento. A todos aqueles que me encorajaram a persistir nos momentos difíceis dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, pela paciência e incentivo, que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

À minha co-orientadora, Dra. Suzana Meira Ribeiro, pelo zelo, sugestões e amizade, que foram essenciais para a concepção deste trabalho.

À minha família e amigos, pela paciência e palavras de incentivo, sem vocês eu não teria conseguido.

Aos amigos Esther, Bruna, Gislaine, Breno, Guilherme e Matheus, pela amizade, apoio, colaboração e por ceder o tempo de vocês para contribuir para realização dos meus experimentos;

Aos colaboradores Betty, Marlon, Osmar e Léo, pela disponibilidade, simpatia, paciência e contribuição para a realização deste trabalho;

Às técnicas do laboratório Miriã e Dayane, pela paciência e o suporte necessário para a realização dos meus experimentos;

A todos os colegas do grupo S-Inova, pelo apoio;

Finalmente, gostaria de agradecer a Universidade Católica Dom Bosco, por me proporcionarem a busca pelo conhecimento técnico e científico e suporte para a realização deste projeto de Mestrado.

SUMÁRIO

1. Revisão de literatura	11
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
1.2 Infecções associadas a biofilmes	15
1.2.1 Características dos biofilmes	17
1.3 Tolerância e resistência de biofilmes aos antimicrobianos	19
1.4 Peptídeos antimicrobianos	21
1.4.1 Peptídeos antibiofilmes e abordagens para utilização	23
1.4.2 Peptídeo PCDAMP-5	26
2. Justificativa	29
3. Objetivo	30
3.1.1 Objetivo geral	30
3.1.2 Objetivo específico	30
4. Material e Métodos	31
4.1 Síntese do peptídeo	31
4.2 Modelagem molecular	31
4.3 Dinâmica molecular	31
4.4 Isolado bacteriano	32
4.5 Padronização da suspensão bacteriana	32
4.6 Formação de biofilmes	33
4.6.1 Ensaio de inibição da formação do biofilme	33
4.6.2 Ensaios de combinação entre peptídeo e antibióticos em microplaca	34
4.7 Ensaio de erradicação do biofilme pré-formado	34
4.8 Ensaios de combinação entre peptídeo e antibióticos contra biofilmes pré-formados	35
4.10 Ensaio hemolítico	35
5. Capítulo I	37
6. Discussão	49
7. Conclusão Geral e Perspectivas	58
8. Referências	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequências de aminoácidos geradas no algoritmo de JOKER II proveniente do *P. chabaudii* contra *P. aeruginosa*.27

Tabela 2– Peptídeos e a sequência aminoácidos correspondentes que foram gerados por janela deslizamento contra *P. aeruginosa*.28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Análise de microscopia eletrônica de varredura de *Klebsiella pneumoniae*. (Disponível em: <http://www.diomedia.com/stock-photo-scanning-electron-micrograph-of-klebsiella-pneumoniae-mag-30000x-at-375-x-5-in-k-pneumoniae-causes-primary-lobar-pneumonia-and-is-common-with-alcoholics-and-persons-with-compromised-pulm-image9926116.html>)..... 12
- Figura 2** - História da resistência a carbapenems 14
- Figura 3** - Mortes atribuídas a resistência a antibióticos até ano de 2050..... 13
- Figura 4** -Representação esquemática das várias etapas de desenvolvimento de um biofilme de acordo com o modelo aceito para *Pseudomonas aeruginosa* 16
- Figura 5** - Estrutura tridimensional de diferentes peptídeos catiônicos22
- Figura 6** - Mecanismo de ação das estratégias antibiofilmes mediadas por PAMs.. 26

RESUMO

Referência: MARQUES DOS SANTOS, Viviane P. Avaliação da atividade antibiofilme do peptídeo catiônico PCDAMP-5 contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente a antibiótico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2017.

Klebsiella pneumoniae produtora de *K. pneumoniae* carbapenemase (Kp-KpC) é uma bactéria resistente a múltiplos antibióticos, incluindo carbapenemases, antibióticos de última geração. Portanto, combater biofilmes formados por Kp-KpC pode ser considerado um desafio. Aqui, avaliamos o potencial antibiofilme do peptídeo catiônico bioinspirado em uma proteína proveniente de *Plasmodium chabaudii* (MNAINFTCTVHKKVAISV), denominado PCDAMP-5 (IKLLCRVHKK), sintetizado por cromatografia de fase sólida, contra KpC-Kp. O PCDAMP-5 na concentração $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ impediu em 91 % a formação do biofilme durante 24 h de incubação. Por outro lado, o PCDAMP-5 foi incapaz de erradicar biofilmes pré-formados crescidos por 6 h. Ensaios de combinação entre PCDAMP-5 e antibióticos (imipenem, meropenem, ciprofloxacino) foram ineficientes em impedir ou erradicar biofilmes de KpC-Kp. Adicionalmente, PCDAMP-5 não apresentou atividade lítica contra eritrócitos humanos e de camundongos na concentração de $640 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ademais, realizamos estudos estruturais teóricos com base na sequência primária de PCDAMP-5, onde 100 modelos tridimensionais foram construídos. Dentre estes, foi observado que o modelo de menor energia livre adotou conformação em *random coil*, sendo posteriormente validado e submetido a simulações de dinâmica molecular. Assim, foi possível avaliar a alta instabilidade estrutural deste peptídeo em ambiente hidrofílico, fato este que pode estar relacionado com diversos estágios de transição possivelmente relacionados a suas funções perante biofilmes. A atividade seletiva do PCDAMP-5 contra biofilmes e a incapacidade de causar hemólise em eritrócitos murino poderia fazer deste peptídeo uma alternativa potencial e segura para prevenir infecções causadas por biofilmes bacterianos no cenário clínico.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, Biofilmes, carbapenemases, *K. pneumoniae*, biofísica computacional.

ABSTRACT

Reference: MARQUES DOS SANTOS, Viviane P. Evaluation of antibiofilm activity of cationic peptide PCDAMP-5 against *Klebsiella pneumoniae* multi-resistant to antibiotic. Dissertation (Master of Biotechnology) –Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2017.

Klebsiella pneumoniae carbapenemase- producing *K. pneumoniae* (KpC-Kp) is resistant to multiple antibiotics, including carbapenem, a last resource antibiotic. Therefore, combating biofilms formed by KpC-Kp can be a challenge. Here, we evaluated the bio-inspired cationic peptide potential of a protein derived from *Plasmodium chabaudii* (MNAINFTCTVHKKVAISV), called PCDAMP-5 (IKLLCRVHKK), synthesized by solid-phase chromatography against KpC-Kp. PCDAMP-5 at concentration $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ prevented biofilm formation by 91% for 24 h incubation. On the other hand, PCDAMP-5 was unable to eradicate preformed biofilms grown for 6 h. Combinations of PCDAMP-5 and antibiotics (imipenem, meropenem, ciprofloxacin) were inefficient in preventing or eradicating KpC-Kp biofilms. Additionally, PCDAMP-5 showed no lytic activity against human erythrocytes and mice at $640 \mu\text{g.mL}^{-1}$. In addition, we performed theoretical structural studies based on the primary sequence of PCDAMP-5, where 100 three-dimensional models were constructed. Among these, it was observed that the lower free energy model adopted conformation in random coil, being later validated and submitted to molecular dynamics simulations. Thus, it was possible to evaluate the high structural instability of this peptide in a hydrophilic environment, which may be related to several transition stages possibly related to its functions in biofilms. The selective activity of PCDAMP-5 against biofilms and the inability to cause hemolysis in murine erythrocytes could make this peptide a potential and safe alternative to prevent infections caused by bacterial biofilms in the clinical setting.

Keywords: Antimicrobial peptides, biofilms, carbapenemases, *K. pneumoniae*, computational biophysics.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* pode ser encontrado em diversos nichos ecológicos, como solo, água, incluindo esgotos, efluentes industriais, vegetações e superfícies inertes. A espécie *Klebsiella pneumoniae* consiste em um bastonete Gram-negativo, encapsulada, oportunista e anaeróbica facultativa (1,2). Esta bactéria se apresenta como um importante agente etiológico, que está associado a altos índices de infecções nosocomiais que acometem pacientes imunodeprimidos, causam infecções no trato urinário decorrentes do uso de cateter, pneumonia, meningite e infecções sistêmicas (3–5). Essa bactéria reside no trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, entretanto em situações de desequilíbrio, em que o sistema imune do hospedeiro está fragilizado, esse microrganismo pode se tornar um agente oportunista e causar infecções (1).

As infecções causadas por *K. pneumoniae* podem atingir cerca de 50% dos pacientes hospitalizados que fazem uso de cateteres, entre estes, 5-10% estão passíveis de infecções severas (4). Em unidades de tratamento intensivo (UTIs), a *K. pneumoniae* pode ser responsável por 15% das infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Entre 2006-2007, a Rede Nacional de Segurança em Saúde dos Estados Unidos informou que 10,8% das infecções associadas a dispositivos implantados foram provocados por *K. pneumoniae* (6). Existem alguns fatores que contribuem para o aumento da patogenicidade bacteriana, como a presença de cápsula, responsável por proteger as células bacterianas contra a ação de fagócitos, adesinas que favorecem a adesão a superfícies e sideróforos, compostos que apresentam afinidade pelo ferro, elemento importante para o desenvolvimento e metabolismo bacteriano. Esses artifícios favorecem mecanismos para a bactéria esquivar-se do sistema de defesa do hospedeiro (7).

O aparecimento de estirpes de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos se tornou uma grande ameaça para o tratamento de infecções causadas por essa bactéria. *K. pneumoniae* e outras bactérias (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) da família *Enterobacteriaceae* foram relatadas por serem produtora de ESBL (β -lactamase de espectro ampliado) (8). A enzima ESBL consiste em uma das maiores

responsáveis pela disseminação de genes de resistência em hospitais e está intrinsecamente relacionada a resistência a diferentes antibióticos (6,9). Do mesmo modo, esta bactéria pode apresentar genes que codificam enzimas que conferem resistência aos antibióticos como as metalo- β -lactamases (M β L), não-metalo-carbapenemases, adenosina monofosfatocíclica (AMPc), ESBLs (9) e *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) (10). Dentre estas, a KPC, tem sido comumente relatada em ambientes hospitalares e apresenta moderado a alto nível de resistência aos antibióticos carbapenêmicos, com espectro de atividade mais abrangente que as M β L (6).

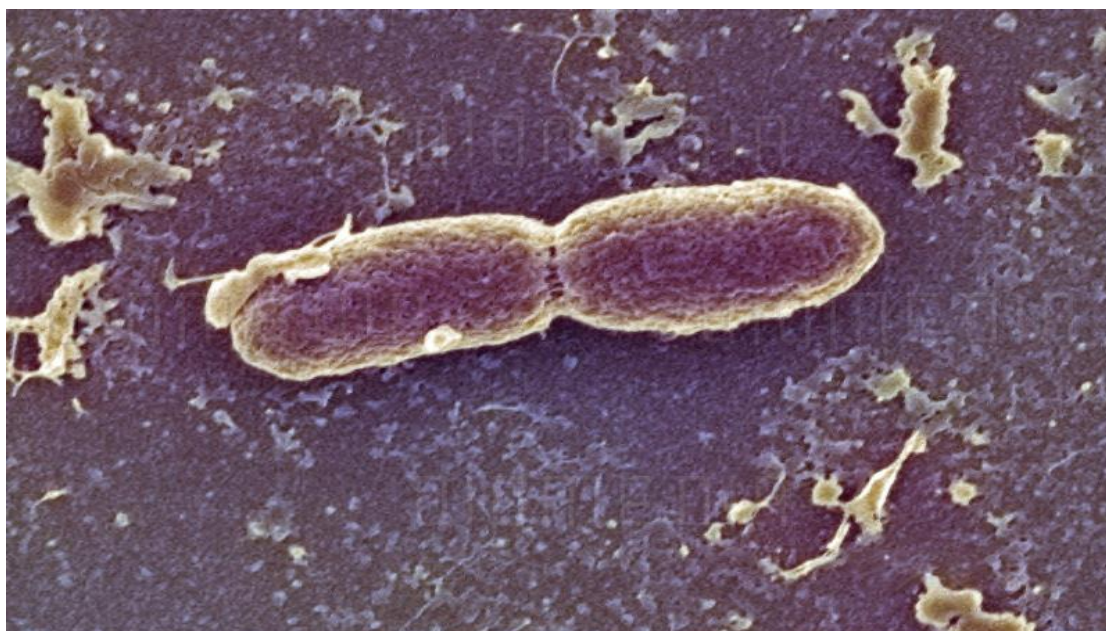


Figura 1 - Análise de microscopia eletrônica de varredura de *Klebsiella pneumoniae*. (Disponível em: <http://www.diomedia.com/stock-photo-scanning-electron-micrograph-of-klebsiella-pneumoniae-mag-30000x-at-375-x-5-in-k-pneumoniae-causes-primary-lobar-pneumonia-and-is-common-with-alcoholics-and-persons-with-compromised-pulm-image9926116.html>)

Os antibióticos carbapenêmicos como imipenem, meropenem e ertapenem foram desenvolvidos no final da década de 1980, como alternativa para combater infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, produtoras de ESBL e AMPc. Os carbapenêmicos apresentavam um largo espectro de atividade, agindo tanto para bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas. Devido à ampla utilização desses antibióticos, ocorreu a seleção e disseminação de microrganismos resistentes, surgindo dessa forma as carbapenemases (6). Embora

esta enzima seja nomeada como carbapenemase, ela apresenta a capacidade de hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos (3,11). As primeiras carbapenemases foram identificadas em bacilos Gram-positivos e foram inibidas utilizando ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em meados da década de 1980, as carbapenemases não apresentavam mais susceptibilidade ao EDTA, sendo posteriormente, contidas com o uso de inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico). No início da década de 1990, as carbapenemases foram descritas como enzimas que são codificadas devido a mutações nos genes de resistência. Atualmente, as carbapenemases codificadas por genes em plasmídeos, extensivamente encontradas em bactérias Gram-negativas, têm sido um importante agente fomentador da resistências aos carbapenêmicos (6).



Figura 2 - História da resistência a carbapenens. Adaptado: MCKENNA, 2013.

No ano de 2001, em um hospital no estado da Carolina do Norte, foi identificado o primeiro isolado clínico de *K. pneumoniae* KPC. A enzima KPC foi classificada como grupo A de Ambler. Ambler, classificou as enzimas (A, B, C e D)

segundo a estrutura molecular que apresentavam. A KPC apresenta serina no sítio ativo que favorece a hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos (6). Espécies KPC-produtoras rapidamente se espalharam pelo mundo (12). Em 2002, estudos realizados em Nova Iorque encontraram isolados de *K. pneumoniae* contendo o gene blaKPC. A enzima KPC foi identificada em outros bacilos Gram-negativos como *E. coli*, *S. marcescens*, em espécies dos gêneros *Salmonella*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. Nos Estados Unidos, Itália, Grécia e Israel, a KPC se tornou um dos principais problemas de resistência a carbapenêmicos (Figura 2).

