



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DE
PEPTÍDEOS OTIMIZADOS CONTRA BACTÉRIAS
PATOGÊNICAS HUMANAS**

Autora: Bruna de Oliveira Costa
Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco
Co-orientadora: Dr^a. Suzana Meira Ribeiro

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Jul – 2018



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME DE
PEPTÍDEOS OTIMIZADOS CONTRA BACTÉRIAS
PATOGÊNICAS HUMANAS

Autora: Bruna de Oliveira Costa
Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco
Co-orientadora: Dr^a. Suzana Meira Ribeiro

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde”

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Jul – 2018

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

C837a Costa, Bruna de Oliveira

Avaliação do potencial antibiofilme de peptídeos otimizados contra bactérias patogênicas humanas / Bruna de Oliveira Costa; orientador Octávio Luiz Franco; coorientadora Suzana Meira Ribeiro -- 2018
77 f. + anexos.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande , 2018.
Inclui bibliografias.

1. Peptídeos 2. Biotecnologia 3. Bactérias 4. Biofilme I. Franco , Octávio Luiz II. Ribeiro, Suzana Meira III. Título.

CDD: 579.3

**Avaliação do Potencial Antibiofilme de Peptídeos Otimizados contra
Bactérias Patogênicas Humanas**

Autora: Bruna de Oliveira Costa

Orientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

Coorientadora: Dra. Suzana Meira Ribeiro

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 05 de julho de 2018.



Prof. Dr. Octavio Luiz Franco - UCDB



Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB



Profa. Dra. Márcia Renata Mortari - UNB

*“Tudo posso naquele que me
fortalece.”*

Filipenses 4:13

Dedico à minha mãe Mônica Sueli de Oliveira, meu maior exemplo de força, determinação e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e nunca desistir, por mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Octávio Luiz Franco pela oportunidade, confiança e pelos ensinamentos.

A minha co-orientadora Suzana Meira Ribeiro, pelos ensinamentos, incentivo e, por contribuir grandemente para a minha formação como pesquisadora.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UCDB, pelos valiosos ensinamentos.

A equipe do laboratório de Microbiologia *S-Inova Biotech*, pelo auxílio e companheirismo.

Aos meus pais, Mônica Sueli de Oliveira e Luiz Salvador da Costa, por toda confiança, paciência, pelas palavras de incentivo e, por todo apoio financeiro.

Ao amigo Osmar Nascimento Silva, sobretudo pela amizade e apoio emocional, pelos ensinamentos, incentivo e sugestões.

A uma grande amiga que ajudou muito em todos os aspectos, Gislaine Greice de Oliveira Silva, que a nossa amizade prevaleça sempre e, dure por toda eternidade.

Aos órgãos de fomento FUNDECT e CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Referência: COSTA, Bruna O. Avaliação do potencial antibiofilme de peptídeos otimizados contra bactérias patogênicas humanas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, 2018.

Os biofilmes bacterianos representam um dos principais problemas de saúde pública, uma vez que têm sido associados a aproximadamente dois terços de todas as infecções clínicas. Além disso, as células sésseis que constituem o biofilme podem desenvolver resistência a elementos do sistema de defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos convencionais, o que dificulta o tratamento e contribui para o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Portanto, a busca por moléculas com ação antibiofilme torna-se extremamente necessária, e os peptídeos desenvolvidos a partir de otimização *in silico* surgem como uma estratégia alternativa e promissora de tratamento. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a atividade antibiofilme dos peptídeos otimizados guavanina13, guavanina14 PaDSBS1R1 e PaDSBS1R3F4, sobre biofilmes de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC, *E. coli* ATCC e KPC pelo método de microdiluição de peptídeos em microplacas de 96 poços, sendo as concentrações testadas de 2 - 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Mediante a determinação da concentração inibitória mínima para células planctônicas e biofilmes (CIM e CIMB respectivamente), observou-se que guavanina13 e guavanina14 demonstraram atividade específica para inibição da formação do biofilme das mesmas cepas bacterianas, *K. pneumoniae* ATCC (CIMB = 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambos os peptídeos) e *E. coli* ATCC (CIMB = 16 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Já o peptídeo PaDSBS1R1 apresentou seletividade para inibição da formação de biofilmes de quatro cepas em concentrações que não afetaram o crescimento planctônico, sendo elas, *K. pneumoniae* ATCC (CIMB = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CIM = 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *K. pneumoniae* KPC (CIMB = 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CIM = >64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *E. coli* ATCC (CIMB = 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CIM = >64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *E. coli* KPC (CIMB = 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CIM = 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Na triagem da atividade antibiofilme dos peptídeos sobre biofilmes maduros formados em 24h, a guavanina13 demonstrou um potencial inibitório sobre *K. pneumoniae* KPC e *E. coli* ATCC. A guavanina14, assim como o PaDSBS1R3F4, apresentaram um potencial inibitório apenas sobre *K. pneumoniae* KPC. O peptídeo PaDSBS1R1 apresentou potencial inibitório contra as cepas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC e, um potencial erradicatório sobre *K. pneumoniae* KPC. A combinação dos peptídeos com o antimicrobiano ciprofloxacina não demonstrou um efeito sinérgico sobre a inibição de células planctônicas ou na formação de biofilmes, ou ainda na inibição/erradicação dos biofilmes maduros. Na determinação da citotoxicidade dos peptídeos sobre eritrócitos de camundongo, o peptídeo PaDSBS1R1 apresentou cerca de 65% de hemólise na concentração de 640 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em contrapartida guavanina13, guavanina14, e PaDSBS1R3F4 demonstraram completa ausência de atividade hemolítica. Em conclusão, estes resultados sugerem que os peptídeos otimizados, guavanina13, guavanina14 e PaDSBS1R3F4, podem ser potentes inibidores da formação de biofilme, podendo deste modo se constituir em uma nova alternativa terapêutica no cenário clínico para prevenir as infecções bacterianas ocasionadas por biofilmes.

Palavras-chave: biofilme bacteriano, bactérias patogênicas, peptídeos antimicrobianos, peptídeos otimizados.

ABSTRACT

Reference: COSTA, Bruna O. Evaluation of the potential antibiofilm of optimized peptides against human pathogenic bacteria. Dissertation (Master in Biotechnology) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, 2018.

Bacterial biofilms represent one of the major public health problems since they have been associated with approximately two-thirds of all clinical infections. In addition, the sessile cells that yield biofilm may develop resistance host organism elements of the defense system and to conventional antimicrobials, which makes treatment difficult and contributes to the increase of patients' morbidity and mortality. Therefore, the search for molecules with antibiofilm action becomes extremely necessary, and the peptides developed from *in silico* optimization appear as a promising treatment strategy. In this context, the objective was to evaluate the antibiofilm activity of the optimized peptides guavanin13, guavanin14, PaDSBS1R1 and PaDS1R3F4 against biofilms of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC and KPC, *E. coli* ATCC and KPC by microdilution method of peptides in microplates of 96 wells, and the concentrations tested were 2 - 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The minimum inhibitory concentration determination for planktonic cells and biofilms (MIC and MICB) showed that guavanin13 and 14 demonstrated specific activity for biofilm inhibition formation of same bacterial strains, *K. pneumoniae* ATCC (MICB = 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for both peptides) and *E. coli* ATCC (MICB = 16 and 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively). In screening of antibiofilm activity of peptides on mature biofilms formed in 24h, guavanin13 demonstrated an inhibitory potential against *K. pneumoniae* KPC and *E. coli* ATCC. Guavanin14, as well as PaDS1R3F4, had a potential inhibitory effect against *K. pneumoniae* KPC. The peptide PaDSBS1R1 showed inhibitory potential against strains of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC and *E. coli* ATCC and a potential eradication against *K. pneumoniae* KPC. In the combination peptides approach with the antimicrobial ciprofloxacin, there was none synergistic effect to inhibit planktonic cells on biofilms formation or inhibit/eradicate mature biofilms. In the peptide cytotoxicity determination over Swiss mouse erythrocytes, the peptide PaDSBS1R1 caused about 65% hemolysis at the concentration of 640 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In contrast, guavanin13, guavanin14, and PaDS1R3F4 demonstrated hemolytic activity completely absence. In conclusion, the results suggest that the optimized peptides, guavanin13, guavanin14 and PaDS1R3F4, may be potent inhibitors of biofilm formation. Thus, these peptides represent a promising strategy for the development of novel agents with potential on bacterial biofilms.

Key words: bacterial biofilm, pathogenic bacteria, antimicrobial peptides, optimized peptides.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Infecções relacionadas ao biofilme. Locais frequentes de infecções relacionadas a biofilmes em dispositivos médicos e em tecidos. Figura adaptada de Lebeaux et al. (2014)	20
Figura 2: Estágios da formação do biofilme. (1) Adesão bacteriana reversível: as bactérias no estado planctônico se aderem reversivelmente a uma superfície (biótica ou abiótica). (2) Adesão bacteriana irreversível: células bacterianas aderidas de forma irreversível a uma superfície começam a formar microcolônias e, inicia-se o processo de <i>Quorum Sensing</i> . (3) Maturação: ocorre o aumento da densidade populacional e da espessura do biofilme, e a produção da matriz extracelular. (4) Dispersão: ocorre a desestruturação do biofilme quando o ambiente não é mais propício e se tem a dispersão de células bacterianas que poderão colonizar novos ambientes. Figura modificada de Lebeaux et al. (2014).....	22
Figura 3: Estratégias de inibição e erradicação de biofilmes bacterianos.(1)Inibição da formação do biofilme alvejando as células no estado planctônico. (2)Inibição da adesão em superfície biótica atingindo as vias reguladoras responsáveis pela produção de estruras de adesão, como: pili e flagelo. (3)Inibição da adesão por revestimento da superfície abiótica. (4) Inibição do <i>Quorum sensing</i> . (5)Erradicação do biofilme pré-formado por meio da disruptão da matriz extracelular. (6) Erradicação do biofilme pré-formado por meio da morte das células aderidas e incorporadas na matriz extracelular. Figura modificada de Gupta et al. (2016).	30
Figura 4: Representação das principais classes estruturais de PAMs. (A) α -helicoidal, magainina; (B) folha- β , defensina; (C) peptídeo estendido, indolicidina...	32
Figura 5: Representação dos mecanismos de ação dos PAMs com atividade antibiofilme. (A) Inibição da formação do biofilme. Os PAMs podem evitar a adesão inicial ao biofilme por revestimento da superfície do dispositivo médico ou interagindo com a superfície microbiana. A maturação do biofilme pode ser prevenida matando os colonizadores da superfície inicial. Os PAMs podem se ligar	

às moléculas de detecção de *Quorum sensing* para inibir a comunicação bacteriana.(B) Erradicação da formação do biofilme. Os PAMs podem matar o biofilme pré-formado penetrando a matriz do biofilme e matando as células associadas ao biofilme. Os PAMs podem se ligar e neutralizar a endotoxina bacteriana liberada por células associadas ao biofilme. Figura modificada de Di Luca et al. (2014).....33

Figura 6: Análise por espectrometria de massas. (A) Íon majoritário em massa de 2107,3 Da, referindo-se a PaDSBS1R1. (B) Íon majoritário em massa de 1236,9 Da, referindo-se a PaDBS1R3F4. (C) Íon majoritário em massa de 2772,5 Da, referindo-se a guavanina13. (D) Íon majoritário em massa de 2534,5 Da, referindo-se a guavanina14.....46

Figura 7: Avaliação da atividade hemolítica dos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 contra eritrócitos de camundongo Swiss. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três repetições.....59

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Parâmetros físico-químicos dos peptídeos otimizados.	38
Tabela 2: Avaliação da atividade antibacteriana de peptídeos otimizados para inibir o crescimento planctônico e a formação de biofilmes de cepas de <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> ATCC e KPC e, <i>E. coli</i> ATCC e KPC em ensaios realizados em microplacas. CIM (Concentração Inibitória Mínima), CIMB (Concentração Inibitória Mínima para Biofilmes).....	48
Tabela 3: Avaliação da combinação entre guavanina13 e ciprofloxacina para inibir o crescimento de células planctônicas de <i>K. pneumoniae</i> ATCC e <i>E. coli</i> ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.	50
Tabela 4: Avaliação da combinação entre guavanina13 e ciprofloxacina para inibir a formação de biofilmes de <i>K. pneumoniae</i> ATCC e <i>E. coli</i> ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.	50
Tabela 5: Avaliação da combinação entre guavanina14 e ciprofloxacina para inibir o crescimento de células planctônicas de <i>K. pneumoniae</i> ATCC e <i>E. coli</i> ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.	51
Tabela 6: Avaliação da combinação entre guavanina14 e ciprofloxacina para inibir a formação de biofilmes de <i>K. pneumoniae</i> ATCC e <i>E. coli</i> ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.	51
Tabela 7: Avaliação da combinação entre PaDSBS1R1 e ciprofloxacina para inibir o crescimento de células planctônicas de <i>K. pneumoniae</i> ATCC, <i>K. pneumoniae</i> KPC, <i>E. coli</i> ATCC e, <i>E. coli</i> KPC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que as combinações foram ineficazes quando

comparadas com o controle.52

Tabela 8: Avaliação da combinação entre PaDSBS1R1 e ciprofloxacina para inibir a formação de biofilmes de *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* KPC, *E. coli* ATCC e, *E. coli* KPC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que as combinações foram ineficazes quando comparadas com o controle.....52

Tabela 9: Avaliação da atividade antibiofilme de guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 após 24h de tratamento (na presença ou ausência do petídeo) sobre biofilmes pré foramados em 24h de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* KPC, *E. coli* ATCC e, *E. coli* KPC. Nota: os (-) significam que os tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa quando compardos com o controle, portanto não foram interpretados^a.....54

Tabela 10: Avaliação da combinação entre guavanina13 e ciprofloxacina para inibir a continuidade do crescimento de biofilmes previamente formados de *K. pneumoniae* KPC e *E. coli* ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os (-) indicam que as combinações foram ineficazes quando comparadas com o controle.56

Tabela 11: Avaliação da combinação entre guavanina14 e ciprofloxacina para inibir a continuidade do crescimento do biofilme previamente formado de *K. pneumoniae* KPC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.....56

Tabela 12: Avaliação da combinação entre PaDBS1R3F4 e ciprofloxacina para inibir a continuidade do crescimento do biofilme previamente formado de *K. pneumoniae* KPC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.....57

Tabela 13: Avaliação da combinação entre PaDSBS1R1 e ciprofloxacina para inibir a continuidade do crescimento dos biofilmes previamente formados de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os (-) indicam que as combinações foram ineficazes quando comparadas com o controle.57

Tabela 14: Avaliação da combinação entre PaDSBS1R1 e ciprofloxacina para erradicação do biofilme previamente formado de *K. pneumoniae* KPC. Índice de concentração erradicatória fracionada (ICEF). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.....58

LISTA DE ABREVIATURAS

AG – Algoritmo genético

APD – *Antimicrobial Peptide Database*

BaAMPs – *Biofilm-active AMPs database*

CIM – Concentração inibitória mínima

CIMs – Concentrações inibitórias mínimas

CIMB – Concentração inibitória mínima para biofilme

CIMBs – Concentrações inibitórias mínimas para biofilme

CEMB – Concentração erradicatória mínima para biofilme

HSM – *Hydrophobic submoments* (Sub-momentos hidrofóbicos)

ICEF – Índice de concentração erradicatória fracionada

ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada

mg – Miligramas

MH – Mueller Hinton

mL – Mililitros

Milli-Q – Água ultrapura

min – Minutos

µL – Microlitros

ND – Não determinável

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

pH – Potencial hidrogeniônico

ppGpp – Guanosina 3'-difosfato 5'-difosfato

pppGpp – Guanosina-3'-difosfato 5'-trifosfato

QS – *Quorum sensing*

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 INFECÇÕES ASSOCIADAS A BIOFILMES BACTERIANOS	19
2.2 BIOFILMES BACTERIANOS.....	21
2.3 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS HUMANAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA FORMADORAS DE BIOFILME	24
2.4 BIOFILMES BACTERIANOS E OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	25
2.5 ESTRATÉGIAS DE INIBIÇÃO E ERRADICAÇÃO DE BIOFILMES	27
2.6 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMs) COMO ALTERNATIVA DE TRATAMENTO PARA INFECÇÕES BACTERIANAS ASSOCIADAS A BIOFILMES30	30
2.7 PEPTÍDEOS OTIMIZADOS ANTIBIOFILMES	34
2.8 OTIMIZAÇÃO <i>in silico</i> DE PEPTÍDEOS.....	36
3. JUSTIFICATIVA.....	39
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 OBJETIVO GERAL	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5. METODOLOGIA	41
5.1 CEPAS BACTERIANAS.....	41
5.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS.....	41
5.3 ANÁLISE DE MASSA MOLECULAR	41
5.4 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS	41
5.5 ENSAIOS DE COMBINAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS E ANTIMICROBIANO PARA INIBIÇÃO DE BIOFILMES DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS.....	42

5.6 TRIAGEM DE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS CONTRA BIOFILMES MADUROS DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS.....	43
5.7 ENSAIOS DE COMBINAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS E ANTIBIÓTICO SOBRE BIOFILMES PRÉ-FORMADOS DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS	44
5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS PEPTÍDEOS OTIMIZADOS	44
5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
6 RESULTADOS.....	46
6.1 CONFIRMAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DOS PEPTÍDEOS TESTADOS	46
6.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS.....	47
6.3 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS E CIPROFLOXACINA PARA INIBIÇÃO DE BIOFILMES DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS.....	48
6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS SOBRE BIOFILMES MADUROS POR MEIO DE TRIAGEM	53
6.5 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS E CIPROFLOXACINA SOBRE BIOFILMES PRÉ-FORMADOS DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS.....	54
6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS PEPTÍDEOS OTIMIZADOS	59
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	65
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas têm sido responsáveis pela elevada taxa de morbidade e mortalidade mundial, principalmente em pacientes hospitalizados. Fato este que pode ser atribuído ao número reduzido de opções disponíveis para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas humanas e, ao frequente aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos efeitos dos antimicrobianos convencionais (ALANIS, 2005; SANTOS, 2004). Ademais, esse contexto tende a agravar-se devido a interrupção do tratamento e ao uso indiscriminado de antimicrobianos, bem como a automedicação e, a prescrição ou dosagens inadequadas, fatores estes que, contribuem para a seleção de bactérias patogênicas humanas cada vez mais resistentes para uma condição alarmante à saúde pública (ALANIS, 2005).

A capacidade de bactérias patogênicas humanas em formar biofilmes pode agravar ainda mais esta situação, uma vez que, as células bacterianas organizadas como biofilme comportam-se de forma diferenciada das células planctônicas. Essas diferenças podem estar relacionadas às taxas de crescimento e a capacidade de resistir aos tratamentos antimicrobianos, representando um grande problema para a saúde humana e sendo causa comum de infecções persistentes (DONLAN, 2001a; NEIDELL et al., 2012).

Notoriamente, este cenário aponta para um risco iminente em escala mundial, o qual apresenta uma dupla característica: (i) a indisponibilidade de antimicrobianos eficientes para combater bactérias resistentes e (ii) a indisponibilidade de antimicrobianos eficientes para combater biofilmes, principalmente se o mesmo for constituído por bactérias resistentes (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013; WILSON et al., 2002). Deste modo, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas moléculas que tenham capacidade antibacteriana e antibiofilme. Nesta perspectiva, dentre os antimicrobianos, os peptídeos otimizados *in silico* consistem em moléculas que surgem como uma potencial alternativa de tratamento contra biofilmes (PRATES; BLOCH, 2000). Essas moléculas consistem em sequências peptídicas desenvolvidas por ferramentas de bioinformática (TORRENT et al., 2012), que tendem a apresentar tamanho reduzido, baixa citotoxicidade, amplo espectro de atividade e múltipla aplicabilidade (PRATES; BLOCH JUNIOR, 2000). Na literatura já se tem descrito estudos que demonstram a atividade antibiofilme dos peptídeos

desenvolvidos a partir de otimização *in silico* independente da atividade contra bactérias planctônicas (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014; OVERHAGE et al., 2008). Já outros estudos evidenciam que esses peptídeos ao demonstrarem atividade antibiofilme podem ter a capacidade de funcionar sinergicamente com diversos antimicrobianos convencionais, apresentando assim, uma nova alternativa para potencializar a ação antibiótica contra biofilmes bacterianos (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2015; REFFUVEILLE et al., 2014). Frente a isso, a busca por novos peptídeos com ação antibiofilme torna-se relevante, visto que as opções terapêuticas para o tratamento de infecções ocasionadas por biofilmes têm sido extremamente limitadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES ASSOCIADAS A BIOFILMES BACTERIANOS

A formação de biofilmes pode exercer papel positivo em alguns ecossistemas – como no trato intestinal humano de indivíduos saudáveis, podendo desempenhar uma papel importante na sinalização para o hospedeiro, ou então na degradação de substratos poliméricos(VOS, 2015)– mas também pode resultar em efeitos negativos, como ocasionar infecções crônicas devido à resistência ou tolerância a elementos do sistema de defesa do organismo hospedeiro e a ação de agentes antimicrobianos (HØIBY et al., 2011; LEBEAUX et al., 2014). Hoiby et al. (1977) foram os primeiros a suspeitar de uma correlação direta entre o desenvolvimento de biofilmes e infecções persistentes, que foi demonstrada em casos de pacientes com fibrose cística associada à colonização crônica de *P. aeruginosa* nos pulmões. No final da década de 90, Costerton et al. (1999) destacaram a relevância da formação dos biofilmes bacterianos e da sua inerente resistência aos antimicrobianos como causas de inúmeras infecções persistentes do tipo crônica.

No contexto atual, existe um crescente aumento no número de infecções associadas a biofilmes. O que consiste em uma potencial fonte de infecção humana, uma vez que podem se desenvolver em qualquer parte do corpo, como em tecidos (causando osteomielite e endocardite), cavidade oral (dentes e gengivas), trato urogenital, trato respiratório superior e inferior, e em feridas, assim como em dispositivos médicos: cateteres, tubos endotraqueais, implantes, lentes de contato, marca-passos, válvulas cardíacas, articulações artificiais e próteses (**Fig. 1**) (BJARNSHOLT et al., 2013; DONLAN, 2001a; HØIBY et al., 2011).

Em ambiente hospitalar estima-se que 65% de todas as infecções bacterianas podem ser ocasionadas por biofilmes (LEWIS, 2001), sendo boa parcela relacionada à presença de biofilmes em dispositivos médicos. Esses dispositivos médicos contaminados por biofilme têm se tornado cada vez mais frequentes em todas as áreas da medicina, sobretudo em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (BRYERS, 2008), o que contribui para o aumento significativo dos índices de morbidade e mortalidade dos pacientes (PERCIVAL et al., 2012; SIMÕES, 2011).

As infecções ocasionadas por biofilmes têm sido consideradas recorrentes e, despertam apreensão em profissionais da saúde em todo o mundo, uma vez que, os

antimicrobianos disponíveis para tratamento clínico foram desenvolvidos para atingir as bactérias no estado planctônico (BJARNSHOLT et al., 2013; HANCOCK, 2015) e, não para tratar especificamente este estilo de vida bacteriano (PLETZER; HANCOCK, 2016), o que torna cada vez mais comum a ineficácia de tratamentos (DHARMAPRAKASH et al., 2015). Assim a limitação em combater biofilmes confere uma importante ameaça para os avanços da medicina, já que podem ocasionar infecções persistentes e recidivas, sendo então responsáveis por insucessos de cirurgias, transplantes e até mesmo no tratamento de cânceres (BJARNSHOLT et al., 2013; CERCA et al., 2005; DEL POZO; PATEL, 2007; ROSSOLINI et al., 2014). Desta maneira, pesquisadores e profissionais da saúde já admitem a urgente necessidade de se desenvolver medicamentos para tratamento de infecções causadas por biofilmes.

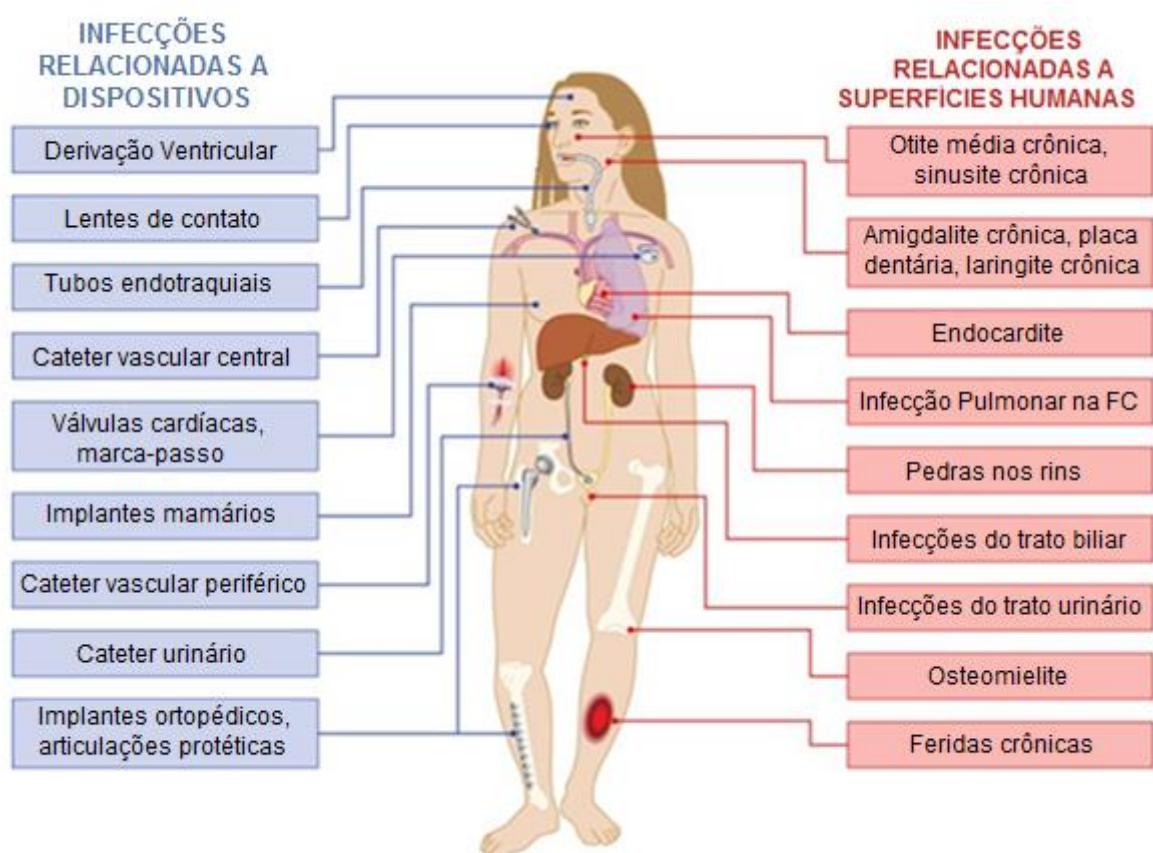


Figura 1: Infecções relacionadas ao biofilme. Locais frequentes de infecções relacionadas a biofilmes em dispositivos médicos e em tecidos. Figura adaptada de Lebeaux et al. (2014).