Infecções causadas por *K. pneumoniae* KPC podem estar associadas a altas taxas de mortalidade, podendo atingir acima dos 50 %. A complexidade em encontrar opções terapêuticas eficientes afeta, sobretudo, o tratamento de pacientes imunodeprimidos e acentua a propensão da *K. pneumoniae* KPC em causar surtos em ambientes hospitalares (5). Estudos evidenciaram que as bactérias podem transferir genes de resistência entre diferentes espécies, através da propagação plasmidial de genes codificadores de resistência a múltiplos fármacos. Foram relatados casos de transferência plasmidial dos genes de resistência entre *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, indicando que o problema de propagação clonal se tornou um problema global de dispersão dos genes entre as espécies (11). Até o ano de 2050, acredita-se que a resistência a antibióticos pode ser responsável por 4 milhões de mortes somente na Ásia (Figura 3).

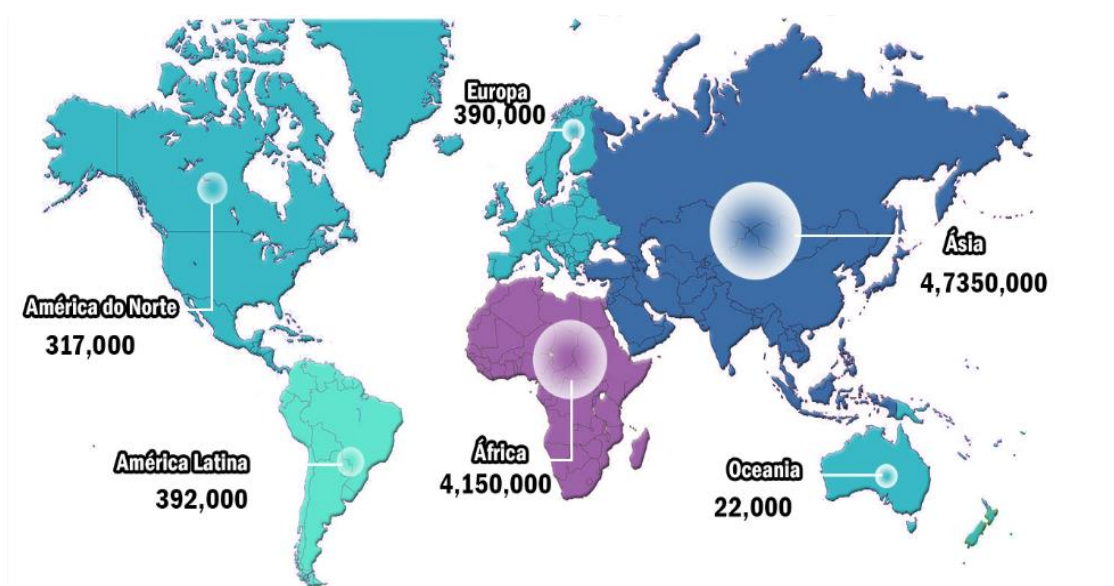


Figura 3 - Mortes atribuídas a resistência a antibióticos até ano de 2050. (Disponível em: <http://tpgwellness.livejournal.com/8842.html>).

Embora a rápida dispersão de bactérias produtoras de carbapenemases esteja fornecendo um significativo volume de informações sobre a genética e epidemiologia das carbapenemases, o combate a esses microrganismos ainda tem sido ineficiente. A diminuição de terapias eficazes e a ineficiência de medidas preventivas revelam o despreparo para impedir e tratar infecções ocasionadas por microrganismos resistentes. Diante desse cenário, torna-se fundamental a busca por novas medidas preventivas e curativas (13,14).

1.2 INFECÇÕES ASSOCIADAS A BIOFILMES

O estilo de vida em agregados bacterianos pode ser usualmente descrito como biofilme, várias espécies bacterianas podem ser encontradas nessas comunidades. Biofilme em suma, consiste em uma estratégia de sobrevivência das bactérias e são encontrados universalmente em superfícies naturais e artificiais (como em implantes médicos, materiais cirúrgicos) (15). Bactérias agrupadas em biofilmes são extremamente tolerantes a ação de antimicrobianos e podem estar associadas a infecções crônicas (16,17).

Os biofilmes podem estar presentes em 60-65% das infecções humanas (15,18), e tem sido um fator importante associado a uma série de infecções persistentes (19). Testes de susceptibilidade *in vitro* demonstraram aumento na capacidade de resistência a fatores físico-químicos em biofilmes (17). Com base em modelos experimentais, a formação de biofilme pode ser descrita em quatro etapas (Figura 4) incluindo ligação de células bacterianas, agregação das células, maturação do biofilme e dispersão bacteriana. Na primeira etapa, ocorre interação entre as bactérias e a superfície do material aonde irão se aderir. Em seguida, ocorre a agregação de bactérias em múltiplas camadas, essa etapa permite o aumento na interação entre as células, ativação de componentes microbianos e adesão intercelular (17). Na terceira etapa, ocorre a maturação do biofilme, onde cada espécie bacteriana possui características específicas no processo de maturação, que pode ser atribuído à natureza multifatorial do desenvolvimento do biofilme. Na última etapa, algumas células protegidas na estrutura do biofilme são dispersas e retomam a forma planctônica inicial, permitindo um novo ciclo de colonização a superfícies e desenvolvimento de novos biofilmes (15,20).

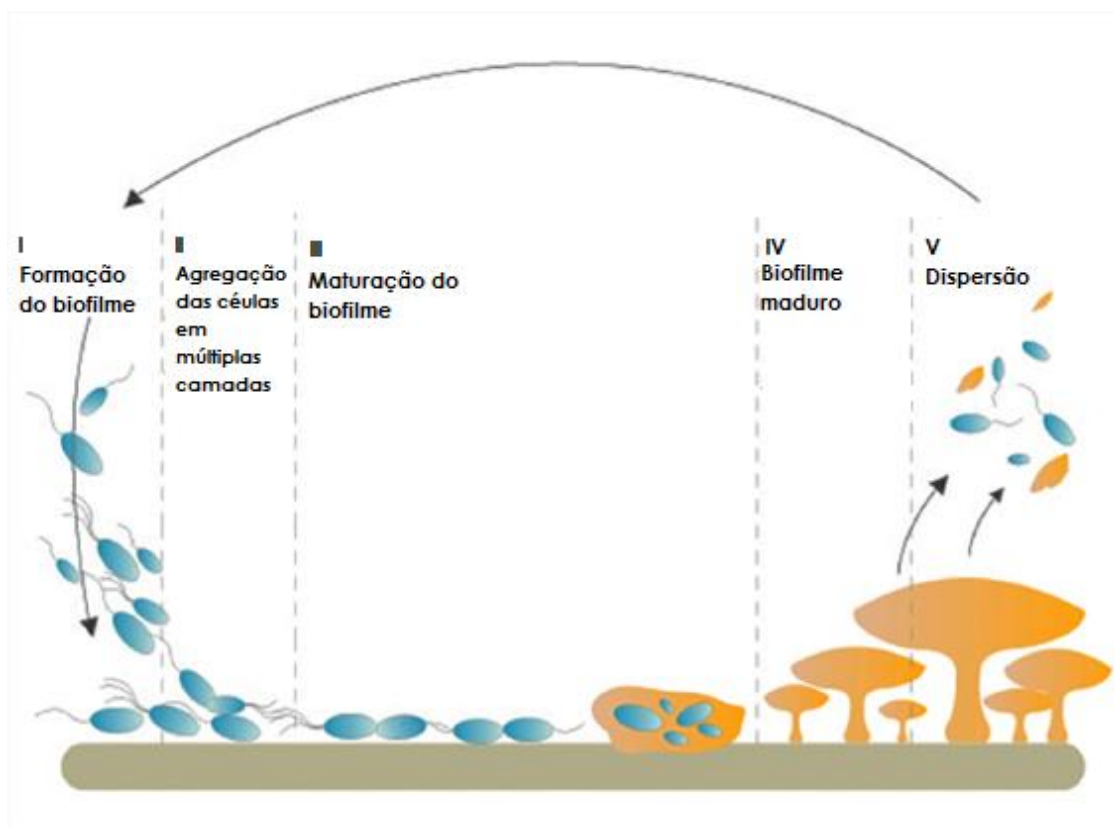


Figura 2 -Representação esquemática das várias etapas de desenvolvimento de um biofilme de acordo com o modelo aceito por *P. aeruginosa*. Adaptado de Ghigo, 2003.

Devido a matriz, os biofilmes podem resistir aos antibióticos muito além da concentração inibitória mínima (CIM) requeridas para sua contraparte planctônica. Usualmente, são necessárias altas doses de antibióticos para eliminar biofilmes, com base na concentração mínima para erradicação de biofilme (MBEC) (17). No entanto, a administração de doses elevadas pode aumentar os riscos de efeitos colaterais, intoxicação e resistência aos antimicrobianos (21,22). Existem pelo menos três abordagens a fim de impedir a colonização bacteriana incluindo 1) evitar ao máximo a aderência bacteriana; 2) as bactérias que conseguiram resistir a primeira linha de defesa devem ser eliminadas imediatamente e 3) estratégias destinadas a romper a matriz polissacarídica do biofilme (22).

Os biofilmes têm sido amplamente descritos em infecções crônicas, como em rinossinusites, otite média, fibrose cística e implantes ortopédicos (23,24). As bactérias são responsáveis por infecções agudas e crônicas e, muitas vezes por ambas as infecções. A *P. aeruginosa*, por exemplo, pode causar otite externa aguda e pode ser comumente observada em pacientes com fibrose cística (23). Anualmente 1 milhão de infecções nosocomiais tem sido registradas nos Estados

Unidos relacionadas a formação de biofilme em dispositivos implantados como cateteres venosos centrais, cateteres urinários, válvulas cardíacas, aparelhos ortopédicos, e até mesmo em lentes de contato (25). Os tecidos que estão localizados próximos aos dispositivos implantados podem sofrer processo inflamatório e necrose, decorrente da migração de células de defesa como neutrófilos e leucócitos. Essas infecções podem resultar em maior tempo de internação, gastos com cirurgias e risco de morte (21). Devido a características intrínsecas relacionadas ao estilo de vida dos biofilmes, eles estão frequentemente associados a infecções crônicas, são resistentes a erradicação e apresentam constantes incidências de infecções agudas (23). Estudos observaram biofilmes bacterianos em 71% dos pacientes com rinossinusite crônica (RC) que seriam submetidos a cirurgia endoscópica sinusal. Após a cirurgia, os pacientes que apresentaram infecções por biofilmes necessitaram de tratamentos com múltiplos antibióticos, diferentemente dos pacientes que não apresentaram infecções por biofilmes (26).

Também foram observados que pacientes com fibrose cística apresentam infecções por biofilmes persistentes mesmo com tratamentos intensivos com antibióticos. Os tratamentos intensivos são ineficientes em erradicar os biofilmes, mas conseguem reduzir os danos causados pelas infecções crônicas (27). O tratamento de infecções crônicas causadas por biofilmes apresenta um grande impasse, que consiste na dificuldade em alvejar somente as células bacterianas responsáveis pelo estado de doença (23). Desde 2004, a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), preocupada com o aumento de microrganismos resistentes a vários antibióticos, vem emitindo relatórios anuais sobre os problemas associados com infecções resistentes. O propósito destes relatórios consiste em incentivar ações comunitárias e legislativas para o financiamento e desenvolvimento de antimicrobianos (28). Em virtude dos fatores mencionados, estudos de prevenção da formação de biofilmes são pertinentes.

1.2.1 Características dos biofilmes

Estudos demonstram que biofilmes de *K. pneumoniae* se desenvolvem de forma clonal (células unicelulares) e não por recrutamento de células planctônicas (1) Entretanto, os biofilmes formados *P. aeruginosa* podem ser arquitetados a partir

de células planctônicas individuais, em um processo altamente regulado. A formação do biofilme inicia-se em resposta a vários sinais e devido às condições nutricionais que o ambiente fornece (29,30). Diferentes condições que o meio proporciona para o desenvolvimento do biofilme podem alterar características cinéticas como adesão, agregação, maturação e dispersão, com efeitos sobre o desenvolvimento do biofilme (20). Características peculiares de cada biofilme também são influenciadas pela espécie bacteriana (31). As diferentes condições do meio, podem proporcionar componentes extracelulares diversos para a formação do biofilme, e consequentemente, induzir a distintos comportamentos dessas células e favorecer adaptações dos microrganismos em diferentes ambientes (32).

Nos biofilmes, as células mais ativas estão concentradas na região periférica em comparação as células centrais, as quais são menos ativas. As condições ambientais que envolvem o biofilme podem resultar na expressão gênica diferencial entre as células periféricas e as centrais, esse fato também está associado a mutações que podem atribuir diferenças genotípicas e fenotípicas entre as células (33). Sabe-se que os biofilmes podem aumentar expressão de genes responsáveis pela resistência a antibióticos. Os biofilmes formados por *P. aeruginosa* aumentam a expressão de *algC*, gene responsável pela síntese de polissacarídeos extracelulares, que facilita a aderência à superfícies e podem ser utilizados com reserva energética (30).

A matriz produzida nos biofilmes pode ser composta por expolissacarídeos, incluindo proteínas, DNA e polissacarídeos. A constituição da matriz pode ser influenciada pela espécie bacteriana e condições ambientais (20,34,35). Ademais, os biofilmes conseguem resistir a uma gama de agentes, como desinfetantes (36), antibióticos, fagócitos, sistema imune inato e adaptativo e células de defesa do sistema inflamatório (20). Os biofilmes microbianos resistem a variações extremas de pH (aumento na produção do biofilme com a elevação do pH) e temperatura (estirpes de *K. pneumoniae* podem aumentar ou reduzir a produção do biofilme devido a variações de temperatura) (37), adotam estruturas complexas e interagem ao seu entorno com superfícies e células (38). Entre outros determinantes de resistência, a grande quantidade de enzimas de inativação, as β -lactamases, que se acumulam no glicocálice protegem as células subjacentes do biofilme (15).

O surgimento dos biofilmes pode estar ligado à transição no estilo de vida de bactérias em resposta ao estresse. A combinação de sinais de estresse pode ativar

vias moleculares e resultar na formação do biofilme. Para impedir que o estresse interfira na formação do biofilme e provoque a morte dessas células, a resposta ao estresse deve ser mais rápida que a reação adversa a esse sinal. Assim, o desenvolvimento de biofilmes deve ser rápido e eficiente para impedir a sua morte (39,40). Ao serem submetidas há algum estresse ambiental, as bactérias em formas livres, iniciam um processo de adesão a superfícies que leva a formação do biofilme. O crescimento em biofilmes permite o desenvolvimento de um circuito de sinalização conhecido como *quorum sensing*. Esse sistema de comunicação entre as bactérias é baseado na emissão e resposta a estímulos. Essa comunicação permite o processo de transferência de informações entre espécies, controla a expressão gênica, formação do biofilme e fatores de virulência (18).