2.2 BIOFILMESBACTERIANOS

As bactérias podem ocorrer como células individuais flutuantes – células planctônicas – ou agrupadas – biofilmes(HØIBY et al., 2015).Os biofilmes bacterianos podem ser definidos como uma complexa comunidade de células bacterianas, desenvolvida a partir de uma ou muitas espécies, que se encontram aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, cercadas por uma matriz polimérica composta de polissacarídeos, cristais minerais, proteínas e DNA extracelular (BJARNSHOLT et al., 2013; FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013).

Inicialmente, as análises com biofilmes foram feitas por Antonie Van Leeuwenhoek, quando estudava amostras dentárias em seu microscópio, onde observou uma maior presença de células agregadas do que planctônicas. Contudo, a primordial publicação que descreve esse estilo de vida microbiano foi realizada por Zobell em 1943, na qual o autor iniciou pesquisas sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios e em distintas superfícies que se encontravam submersas, como metal, plástico e vidro(MENOITA et al., 2012). Mas somente em 1978 o termo biofilme foi proposto pela primeira vez, por Costerton e colaboradores, para descrever uma comunidade de microrganismos embutidos em uma matriz composta por polímeros extracelulares ligados a uma superfície (LEBEAUX; GHIGO, 2012). Desde então, pesquisa com biofilmes tornou-se um campo de estudo reconhecido e importante dentro da microbiologia (JOO; OTTO, 2012).

O processo de desenvolvimento do biofilme consiste em uma estratégia de sobrevivência que foi refinada ao longo de milhões de anos e, pode ser empregada por praticamente todas as bactérias (DUNNE, 2002). As bactérias têm sido consideradas como os microrganismos que comumente têm capacidade de produzir biofilmes em condições de meios menos exigentes ou em condições extremas (CAPELLETTI, 2006; HALL-STOODLEY et al., 2004). O reduzido tamanho desses microrganismos, as elevadas taxas de reprodução, a grande capacidade de adaptação e a produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio, são as principais características associadas à facilitação da colonização das superfícies(CAPELLETTI, 2006).

Biofilmes bacterianos de diferentes ambientes podem apresentar características comuns, são elas: (i) as células bacterianas estão incorporadas em uma matriz polimérica composta de exopolissacárideos, proteínas e ácidos

nucleicos; (ii) o desenvolvimento do biofilme ocorre em resposta a sinais extracelulares desencadeados pelo ambiente ou pelas próprias células bacterianas; (iii) o biofilme fornece proteção às bactérias, tanto contra o sistema imune do hospedeiro, quanto pela ação de agentes antimicrobianos, sendo esta característica a mais alarmante (COSTERTON et al., 1999; HALL-STOODLEY et al., 2004; VAN HOUDT; MICHELS, 2010).

Quanto à formação do biofilme bacteriano, se faz necessário conhecer as etapas envolvidas nesse processo para que se tenha um aumento das possibilidades no controle, inibição e erradicação desta forma de vida microbiana (CAPELLETTI, 2006). A formação de um biofilme bacteriano inclui uma sequência de processos físicos, biológicos e químicos dependentes de condições genéticas, ambientais e hidrodinâmicas, que resultam na reorganização espacial e temporal da célula bacteriana (BRYERS; RATNER, 2004). Sendo que, esta forma de vida pode ser considerada um ponto estável em um ciclo biológico que inclui adesão, maturação e dispersão (Fig. 2) (DUNNE, 2002; SAUER et al., 2002).

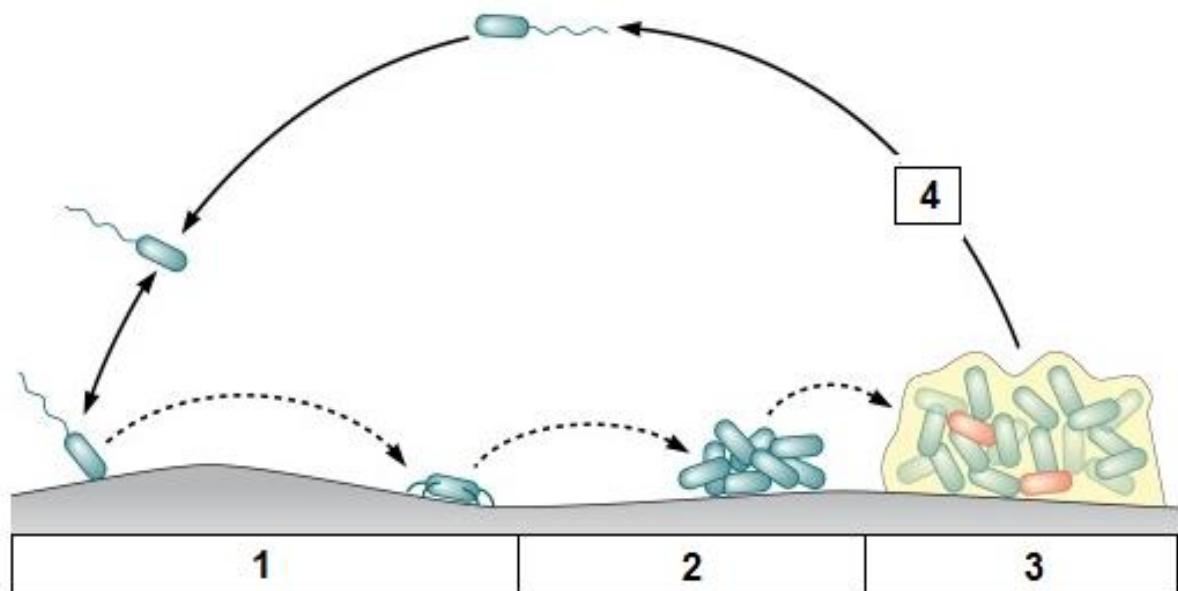


Figura 2: Estágios da formação do biofilme. (1) Adesão bacteriana reversível: as bactérias no estado planctônico se aderem reversivelmente a uma superfície (biótica ou abiótica). (2) Adesão bacteriana irreversível: células bacterianas aderidas de forma irreversível a uma superfície começam a formar microcolônias e, inicia-se o processo de *Quorum Sensing*. (3) Maturação: ocorre o aumento da densidade populacional e da espessura do biofilme, e a produção da matriz extracelular. (4) Dispersão: ocorre a desestruturação do biofilme quando o ambiente não é mais propício e se tem a dispersão de células bacterianas que poderão colonizar novos ambientes. Figura modificada de Lebeaux et al. (2014).

A adesão bacteriana em superfície abiótica (materiais inertes) ou biótica (superfície viva, como células e tecidos) pode constituir a primeira etapa para a

formação do biofilme (DUNNE, 2002). A princípio, as bactérias no estado planctônico se aproximam de uma superfície e aderem-se reversivelmente (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). Nesse estágio existe a presença de estruturas de adesão (pili, fimbrias e flagelos), que são presentes na superfície celular, por sua vez, a motilidade flagelar apresenta-se como facilitadora para adesão por conduzir a célula bacteriana até a superfície, vencendo as forças repulsivas (PRATT; KOLTER, 1998). Em seguida, ocorre adesão irreversível à superfície, que se define pela formação de microcolonias através da divisão das células bacterianas, que consiste na acumulação de células aderidas a uma superfície (STOODLEY et al., 2002). Neste momento ocorre o término da motilidade e o mecanismo de comunicação celular – *Quorum sensing (QS)* – passa regular a expressão dos genes envolvidos na formação do biofilme, estes que se tornam extremamente ativos e desencadeiam a produção da matriz extracelular, o crescimento e agrupamento tridimensional das bactérias e a formação de canais aquosos que possibilitam o transporte de nutrientes essenciais e oxigênio do meio externo para as células em crescimento dentro do biofilme (DAVIES, 2003; DONLAN, 2001b; RÖMLING; BALSALOBRE, 2012).

A etapa de maturação do biofilme bacteriano denota-se pelo aumento da densidade populacional decorrente da divisão celular, da redistribuição de células entre as microcolônias, da adesão de novas células planctônicas e, pela acumulação de componentes extracelulares gerados pelas bactérias, que acabam resultando no aumento da espessura do biofilme e na estabilidade da colônia contra variações ambientais (DONLAN, 2001b; FORSYTHE, 2013). Por fim, quando o ambiente não for mais propício à sua manutenção, devido a alteração de pH, temperatura, ou escassez de nutrientes, ocorre a desestruturação do biofilme e dispersão da massa de células que poderão colonizar novos ambientes, dando início a novos biofilmes, e no caso de patógenos novos locais de infecção no corpo humano (DONLAN, 2001b; GARNETT; MATTHEWS, 2012; OTTO, 2008).

Quanto à composição dos biofilmes bacterianos, estes podem ser compostos basicamente por comunidades bacterianas e matriz extracelular, na qual as células bacterianas encontram-se incorporadas (BRANDA et al., 2005). Em termos de massa seca, as bactérias podem representar cerca de 10% de um biofilme, ou seja, uma pequena parcela, e a matriz aproximadamente 90%. Sendo que, a composição dessa matriz pode ser intensamente variável dependendo do tipo de bactéria e das

condições ambientais (SUTHERLAND, 2001). Na matriz de um biofilme bacteriano, basicamente, a água representa a parte mais significativa, cerca de 97%, tendo como função o fluxo de nutrientes. Outros componentes considerados essenciais como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, são substâncias poliméricas extracelulares, em menores proporções, que conferem estabilidade à estrutura tridimensional do biofilme (KOSTAKIOTI et al., 2013; SUTHERLAND, 2001). Em suma, os componentes estruturais da matriz do biofilme bacteriano propiciam o desenvolvimento de uma estrutura resistente e extremamente hidratada, que conserva a proximidade das bactérias, possibilitando interações celulares e troca de DNA (BRANDA et al., 2005; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Além disso, conferem proteção à biomassa da dessecação, de moléculas oxidantes e outros agentes danosos, como antimicrobianos (FLEMMING; WINGENDER, 2010; KOSTAKIOTI et al., 2013).

2.3 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS HUMANAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA FORMADORAS DE BIOFILME

No ambiente médico, os biofilmes bacterianos formados por *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* KPC, *E. coli*, *E. coli* KPC tem despertado grande preocupação por serem frequentes causas de infecção (BELOIN et al., 2008; BOLES; HORSWILL, 2011; RASAMIRAVAKA et al., 2015; SEIFI et al., 2016; VUOTTO et al., 2014).

Entre as bactérias envolvidas com infecções associadas a biofilme, a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* desempenha um papel proeminente (HØIBY et al., 2010). Este microrganismo tem sido particularmente notório por causar infecções associadas a biofilmes, como: infecções crônicas em feridas e enxertos, infecções em pulmões com fibrose cística, otite média crônica, prostatite bacteriana crônica e infecções relacionadas com dispositivos médicos (TOLKER-NIELSEN, 2014). Dentre os dispositivos médicos, os mais propensos a infecção são: cateteres urinários, ventilador mecânico, válvulas cardíacas mecânicas, *stents* e lentes de contato (COLE et al., 2014).

A *K. pneumoniae* consiste em uma bactéria Gram-negativa, bacilar, encapsulada, oportunista, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). O biofilme formado por esse patógeno frequentemente tem sido

associado a infecções crônicas em superfícies do corpo como pulmões, coração e ossos (CHANG et al., 2008; CORTÉS et al., 2002; PAI et al., 2006; SANDERS, 1989)e, também por infecções desencadeadas pela colonização de dispositivos médicos como, cateteres, tubos endotraqueais, válvulas cardíacas mecânicas e implantes(CORTÉS et al., 2002; PAI et al., 2006; PODSCHUN; ULLMANN, 1998; ROY et al., 2014).

E. coli também consiste em uma bactéria Gram-negativa, baciliforme, membro da família *Enterobacteriaceae*. Este microrganismo tem representado uma parte das infecções comunitárias e nosocomiais (NAVES et al., 2010), sendo a infecção que tem sido mais recorrente,a do trato urinário relacionada ao uso de cateterocasionada pela formação de biofilmes persistentes, o que possibilita a sobrevivência e proliferação desse microrganismo no ambiente existente no aparelho urinário (ONG et al., 2008).

K. pneumoniae KPC e *E. coli* KPC consistem em enterobactérias produtoras da enzima carbapenemase, esta que confere alta resistência a antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos(DIENSTMANN et al., 2010). Esse mecanismo de resistência desperta grande temor no contexto hospitalar mundial, visto que o tratamento de infecções ocasionadas por essas cepas tem sido dificultado e, o risco de surtos epidêmicos aumentados (DIENSTMANN et al., 2010; NORDMANN; CORNAGLIA, 2012). Won et al. (2011) em seus estudos com *K. pneumoniae* KPC observaram uma extensa transmissão dessa bactéria em hospitais e lares de idosos, sendo que a alta prevalência dessas infecções estava associada a pacientes que usavam dispositivos médicos, como cateter venoso central, ventilação mecânica e aqueles submetidos a hemodiálise (REVDIWALA et al., 2012).

2.4 BIOFILMES BACTERIANOS E OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Uma das características compartilhadas por biofilmes bacterianos tem sido a redução da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. Esta pode ocorrer sob dois fenômenos, tolerância e resistência (BJARNSHOLT, 2013). A tolerância ocorre quando as células bacterianas não são eliminadas, porém também não conseguem crescer na presença do agente antimicrobiano mesmo após um longo período de exposição, enquanto que a resistência possibilita a sobrevivência das bactérias, assim como o crescimento na presença do fármaco (HARMSEN et al., 2010;

ROBERTS; STEWART, 2004). Desta forma pode ser imprescindível ressaltar uma importante diferença entre essas duas condições, sendo que todas as bactérias podem se tornar resistentes, independentemente de seus fenótipos de crescimento, enquanto que somente os agregados bacterianos – biofilmes – demonstram tolerância (BJARNSHOLT, 2013).

Na condição de tolerância Bjarnsholt et al. (2013) descrevem três tipos de tolerância: (i) tolerância fisiológica, (ii) tolerância física e (iii) tolerância adaptativa. A tolerância fisiológica compreende os estados metabólicos das bactérias. Via de regra, à medida que o biofilme se forma a população de células bacterianas localizadas mais internamente passam a ter restrições no acesso a nutrientes e oxigênio, e consequentemente o metabolismo passa ser afetado (COSTERTON et al., 1999; MCDOUGALD et al., 2011). Essas células bacterianas comumente têm sido denominadas persistentes ou dormentes, e frequentemente têm sido associadas a ineficiência dos tratamentos com antimicrobianos, visto que, estes usualmente atuam na fase de crescimento bacteriano, como síntese proteica, síntese de ácidos nucleicos, e de parede celular. Deste modo, a parcela da população de células persistentes que não for atingida pelo agente de tratamento pode ainda atuar como fonte para nova infecção (LEWIS, 2012; MAISONNEUVE; GERDES, 2014).

A tolerância física pode ser determinada pela presença da matriz e da estrutura tridimensional que caracteriza o biofilme. A redução da susceptibilidade aos antimicrobianos pode ser atribuída a difusão limitada e à presença de componentes quelantes (como alginato e DNase) na matriz (ALIPOUR et al., 2009; STEWART, 1996). A tolerância adaptativa dos biofilmes tem sido associada à exposição ao antimicrobiano, isto é, quando esta exposição for interrompida ocorre a desativação desta condição, ou seja, os biofilmes induzem de forma temporária mecanismos de resistência de forma específica ou inespecífica à ação do antimicrobiano, por meio de redes reguladoras (BJARNSHOLT et al., 2013). Como exemplo de mecanismo específico pode ser citada a indução da transcrição da enzima β -lactamase em resposta à presença de um antimicrobiano β -lactâmico, sendo que a secreção dessa enzima pode prejudicar a penetração das moléculas do antimicrobiano através das camadas do biofilme (DIBDIN et al., 1996). Um exemplo de mecanismo inespecífico consiste na regulação positiva de bombas de efluxo induzida por várias classes de antimicrobianos (BJARNSHOLT et al., 2013).

Em contrapartida, os fatores de tolerância são descritos por Stewart (2015), como: (i) a química dos agentes antimicrobianos, por exemplo, os β -lactâmicos tem sido mais eficazes contra as bactérias que se multiplicam de forma ativa; (ii) o material do substrato (superfícies bióticas ou abióticas); (iii) a densidade celular, pois estudos mostram que a tolerância aos agentes antimicrobianos depende da extensão e, da acumulação de biomassa, sendo demonstrado que os biofilmes mais antigos e mais espessos são invariavelmente menos suscetíveis que os biofilmes mais jovens e menos densos, sob a mesma dose do antimicrobiano. Além disso, fatores como: (iv) a idade do biofilme, pois estudos demonstram que a tolerância ao biofilme se manifesta numa escala temporal de alguns dias, ou seja, os biofilmes tendem a tornar-se menos suscetíveis à medida que envelhecem, parâmetro que tem sido correlacionado com a densidade do biofilme. Por fim, (v) a composição microbiana do biofilme; e (vi) a composição do meio, pois as condições de cultura podem influenciar na eficiência dos agentes antimicrobianos.

O fenômeno de resistência dos biofilmes bacterianos inclui mecanismos que têm como objetivo impedir o agente antimicrobiano de interagir com seu alvo (LEBEAUX; GHIGO, 2012). A maioria desses mecanismos têm sido hereditários e os mais comuns são: modificação do alvo dos antimicrobianos por mutação ou por ação enzimática especializada; substituição do alvo, através da expressão de um alvo alternativo; modificação ou destruição de antimicrobianos; efluxo de antimicrobianos; e permeabilidade restrita aos antimicrobianos (LEWIS, 2007). Neste contexto, a susceptibilidade reduzida aos agentes antimicrobianos tem sido preocupante e requer a busca por novas opções de tratamento.

2.5 ESTRATÉGIAS DE INIBIÇÃO E ERRADICAÇÃO DE BIOFILMES

Na comunidade científica, o desenvolvimento de estratégias para combater biofilmes associados a infecções tem recebido grande atenção. Deste modo, as estratégias de combate aos mesmos podem ser separadas basicamente em duas frentes, na inibição da formação de biofilmes e na erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (**Fig. 3**)(TRENTIN et al., 2013). Sendo que, essas duas estratégias requerem, em alguns casos, a necessidade de combinações de agentes de tratamento para se obter a eficácia no combate deste estilo de vida microbiano, pois a monoterapia tem demonstrado recorrente ineficiência devido

àsusceptibilidade reduzida das células embutidas no biofilme, principalmente às que se encontram em biofilmes maduros (JACQUELINE; CAILLON, 2014).

Para inibir a formação de biofilmes, existem três opções de procedimentos: (i) atingir diretamente as células bacterianas no estado planctônico, (ii) o bloqueio da adesão celular bacteriana a uma superfície ou (iii) por meio da interrupção da comunicação celular bacteriana – QS(BJARNSHOLT et al., 2013; MARTIN et al., 2008). Enquanto que a erradicação consiste no combate de biofilmes já estabelecidos mediante a degradação da matriz, sem necessariamente combater as células bacterianas (BJARNSHOLT et al., 2013).

Para evitar que os biofilmes sejam formados por células bacterianas planctônicas, estas devem ser alvejadas por agentes de tratamento que tenham propriedades antimicrobianas e, assim, possam eliminar as células planctônicas, impedindo então a sua fixação em diferentes tipos de superfícies (BJARNSHOLT et al., 2013).A inibição da formação do biofilme bacteriano por bloqueio da adesão celular requer estratégias diferenciadas dependendo do tipo de superfície(VASILEV et al., 2009). Por exemplo, nas superfícies abióticas, como dispositivos médicos e implantes cirúrgicos, o uso profilático de agentes antimicrobianos tem sido uma alternativa de tratamento, que inclui revestimentos, imersão, ou irrigação dessas superfícies com antimicrobianos (LYNCH; ROBERTSON, 2008; VASILEV et al., 2009).Adicionalmente,mesmo que a profilaxia tenha pontos questionáveis como a durabilidade de seu efeito e seu potencial de resistência à antimicrobianos, essa prática progressivamente tem sido utilizada em pacientes de alto risco (LYNCH; ROBERTSON, 2008). Já em superfícies bióticas, quando estas não são acessíveis,a utilização de moléculas com propriedades antiadesivas, ou seja, moléculas que podem inibir as vias reguladoras responsáveis pela produção de estruturas como pili e flagelo e, compostos extracelulares, ou ainda moléculas capazes de atuar como quelantes de ferro, elemento fundamental para adesão das células bacterianas a superfícies, podem ser abordagens promissoras na prevenção de formação de biofilmes (BJARNSHOLT et al., 2013; PINKNER et al., 2006; SINGH et al., 2002).

A inibição da formação de biofilmes bacterianos após a etapa da adesão reversível pode ser obtida por meio da interrupção do QS, sistema de comunicação intercelular bacteriano que regula a expressão dos genes envolvidos na formação do biofilme. As moléculas inibidoras do sistema QS estabelecem um quadro de

competição com o receptor das moléculas sinalizadoras, consequentemente ocorre a inibição da produção da matriz e outras atividades, o que dificulta a manutenção da estrutura tridimensional dos biofilmes (LAZAR, 2011; MARTIN et al., 2008).

Quanto ao tratamento de biofilmes já estabelecidos em superfícies bióticas, quando possível, inclui o uso de terapia antimicrobiana com doses elevadas ou regimes de combinação (LEEKHA et al., 2011). Já em relação ao combate de biofilmes aderidos a dispositivos médicos e implantes, a opção de tratamento mais comum tem sido a substituição ou remoção destes, combinado com o uso de antimicrobianos (DAROUCHE, 2004; TRAMPUZ; ZIMMERLI, 2006), o que resulta em maior custo para o sistema de saúde e maior risco ao paciente, por este ser submetido a repetidos procedimentos (MORENO et al., 2017).

Em relação a erradicação de biofilmes estabelecidos, busca-se agentes de tratamento que sejam capazes de degradar a matriz do biofilme juntamente com a possibilidade de eliminar (não necessariamente) as células bacterianas (BOLES; HORSWILL, 2011). Quando as células bacterianas do biofilme são eliminadas após a desintegração da matriz, novos biofilmes são definitivamente impedidos de serem formados (BOLES; HORSWILL, 2011; RIBEIRO, 2015). Em contrapartida, se houver a disruptão da matriz pelo agente de tratamento, sem a eliminação das células bacterianas, um quadro de recolonização pode ser instaurado, já que estas células passariam a estar livres, o que tornaria necessário a combinação com um agente antimicrobiano, pois este teria a função de eliminar as células que fossem dispersas do biofilme para que estas não se tornassem novos focos de colonização (RIBEIRO, 2015). Não obstante, com todas as buscas por agentes de tratamento que sejam capazes de combater biofilmes em diferentes frentes como, na eliminação de células planctônicas, na antiadesão, interrupção do sistema QS e erradicação, ainda estamos à espera destes como produtos no mercado.

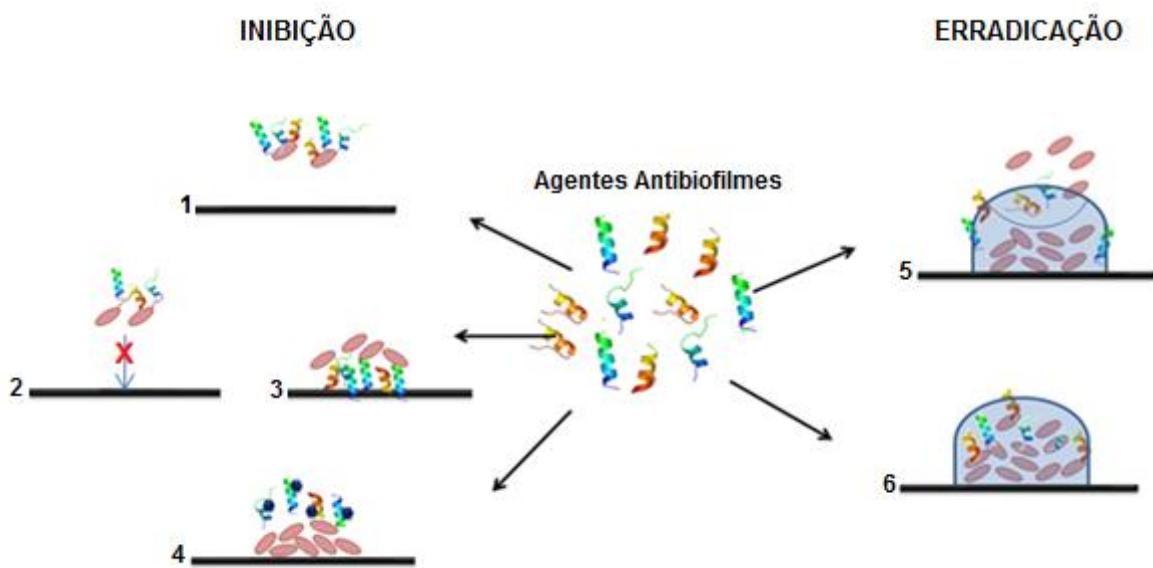


Figura 3: Estratégias de inibição e erradicação de biofilmes bacterianos.(1)Inibição da formação do biofilme alvejando as células no estado planctônico. (2)Inibição da adesão em superfície biótica atingindo as vias reguladoras responsáveis pela produção de estruturas de adesão, como: pili e flagelo. (3)Inibição da adesão por revestimento da superfície abiótica. (4) Inibição do *Quorum sensing*. (5)Erradicação do biofilme pré-formado por meio da disruptão da matriz extracelular. (6) Erradicação do biofilme pré-formado por meio da morte das células aderidas e incorporadas na matriz extracelular. Figura modificada de Gupta et al. (2016).

2.6 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMs) COMO ALTERNATIVA DE TRATAMENTO PARA INFECÇÕES BACTERIANAS ASSOCIADAS A BIOFILMES

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) ou peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) compõem um grupo heterogêneo de moléculas pequenas conservadas evolutivamente, que podem ser encontradas em inúmeros organismos, como: bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2016). Essas moléculas têm sido consideradas como importantes efetores da resposta imune inata de organismos multicelulares e geralmente podem estar associados à defesa contra microrganismos patogênicos, como vírus, fungos, protozoários e bactérias, até mesmo contra as bactérias resistentes a múltiplos fármacos (MOOKHERJEE; HANCOCK, 2007; MORENO et al., 2017).

Os PAMs além de atuarem diretamente contra os microrganismos, também podem desempenhar a função de imunomoduladores, podendo recrutar células imunes para o local da infecção, neutralizar a endotoxina bacteriana, regular a expressão de efetores da resposta imune celular (como citocinas e quimiocinas) e, ativar leucócitos(DUTTA; DAS, 2016).

Atualmente estão listados no *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) (WANG et al., 2016), cerca de 2995 PAMs, tanto naturais como otimizados (último acesso em: 19 de julho de 2018. <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Os peptídeos naturais podem ser definidos como aqueles encontrados na natureza. Enquanto que os peptídeos otimizados podem ser definidos como aqueles modificados físico-quimicamente com a intenção de se aperfeiçoar a sequência e assim sanar algumas limitações, o que caracteriza o desenho racional (FJELLET al., 2011a). Como exemplo, temos os peptídeos desenvolvidos a partir de um modelo de peptídeo antimicrobiano com atividade definida para que problemas como as sequências alongadas de aminoácidos que aumentam os custos de produção, a elevada toxicidade e a instabilidade, sejam resolvidos (FJELLET al., 2011a; ROBINSON, 2011). Os peptídeos são otimizados *in silico* para que as sequências peptídicas tenham funções biológicas melhoradas.