1.3 TOLERÂNCIA E RESISTÊNCIA DE BIOFILMES AOS ANTIMICROBIANOS

A capacidade das bactérias em formar biofilmes pode ter se desenvolvido desde a primeira bactéria presente na Terra e os biofilmes poderiam ter sido a primeira forma de vida multicelular. O estilo de vida em comunidades pode estar associado a estratégias de sobrevivência que possibilitaram o crescimento em ambientes adversos (16,18). Ao longo dos anos, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência como forma de sobrevivência, para resistir à ação letal de compostos antimicrobianos. Esse fenômeno de resistência a antimicrobianos consiste em um evento natural (mecanismo de evolução das espécies). A diminuição da susceptibilidade das células do biofilme à ação dos antibióticos pode se apresentar a partir de duas perspectivas, resistência e tolerância. A resistência permite que as bactérias cresçam e se tornem mais fortes mesmo na presença dos antibióticos. Por outro lado, a tolerância impede o crescimento bacteriano frente ao antibiótico, mesmo sem causar a morte dessas células (16).

A tolerância adaptativa a antimicrobianos faz com que as células do biofilme suportem grandes períodos de exposição. No entanto, a tolerância a antibióticos pode variar com a idade do biofilme. Biofilmes recém-formados podem ser mais susceptíveis aos antimicrobianos no primeiro dia de formação em comparação com biofilmes maduros (41). Essa característica pode estar relacionada ao desenvolvimento de biomassa que leva ao aumento da fase estacionária ou ao acúmulo de β -lactamases em biofilmes maduros em relação aos mais jovens (42). A

transcrição de genes codificadores de β -lactamases que inativam muitos antibióticos β -lactâmicos, consiste em um exemplo de tolerância específica a antibióticos. A inativação minimiza a capacidade de difusão desses antibióticos para o interior do biofilme, conseqüentemente, alterando as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do antibiótico (1).

As células presentes nos biofilmes utilizam diversos mecanismos para sobrepujar a ação dos antibióticos, dentre estes, a barreira física formada pela matriz extracelular. As células em biofilmes conseguem resistir a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e também até a concentrações 1000 vezes maiores de antibióticos requeridas para eliminar células planctônicas (43). Entretanto, a exposição prolongada a antibióticos poderia romper a matriz extracelular que impede a difusão destes. Esse rompimento pode promover o retorno dessas células ao estado planctônico, tornando-as mais susceptíveis aos antimicrobianos (13,18)

As células em biofilmes crescem de forma heterogênea devido a diferentes posicionamentos dentro da matriz, e conseqüentemente influenciam no crescimento desses microrganismos. A diferença no crescimento pode ser decorrente do acesso desigual a oxigênio e nutrientes, devido a disposição espacial diferencial entre superfície e células das camadas profundas do biofilme. A diferença metabólica entre as células resulta em comportamentos distintos dentro do biofilme — existem bactérias metabolicamente mais ativas (crescimento aeróbico), e as células menos ativas (crescimento anaeróbico), localizadas nas camadas desfavorecidas de nutrientes e oxigênio (1).

A resistência microbiana pode ser conferida por mecanismos de transferência gênica horizontal a partir de outras bactérias ou por mutações. Estudos demonstraram que isolados de *K. pneumoniae* em estado planctônico, resistentes a gentamicina ($\text{CIM} \geq 32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) mostraram um aumento de 6 vezes na resistência a gentamicina quando cultivados em biofilmes (13). Outro estudo analisou a taxa de mutabilidade entre crescimentos planctônicos de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* em comparação com crescimentos em biofilmes. Estirpes de *S. aureus* em culturas de biofilmes apresentaram altas taxas de mutações referentes à resistência a rifampicina e a mupirocina, que foram aumentadas 59,5 vezes e 8,6 vezes, respectivamente. Biofilmes de *S. epidermidis* com 72 h de crescimento apresentaram mutabilidade máxima a rifampicina e a

mupirocina e foram até 4 vezes mais resistentes quando comparados com sua contraparte em estado planctônico. Estudos sugerem que o estresse oxidativo pode induzir a mutações no DNA e alterar as características fenotípicas e genotípicas (44).

1.4 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos com atividade antimicrobiana podem ser encontrados em numerosos organismos, tecidos e células, estando presentes em praticamente todas as formas de vida (45). Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são importantes componentes do sistema imune inato (46), participam do sistema de defesas das plantas, similarmente ao sistema imune inato dos seres humanos, protegendo-as de patógenos e pragas. Esses peptídeos catiônicos apresentam menos de 50 resíduos de aminoácidos (47), baixa massa molecular (>10 kDa), anfipaticidade (solubilidade tanto em ambiente aquoso como em membranas lipídicas), estrutura variada (α -hélice; folha- β ; mistura de α -hélice e folha- β) (Figura 5). Essas características propiciam a permeabilização das membranas celulares dos microrganismos, que podem se romper. Em virtude de todas essas características, PAMs têm apresentado grande potencial em se tornarem uma nova classe de antimicrobianos (48,49).

PAMs naturais como catelicidinas, defensinas, magaininas e criptidinas, participam das defesas do sistema imune humano (50). No entanto, apresentam algumas questões a serem analisadas como (i) toxicidade, (ii) atividade hemolítica, (iii) instabilidade, (iv) especificidade e (v) alto custo de produção (51). Alguns desses peptídeos podem ter a atividade comprometida ao serem antagonizados por cátions monovalentes e divalentes, glicosaminoglicanos e mucinas, dessa forma estariam vulneráveis a ação das proteases. As diminuições da atividade antimicrobiana dos PAMs em virtude dessas condições sustentam a teoria de que os PAMs agem inicialmente como imunomoduladores e não diretamente na morte de microrganismos (1).

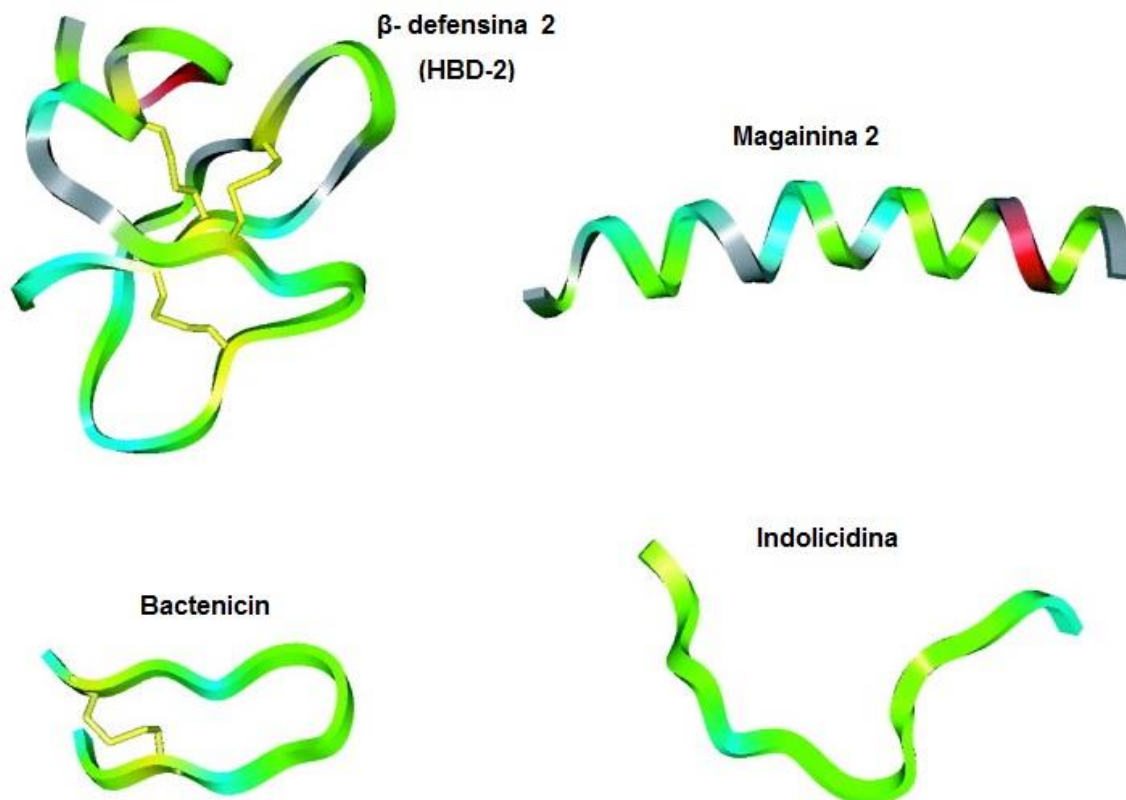


Figura 3 - Estrutura tridimensional de diferentes peptídeos catiônicos. Adaptado de Hancock, 2001.

Apesar dos PAMs naturais apresentarem um caráter antimicrobiano, tornando-os candidatos potenciais a possíveis terapias, algumas questões limitam o seu uso clínico. Peptídeos presentes no veneno da abelha, melitina, apresentam fortes propriedades hemolíticas. A LL-37, peptídeo derivado de catelicidina humana, pode ser atacada por proteases bacterianas ou perder atividade na presença de sal (49). Além disso, a síntese de peptídeos com estruturas complexas como as defensinas, pode ser dificultosa e levar ao aumento dos gastos para a síntese desse peptídeo. Alguns peptídeos apresentam limitações e restrições de atividades antimicrobianas. A efetividade e atividade antimicrobiana dos peptídeos podem ser afetadas pela estrutura, carga líquida, anfipaticidade e tamanho molecular, o entendimento da contribuição desses fatores podem permitir a concepção de novos peptídeos com aumento na capacidade terapêutica (49).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para aperfeiçoar a sequência de PAMs. Neste contexto, o desenho racional de peptídeos permite identificar sequências-padrão, responsáveis pelas atividades antimicrobianas. A partir dessa

observação, podemos obter um análogo altamente ativo, com atividade de amplo espectro, não tóxico, com um bom perfil farmacocinético e com alta taxa de seletividade (50). A fim de alcançar esse propósito, o desenvolvimento de peptídeos com alta seletividade por membranas microbianas, conseguindo dissociar a toxicidade e atividade hemolítica contra células humanas parece ser essencial (52).

1.4.1 PEPTÍDEOS ANTIBIOFILMES E ABORDAGENS PARA UTILIZAÇÃO

A pesquisa por pequenos peptídeos catiônicos no tratamento contra biofilmes aumentaram drasticamente nos últimos anos (53). Os peptídeos antibiofilmes podem ser específicos para combater células em biofilmes embora sejam bioquimicamente semelhantes aos peptídeos antimicrobianos, utilizados contra células em estado planctônico (47). Adicionalmente, os peptídeos antibiofilmes apresentam características particulares contra biofilmes e são requeridas concentrações mais baixas para impedir o crescimento do que as utilizadas para células em crescimento planctônico (54,55).

Os peptídeos podem atuar através vários mecanismos para combater biofilmes (Figura 5). Os peptídeos podem a) agir de maneira profilática; b) impedindo a colonização bacteriana em superfícies de implantes médicos (56); c) ou alvejando células bacterianas ligadas ao início da formação do biofilme. Os peptídeos podem erradicar os biofilmes pré-formados a) impedindo o circuito de comunicação entre as células (*quorum sensing*) (53), b) alvejando a matriz que envolve o biofilme e causar desagregação ou neutralizando endotoxinas (Lipopolissacarídeos, fosfolipídeos) que tornam oportuno o estabelecimento de infecções (57).

Estudos com a LL-37 mostraram a sua capacidade em impedir a formação de biofilmes por *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* em soluções com elevados níveis de sal. No entanto, a atividade antimicrobiana foi perdida, demonstrando que peptídeos antimicrobianos e antibiofilmes utilizam mecanismos diferentes para alvejar as células bacterianas. Este estudo também mostrou que, a LL-37 inibiu (58-62%) a fixação do biofilme, sugerindo que, a interação entre o peptídeo e as adesinas bacterianas poderiam estar relacionadas com a redução na formação do biofilme (58). Os peptídeos sintéticos derivados da LL-37 (IDR-1018, DJK-5, e DJK-6) também foram descritos por apresentarem largo espectro de ação contra microrganismos multirresistentes, além de apresentarem atividade antibiofilme (6).

Recentemente, dois peptídeos catiônicos anfipáticos, KT2 e RT2, foram relatados por impedirem a formação de biofilmes de *E. coli* O157:H7 e se mostraram eficazes em erradicar biofilmes maduros deste isolado. Experimentos mostraram que o mecanismo de ação destes peptídeos consiste em interagir com o LPS (carregado negativamente) da membrana externa e auto-promover a sua captação para posteriormente interagir com os fosfolipídios de membrana. Interessantemente, estes peptídeos não induzem a formação de poros ou agregação das membranas bacterianas (59).

Um outro peptídeo, SB056, recentemente desenvolvido, mostrou atividade contra células planctônicas de *E. coli* e *S. aureus* e atividade contra biofilmes formados por *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* em concentrações abaixo ou próxima da CIM. Este peptídeo apresenta alta afinidade com pelas membranas bacterianas, isto pode ser explicado devido a carga e a presença de resíduos hidrofóbicos que poderiam favorecer a interação peptídeo-lipídio (60). Os peptídeos antibiofilmes aparentemente prejudicam alvos celulares que podem ser essenciais para o desenvolvimento do biofilme. A hipótese seria de que os peptídeos exerçam sua atividade através da restrição da resposta ao estresse que pode ser mediada pelo ppGpp (guanosina 3',5'-bispirofosfato). O ppGpp contribui para o desenvolvimento do biofilme, em situações em que os aminoácidos se encontram escassos, há o acúmulo de ppGpp, que desativa a síntese de novas proteínas, induz em larga escala alterações na transcrição, que conduzem a repressão dos genes necessários para o crescimento rápido, como RNAr. Rapidamente, fatores que são cruciais para a resistir ao estresse começam a ser produzidos, como a glicólise e a síntese de aminoácidos. A presença do ppGpp está relacionado com o crescimento, estresse, escassez de nutrientes, patogenicidade (61). Com aumento dos níveis de ppGpp as células do biofilme entram num estado caracterizado como dormência, que leva a um aumento da resistência aos antibióticos usualmente utilizados (62,63). Recentemente, Wang *et al.* (62) publicaram um estudo com o peptídeo 1018, demonstrando que atividade antibiofilme pode ocorrer através da estimulação e degradação do ppGpp. A degradação do ppGpp desencadeou morte celular de biofilmes com três dias de idade, em concentrações muito abaixo da CIM.

Tendo em vista todos os fatores apresentados, os peptídeos catiônicos são candidatos promissores para a concepção de novos antibióticos, uma vez que antibióticos clássicos utilizam metodologias convencionais visando vias metabólicas

específicas ou estruturas microbianas, que levam ao aumento de microrganismos amplamente resistentes. Um dos principais obstáculos para eficácia dos tratamentos antimicrobianos poderia ser a seleção de microrganismos resistentes, devido a mutações que favorecem a resistência a estes medicamentos (51).