Dentre as classes de PAMs, uma das mais populares têm sido as magaininas (MORENO et al., 2017), essas moléculas podem ser definidas como peptídeos que possuem estruturas helicoidais, que são catiônicos e anfipáticos, contendo uma sequência de 23 resíduos de aminoácidos que foram isolados pela primeira vez da pele do sapo africano *Xenopus laevis* (ZASLOFF, 1987). Apresentam atividade antibacteriana de amplo espectro com base em um mecanismo de formação de poros nas membranas (ZASLOFF, 2002). As magaininas comumente têm sido utilizadas como *templates* (modelos) para novas sequências peptídicas (análogos/derivados) (FJELLET al., 2011a), com o intuito de se obter moléculas com atividade aumentada contra inúmeros patógenos (LIPSKY et al., 2008).

Ademais, em mamíferos as catelicidinas compõem uma das famílias mais relevantes de PAMs (KOŚCIUCZUK et al., 2012). Essas moléculas desempenham importante papel no sistema imunológico de muitos vertebrados e têm sido caracterizadas como peptídeos catiônicos com propriedades anfipáticas que apresentam múltiplas funções, como um amplo espectro de atividade antimicrobiana (contra protozoários, vírus, fungos e bactérias) e como desencadeadores de respostas específicas do sistema de defesa do hospedeiro (HANCOCK; SCOTT, 2000; KOSTAKIOTI et al., 2013). Dentre as catelicidinas, o peptídeo humano LL-37 consiste em uma molécula efetora de múltiplas funções, que tem a capacidade de atuar contra diferentes patógenos, além de modular a resposta imune e promover a cicatrização de feridas (YANG et al., 2004).

Na literatura, já existem registros de estudos que descrevem abordagens que foram empregadas para otimizar a sequência original do peptídeo LL-37. Visto que, se tem descrito que essas moléculas tem sido suscetíveis ao ataque de proteases bacterianas (THWAITE et al., 2006), ou perdem atividade na presença de sal (BOWDISH et al., 2005).

Apesar dos PAMs se apresentarem de forma diversificada, em sua maioria apresentam baixa massa molecular (menos de 100 aminoácidos que corresponde a <10 kDa); prevalência de aminoácidos básicos que lhes conferem uma carga líquida positiva, que varia de +2 a +7 em pH 7,0; característica anfipática, que atribui faces hidrofílica e hidrofóbica; e estrutura que pode se diferenciar em três tipos – α -hélice, folha- β e, estendido (Fig. 4) (BULET; STOCKLIN, 2005; YOUNT; YEAMAN, 2013).

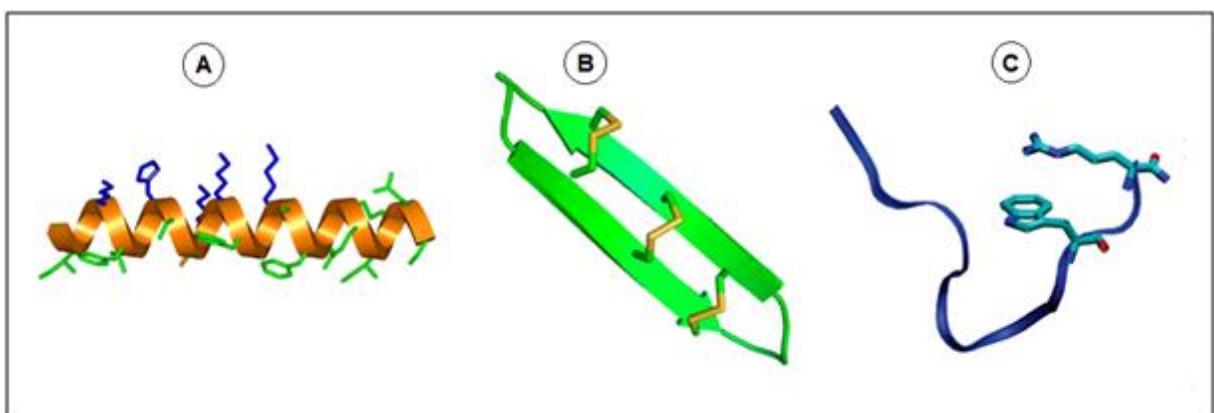


Figura 4: Representação das principais classes estruturais de PAMs. (A) α -helicoidal, magainina; (B) folha- β , defensina; (C) peptídeo estendido, indolicidina.

Neste contexto, os PAMs naturais ou otimizados têm sido propostos como uma potencial alternativa terapêutica no tratamento de infecções bacterianas associadas a biofilmes, podendo ser utilizados em combinação ou não com outros antimicrobianos para se obter um efeito sinergístico (OTVOS et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2010).

Na perspectiva de PAMs com atividade antibiofilme, Di Luca et al. (2015) desenvolveram um banco de dados denominado *BaAMPs – Biofilm-active AMPs database* (<http://www.baamps.it/>), que visa a disponibilização das sequências peptídicas e dos dados experimentais de peptídeos antimicrobianos testados especificamente contra biofilmes, com o intuito de fornecer à comunidade científica uma plataforma de acesso aberto para consulta e também para auxílio de projetos de desenvolvimento de PAMs que visem essa atividade.

Quanto aos mecanismos de ação envolvidos no combate a biofilmes, os PAMs

podem evitar a formação desse estilo de vida microbiano por meio da: inibição da adesão inicial, através do revestimento da superfície abiótica ou pela interação com a superfície bacteriana; pela prevenção da maturação do biofilme, alvejando os primeiros colonizadores da superfície; ou ainda, pela ligação às moléculas de QS, e assim, inibindo a comunicação bacteriana(**Fig. 5 A**) (DI LUCA et al., 2014; JORGE et al., 2012). No combate a biofilmes maduros (estabelecidos), os mecanismos envolvidos que podem promover a erradicação consistem na penetração da matriz extracelular, causando a morte das células associadas ao biofilme, ou então, na ligação com endotoxinas e consequentemente neutralização das mesmas (**Fig. 5 B**) (DI LUCA et al., 2014; JORGE et al., 2012).

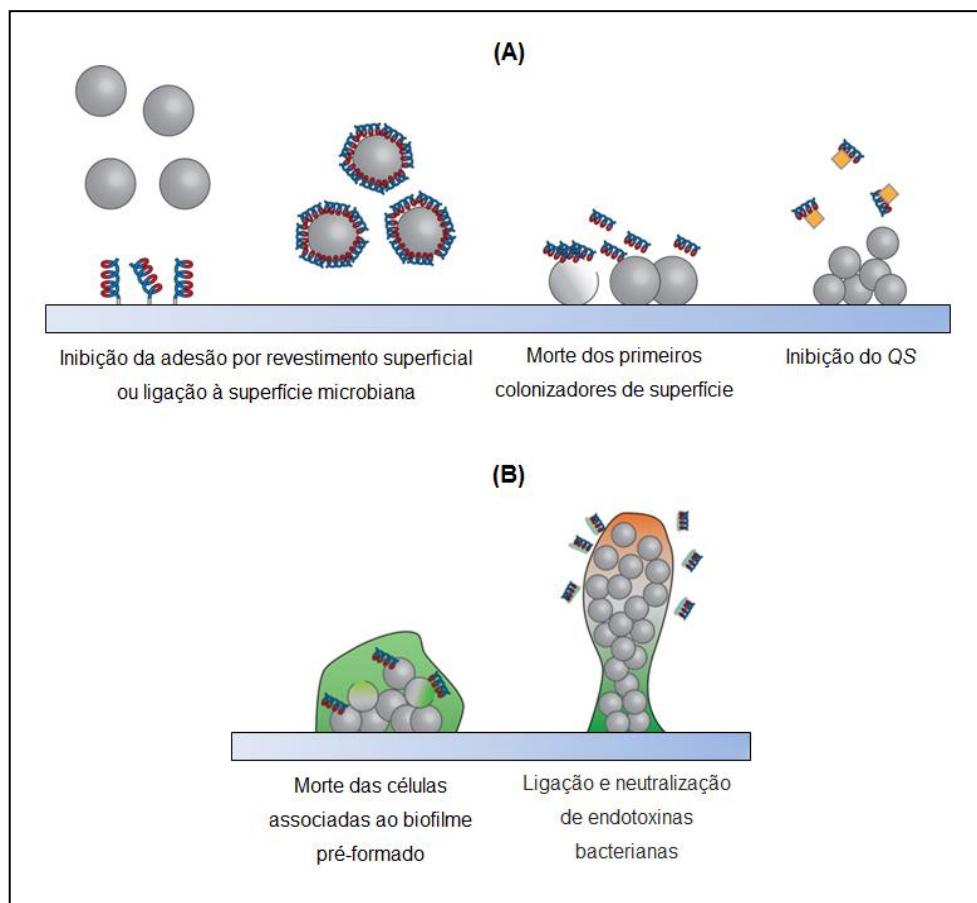


Figura 5: Representação dos mecanismos de ação dos PAMs com atividade antibiofilme. (A) Inibição da formação do biofilme. Os PAMs podem evitar a adesão inicial ao biofilme por revestimento da superfície do dispositivo médico ou interagindo com a superfície microbiana. A maturação do biofilme pode ser prevenida matando os colonizadores da superfície inicial. Os PAMs podem se ligar às moléculas de detecção de *Quorum sensing* para inibir a comunicação bacteriana. (B) Erradicação da formação do biofilme. Os PAMs podem matar o biofilme pré-formado penetrando a matriz do biofilme e matando as células associadas ao biofilme. Os PAMs podem se ligar e neutralizar a endotoxina bacteriana liberada por células associadas ao biofilme. Figura modificada de Di Luca et al. (2014).

Dentre os PAMs naturais que podem exercer uma atividade antibiofilme pode-

se citar a defensina humana β -defensina3, que ao ser testada contra biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina (MRSE) e *S.aureus* resistente à meticilina (MRSA) em titânio (material de implantes ortopédicos), foi capaz de inibir a formação dos biofilmes nas concentrações de 4-8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ZHU et al., 2013), e quando testada contra biofilme maduro polimicrobiano (composto por quatro espécies de bactérias orais, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *S. mutans* e *Enterococcus faecalis*) com três semanas de idade, pelo método de microscopia confocal de varredura a laser, demonstrou uma maior porcentagem de eliminação de células bacterianas incorporadas ao biofilme em comparação com as amostras não tratadas e amostras tratadas com soluções desinfetantes comuns (solução saturada de hidróxido de cálcio e solução a 2% de clorhexidina) (LEE et al., 2013). Outro exemplo, o peptídeo DLP-PH, identificado a partir dasecreção cutânea de *Phylomedusa hypochondrialis*, que em testes contra biofilmes de *E. coli*, *Candida albicanse* e *P. aeruginosa*, foi capaz de inibir a formação dos mesmos nas concentrações de 32, 64 e 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (WU et al., 2018). Já o peptídeo AMP-jsa9, isolado da bactéria Gram-positiva *Paenibacillus polymyxa*, quando testado contra o patógeno *Bacillus cereus* na concentração de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrou-se altamente eficaz para a ruptura ou remoção dos biofilmes pré-formados dessa espécie (HAN et al., 2017).

2.7 PEPTÍDEOS OTIMIZADOS ANTIBIOFILMES

Os peptídeos otimizados antibiofilmes podem ser definidos como moléculas desenvolvidas a partir de sequências peptídicas originais por uma abordagem *in silico*, que apresentam um amplo espectro de atividade, e denotam-se como uma alternativa favorável aos antimicrobianos convencionais para o tratamento de infecções relacionadas a biofilme (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2016; JORGE et al., 2012; PLETZER; HANCOCK, 2016). São peptídeos que se assemelham aos PAMs em relação à estrutura, como: tamanho reduzido, presença de aminoácidos catiônicos e uma alta proporção de resíduos hidrofóbicos, mas divergem no que se refere à origem e atividade (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2012; HANCOCK; SAHL, 2006).

Quanto à atividade, estes peptídeos podem apresentar ação antibiofilme em concentrações que não afetam o crescimento planctônico, ou então podem ser capazes de combater apenas os biofilmes, demonstrando assim uma atividade

seletiva (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2012; FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014). Uma abordagem relevante envolvendo esse tipo de peptídeo tem sido a combinação dessas moléculas com antimicrobianos convencionais. Dado que, essas moléculas podem aumentar a ação antimicrobiana para prevenir a formação de biofilmes e também erradicar os biofilmes maduros (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2015; REFFUVEILLE et al., 2014). Além disso, essa abordagem pode servir para reduzir a pressão seletiva no desenvolvimento da resistência exercida por cada agente individual, pois nos experimentos são utilizadas concentrações muito baixas (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2016).

Na literatura podemos encontrar muitos estudos envolvendo peptídeos otimizados antibiofilmes, como exemplo, o peptídeo 1037 de apenas 9 aminoácidos de comprimento que foi desenvolvido a partir do peptídeo natural humano LL-37. Em testes, este peptídeo foi capaz de prevenir efetivamente a formação de biofilmes dos patógenos Gram-negativos *P. aeruginosa* e *Burkholderia cenocepaciae* e Gram-positivo *Listeria monocytogenes*, sendo sua atividade antibiofilme independente da atividade contra células planctônicas (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2012).

Outro peptídeo otimizado com ação contra biofilmes bacterianos desenvolvido a partir de uma sequência natural consiste no peptídeo IDR-1018. Este peptídeo é derivado do peptídeo antimicrobiano bactenecina, isolado a partir de grânulos de neutrófilos bovinos (NIYONSABA et al., 2013). Fuente-Núñez et al. (2014), desenvolveram estudos com esse peptídeo e constaram que as concentrações testadas não afetaram o crescimento planctônico das bactérias, em contrapartida, impediram completamente a formação de biofilmes e levou à erradicação de biofilmes maduros em cepas de patógenos bacterianos Gram-negativos e Gram-positivos, incluindo *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* resistente à meticilina, *Salmonella typhimurium* e *Burkholderia cenocepacia*, sendo que, concentrações baixas do peptídeo levaram à dispersão do biofilme, enquanto que concentrações mais elevadas desencadearam a morte celular do biofilme. O mecanismo de ação do IDR-1018 confere no bloqueio da resposta rigorosa por meio da hidrólise dos nucleotídeos de sinalização intracelular denominados (p) ppGpp (guanosina-tetra e pentafosfato), essas moléculas têm sido consideradas de suma importância no desenvolvimento do biofilme de múltiplas espécies bacterianas (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014).