Ademais, os peptídeos podem atuar sinergisticamente com antibióticos para melhorar a eficácia terapêutica contra microrganismos multirresistentes (53,64). A literatura propõe, que os peptídeos antibiofilme em sinergismo com antibióticos aumentam a permeabilidade de membranas bacterianas e que os peptídeos poderiam aumentar a atividade das hidrolases bacterianas ou de outras enzimas que diminuem a integridade de camada do peptideoglicano, permitindo que os antibióticos atuem de maneira eficiente (65).

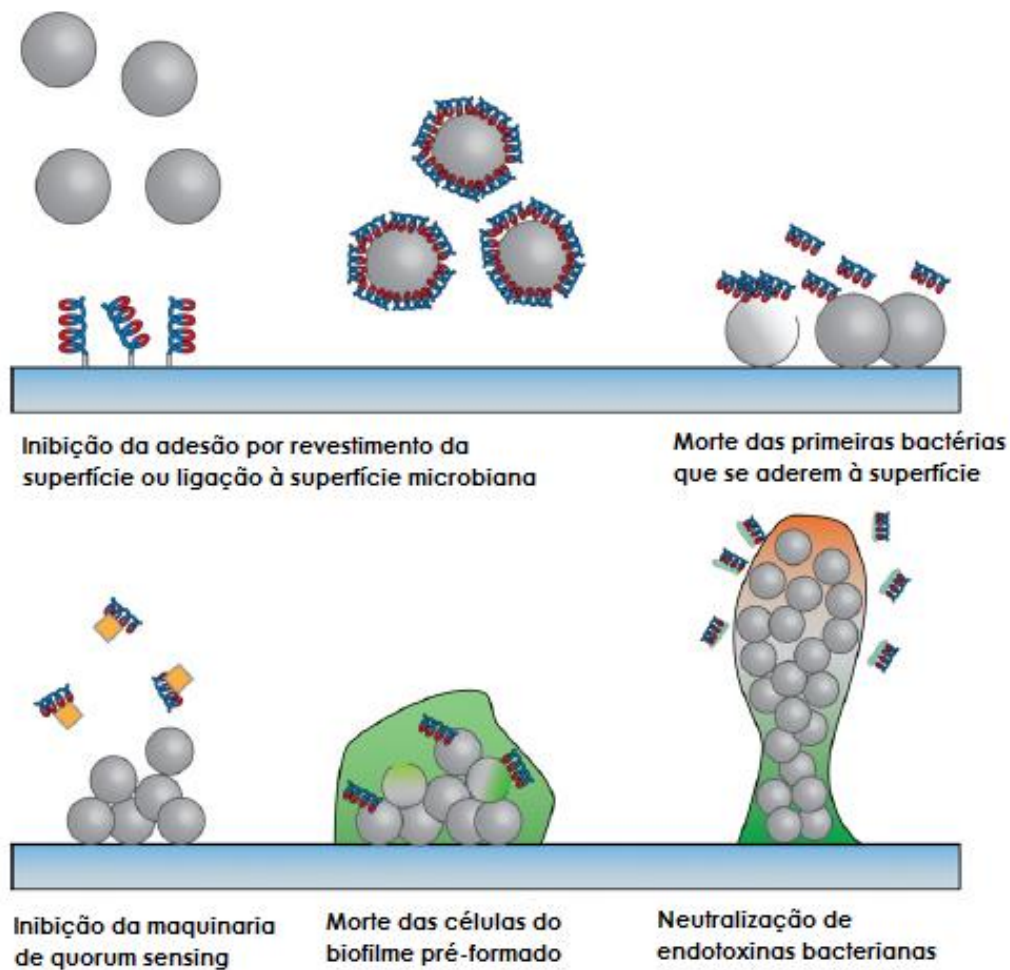


Figura 4 - Mecanismo de ação das estratégias antibiofilmes mediadas por PAMs. Painel superior, estratégias para a inibição do biofilme. PAMs pode impedir a adesão inicial do biofilme em superfícies. A maturação do biofilme pode ser evitada matando as células bacterianas colonizadoras iniciais. Painel inferior, estratégias de erradicação. Os PAMs podem se ligar a moléculas do sensor de *quorum sensing* para impedir a comunicação entre as bactérias. PAMs podem matar os biofilmes pré-formados pela penetração da matriz do biofilme. Os PAMs podem se ligar e neutralizar endotoxinas bacterianas associadas ao biofilme. Adaptado de LUCA: MACCARI: NIFOSI, 2014.

1.4.2 Peptídeo PCDAMP-5

Em virtude da procura por novas alternativas aos antibióticos convencionais, estudos de bioinformática têm sido apropriados para otimização de peptídeos antibiofilmes. Neste contexto, Porto et al. (dados não publicados) desenvolveu estudos de desenho racional para encontrar sequências de peptídeos antimicrobianos, realizando busca no banco de dados de proteínas não redundantes

(NR) por sequências potencialmente antimicrobianas. A partir desta análise, foi encontrado em um fragmento proteico hipotético proveniente de *Plasmodium chabaudii* (MNAINFTCTVHKKVAISV). Essa sequência obtida foi utilizada como entrada para o algoritmo JOKERII para obtenção de análogos com atividade antimicrobiana melhorada. Foram obtidas sete sequências análogas a sequência inicial (Tabela 1).

Tabela 1- Sequências de aminoácidos geradas no algoritmo de JOKER II proveniente do *P. chabaudii* contra *P. aeruginosa*. MM: massa molecular; CIM: Concentração inibitória mínima em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. *Sequência escolhida.

Peptídeos	Sequência de aminoácidos	MM (Da)	CIM
PCAMP1R1	PKLAIRITCKIHKKVAISV	2118,7	12,5
PCAMP1R2	PMKLLNRICTKIKKVAISV	2155,7	25
PCAMP1R3*	PMNAIKLLCRVHKKIAISV	2134,7	12,5
PCAMP1R4	PMNAINFTCKLLKKVAIKI	2145,7	12,5
PCAMP1B1	PMNKLLFRITVKIRVAISV	2198,7	200
PCAMP1B2	PMNAKILTRIVHKIVAISV	2103,6	100
PCAMP1B3	PMNAINKILTRIKKKIISV	2067,6	25

Dentre os resultados concebidos, a sequência PcAMP1R3 obteve melhor atividade contra *P. aeruginosa*. Com base nessa sequência foram feitas janelas deslizamento de 10 resíduos de aminoácidos (Tabela 2). Dentre os 10 fragmentos gerados, o peptídeo PCDAMP-5 mostrou-se promissor contra *P. aeruginosa* com CIM de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dados não mostrados. A partir desses resultados, o PCDAMP-5 (cod: *Plasmodium chabaudii* Antimicrobial Peptide sequência 5) foi sintetizado e avaliado neste estudo em relação a sua atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *K. pneumoniae*.

Tabela 2– Peptídeos e a sequência aminoácidos correspondentes que foram gerados por janela deslizamento contra *P. aeruginosa*. MM: massa molecular; CIM: Concentração inibitória mínima em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. *Sequência escolhida.

Peptídeos	Sequência de	MM(Da)	CIM
-----------	--------------	--------	-----

aminoácidos			
PCDBS1R3F1	PMNAIKLLCR	1158,4	>200
PCDBS1R3F2	MNAIRLLCRV	1188,5	25
PCDBS1R3F3	NAIKLLCRVH	1166,4	100
PCDBS1R3F4	AIKLLCRVHK	1180,5	50
PCDAMP-5*	IKLLCRVHKK	1237,6	12,5
PCDBS1R3F6	KLLCRVHKKI	1237,6	50
PCDBS1R3F7	LLCRVHKKIA	1180,5	50
PCDBS1R3F8	LCRVHKKIAI	1180,5	200
PCDBS1R3F9	CRVHKKIAIS	1154,4	>200
PCDBS1R3F10	RVHKKIAISV	1150,4	>200

2 JUSTIFICATIVA

K. pneumoniae está, nos dias de hoje, entre as principais responsáveis por infecções hospitalares que acometem pacientes imunodeprimidos. As infecções causadas por *K. pneumoniae* podem estar frequentemente associadas a biofilmes e consistem em problema emergente responsável por altas taxas de morbimortalidade devido à resistência bacteriana a múltiplos antibióticos. Na literatura foram relatados inúmeros fenótipos de resistência encontrados em isolados de *K. pneumoniae* por todo o mundo. Os fenótipos encontrados em isolados de *K. pneumoniae* apresentam resistência para quase todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo os antibióticos meropenem e imipenem. Infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC) vem se tornando cada vez mais um problema de saúde pública. Combater as infecções causadas por estes microrganismos são um desafio devido à limitação dos antibióticos disponíveis frente a esta bactéria. Na busca por novas alternativas, estudos com peptídeos antimicrobianos têm demonstrado importância, sendo designados como uma nova classe de antibióticos. A combinação de antibióticos clássicos com peptídeos tem se revelado efetiva contra crescimentos bacterianos. Este trabalho torna-se interessante, uma vez que investiga a eficácia entre o peptídeo sozinho ou combinado com antibióticos em inibir a formação de biofilme de *K. pneumoniae* multiresistente a antibióticos.

3 OBJETIVO

3.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antibacteriano e antibiofilme do peptídeo PCDAMP-5 combinado ou não combinado com antibióticos contra biofilmes formados por *K. pneumoniae* KPC. Ademais, analisar o comportamento estrutural do PCDAMP-5 através de simulações computacionais.

3.1.2 Objetivo Específico

- ✓ Avaliar o efeito antimicrobiano do peptídeo PCDAMP-5 em microplacas;
- ✓ Avaliar a atividade antibiofilme do peptídeo PCDAMP-5 em microplacas;
- ✓ Avaliar o efeito antibiofilme do peptídeo PCDAMP-5 em combinações com antibióticos imipenem e meropenem e ciprofloxacino em microplacas;
- ✓ Avaliar o potencial de PCDAMP-5 em erradicar biofilmes pré-formados;
- ✓ Avaliar a atividade hemolítica do peptídeo PCDAMP-5;
- ✓ Realizar análises estruturais do peptídeo PCDAMP-5 através de modelagem molecular e dinâmica molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese do peptídeo

A síntese do peptídeo PCDAMP-5 foi realizada pela empresa *Peptide 2.0 Incorporated* (EUA). A síntese foi realizada através da estratégia de 9-fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc), sendo utilizada a resina *RINK amide* para o acoplamento dos resíduos de aminoácidos, obtendo 95% de pureza. Para análise de massa, o peptídeo foi solubilizado em água Milli-Q, misturado em uma solução saturada de matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxycinâmico (1:3) e depositado em uma placa do tipo *MTP 384 massive*, seca a temperatura ambiente. PCDAMP-5 teve sua massa molecular exata determinada, utilizando um espectrômetro de massa do tipo *MALDI-ToF/ToF Ultraflex III (Bruker Daltonics)*. A calibração foi realizada utilizando *Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics)* como padrões de massa molecular.

4.2 Modelagem molecular

PCDAMP-5 foi submetido a simulações de modelagem molecular por homologia com base na estrutura cristalográfica de uma proteína DNA-ligante expressa em *E. coli* (PDB: 3ulx). No total, 100 modelos tridimensionais teóricos foram gerados, submetidos a etapas de refinamento e classificados de acordo com suas energias livre (DOPE score) utilizando o *software* Modeller v. 9.15 (66). O modelo teórico de menor energia livre foi então selecionado e validado em relação ao seu dobramento estrutural pelo servidor ProSA-web (67) bem como distribuição no Mapa de Ramachandram. A visualização da estrutura foi feita em PyMOL (<http://www.pymol.org>).

4.3 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular para PCDAMP-5 foram realizadas em ambiente hidrofílico (água – ponto de carga único). O campo de força

utilizado foi GROMOS96 43A1 e as análises foram realizadas utilizando o pacote computacional GROMACS versão 5.0.4 (68) . A dinâmica foi realizada com o melhor modelo tridimensional obtido para o peptídeo em potencial como estrutura inicial, o qual foi primeiramente imerso em moléculas de água dentro de uma caixa cúbica com os lados otimizados. Íons cloro (Cl) foram inseridos para neutralizar a carga do sistema. Todos os comprimentos de ligação de átomos foram ligados pelo algoritmo LINCS (69). Correções eletrostáticas foram feitas pelo algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME), com raio possuindo um *cut-off* de 1,4 nm, a fim de minimizar o tempo de simulação computacional. O mesmo *cut-off* para o raio foi também utilizado para as interações de van der Waals. A lista de vizinhos para cada átomo foi atualizada a cada 10 passos de simulação de 2 fs. A minimização de energia foi implementada por meio de um gradiente conjugado (2 ns) e do algoritmo *steepest descent* (2 ns). Depois disso, o sistema foi submetido a uma normalização da pressão e temperatura, usando o integrador estocástico de dinâmica a cada 2 ns. Os sistemas com energias minimizadas, temperaturas e pressão equilibradas foram realizadas por meio de um passo de restrição de posição, usando o integrador de dinâmica molecular, durante 2 ns. As simulações foram realizadas a temperatura ambiente. O tempo total de simulação foi de 100 ns para cada réplica. As simulações foram programadas em triplicata.

4.4 Isolado bacteriano

O isolado clínico de *K. pneumoniae* 182597, obtido do LACEN (Laboratório Centra de Saúde Pública) de Brasília, positivo para presença do gene KPC e multiresistentes a antibióticos (denominadas aqui como KP-KPC 182597), foram plaqueados em Ágar Müeller Hinton e incubados por 18-24 h a 37 °C. Estudos anteriores constataram que o isolado KP-KPC 182597 é resistente a múltiplos antibióticos (1).

4.5 Padronização da suspensão bacteriana

A preparação da suspensão bacteriana, separadamente, os meios de cultura Mueller Hinton (MH) caldo e ágar foram preparados conforme as instruções do fabricante, em seguida esterilizados em autoclave a 120 °C. Em segundo momento, as cepas KP-KPC 182597, KP-ATCC 13883 foram crescidas em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton por 24 h a 37°C. Após, foi realizada cultura *overnight* do inóculo bacteriano e cultivado em 3 mL caldo Müller Hinton, durante 18 h em incubadora shaker *Novatécnica*®.

4.6 Formação de biofilmes

A formação de biofilmes foi obtida através do meio mínimo BM2 líquido [fosfato de potássio 62 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 mM, MgSO_4 2 mM, FeSO_4 10 μM e glicose 0,5%]. Culturas de *K. pneumoniae* crescidas durante 18 h em meio Muller Hinton. O crescimento das células planctônicas foi avaliado através da absorbância a 600 nm. Os meios foram removidos, e os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada. Células aderentes foram coradas com cristal violeta a 0,01% por 20 min. Os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada, secas ao ar e o cristal violeta aderido a células, solubilizado com 100 μL de etanol 60%. A formação de biofilmes foi determinada através da absorbância a 595 nm. Todas as leituras foram realizadas em leitor de microplaca *Thermo Scientific*®. Para cada experimento foram realizados três repetições técnicas e três biológicas (1).