Ademais, com base nas características de desenho dos peptídeos

antibibiofilmes otimizados, Fuente-Núñez et al. (2015) desenvolveram sequências peptídicas D-enantioméricas derivadas do peptídeo otimizado 1018. Esses peptídeos demonstraram eficácia em inibir o desenvolvimento do biofilme e erradicar os biofilmes pré-formados por *P. aeruginosa*, *E. coli* 0157, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*. Além disso, apresentaram um forte efeito sinergístico com antimicrobianos convencionais, reduzindo em até 64 vezes as concentrações de antimicrobianos necessárias para a inibição completa do biofilme. Quanto ao mecanismo de ação, foi elucidado que este comprehende no bloqueio dos nucleotídeos de sinalização (p) ppGpp, assim como descrito no peptídeo 1018.

2.8 OTIMIZAÇÃO *in silico* DE PEPTÍDEOS

Em virtude da busca por novas opções de tratamento aos fármacos disponíveis no mercado, a otimização de sequências peptídicas *in silico* tem-se demonstrado recorrente. Sendo que, essa abordagem visa à aceleração do processo de desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos (JORGE et al., 2012). Para que uma sequência peptídica seja otimizada *in silico*, se faz necessário a utilização de recursos de bioinformática (TORRENT et al., 2012). Como exemplo, (i) os modelos linguísticos (ii) os algoritmos genéticos, (iii) e os algorítimos baseados em estrutura.

O modelo línguístico foi descrito como um arranjo de aminoácidos padrões para atividade antimicrobiana em uma sequência peptídica (TORRENT et al., 2012). Nesse contexto, Loose et al. (2006) utilizaram o algoritmo denominado Teiresias para a descoberta de padrões regulares – aminoácidos – em sequências naturais de PAMs provenientes do banco de dados APD. Posterior à identificação dos aminoácidos regulares, esses foram recombinados para o desenvolvimento de sequências peptídicas otimizadas com potencial antimicrobiano. Como resultado, os autores obtiveram 42 sequências otimizadas, com um comprimento de 20 resíduos de aminoácidos para cada uma delas, que apresentaram homologia limitada aos PAMs de ocorrência natural.

O algoritmo genético (AG) consiste em um método heurístico para problemas de busca e aproximação, e tem sido adequado para sanar os problemas que envolvem dados de cadeia semelhante, tais como os aminoácidos de um peptídeo. O AG tende a buscar soluções interativas por meio de operações inspiradas em processos genéticos naturais como, a recombinação (combinando partes de duas

soluções para sugerir outra) e mutações (alterando aleatoriamente uma parte de uma solução para gerar outra) (FJELLet al., 2011b). No caso de sequências peptídicas, a mutação de um ou mais aminoácidos pode resultar em um novo peptídeo melhorado, assim comona recombinação de aminoácidos provenientes de dois ou mais peptídeos. Sendo que, a aptidão de cada interação (geração) deve ser comprovada mediante avaliação (FJELL et al., 2011b). Nessa perspectiva, Fjell e et al.(2011b) utilizaram um algoritmo genético para desenvolver novos peptídeos antibacterianos. Como resultado, os autores obtiveram sequências otimizadas que demonstraram ser 19 vezes mais potentes para combater patógenos de importância clínica quando comparadas as sequências originais.

Ainda na linha de otimização de sequências peptídicas por algoritmo genético, Decaffmeyer et al. (2006), descreveram um algoritmo denominado PepDesign, que começa por analisar a interação nativa de um peptídeo com um alvo para definir quais pontos são importantes. Posteriormente, um protocolo de modelagem para a substituição de resíduos de aminoácidos que compreenderão no desenho de peptídeos melhorados é definido. Esse algoritmo tem capacidade de (i) calcular novos peptídeos que cumprem a hipótese pré-estabelecida, (ii) de testar o espaço conformacional dos novos peptídeos em interação com o alvo por dinâmica angular e, de (iii) selecionar o melhor peptídeo com base na análise das propriedades da estrutura complexada. Além disso, os autores defendem que a aplicação do algoritmo pode ser abrangente, pois os procedimentos tendem a permanecer semelhantes independentemente do alvo.

Os algoritmos baseados em estruturas consideram propriedades estruturais e fisicoquímicas importantes, como os momentos hidrofóbicos dependentes da sequência e da topologia, para o desenvolvimento de novas sequências peptídicas (PILLONG et al., 2017). Nesse entendimento, Pillong et al. (2017), desenvolveram o algoritmo denominado *Hydrophobic Submoments* (HSM), que codifica a anfifilidade helicoidal com base na distribuição espacial de padrões hidrofóbicos, para que se tenha o desenvolvimento de novas sequências peptídicas, cujo mecanismo de ação seja a formação de poros em membranas. A partir dessa ferramenta, os autores desenvolveram o peptídeo otimizado Lavracin e, mais três variações a partir do mesmo, estes que demonstraram atividade antibacteriana melhorada quando comparados a sequência do PAM original (Magainina-2) e, que confirmaram a hipótese de possuirem mecanismo de ação envolvendo a formação de poros em

membrana.

Visando a aborgem *in silico*, Porto (2013, 2017) desenvolveu ferramentas computacionais para o desenvolvimento de peptídeos a partir da otimização de sequências naturais. Dentre eles, os peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1e PaDBS1R3F4 (**Tab. 1**), foram testados quanto ao seu potencial antibiofilme no presente trabalho.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos dos peptídeos otimizados.

Peptídeo	Sequência	Carga	Hidrofobicidade	Momento Hidrofóbico	Massa Esperada (Da)
Guavanina13	RRYMECYEQAERYFRRFGRR	+4	0,016	0,571	2773,1
Guavanina14	RSFMKCYEQASRYGNRILRR	+5	0,136	0,573	2534,9
PaDSBS1R1	PKILNKILGKILRLAAAFK	+5	0,530	0,586	2107,7
PaDBS1R3F4	KLLPRIKKKI	+5	0,275	0,718	1236,6

Os peptídeos guavanina13 e guavanina14 foram projetados por meio de uma ferramenta de bioinformática baseada nos métodos evolutivos, o algoritmo genético personalizado (PORTO, 2017). A partir do algoritmo foram realizadas interações de quatro fragmentos da sequência original do PAM natural Pg-AMP1 isolado de sementes de goiaba (*Psidium guajava*) (PELEGRINI et al., 2008). Essas interações deram origem a variados análogos, dentre eles aguavanina13 e 14 (PORTO, 2017).

O PaDSBS1R1 consiste em um peptídeo derivado da sequência peptídica PaDBS1, que corresponde à um fragmento da proteína ribossomal L39E da arqueia hipertermofílica *Pyrobaculum aerophilum* (PORTO, 2013). Já o peptídeo PaDBS1R3F4 consiste em um dos fragmentos do peptídeo sintético PaDBS1R3, este que por sua vez é derivado do peptídeo PaDBS1, correspondente ao fragmento da proteína ribossomal L39E de *P. aerophilum* (PORTO, 2013). Esses peptídeos (PaDSBS1R1 e PaDBS1R3) foram gerados a partir de uma ferramenta de bioinformática baseada no modelo linguístico, o algoritmo *Joker*. Esse algoritmo visa à inserção de padrões rígidos em sequências de peptídeos conhecidas através do sistema de janela deslizante, sendo que, para cada janela, um novo análogo foi gerado (PORTO, 2013).

3. JUSTIFICATIVA

Os biofilmes bacterianos têm sido associados a aproximadamente dois terços de todas as infecções clínicas. Fato que pode ser atribuído ao desenvolvimento de mecanismos de resistência aos elementos de defesa do organismo hospedeiro e, a resistência aos antimicrobianos convencionais. O que resulta em elevadas taxas de internações hospitalares e no aumento dos custos de hospitalização em nível mundial, representando então, uma condição alarmante para a saúde pública. Portanto, torna-se urgente o desenvolvimento de compostos que atuem contra esse estilo de vida bacteriano. Nessa perspectiva, os peptídeos otimizados *in silico* surgem como uma estratégia alternativa e promissora de tratamento por geralmente apresentarem tamanho reduzido, baixa citotoxicidade, amplo espectro de atividade e múltipla aplicabilidade. Deste modo, o desenvolvimento deste trabalho torna-se relevante, posto que, pretende-se utilizar peptídeos individualmente ou combinados com antimicrobianos, para inibir e erradicar biofilmes de bactérias patogênicas humanas de importância médica. Visto que, os resultados obtidos nesse trabalho poderão ser utilizados para o desenvolvimento de novas terapias antibiofilmes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antibiofilme dos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 individualmente e combinados com antimicrobianos contra biofilmes formados por bactérias patogênicas humanas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito inibitório dos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4, sobre células planctônicas e biofilmes de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC, *E. coli* ATCC e KPC.
- Avaliar o efeito inibitório dos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 combinados com o antimicrobiano ciprofloxacina contra células planctônicas e biofilmes de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC, *E. coli* ATCC e KPC.
- Avaliar a atividade antibiofilme dos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 sobre biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC, *E. coli* ATCC e KPC.
- Avaliar a susceptibilidade dos biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC, *E. coli* ATCC e KPC frente aos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 combinados com o antimicrobiano ciprofloxacina.
- Avaliar a atividade hemolítica dos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 sobre eritrócitos de camundongo Swiss.

5. METODOLOGIA

5.1 CEPAS BACTERIANAS

As cepas bacterianas são provenientes da coleção de culturas do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de Brasília-DF e, foram testadas as seguintes cepas: *P. aeruginosa* 27853, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* KPC+001825971, *E. coli* ATCC 25922 e, *E. coli* KPC+001812446.

5.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Os peptídeos testados, guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4, foram desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa. A síntese foi realizada pela *Peptide 2.0* (USA), por meio de síntese química de fase sólida carbonila 9-fluoretentilmetoxi (FMOC) e purificado por cromatografia líquida de alto desempenho a 95%.

5.3 ANÁLISE DE MASSA MOLECULAR

A verificação da massa molecular foi desenvolvida por *MALDI-ToF/ToF Ultraflex III* (*Bruker Daltonics*) em modo refletido. Para isso, uma alíquota dos peptídeos otimizados *in silico* guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 foram solubilizadas em água *milli-Q* e misturados em solução saturada de matriz constituída por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico ($\text{H}_2\text{O:ACN:TFA/50:50:0,3, v:v:v}$) em uma razão de (1:3, v:v) e, por fim depositados sob uma placa do tipo *MTP 384 massive* para peptídeos sintéticos, onde foram mantidos a temperatura ambiente até completa secagem das amostras aplicadas. A massa monoisotópica foi obtida em modo refletido usando calibrante externo Peptide Calibration Standard II.

5.4 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS

Os peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 foram avaliados quanto a capacidade de inibir o crescimento de células planctônicas (CIM)

e a formação de biofilme (CIMB) das cepas de *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae* ATCC, *K.pneumoniae* KPC, *E. coli* ATCC e, *E. coli* KPC através do método de microdiluição para peptídeos (WIEGAND et al., 2008). Para tanto, as cepas bacterianas foram crescidas durante 16h em 3 mL de meio caldo Mueller Hinton (MH), que posteriormente foram diluídas (1:100, v:v) no meio BM2 [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%] na presença do tratamento (peptídeo) em microplacas de 96 poços, que foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, o crescimento das células planctônicas foi avaliado em leitor de microplacas (*Multiskan FC – Thermo Scientific*) a uma absorbância de 600 nm. O meio então foi descartado, e os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada. As células aderidas à superfície da microplaca foram coradas com 100 μL de cristal violeta a 0,01 % (em cada poço) por 20 min, posteriormente o cristal violeta foi removido e os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água deionizada. As microplacas foram secas ao ar e o cristal violeta aderido às células foi solubilizado com 110 μL de etanol a 60 %. A formação de biofilmes foi avaliada através da absorbância a 595 nm, leitura realizada em leitor de microplacas (*Multiskan FC – Thermo Scientific*). Foi utilizado como controle positivo de crescimento as células planctônicas e o biofilme sem tratamento. Neste ensaio foram realizadas três réplicas biológicas com três repetições técnicas para cada.

5.5 ENSAIOS DE COMBINAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS E ANTIMICROBIANO PARA INIBIÇÃO DE BIOFILMES DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS

O efeito das combinações entre os peptídeos otimizados e o antimicrobiano ciprofloxacina foi avaliado por meio de ensaios de microdiluição em microplacas de 96 poços, pelo método de tabuleiro de xadrez(MOODY, 2004). Nesse ensaio, o antimicrobiano foi adicionado ao longo das linhas (poços na horizontal) da microplaca, enquanto os peptídeos foram adicionados ao longo das colunas (poços na vertical) partindo de concentrações correspondentes a 2X mais que as CIMs e CIMBs detectadas no ensaio descrito anteriormente. O crescimento das células planctônicas e a formação de biofilmes foram determinados como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como a soma do índice de

concentração inibitória fracionada (Σ ICIF), que é determinado como: Σ ICIF= [A]/CIMA + [B]/CIMB, onde [A] e [B] são as CIMs de A e B quando combinados e CIMA e CIMB são as CIMs dos compostos antimicrobianos sozinhos. A Σ ICIF foi interpretada como: Σ ICIF \leq 0,5 efeito sinergístico; $>0,5$ a \leq 4 efeito indiferente; >4 efeito antagonista. Ainda de acordo com Moody (2004), a Σ ICIF pode não ser determinável (ND) para algumas combinações de concentrações se as CIMs dos agentes únicos forem iguais as CIMs quando combinadas, que na prática significa que a interação entre os dois agentes de tratamento é indiferente. A mesma abordagem foi utilizada para calcular a soma do índice de concentração inibitória fracionada para biofilmes.