4.6.1 Ensaio de inibição da formação do biofilme

Cepas KP-KPC 182597 foram cultivadas como descrito anteriormente. Para este ensaio, a suspensão bacteriana foi diluída (1:50, v/v) e, os poços da microplaca foram preenchidos com 50 μL de meio BM2. Em seguida foram acrescentados 100 μL do peptídeo ou meropenem e realizada as diluições seriadas de 64 a 0,0625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Adicionalmente, foram distribuídos 50 μL das suspensões dos microrganismos em cada poço das microplacas. Também foram utilizados o controle não tratado (50 μL de meio BM2 e 50 μL da

suspensão bacteriana) e controle do meio (100 µL). As microplacas foram incubadas a 37 °C e acessadas no tempo de 24 horas. O crescimento planctônico e a formação de biofilmes foram acessados como descrito anteriormente (1).

4.6.2 Ensaios de combinação entre peptídeos e antibióticos em microplaca

Cepas de KP-KPC 182597 foram cultivadas como descrito anteriormente. A suspensão bacteriana foi diluída (1:100, v/v). Foram realizadas diluições seriadas de 0,25 a 32 µg.mL⁻¹ do peptídeo e diluições de 8 a 0,125 µg.mL⁻¹ dos antibióticos meropenem, imipenem e ciprofoxacino. Para avaliar o efeito sinérgico do PCDAMP-5 com os antibióticos, foi realizada a técnica de tabuleiro em xadrez em microplacas de 96 poços (70). Neste ensaio, os antibióticos foram diluídos ao longo das linhas enquanto o peptídeo foi diluído ao longo das colunas, de forma que cada poço estivesse com 25 µL do antibiótico e 25 µL do peptídeo. Adicionalmente, foram distribuídos 50 µL das suspensões dos microrganismos (diluição 1:100, v/v) em cada orifício das microplacas. Também foram utilizados o controle não tratado (50 µL de meio e 50 µL da suspensão bacteriana) e controle do meio (100 µL). As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24h. O crescimento planctônico e a formação de biofilmes foram acessados como descrito acima. O índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), é determinado como segue: $ICIF = [A]/CIM_A + [B]/CIM_B$, onde CIM_A e CIM_B são as CIM dos compostos antimicrobianos isolados, $[A]$ e $[B]$ são as CIMs de A e B quando combinados. O ICIF foi interpretado como segue: $ICIF \leq 0.5$, efeito sinérgico; $0.5 < ICIF \leq 1$, efeito aditivo; $1 < ICIF \leq 2$, efeito indiferente.

4.7 Ensaio de erradicação do biofilme pré-formado

O ensaio foi desenvolvido segundo La Fuente-Núñez *et al* (18) com modificações. Para erradicar biofilme pré-formado, a suspensão bacteriana foi diluída (1:100, v/v). Biofilmes de KP-KPC 182597 foram formados como descrito anteriormente, durante o período de 6 e 24 horas. Após, as placas

foram lavadas duas vezes com água deionizada, este processo foi realizado para eliminar as células planctônicas. Diferentes concentrações do peptídeo ou meropenem (2 a 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram adicionadas nas microplacas do biofilme pré-formado. Também foram utilizados o controle não tratado (50 μL de meio BM2 e 50 μL da suspensão bacteriana) e controle do meio (100 μL). Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24h. A formação de biofilmes foi acessada como descrito anteriormente.

4.8 Ensaios de combinação entre peptídeo e antibióticos contra biofilmes pré-formados

Para este ensaio, a suspensão bacteriana foi diluída (1:100, v/v). Biofilmes de KP-KPC 182597 foram formados como descrito anteriormente, durante o período de 6 horas. Após, os biofilmes pré-formados foram lavados duas vezes com água deionizada para remoção das células planctônicas. Foram realizadas diluições seriadas de 64 a 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do peptídeo e dos antibióticos meropenem ou ciprofloxacino. A avaliação do efeito sinérgico foi realizada pela técnica de tabuleiro em xadrez como descrito anteriormente (68). Neste ensaio, os antibióticos foram diluídos ao longo das linhas enquanto o peptídeo foi diluído ao longo das colunas, de forma que cada poço estivesse com 10 μL do antibiótico e 10 μL do peptídeo. Adicionalmente, foram distribuídos 90 μL (controle dos agentes antimicrobianos, onde os mesmos não são combinados) e 80 μL do meio BM2 nos demais orifícios das microplacas. Também foi utilizado controle não tratado (100 μL de BM2) e controle do meio (100 μL de BM2). As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A formação de biofilmes foi acessada como descrito acima. Os cálculos do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foram realizados como descrito anteriormente.

4.9 Ensaio hemolítico

O ensaio hemolítico foi desenvolvido conforme Tavares *et al* (52), com algumas modificações. Brevemente, sangue fresco de camundongo *swiss* foi coletado em tubos BD *Vacutainer* com EDTA e lavado três vezes com solução

salina. A suspensão das células foi centrifugada a 1600 rpm por 2 minutos. Alíquotas de 50 µL da suspensão de eritrócitos a 1% foi incubada com 50 µL de uma série de diluições de duas vezes (1:2) do peptídeo, em microplaca de 96 poços. A placa foi incubada a temperatura ambiente por uma hora. A hemoglobina liberada foi quantificada a 415 nm no leitor de microplacas *Thermo Scientific®*. Triton X-100 (1 %) foi utilizado como controle positivo, representando 100 % de lise celular e solução salina foi utilizada, como controle negativo, representando 0 % de hemólise. Todos os experimentos foram realizadas em triplicata. A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{(A_{415 \text{ nm}} \text{ com a solução do peptídeo} - A_{415 \text{ nm}} \text{ em solução salina})}{(A_{415 \text{ nm}} \text{ com Triton X-100} - A_{415 \text{ nm}} \text{ em solução salina})} \times 100$$

Todos os procedimentos foram realizados levando em consideração o bem estar animal e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Católica Dom Bosco, nº028/2015.

5 CAPÍTULO I

O trabalho a seguir foi elaborado segundo as normas da **Revista Antimicrobial Agents Chemotherapy- Short Communication**.

Bioinspired non-haemolytic small cationic peptide with selective antibiofilm activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*

Viviane P. M. Santos¹, Suzana M. Ribeiro¹, Marlon H. Cardoso^{1,2,3}, Willian F. Porto², Bruna O. Costa¹, Matheus J. Santos¹, Osmar N. Silva¹, and Octávio L. Franco^{1,2,3*}

¹S-inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil;

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises de Proteômica e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil;

³Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil.

Running title:

***Corresponding author:** Octávio Luiz Franco: Phone number: +55 61 34487167/ +55 61 34487220, Fax number: + 55 61 33474797, ocfranco@gmail.com

Abstract

Klebsiella pneumoniae carbapenemase producing *K. pneumoniae* (KpC-Kp) could resistant to multiples antibiotics. Biofilms formed by this resistant bacterium are hardly to treat. Here, we describe the activity of bioinspired non-hemolytic, small cationic peptide, named PCDAMP-5 (IKLLCRVHKK), presents a selective antibiofilm activity against *K. pneumoniae* strains resistant to multiple antibiotics, also presenting a highly unstable structure in hydrophilic environment. Such characteristics make this peptide a potential alternative in clinical scenario.

Klebsiella pneumoniae carbapenemase producers represents a public health threat due its resistance to multiples antibiotics (1–3). In addition, their inherent ability to form biofilm increase the pathogenicity among this bacterium and limit even more the antibiotic therapy (4,5). In this scenario, peptides have become a promising alternative to inhibit bacterial biofilms (6,7). Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the peptide PCDAMP-5 against *K. pneumoniae*, also shedding some light over the possible structural conformations adopted by PCDAMP-5 in hydrophilic environment.

In order to generate potential antimicrobial peptides we use computational tools for rational design. Antimicrobial sequences were screened from the non-redundant database (NR) (8). A fragment of 18 amino acid

residues from a hypothetical protein from *Plasmodium chabaudii* was used as input for the JOKER II algorithm (data not published). The peptide was synthesized by solid phase (Fmoc) with >95% purity. The molecular mass was confirmed by MALDI-ToF analyses (Fig.S1). The peptide PCDAMP-5 inhibited *P. aeruginosa* with minimal inhibitory concentration (MIC) of 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In this context, PCDAMP-5 was selected for further antimicrobial and antibiofilm assays against *K. pneumoniae* (ATCC 13883) and (KpC182597 - clinical isolate) strains (9), respectively.

The primary sequence of PCDAMP-5 was subjected to homology modelling based on the crystal structure of a DNA-binding protein expressed in *E. coli* (PDB code: 3ulx). A hundred 3D theoretical models were built on Modeller v.9.15 (10), ranked according to their free-energy values and further submitted to refinement procedures. The lowest free-energy model had its folding quality evaluated on ProSA-web (z-score = 0.22) (11) and the Ramachandran Plot (>90% in most favourable regions) (12) was generated. Further, the validated model was then submitted to molecular dynamics simulations in water during 100 ns using the GROMOS43a1 force field from the GROMACS v.5.0.4 (13) computational package. Structure visualization was performed in PyMOL (<http://www.pymol.org>) (Fig. 1A). PCDAMP-5 presented an amphipathic random coil structure (Fig. 1A) highly unstable in water, as indicated by root mean square deviation (RMSD) and root mean square fluctuation (RMSF) analyzes (Fig. 1B). Moreover, during dynamics simulations it was observed that PCDAMP-5 tends to compact as suggested by a decrease on its radius of gyration (Rg) and solvent-surface accessible area (SASA) (Fig. 1B), and observed during 100 ns of dynamics simulations (Fig. 1C). These data,

might suggest several transition states in PCDAMP-5 folding kinetics, which may be related to its selective antibiofilm activities toward KpC-Kp.

Antibiofilm assays were performed using basal medium 2 (BM2) [62 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 7 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 10 μM FeSO₄ and 0.4 % glucose] (9) to determine the MIC and the minimal biofilm inhibitory concentration (MBIC) toward KpC-Kp strains. We observed that PCDAMP-5, at concentrations up to 64 μg.mL⁻¹, was unable to inhibit planktonic cells. However, this peptide presented a dose-dependent activity in the inhibition of biofilm (Figure 1). On the other hand, meropenem presented a dose-dependent effect both against planktonic cells and against biofilm of *K. pneumoniae*, indicating that the prevention of biofilm formation was associated with the inhibition of these free-floating cells. Taken together, these results suggest that PCDAMP-5 presents a selective activity in preventing *K. pneumoniae* biofilm formation. These results corroborate with previous studies showing that some peptides present higher antibiofilm potential than antimicrobials against resistance bacteria (9,14–16). Therapies that target the biofilm formation inhibition are essential, due to the resistance biofilms profile. Usually, high concentrations of antibiotics are required to eradicate pre-established biofilms, favoring the selection of resistant microorganisms (17,18). In this scenario, preventing biofilm formation appears as an advantageous strategy.

Inhibition studies involving combination (9) between PCDAMP-5 and antibiotics (imipenem, meropenem and ciprofloxacin) was inefficient to inhibit biofilm formation of *K. pneumoniae*. Moreover, biofilm eradication assays based on previous studies with modifications (19) revealed that PCDAMP-5 alone or

combined to antibiotics was ineffective in eradicating *K. pneumoniae* pre-formed biofilms.

Haemolytic assays developed according to Tavares and colleagues (20) showed that PCDAMP-5 had no hemolytic effects when tested up to $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ against human erythrocytes and up to $640 \mu\text{g.mL}^{-1}$ against mouse erythrocytes. These results indicate that PCDAMP-5 may be a safe antibiofilm candidate to use in clinical context.

The pathogenic bacterial ability to form biofilm form is a serious issue to public health. Usually higher antibiotic doses are used to treat biofilm infections. Such therapies may be toxic to patients and additionally, may favor the positive selection of resistant strains. Combat these microorganisms without kill them could be an interesting approach to avoid selection of resistant traits. In this context, the selective antibiofilm ability of PCDAMP-5, its non-haemolytic effect, could make of this peptide a potential and secure option to prevent biofilm infections in clinical scenario.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) and Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT)

REFERENCES

1. ARNOLD, Ryan S. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. **Southern medical journal**, v. 104, n. 1, p. 40, 2011.
2. MARSH, Jane W. et al. Genomic epidemiology of an endoscope-associated outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0144310, 2015.
3. VUOTTO, Claudia et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743-758, 2014.
4. BJARNSHOLT, Thomas. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **Apmis**, v. 121, n. s136, p. 1-58, 2013.
5. JORGE, Paula; LOURENÇO, Anália; PEREIRA, Maria Olívia. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. **Biofouling**, v. 28, n. 10, p. 1033-1061, 2012.
6. HANCOCK, Robert EW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 3, p. 156-164, 2001.
7. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, César et al. Anti-biofilm and immunomodulatory activities of peptides that inhibit biofilms formed by pathogens isolated from cystic fibrosis patients. **Antibiotics**, v. 3, n. 4, p. 509-526, 2014.
8. LIU, Bo; POP, Mihai. ARDB—antibiotic resistance genes database. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_1, p. D443-D447, 2008.
9. RIBEIRO, Suzana Meira et al. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to β -lactam antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3906-3912, 2015.
10. SALI, Andrej. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Immunotechnology**, v. 4, n. 2, p. 279-280, 1996.
11. WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl 2, p. W407-W410, 2007.
12. RAMACHANDRAN, Gopalasamudram Narayana et al. Aspects of protein structure. In: **International Symposium on Protein Structure and Crystallography (1963: Madras, India)**. Academic Press, 1963.

13. LINDAHL, Erik; HESS, Berk; VAN DER SPOEL, David. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of molecular modeling**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001.
14. OVERHAGE, Joerg et al. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 76, n. 9, p. 4176-4182, 2008..
15. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, César et al. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 5, p. e1004152, 2014.
16. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, César et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.
17. RABIN, Nira et al. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. **Future medicinal chemistry**, v. 7, n. 5, p. 647-671, 2015.
18. WORTHINGTON, Roberta J.; RICHARDS, Justin J.; MELANDER, Christian. Small molecule control of bacterial biofilms. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 10, n. 37, p. 7457-7474, 2012.
19. GUTIERREZ, Diana et al. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107307, 2014.
20. TAVARES, Letícia Stephan et al. Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 294-300, 2012.

Figure legends

Figure S1. Analysis of PCDAMP-5 by MALDI-ToF revealing a ion of monoisotopic mass $[M + H]^+ = 1237.6$ m/z.

Figure 1. (A) Three-dimensional structure predicted for the peptide PCDAMP-5, in yellow: basic polar residues; In cyan: nonpolar residues. (B) Graphical representation of the physicochemical parameters resulted from molecular dynamics simulations. (C) Three-dimensional theoretical structures snapshots of PCDAMP-5 during 100 ns of molecular dynamics simulation in water.

Figure 2. Inhibition of the formation of biofilms of KpC-Kp 1825971 in the presence of numerous concentrations PCDAMP-5 and meropenem in the time of 24 hours. In the x-axis, we have the concentrations of antimicrobial agents.

Figure S1

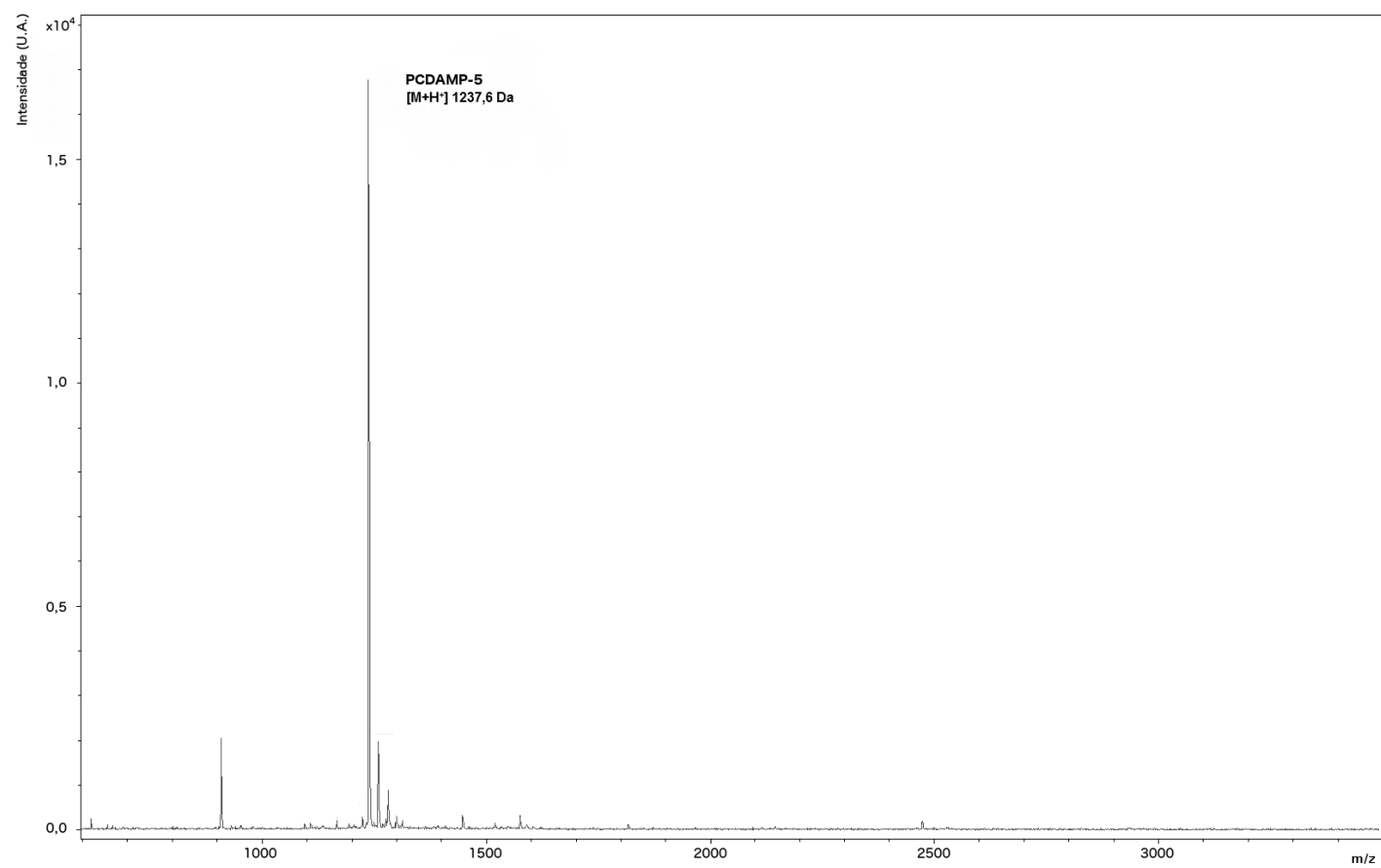


Figure 1

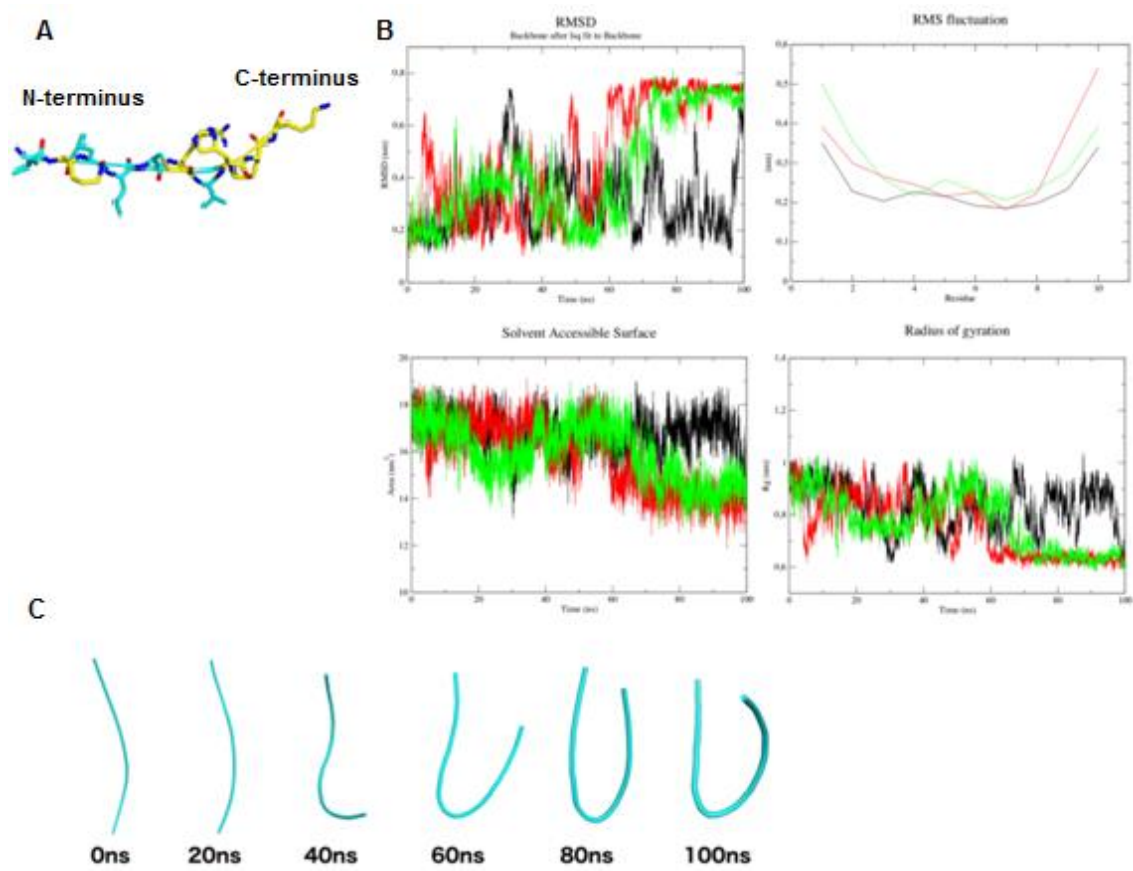
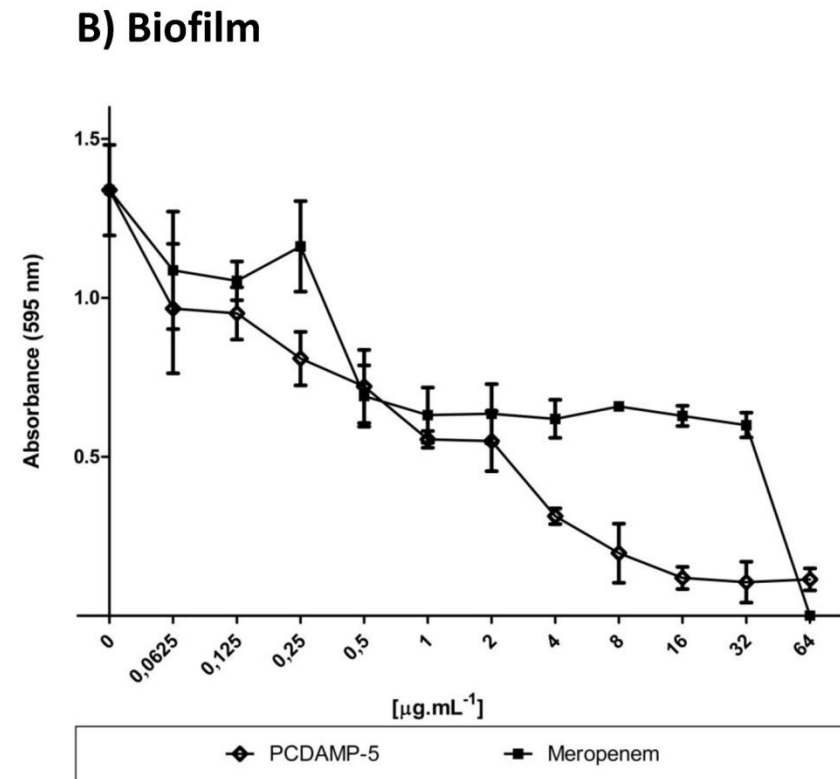
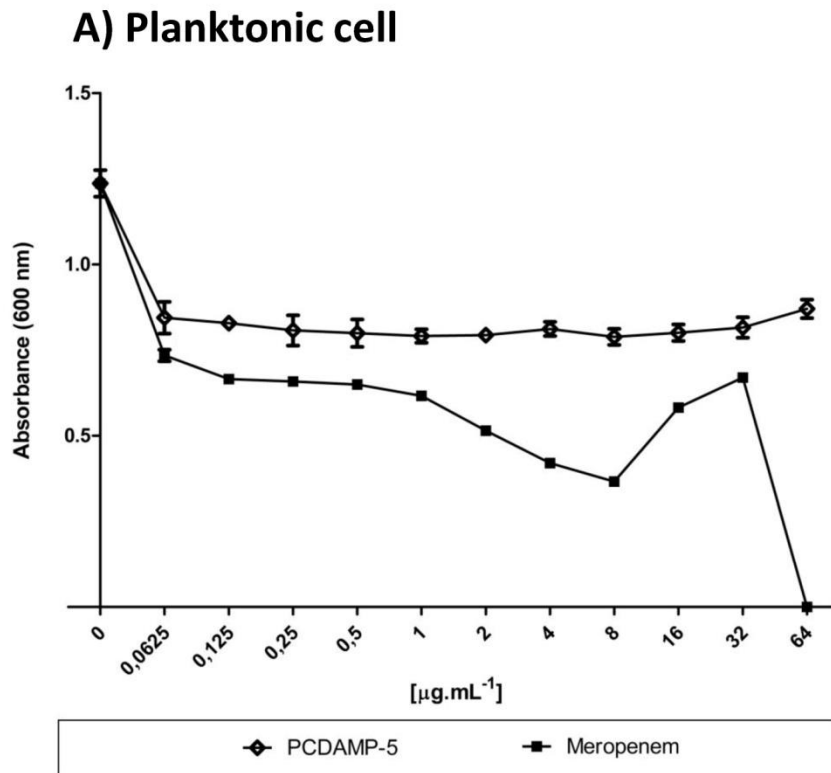


Figure 2



6 DISCUSSÃO

As infecções causadas por biofilmes comumente são difíceis de serem tratadas com os antibióticos disponíveis devido a altas taxas de resistência (13). A inerente capacidade de *K. pneumoniae* produtoras KPC em formar biofilmes e a ineficiência dos antimicrobianos em eliminá-los tem sido preocupante. Esta estirpe tem sido resistente a quase todos os antibióticos incluindo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenens (71). A busca por novos antimicrobianos para tratar essas infecções pode ser crucial (13). Pesquisas dedicadas aos estudos peptídeos antimicrobianos e antibiofilmes podem ser altamente promissoras, uma vez que, mais de 1200 PAMs foram identificados nos últimos anos. Essas descobertas foram impulsionadas por estudos que avaliaram o número crescente de resistência bacteriana a antibióticos (49). Pequenos peptídeos catiônicos podem impedir a formação de biofilmes, por interagir com a membrana celular do biofilme através de interações eletrostáticas. Após atingirem determinada concentração na membrana, os peptídeos podem criar poros e danos a membrana, podendo levar a morte celular (72). É importante ressaltar que peptídeos antibiofilmes não apresentam necessariamente atividade contra as células em estado planctônico. Como exemplo, pode ser citado o peptídeo LL-37, que em condições fisiológicas apresenta baixa atividade contra culturas planctônicas, entretanto, apresenta atividade contra biofilmes em concentrações muito abaixo da CIM (60).

Com o objetivo de combater biofilmes, analisamos a atividade *in vitro* do peptídeo PCDAMP-5 sozinho e em combinação com antibióticos contra biofilmes formados por uma estirpe susceptível e resistente de *K. pneumoniae*. Neste trabalho, foi verificada a capacidade de inibição de crescimento das células planctônicas e dos biofilmes dos isolados KP-ATCC 13883 e KpC-Kp 1825971 na presença do PCDAMP-5 e meropenem (64 a 0,0625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi observado que o peptídeo PCDAMP-5 foi ineficiente contra células planctônicas. Entretanto esse peptídeo limitou a formação do biofilme nas concentrações de 16 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Concentrações de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do PCDAMP-5 e meropenem inibiram a formação de biofilmes de KpC-Kp 1825971, em 90 % e 100 %, respectivamente, após 24 horas

de incubação. Nossos estudos sugerem que o peptídeo reduz a adesão bacteriana a superfícies. Nesse contexto, muitos peptídeos sintéticos têm sido relatados por apresentarem atividade antibiofilme. Dentre estes, o peptídeo 1018 tem demonstrado potente atividade antibiofilme contra bactérias (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Burkholderia cenocepacia*) em concentrações sub-inibitórias. O peptídeo 1018 pode apresentar diferente atividade contra os biofilmes, concentrações de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram suficientes para dispersar biofilmes pré-formados, enquanto que concentrações de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram responsáveis pela morte celular dos biofilmes. Ademais, foi demonstrado que o 1018 pode alvejar nucleotídeos associados à resposta ao estresse, o ppGpp, um fator importante que contribui para a manutenção e desenvolvimento dos biofilmes. Esta descoberta pode explicar a ampla atividade do peptídeo 1018 contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (54).