5.6 TRIAGEM DE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS CONTRA BIOFILMES MADUROS DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS

Na determinação da atividadeantibiofilme dos peptídeos otimizados guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 contra biofilmes maduros, a suspensão bacteriana foi diluída 1:100, v:v. Os biofilmes de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC, e *E. coli* ATCC e KPC, foram formados como descrito anteriormente, durante o período de 24 horas para se obter um biofilme maduro. Posteriormente, as placas foram lavadas duas vezes com 200 μ L de água Milli-Q esterilizada em fluxo laminar para a remoção das células planctônicas. Os peptídeos na concentração de 64 μ g.mL $^{-1}$ foram adicionados em suas respectivas microplacas de biofilme previamente formado. Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por mais 24h, totalizando 48h de incubação. Os meios de cultura foram então removidos e os poços da microplaca lavados duas vezes com água deionizada. As células aderidas à superfície da microplaca foram coradas com 100 μ L de cristal violeta a 0,01% (em cada poço) por 20 min, posteriormente o cristal violeta foi removido e os poços da microplaca foram lavados novamente duas vezes com água deionizada. As microplacas foram secas ao ar e o cristal violeta aderido às células foi solubilizado com 110 μ L de etanol a 60%. A quantificação da biomassa dos biofilmes foi obtida através da absorbância a 595 nm em leitor de microplacas (*Multiskan FC – Thermo Scientific*). O biofilme formado em 24h e o biofilme sem tratamento após mais 24h de incubação foram utilizados como controles positivo de crescimento. E para cada cepa bacteriana, foram realizadas três repetições técnicas

para cada uma das três réplicas biológicas. Sendo que, os resultados foram interpretados como: Percentual da Biomassa do Biofilme após 24h de tratamento < Percentual da Biomassa do Biofilme Maduro em 24h = potencial erradicatório, que corresponde à eliminação do biofilme já estabelecido; Percentual da Biomassa do Biofilme após 24h de tratamento > Tratamento < Percentual da Biomassa do Biofilme após 24h > Percentual da Biomassa do Biofilme Maduro em 24h = potencial inibitório, que corresponde a interrupção do crescimento do biofilme já estabelecido.

5.7 ENSAIOS DE COMBINAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS E ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILMES PRÉ-FORMADOS DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS

O efeito antibiofilme das combinações entre os peptídeos otimizados e o antimicrobiano ciprofloxacina sobre biofilmes pré-formados foi avaliado por meio de ensaios de microdiluição em microplacas de 96 poços, pelo método de tabuleiro de xadrez(MOODY, 2004). Nesse ensaio, os biofilmes foram previamente formados como descrito anteriormente, para posterior adição do antimicrobiano ao longo das linhas (poços na horizontal) e do peptídeo ao longo das colunas (poços na vertical). Os resultados para inibição dos biofilmes pré-formados foram expressos pela mesma abordagem utilizada para o cálculo da Σ ICIF. No caso de erradicação dos biofilmes previamente formados os resultados foram expressos como a soma do índice de concentração erradicatória fracionada (Σ ICEF), que é determinado como: Σ ICEF = [A]/CEMA + [B]/CEMB, onde [A] e [B] são as CEMs de A e B quando combinados e CEMA e CEMB são as CEMs dos compostos antimicrobianos sozinhos. Σ ICEF foi interpretada como: Σ ICEF \leq 0,5 efeito sinergístico; >0,5 a \leq 4 efeito indiferente; >4 efeito antagonista.

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS PEPTÍDEOS OTIMIZADOS

A determinação da atividade hemolítica dos peptídeos otimizados *in silico* foi desenvolvida conforme Evans et al.(2013), com algumas modificações. As células de sangue de camundongo Swiss foram separadas do plasma por centrifugação (1600 rpm por 2min) e, preparadas a 1% (v:v) de eritrócitos (lavado três vezes com

PBS, pH 7,4). Posteriormente, 50 µL dos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 ePaDBS1R3F4, foram adicionados a tubos com 50 µL da suspensão de eritrócitos nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20; 40; 80;160; 320; 640 µg.mL⁻¹, sendo a maior concentração testada correspondente a 10X mais que a maior concentração dos ensaiosantibiofilmes (64 µg.mL⁻¹). Como controle positivo para hemólise foi utilizado 1% (v:v) da suspensão de eritrócitos incubada com 1% de Triton X-100 e, como controle negativo, 1% (v:v) da suspensão de eritrócitos em PBS. Os tubos foram incubados por 60 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente centrifugados a 3000 rpm por 2min, sendo que 100 µL de sobrenadante foi transferido pra uma microplaca de 96 poços para a realização da leitura a 415 nm em leitor de microplacas (*Multiskan FC – Thermo Scientific*). A porcentagem de hemólise foi calculada como segue: % hemólise = $100 \times \frac{[PO - N]}{[P - N]}$, onde PO corresponde ao peptídeo otimizado, N controle negativo (tampão fosfato com eritócitos) e Pcontrole positivo (Triton-X com eritrócitos). Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA), com posterior aplicação do teste de correção Bonferroni, usando o programa “GraphPad Prism versão 6.01”. Os resultados foram expressos como média ± EPM e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de p<0,05.

6 RESULTADOS

6.1 CONFIRMAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DOS PEPTÍDEOS TESTADOS

As análises realizadas por meio da espectrometria de massas confirmaram a massa dos peptídeos testados. O peptídeo PaDSBS1R1 apresentou massa de 2107,3 Da(**Fig. 6 A**), o peptídeo PaDBS1R3F4massa de 1236,9 Da(**Fig. 6 B**), guavanina13 massa molecular de 2772,5 Da (**Fig. 6 C**) e guavanina14 2534,5 Da (**Fig. 6 D**).

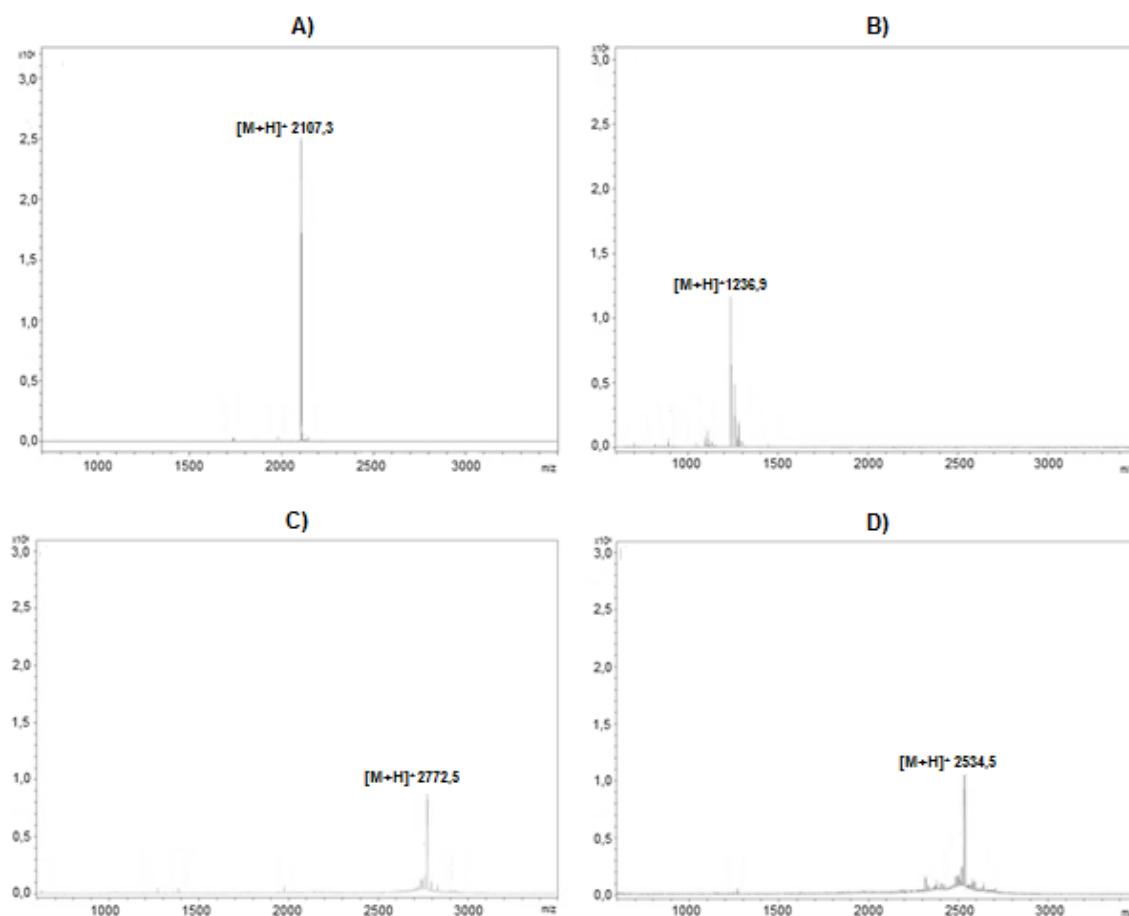


Figura 6: Análise por espectrometria de massas. (A) Íon majoritário em massa de 2107,3 Da, referindo-se a PaDSBS1R1. (B) Íon majoritário em massa de 1236,9 Da, referindo-se a PaDBS1R3F4. (C) Íon majoritário em massa de 2772,5 Da, referindo-se a guavanina13. (D) Íon majoritário em massa de 2534,5 Da, referindo-se a guavanina14.

6.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS

Os peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 foram avaliados quanto ao potencial de inibição contra células planctônicas e formação de biofilme das cepas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC e, *E. coli* ATCC e KPC (**Tab. 2**) pelo método de microdiluição em microplacas de 96 poços, sendo as concentrações testadas 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram que, os peptídeos otimizados guavanina13 e guavanina14 foram incapazes de inibir células planctônicas de todas as cinco cepas testadas. Em contrapartida, guavanina13 e guavanina14 apresentaram atividade seletiva para inibição de biofilme contra duas das cinco cepas testadas –*K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC.

O peptídeo PaDSBS1R1 apresentou atividade de inibição para quatro das cinco cepas testadas. Sendo que, para *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* KPC demonstrou-se menos efetivo para células planctônicas, apresentando CIM de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que para biofilmes demonstrou atividade de inibição em uma concentração oito vezes menor, apresentando CIMB de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Contra as cepas de *K. pneumoniae* KPC e *E. coli* ATCC, o PaDSBS1R1 demonstrou atividade de inibição seletiva para biofilme, sendo que, para *K. pneumoniae* KPC apenas na maior concentração testada, CIMB de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O peptídeo PaDBS1R3F4 foi único que demonstrou ineficácia em inibir tanto células planctônicas quanto a formação de biofime das cinco cepas testadas.

Tabela 2: Avaliação da atividade antibacteriana de peptídeos otimizados para inibir o crescimento planctônico e a formação de biofilmes de cepas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC e, *E. coli* ATCC e KPC em ensaios realizados em microplacas. CIM (Concentração Inibitória Mínima), CIMB (Concentração Inibitória Mínima para Biofilmes).

Peptídeo	Sequência	Bactéria	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	
			CIM	CIMB
guavanina13	RRYMECYEQAERYFRRFGRR	<i>P. aeruginosa</i>	>64	>64
		<i>K. pneumoniae</i> ATCC	>64	4
		<i>K. pneumoniae</i> KPC	>64	>64
		<i>E. coli</i> ATCC	>64	16
		<i>E. coli</i> KPC	>64	>64
guavanina14	RSFMKCYEQASRYGNRILRR	<i>P. aeruginosa</i>	>64	>64
		<i>K. pneumoniae</i> ATCC	>64	4
		<i>K. pneumoniae</i> KPC	>64	>64
		<i>E. coli</i> ATCC	>64	32
		<i>E. coli</i> KPC	>64	>64
PaDSBS1R1	PKILNKILGKILRLAAAFK	<i>P. aeruginosa</i>	>64	>64
		<i>K. pneumoniae</i> ATCC	64	8
		<i>K. pneumoniae</i> KPC	>64	64
		<i>E. coli</i> ATCC	>64	2
		<i>E. coli</i> KPC	64	8
PaDBS1R3F4	KLLPRIKKKI	<i>P. aeruginosa</i>	>64	>64
		<i>K. pneumoniae</i> ATCC	>64	>64
		<i>K. pneumoniae</i> KPC	>64	>64
		<i>E. coli</i> ATCC	>64	>64
		<i>E. coli</i> KPC	>64	>64

6.3 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS E CIPROFLOXACINA PARA INIBIÇÃO DE BIOFILMES DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS

Uma vez que os peptídeos otimizados apresentaram atividade inibitória contra células planctônicas e/ou biofilmes, os mesmos foram escolhidos para estudos de combinação a partir do método de tabuleiro de xadrez. Sendo as combinações testadas: guavanina13 com ciprofloxacina (**Tab. 3 e 4**) e, guavanina14 com ciprofloxacina (**Tab. 5 e 6**), ambas contra as cepas de *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC. Por fim, PaDSBS1R1 com ciprofloxacina (**Tab. 7 e 8**), contra as cepas de *K.*

pneumoniae ATCC, *K. pneumoniae* KPC, *E. coli* ATCC e *E. coli* KPC. Vale ressaltar que todas as combinações realizadas não apresentaram efeito sinérgico tanto para as células planctônicas, como para a inibição da formação de biofilmes das cepas bacterianas testadas.

Tabela 3: Avaliação da combinação entre guavanina13 e ciprofloxacina para inibir o crescimento de células planctônicas de *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.