Uma etapa crucial para o estabelecimento das infecções em implantes médicos, superfícies dentárias, entre outros, consiste no processo de adesão dos biofilmes a essas superfícies (73). Encontrar substâncias que possam inibir ou reduzir a taxa de adesão bacteriana tem se tornado importante. Estudos prévios evidenciaram que na presença dos peptídeos LL-37 e 1018, houve redução da adesão bacteriana em microplacas de poliestireno após 1 hora de incubação, devido a uma mudança na expressão de genes relacionados a adesão (74). Nosso resultado corrobora com estudos que avaliaram a atividade de inibição do crescimento de culturas planctônicas e de biofilmes na presença da LL-37. A LL-37 apresenta atividade contra células em biofilme, no entanto, não se mostra ativa contra culturas planctônicas (24,75). Anderl *et al.* (76), observaram que os biofilmes formados por estirpes mutantes de *K. pneumoniae* e após 4 e 24 horas de tratamento com ampicilina permaneceram resistentes comparado com as células planctônicas. Estas observações sugerem que peptídeos antimicrobianos podem apresentar mecanismos de ação diferentes na presença de culturas de biofilmes e sob células planctônicas.

Em nossos estudos, o peptídeo PCDAMP-5 foi combinado com antibióticos (imipenem, meropenem e ciprofloxacino). Entretanto, não foram observados efeitos de combinação entre esses agentes. O propósito deste ensaio consistiu em verificar a capacidade do PCDAMP-5 em potencializar a ação antibiofilme dos antibióticos imipenem e meropenem contra *K. pneumoniae* resistente a carbapenem. A

combinação entre dois agentes antimicrobianos no tratamento de infecções resistentes tem sido amplamente estudada a fim de obter melhores resultados no tratamento. A penicilina pode ser usualmente utilizada no tratamento de endocardite estreptocócica. Estudos mostraram que os efeitos da combinação entre a penicilina e a gentamicina, ampliaram a morte bacteriana e foram responsáveis pelo êxito do tratamento (74). A combinação de ciprofloxacino com inúmeros peptídeos (CP α 1, CP204, CP201, CP202) apresentaram resultados sinérgicos contra *P. aeruginosa*, concentrações de 1 a 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos peptídeos, foram eficientes em reduzir em até 4 vezes a CIM do ciprofloxacino (0,25 $\mu\text{g.mL}$) (77). Também foi demonstrada atividade de sinergismo entre o peptídeo 1018 e antibióticos contra a formação de biofilmes. A combinação do 1018 em baixas concentrações com os antibióticos ceftazidima, ciprofloxacino, imipenem ou tobramicina contra as bactérias *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *Salmonella entérica* e *S. aureus* resistente a meticilina, reduziram em até 64 vezes a concentração dos antibióticos necessária para eliminar os biofilmes formados por estas bactérias (54). O peptídeo DJK-6 quando associado ao antibiótico imipenem, retomou atividade do antibiótico contra *K. pneumoniae* carbapenemase produtora, demonstrando que peptídeos podem ser utilizados para “recuperar” atividade de antibióticos contra bactérias resistentes (60). Os efeitos de sinergismo não se limitam somente aos antibióticos, muitos peptídeos têm sido utilizados para aumentar a atividade de antifúngicos. A combinação do peptídeo bacillomycin D com a anfotericina B apresentou potente atividade sinérgica contra *Candida albicans* (78). Ademais, a combinação do peptídeo AS10 com os antifúngicos caspofungin e anfotericina B, reduziram em até 8 vezes a concentração dos antifúngicos necessárias para erradicar os biofilmes formados por *C. albicans* (79).

Muitos estudos têm demonstrado que os peptídeos podem ser usados em combinação com antibióticos, antifúngicos e com compostos antimicrobianos para aumentar a eficácia terapêutica. Os resultados de sinergia advindo dessas combinações podem resultar em diminuição das doses de antibióticos, consequentemente temos a redução de custos, dos efeitos tóxicos e, da propagação de cepas resistentes. Em geral, tratamentos com antibióticos em monoterapia são ineficazes para erradicar infecções causadas por biofilmes, levando a uma infecção crônica (60). Peptídeos que demonstram sinergia com antibióticos podem ser utilizados como uma abordagem eficiente para combater infecções que apresentam

resistência aos antibióticos usualmente empregados (54). Este estudo também avaliou a capacidade do peptídeo PCDAMP-5 e meropenem sozinhos em erradicar biofilmes pré-formados de 6 horas do isolado KpC-Kp1825971 em microplacas, após 24 h de incubação. Observamos que na presença de meropenem ($256 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e do PCDAMP-5, houve redução de 46 % e 38 %, respectivamente dos biofilmes pré-formados. Estudos de erradicação de biofilmes pré-formados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenens, realizados em câmara de fluxo celular mostraram que os peptídeos IDR-1018 e DJK-6, apresentaram uma considerável redução da biomassa dos biofilmes, quando comparado com o controle (1).

Nos estudos de erradicação de biofilmes pré-formados (6 h de idade), também avaliamos as combinações do peptídeo PCDAMP-5 com os antibióticos meropenem e ciprofloxacino. No entanto, não foram observados resultados de sinergia entre os agentes antimicrobianos na erradicação. Como descrito anteriormente, os peptídeos antibiofilmes podem dificultar ou inibir a aderência dos biofilmes a superfícies. Abordagens envolvendo a combinação de compostos têm se mostrado eficiente em inibir ou erradicar biofilmes de cepas bacterianas resistentes. Estudos envolvendo a combinação da lisostafina com o antibiótico oxacilina, por exemplo, resultou no aumento da sensibilidade bacteriana ao antibiótico (80). A combinação lisostafina com nafcilina contra infecções instaladas em dispositivos médicos, mostrou que o tratamento por 4 dias, utilizando 15 mg.Kg^{-1} de lisostafina com 50 mg.Kg^{-1} de nafcilina, foram efetivos em remover biofilmes de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) (80). A combinação dos antibióticos colistina e ciprofloxacino foi ineficaz *in vitro* (não matou todas as células do biofilme) (81), no entanto, apresentou eficácia *in vivo* na erradicação precoce de biofilmes de *P. aeruginosa* de pacientes com fibrose cística (82). Possivelmente, o ciprofloxacino atua na camada mais superficial do biofilme, onde as células metabolicamente mais ativas se encontram, enquanto a colistina, apresenta atividade contra as células menos ativas localizadas nas camadas mais profundas (81). Em nossos estudos mostramos que o peptídeo PCDAMP-5 atua no processo inicial de adesão mas não apresenta a capacidade de erradicar as células que já se encontram aderidas a superfícies.

Embora PCDAMP-5 tenha sido ineficaz em erradicar biofilmes pré-formados de KpC-Kp 1825971, esse peptídeo apresentou como descrito, atividade em inibir a formação de biofilmes. Interessantemente, concentrações até 10 x maior que $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (concentração que inibiu 90% do biofilme) não foi hemolítico contra eritrócitos

humanos ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e camundongo ($640 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sugerindo que o PCDAMP-5 poderia ser um opção segura em terapias antibiofilmes. As atividades líticas que alguns peptídeos catiônicos antimicrobianos e antibiofilmes apresentam contra os eritrócitos humanos, consistem em um impedimento para a utilização destes compostos. Alterações das propriedades membranares dos peptídeos como hidrofobicidade, momento hidrofóbico, podem ser responsáveis pelo aumento atividade antimicrobiana e também da capacidade lítica (48). Estudos *in silico*, utilizando o método *de novo* para o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos, foi realizado para projetar uma série de peptídeos com base em uma sequência (BHPHB) com potencial antimicrobiano. Dos análogos testados, I-RW, apresentou maior atividade antimicrobiana contra *E. coli* ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *S. aureus* ($8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), limitada citotoxicidade e nenhuma atividade hemolítica em altas concentrações ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (83).

A modelagem molecular foi realizada para melhor compreensão da estrutura tridimensional teórica do peptídeo PCDAMP-5, assim como, as possíveis interações que são favorecidas devido à organização estrutural. Observou-se, que o peptídeo não adota uma estrutura tridimensional bem definida, mas uma conformação em *random coil* (sem estrutura secundária definida). O PCDAMP-5 apresentou uma estrutura *random coil* anfipática altamente instável em água, tal como indicado pelo desvio quadrático médio (RMSD), bem como pela flutuação quadrática média (RMSF). Foi observado que alguns peptídeos curtos quando analisados em solução aquosa não apresentavam estrutura definida, como exemplo Cn-AMP1 (84), magainina e cecropinas (85). Além disso, durante as simulações dinâmicas, observou-se que PCDAMP-5 tende a compactar, como observado nas análises de raio de giro (R_g) e área de superfície acessível ao solvente (SASA), bem como em suas estruturas tridimensionais ao longo dos 100 ns de simulação. Esses dados podem sugerir vários estados de transição na cinética de dobramento de PCDAMP-5, o qual pode estar relacionado às suas atividades seletivas de perante biofilmes formados por KpC-Kp1825971.

As diferentes condições que o microambiente proporcionam poderiam estar relacionadas com as múltiplas atividades que os peptídeos exibem —característica denominada como promiscuidade— e, não somente, com a estrutura tridimensional que estes compostos adotam (52,86). As condições microambientais poderiam facilitar o dobramento proteico (86). Estudos sugeriram que a interação da clavanina

A com lipídeos poderia estar correlacionada com as propriedades microambientais, este comportamento foi observado nos peptídeos lineares magainina e LL-37, que apresentam multifuncionalidade a depender do microambiente (52). Foi demonstrado que o peptídeo LfcinB apresenta atividade antitumoral, todavia, sem causar danos as células normais (87). Essa característica poderia ser explorada a fim de obtermos um composto multifuncional para o desenvolvimento de novos antibióticos. Peptídeos multifuncionais conseguem interagir em diferentes alvos celulares, que podem incluir as membranas bacterianas, alvos que visam o controle do processo metabólico e atividade contra células tumorais (86,87).

Inicialmente, os peptídeos podem interagir com as membranas lipídicas através de ligações eletrostáticas, e posteriormente podem ocasionar alterações na estrutura da membrana, que incluem formação de poros, perturbação da membrana, modificação eletrostáticas e interação com alvos intracelulares. Foram descritos alguns mecanismos de resistência. Entretanto, a atividade dos peptídeos envolvem alvos pontuais, altamente específicos, que não poderiam prejudicar a eficácia de inúmeros peptídeos antimicrobianos. Desta forma, a utilização de peptídeos antimicrobianos constitui uma opção vantajosa à utilização de antibióticos (50,88).

As propriedades intrínsecas e o perfil farmacêutico que os peptídeos apresentam podem ser o ponto inicial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas utilizando estes compostos (83). A especificidade associada a excelente segurança, tolerância e eficácia em humanos, representam uma prerrogativa para a utilização clínica destes compostos. Mais de 7000 peptídeos naturais foram identificados e, muitos destes peptídeos apresentam funções essenciais na fisiologia humana, das plantas e das bactérias (47,48,89). Muitas vezes, peptídeos que ocorrem naturalmente podem apresentar baixa seletividade e eficácia, alta capacidade hemolítica e elevados custos de produção para a indústria (atribuído às sequências longas de aminoácidos), devido a estes fatores, estes compostos podem não ser diretamente utilizados como uma opção terapêutica (54). Através do desenho racional obtemos o aprimoramento das propriedades naturais de peptídeos anteriormente descritos, que podem apresentar maior atividade e seletividade, especificidade, segurança, sequências curtas de aminoácidos. As abordagens que utilizam o desenho racional podem também impulsionar a descoberta de novos peptídeos (88). O desenvolvimento de tecnologias inovadoras fundamentadas na multifuncionalidade de peptídeos pode contribuir para

desenvolvimento de medicamentos que apresentam até uma tríplice atividade farmacêutica. Atualmente, muitos peptídeos multifuncionais que estão desenvolvimentos são potenciais candidatos a fármacos antimicrobianos, ademais, esses peptídeos podem estimular o sistema imune e favorecer a cicatrização de feridas (89).

Vários estudos têm-se concentrado em modelos baseado em sequências curtas de aminoácidos, sem alterar ou potencializando a atividade antimicrobiana (50,87). Peptídeos de sequências curtas conseguem penetrar mais facilmente nas células bacterianas, devido ao seu pequeno tamanho e, posteriormente, agindo intracelularmente. Esta capacidade foi observada em dois peptídeos, combi-1 e combi-2, que são compostos por 6 aminoácidos (87). A remoção dos três primeiros resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal do peptídeo magainina 2, não prejudicou a atividade bactericida e contribuiu para a redução dos custos da síntese. Entretanto, a remoção do resíduo Lys (posição 4) foi responsável pela redução da atividade (90). Os peptídeos que apresentam sequências curtas de aminoácidos são interessantes para a indústria, uma vez que, apresentam menores valores gastos na produção quando comparados com peptídeos com sequências longas de aminoácidos (87,90).

Análises *in silico* utilizadas para reconhecer sequências de aminoácidos potencialmente antimicrobianas em banco de dados, puderam prever quase 100.000 peptídeos com possíveis atividades. Destas sequências, 200 foram sintetizadas e testadas contra bactérias. Algumas destas sequências foram altamente ativas quando comparadas com o controle (bactenecin 2A) (50). Esses peptídeos foram testados contra bactérias resistentes a vários antibióticos e, interessadamente, muitos peptídeos sintéticos apresentaram valores de MIC < 10 µM e MIC < 1 µM, semelhantes aos melhores peptídeos anteriormente descritos, mesmo apresentando uma sequência curta, com nove aminoácidos (50).

Em um estudo que avaliou análogos curtos provindos do peptídeo BLFC quanto a sua atividade antimicrobiana, mostrou que peptídeo com sequências curtas de aminoácidos (11 resíduos) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* (6,3-15, µg/mL) e *E. coli* (11,3-30, µg/mL⁻¹) equivalentes os análogos de sequências longas (25 resíduos), no entanto, com menor atividade hemolítica (91). A maioria dos peptídeos antibiofilmes previamente descritos são compostos por L-aminoácidos, que podem ser facilmente degradados por proteases, tanto pelas

bacterianas como as proteases do hospedeiro, que desempenham uma função importante durante o processo de infecção. Na literatura já foram descritos mecanismos de resistência a peptídeos envolvendo a degradação destes compostos por proteases bacterianas. A utilização *in vivo* de peptídeos L-aminoácidos também pode ser susceptível a ação das proteases humanas durante o tratamento (90). No entanto, também já foram descritos na literatura peptídeos catiônicos que interagem com o sistema inum e impede a liberação de proteases no tecido, estimulam a quimioatração de neutrófilos e monócitos e, estimulam a cicatrização de feridas (92). Para impedir o ataque por proteases, tem sido desenvolvidos peptídeos D-enantioméricos, que devido a essa conformação, não são reconhecidos por proteases, essa estratégia superou a limitação para utilização terapêutica de peptídeos *in vivo* em modelos de infecção (90). Bem como a utilização de peptídeos associados a um sistema transportador (lipossomas), elaboração de um pró-fármaco, desenvolvimento de peptídeos cíclicos que dificulta a quebra por proteases. Em último caso, utilizar precursores capazes de inibir a ação de proteases (92).

Abordagens utilizando o desenho racional de peptídeos antibiofilme previamente descritos podem ser necessárias para conhecermos melhor a relação entre estrutura-atividade e consequentemente inspirar o desenvolvimento de peptídeos com maior atividade e seletividade para tratar biofilmes formados por bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas, quer por biofilmes mistos (Gram-negativas, Gram-positivas) (54). Em decorrência à falta de clareza entre a diferença da suscetibilidade dos biofilmes *in vitro* e em infecções crônicas instauradas, há um aumento de clínicos que buscam estudos desenvolvidos em laboratórios para direcioná-los a um tratamento mais eficaz. Muitas vezes identificar a dose alvo necessária para a eficácia do tratamento *in vivo* não é possível. Em virtude da complexidade e das possíveis alterações da efetividade dos peptídeos frente a mudanças drásticas da expressão bacteriana do fenótipo biofilme *in vivo*. Para isso, seria ideal a avaliação da atividade dos peptídeos em ensaios clínicos *in vivo*, permitindo a avaliação direta da atividade. No entanto, devido a questões éticas, muitos ensaios não podem ser desenvolvidos diretamente em biofilmes instalados em pacientes. Um caminho interessante a trilhar, seria o desenvolvimento de um ensaio simplificado que permita a realização alterações que possam ocasionar possíveis adaptações dos biofilmes e testar o desempenho dos peptídeos frente a

essas adaptações. Embora ensaios *in vitro* não forneçam as condições reais dos biofilmes fisiológicos, esses ensaios podem proporcionar a segurança para prosseguir com ensaios clínicos mais dispendiosos (93).

Nas últimas duas décadas, houve um crescimento exponencial de pesquisas que envolvem questões relacionadas aos biofilmes, estudos que visam os mecanismos envolvidos na formação dos biofilmes (atividade metabólica, moléculas sinalizadoras, mecanismos de mutação, condições nutricionais entre outros) (76,94), ensaios que avaliaram a atividade de milhares agentes antimicrobianos e desinfetantes contra a formação e erradicação de biofilmes (65,83), estudos de desenho racional que permitiram o reconhecimento de estruturas e sequências de aminoácidos com possível atividade contra biofilmes (50,87), com o objetivo de encontrar compostos que capazes de combater infecções resistentes associadas a este estilo de vida. Levando em consideração todos esses aspectos, novas abordagens que direcionam para o conhecimento dos mecanismos de ação que diferenciam a atividade antimicrobiana e antibiofilme de peptídeos catiônicos são imprescindíveis. Portanto, compreender a nível molecular os mecanismos intrínsecos envolvidos na formação e resistência dos biofilmes é fundamentais para o desenvolvimento de peptídeos antibiofilmes com enfoque na prevenção e erradicação.

7 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A disseminação de microrganismos resistentes a múltiplos antibióticos constitui-se um problema global de saúde e tem impulsionado a busca por novos compostos capazes de combater estes agentes infecciosos. Bem como, a capacidade de bacteriana em formar biofilmes, estilo de vida associado ao aumento da resistência a antimicrobianos, devido a necessidade da utilização de elevadas doses de antibióticos do que as usualmente utilizadas para combater células em estado planctônico. Elevadas doses que poderiam favorecer a seleção de microrganismos resistentes. Portanto, concluímos que o peptídeo PCDAMP-5, apresenta atividade específica antibiofilme, de forma que não atua sob células planctônicas, e apresenta valores de inibição da formação de biofilme de *K. pneumoniae* carbapenemase, próximos aos apresentados pelo antibiótico meropenem, quando verificada a capacidade de erradicação de biofilmes, o PCDAMP-5 foi ineficaz em erradicar biofilmes formados por 6 horas e, em atuar em combinação com antibióticos na inibição e erradicação de biofilmes. Ademais, seu efeito não hemolítico em elevadas concentrações, bem como, sua promiscuidade estrutural, associado a seu pequeno tamanho, poderiam fazer deste peptídeo uma opção potencial, segura e vantajosa para a atuar na prevenção de infecções por biofilmes.

8 REFERÊNCIAS

1. RIBEIRO, Suzana et al. Antibiofilm Peptides Increase the Susceptibility of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to β -Lactam **Antibiotics. Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3906-3912, 2015.
2. CORREA, Luci et al. A hospital-based matched case–control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 80, 2013.
3. PAGANO, Livio et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and hematologic malignancies. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 7, p. 1235, 2014.
4. STAHLHUT, Steen G. et al. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 350-359, 2012.
5. SNITKIN, Evan S. et al. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. **Science translational medicine**, v. 4, n. 148, p. 148ra116-148ra116, 2012.
6. GUPTA, Neil et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 1, p. 60-67, 2011.
7. RAMOS, Pablo Ivan Pereira et al. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 54, 2014.
8. CAI, Jia Chang et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2014-2018, 2008.
9. UZ ZAMAN, Taher et al. Multi-drug carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection carrying the OXA-48 gene and showing variations in outer membrane protein 36 causing an outbreak in a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 186-192, 2014.
10. YONG, Dongeun et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

11. QUEENAN, Anne Marie; BUSH, Karen. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.
12. MUNOZ-PRICE, L. Silvia et al. Successful Control of an Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase—Producing *K. pneumoniae* at a Long-Term Acute Care Hospital. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 04, p. 341-347, 2010.
13. NAPARSTEK, Livnat et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 1027-1034, 2014.
14. CARMELI, Y. et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 2, p. 102-111, 2010.
15. PONNUSAMY, Poovendran; NATARAJAN, Vidhya; SEVANAN, Murugan. *In vitro* biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 5, n. 3, p. 210-213, 2012.
16. BJARNSHOLT, Thomas. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **Apmis**, v. 121, n. s136, p. 1-58, 2013.
17. SARASWATHI, Padmanabhan; BEUERMAN, Roger W. Corneal biofilms: from planktonic to microcolony formation in an experimental keratitis infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **The ocular surface**, v. 13, n. 4, p. 331-345, 2015.
18. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, César et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.
19. LIMMATHUROTSAKUL, D. et al. Role of *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation and lipopolysaccharide in relapse of melioidosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 11, p. O854-O856, 2014.
20. ARCIOLA, Carla Renata et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.
21. BALABAN, Naomi et al. Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 4, p. 625-630, 2003.
22. BRUELLHOFF, Kristina et al. Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 33, n. 9, p. 646-653, 2010.
23. HARVEY, R. J.; LUND, V. J. Biofilms and chronic rhinosinusitis: systematic review of evidence, current concepts and directions for research. **Rhinology**, v. 45, n. 1, p. 3, 2007.

24. POMPILIO, Arianna et al. Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed α -helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 145, 2012.
25. NOBILE, Clarissa J. et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell**, v. 148, n. 1, p. 126-138, 2012.
26. SINGHAL, Deepti et al. The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. **American journal of rhinology & allergy**, v. 24, n. 3, p. 169-174, 2010.
27. BURMØLLE, Mette et al. Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 324-336, 2010.
28. BOUCHER, Helen W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.
29. ZHANG, Weipeng et al. Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, 2015.
30. O'TOOLE, George A.; KOLTER, Roberto. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.
31. VLAMAKIS, Hera et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 157-168, 2013. .
32. BANDEIRA, Maria et al. Exploring dangerous connections between *Klebsiella pneumoniae* biofilms and healthcare-associated infections. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 720-731, 2014.
33. MCDOUGALD, Diane et al. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 39-50, 2012.
34. VAN MEERVENNE, Eva et al. Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer?. **Pathogens and disease**, v. 70, n. 3, p. 332-338, 2014.
35. STEENACKERS, Hans et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502-531, 2012.
36. DO VALLE GOMES, Milene Zezzi; NITSCHKE, Marcia. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food control**, v. 25, n. 2, p. 441-447, 2012.

37. HOŠTACKÁ, A.; ČIŽNÁR, I.; ŠTEFKOVIČOVÁ, M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. **Folia microbiologica**, v. 55, n. 1, p. 75-78, 2010.
38. LEMOS, M. et al. A fluid dynamic gauging device for measuring biofilm thickness on cylindrical surfaces. **Biochemical Engineering Journal**, v. 106, p. 48-60, 2016.
39. CHUA, Song Lin et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. **Nature communications**, v. 5, 2014.
40. CERI, H. et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.
41. BJARNSHOLT, Thomas et al. Applying insights from biofilm biology to drug development can a new approach be developed?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 10, p. 791-808, 2013.
42. HENGZHUANG, Wang et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4469-4474, 2011..
43. PAMP, Sünje Johanna et al. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 1, p. 223-240, 2008.
44. RYDER, Victoria J.; CHOPRA, Ian; O'NEILL, Alex J. Increased mutability of *Staphylococci* in biofilms as a consequence of oxidative stress. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47695, 2012.
45. BROGDEN, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. Nature reviews. **Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238, 2005..
46. HANCOCK, Robert EW; SAHL, Hans-Georg. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551, 2006.
47. HANEY, Evan F. et al. High throughput screening methods for assessing antibiofilm and immunomodulatory activities of synthetic peptides. **Peptides**, v. 71, p. 276-285, 2015.
48. CHOU, Hung-Ta et al. Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against *Vibrio* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 2, p. 130-138, 2008.
49. FOX, Marc A. et al. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. **Peptides**, v. 33, n. 2, p. 197-205, 2012.

50. FJELL, Christopher D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 1, p. 37-51, 2012.
51. DESLOUCHES, Berthony et al. Rational design of engineered cationic antimicrobial peptides consisting exclusively of arginine and tryptophan, and their activity against multidrug-resistant pathogens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2511-2521, 2013.
52. SILVA, Osmar N. et al. Structural studies of a lipid-binding peptide from tunicate hemocytes with anti-biofilm activity. **Scientific reports**, v. 6, p. 27128, 2016.
53. DI LUCA, Mariagrazia; MACCARI, Giuseppe; NIFOSÌ, Riccardo. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. **Pathogens and disease**, v. 70, n. 3, p. 257-270, 2014.
54. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, César; HANCOCK, Robert EW. Using anti-biofilm peptides to treat antibiotic-resistant bacterial infections. **Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs**, v. 3, n. 2, p. 1, 2015.
55. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, César et al. Anti-biofilm and immunomodulatory activities of peptides that inhibit biofilms formed by pathogens isolated from cystic fibrosis patients. **Antibiotics**, v. 3, n. 4, p. 509-526, 2014.
56. DE LA FUENTE-NÚÑEZ, César et al. Synthetic antibiofilm peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 1061-1069, 2016.
57. DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002..
58. DEAN, Scott N.; BISHOP, Barney M.; VAN HOEK, Monique L. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 114, 2011.
59. ANUNTHAWAN, Thitiporn et al. Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 6, p. 1352-1358, 2015.
60. PLETZER, Daniel; COLEMAN, Shannon R.; HANCOCK, Robert EW. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. **Current opinion in microbiology**, v. 33, p. 35-40, 2016.
61. DALEBROUX, Zachary D.; SWANSON, Michele S. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 203-212, 2012.
62. WANG, Zhejun et al. Treatment of oral multispecies biofilms by an anti-biofilm peptide. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132512, 2015.

63. ÅBERG, Anna; SHINGLER, Victoria; BALSALOBRE, Carlos. Regulation of the *fimB* promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA in vivo. **Molecular microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1223-1241, 2008.
64. TORCATO, Inês M. et al. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 3, p. 944-955, 2013.
65. HE, Jing; STARR, Charles G.; WIMLEY, William C. A lack of synergy between membrane-permeabilizing cationic antimicrobial peptides and conventional antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 1, p. 8-15, 2015.
66. ŠALI, Andrej; BLUNDELL, Tom L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of molecular biology**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.
67. WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl 2, p. W407-W410, 2007.68.
Makarewicz T, Kaźmierkiewicz R. Improvements in GROMACS plugin for PyMOL including implicit solvent simulations and displaying results of PCA analysis. *J Mol Model*. 2016 Apr 23;22(5):109.
68. HESS, Berk et al. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of chemical theory and computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008.
69. RIBEIRO, Suzana Meira et al. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to β -lactam antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3906-3912, 2015.
70. HIRSCH, Elizabeth B.; TAM, Vincent H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkq108, 2010.
71. HOU, Shuyu et al. Effects of Trp-and Arg-containing antimicrobial-peptide structure on inhibition of *Escherichia coli* planktonic growth and biofilm formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1967-1974, 2010.
72. JAGNOW, Jennifer; CLEGG, Steven. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix-and collagen-coated surfaces. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2397-2405, 2003.
73. SEGEV-ZARKO, Li-av et al. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. **Biochemical Journal**, v. 468, n. 2, p. 259-270, 2015.

74. OVERHAGE, Joerg et al. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 76, n. 9, p. 4176-4182, 2008.
75. ANDERL, Jeff N.; FRANKLIN, Michael J.; STEWART, Philip S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1818-1824, 2000.
76. SCOTT, Monisha G.; YAN, Hong; HANCOCK, Robert EW. Biological properties of structurally related α -helical cationic antimicrobial peptides. **Infection and immunity**, v. 67, n. 4, p. 2005-2009, 1999.
77. TABBENE, Olfa et al. Bacillomycin D and its combination with amphotericin B: promising antifungal compounds with powerful antibiofilm activity and wound-healing potency. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 2, p. 289-300, 2016.
78. DE BRUCKER, Katrijn et al. Derivatives of the mouse cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP) inhibit fungal and bacterial biofilm formation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5395-5404, 2014.
79. KOKAI-KUN, John F.; CHANTURIYA, Tanya; MOND, James J. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkp145, 2009.
80. HØIBY, Niels et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.
81. HANSEN, C. R.; PRESSLER, T.; HØIBY, Niels. Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 7, n. 6, p. 523-530, 2008.
82. YU, Lanlan et al. Activity of a novel-designed antimicrobial peptide and its interaction with lipids. **Journal of Peptide Science**, v. 21, n. 4, p. 274-282, 2015.
83. SANTANA, Mábio J. et al. Structural insights into Cn-AMP1, a short disulfide-free multifunctional peptide from green coconut water. **FEBS letters**, v. 589, n. 5, p. 639-644, 2015.
84. EPAND, Richard M.; VOGEL, Hans J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1462, n. 1, p. 11-28, 1999.
85. FRANCO, Octavio Luiz. Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. **FEBS letters**, v. 585, n. 7, p. 995-1000, 2011.
86. CHAN, David I.; PRENNER, Elmar J.; VOGEL, Hans J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of

- action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1184-1202, 2006.
87. RATHINAKUMAR, Ramesh; WALKENHORST, William F.; WIMLEY, William C. Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 22, p. 7609-7617, 2009.
 88. FOSGERAU, Keld; HOFFMANN, Torsten. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug discovery today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, 2015.
 89. HANEY, Evan F.; HANCOCK, Robert EW. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. **Peptide Science**, v. 100, n. 6, p. 572-583, 2013.
 90. KANG, Joo Hyun et al. Structure–biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 48, n. 4, p. 357-363, 1996.
 91. HANCOCK, Robert EW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 3, p. 156-164, 2001.
 92. MALONE, Matthew et al. Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 15, n. 2, p. 147-156, 2017.
 93. BARRIOS, Andrés F. González et al. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 1, p. 305-316, 2006.