Bactéria	CÉLULAS PLANCTÔNICAS							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			guavanina13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICIF	Interpretação
	CIM combinado	CIM sozinho	ICIF	CIM combinado	CIM sozinho	ICIF		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	1	1	ND	4	>64	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC	1	1	ND	32	>64	-	-	-

Tabela 4: Avaliação da combinação entre guavanina13 e ciprofloxacina para inibir a formação de biofilmes de *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.

Bactéria	BIOFILME							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			guavanina13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICIF	Interpretação
	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	1	1	ND	1	4	0,25	-	-
<i>E. coli</i> ATCC	0,5	0,5	ND	4	16	0,25	-	-

Tabela 5: Avaliação da combinação entre guavanina14 e ciprofloxacina para inibir o crescimento de células planctônicas de *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.

Bactéria	CÉLULAS PLANCTÔNICAS							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			guavanina14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICIF	Interpretação
	CIM combinado	CIM sozinho	ICIF	CIM combinado	CIM sozinho	ICIF		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	1	1	ND	4	>64	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC	1	1	ND	64	>64	-	-	-

Tabela 6: Avaliação da combinação entre guavanina14 e ciprofloxacina para inibir a formação de biofilmes de *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.

Bactéria	BIOFILME							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			guavanina14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICIF	Interpretação
	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	1	1	ND	1	4	0,25	-	-
<i>E. coli</i> ATCC	0,25	0,5	0,5	32	32	ND	-	-

Tabela 7: Avaliação da combinação entre PaDSBS1R1 e ciprofloxacina para inibir o crescimento de células planctônicas de *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* KPC, *E. coli* ATCC e, *E. coli* KPC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que as combinações foram ineficazes quando comparadas com o controle.

Bactéria	CÉLULAS PLANCTÔNICAS							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			PaDSBS1R1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICIF	Interpretação
	CIM combinado	CIM sozinho	ICIF	CIM combinado	CIM sozinho	ICIF		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	1	1	ND	64	64	ND	-	-
<i>K. pneumoniae</i> KPC	32	32	ND	32	>64	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC	1	1	ND	0,03125	>64	-	-	-
<i>E. coli</i> KPC	1	1	ND	16	64	0,25	-	-

Tabela 8: Avaliação da combinação entre PaDSBS1R1 e ciprofloxacina para inibir a formação de biofilmes de *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* KPC, *E. coli* ATCC e, *E. coli* KPC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Não determinável (ND). Os (-) indicam que as combinações foram ineficazes quando comparadas com o controle.

Bactéria	BIOFILME							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			PaDSBS1R1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICIF	Interpretação
	CIM combinado	CIM sozinho	ICIF	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	0,5	1	0,5	16	8	2	2,5	Indiferente
<i>K. pneumoniae</i> KPC	4	32	0,125	32	64	0,5	0,625	Indiferente
<i>E. coli</i> ATCC	0,125	0,5	0,25	1	2	0,5	0,75	Indiferente
<i>E. coli</i> KPC	0,125	0,25	0,5	16	8	2	2,5	Indiferente

6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS SOBRE BIOFILMES MADUROS POR MEIO DE TRIAGEM

Na triagem dos peptídeos otimizados contra biofilmes maduros de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e KPC e, *E. coli* ATCC e KPC, os peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 foram testados na concentração única de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram que, o peptídeo guavanina13 apresentou atividade antibiofilme contra *K. pneumoniae* KPC e *E. coli* ATCC, demonstrando um potencial inibitório de crescimento sobre os biofilmes previamente formados. Em contrapartida, a guavanina14 apresentou atividade apenas contra *K. pneumoniae* KPC, assim como o peptídeo PaDBS1R3F4, os quais demonstraram um potencial inibitório sobre o biofilme maduro dessa cepa bacteriana. Já o PaDSBS1R1 apresentou um melhor espectro de atividade antibiofilme quando comparado aos demais peptídeos. PaDSBS1R1 teve atividade sobre quatro das cinco cepas testadas, sendo que contra os biofilmes maduros de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC demonstrou um potencial inibitório e, para *K. pneumoniae* KPC um potencial erradicatório, apresentando uma redução na biomassa do biofilme maduro após o tratamento. Entretanto, nenhum dos peptídeos foram capazes de inibir ou erradicar totalmente os biofilmes maduros na concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 9: Avaliação da atividade antibiofilme de guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDS1R3F4 após 24h de tratamento (na presença ou ausência do peptídeo) sobre biofilmes pré-formados em 24h de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* KPC, *E. coli* ATCC e, *E. coli* KPC. Nota: os (-) significam que os tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com o controle, portanto não foram interpretados^a.

Bactéria	Biomassa do Biofilme em 24h (%)	Biomassa do Biofilme após 24h sem tratamento (%)	Biomassa		Interpretação
			Peptídeo	do Biofilme após 24h com tratamento (%)	
<i>P. aeruginosa</i>	100	168	guavanina13	162	-
			guavanina14	148	-
			PaDSBS1R1	103****	Inibitório
			PaDS1R3F4	156	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	100	336	guavanina13	287	-
			guavanina14	290	-
			PaDSBS1R1	178*	Inibitório
			PaDS1R3F4	295	-
<i>K. pneumoniae</i> KPC	100	240	guavanina13	190**	Inibitório
			guavanina14	186**	Inibitório
			PaDSBS1R1	54****	Erradicatório
			PaDS1R3F4	190**	Inibitório
<i>E. coli</i> ATCC	100	333	guavanina13	229*	Inibitório
			guavanina14	303	-
			PaDSBS1R1	155***	Inibitório
			PaDS1R3F4	288	-
<i>E. coli</i> KPC	100	153	guavanina13	127	-
			guavanina14	144	-
			PaDSBS1R1	104	-
			PaDS1R3F4	128	-

^a Valores de “p”: * indica p<0,05; ** indica p<0,01; *** indica p<0,001; **** indica p<0,0001.

6.5 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS OTIMIZADOS E CIPROFLOXACINA SOBRE BIOFILMES PRÉ-FORMADOS DE CEPAS GRAM-NEGATIVAS

A partir dos resultados obtidos na triagem dos peptídeos otimizados sobre biofilmes previamente formados, aqueles que apresentaram um potencial inibitório ou erradicatório foram escolhidos para estudos de combinação a partir do método

de tabuleiro de xadrez. Uma vez que, na concentração única de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ os peptídeos individualmente foram ineficazesem inibir ou erradicar totalmente os biofilmes pré-formados. Sendo as combinações testadas: guavanina13 com ciprofloxacina (**Tab. 10**) contra *K. pneumoniae* KPC e *E. coli* ATCC. Guavanina14 com ciprofloxacina (**Tab. 11**) e, PaDBS1R3F4 com ciprofloxacina (**Tab. 12**), ambascombinações contra biofilmes pré-formados de *K. pneumoniae* KPC. Por fim, o peptídeo PaDSBS1R1 com ciprofloxacina (**Tab. 13 e 14**) contra as cepas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* KPC e *E. coli* ATCC. Sendo que, como resultado todas as combinações realizadas foram incapazes de inibir ou erradicar os biofilmes previamente formados. Pois,nenhum dos agentes de tratamento apresentou uma concentração mínima inibitória ou erradicatória quando combinados. Ou seja, os biofilmes bacterianos pré-formados demonstraram resistência às combinações testadas.

Tabela 10: Avaliação da combinação entre guavanina13 e ciprofloxacina para inibir a continuidade do crescimento de biofilmes previamente formados de *K. pneumoniae* KPC e *E. coli* ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os (-) indicam que as combinações foram ineficazes quando comparadas com o controle.

Bactéria	BIOFILMES PRÉ-FORMADOS							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			guavanina13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICIF	Interpretação
	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF		
<i>K. pneumoniae</i> KPC	-	>64	-	-	>64	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC	-	>64	-	-	>64	-	-	-

Tabela 11: Avaliação da combinação entre guavanina14 e ciprofloxacina para inibir a continuidade do crescimento do biofilme previamente formado de *K. pneumoniae* KPC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.

Bactéria	BIOFILMES PRÉ-FORMADOS							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			guavanina14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICIF	Interpretação
	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF		
<i>K. pneumoniae</i> KPC	-	>64	-	-	>64	-	-	-

Tabela 12: Avaliação da combinação entre PaDBS1R3F4 e ciprofloxacina para inibir a continuidade do crescimento do biofilme previamente formado de *K. pneumoniae* KPC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.

Bactéria	BIOFILMES PRÉ-FORMADOS						Σ ICIF	Interpretação		
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			PaDBS1R3F4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$						
	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF				
<i>K. pneumoniae</i> KPC	-	>64		-	>64	-	-	-		

Tabela 13: Avaliação da combinação entre PaDSBS1R1 e ciprofloxacina para inibir a continuidade do crescimento dos biofilmes previamente formados de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ATCC e *E. coli* ATCC. Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Os (-) indicam que as combinações foram ineficazes quando comparadas com o controle.

Bactéria	BIOFILME						Σ ICIF	Interpretação		
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			PaDSBS1R1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$						
	CIM combinado	CIM sozinho	ICIF	CIMB combinado	CIMB sozinho	ICIF				
<i>P. aeruginosa</i>	-	>64	-	-	>64	-	-	-		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	-	>64	-	-	>64	-	-	-		
<i>E. coli</i> ATCC	-	>64	-	-	>64	-	-	-		

Tabela 14: Avaliação da combinação entre PaDSBS1R1 e ciprofloxacina para erradicação do biofilme previamente formado de *K. pneumoniae* KPC. Índice de concentração erradicatória fracionada (ICEF). Os (-) indicam que a combinação foi ineficaz quando comparada com o controle.

Bactéria	BIOFILME							
	Ciprofloxacina $\mu\text{g.mL}^{-1}$			PaDSBS1R1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Σ ICEF	Interpretação
	CEMB combinado	CEMB sozinho	ICEF	CEMB combinado	CEMB sozinho	ICEF		
<i>K. pneumoniae</i> KPC	-	>64		-	>64	-	-	-

6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS PEPTÍDEOS OTIMIZADOS

Neste ensaio os peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 foram testados sobre eritrócitos de camundongo Swiss, em diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160; 320; 640 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Como resultado, o peptídeo PaDSBS1R1 apresentou um aumento na porcentagem de hemólise de acordo com o aumento da concentração, obtendo-se cerca de 65% de atividade hemolítica na concentração máxima testada de 640 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo importante ressaltar que esta corresponde a uma concentração superior aos dados de CIMP (2-64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tab. 2 e 9). Quanto aos peptídeos guavanina13, guavanina14 e PaDBS1R3F4 não foi possível observar atividade hemolítica nas concentrações testadas, logo pode-se inferir que, a concentração capaz de ocasionar hemólise para esses peptídeos corresponde a $>640 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 7).

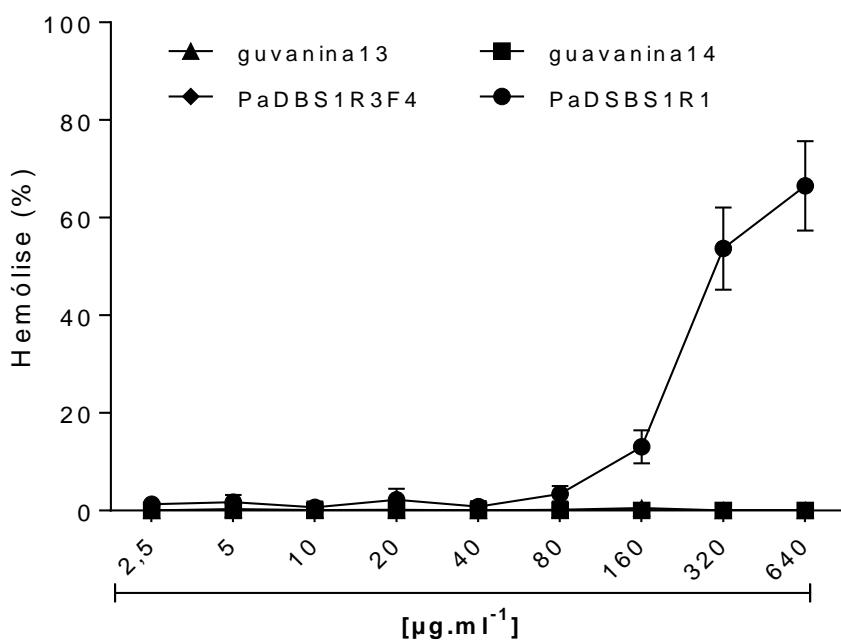


Figura 7: Avaliação da atividade hemolítica dos peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 contra eritrócitos de camundongo Swiss. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três repetições.

7 DISCUSSÃO

Atualmente, o uso de aborgagens *in silico* para a concepção e síntese de novos peptídeos têm sido cada vez mais recorrentes. Uma vez que, buscas e opções de tratamento mais promissoras quanto a função biológica e ao espectro de atividade, visando assim, superar o grande problema da resistência associada aos antimicrobianos convencionais (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2012, 2016). Nesta perspectiva, foram apresentados neste trabalho quatro peptídeos otimizados por uma abordagem *in silico* – guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4 – os quais foram projetados para terem como alvo as células bacterianas Gram-negativas em estado planctônico (PORTO, 2013, 2017). No entanto, neste trabalho, esses peptídeos exibiram propriedades antibiofilme *in vitro*, demonstrando uma baixa atividade inibitória ou ausente contra células bacterianas no estado planctônico, e um amplo espectro de atividade inibitória contra os biofilmes bacterianos, seja em estado de formação ou quando já estabelecidos (Tab. 2 e 9).

Os ensaios para prevenir a formação de biofilme mostraram que os peptídeos guavanina13, guavanina14 e PaDSBS1R1 apresentaram seletividade para inibição da formação de biofilmes em concentrações que não afetaram o crescimento planctônico das espécies Gram-negativas *K. pneumoniae* ATCC (CIMBs = 4, 4, e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente) e *E. coli* ATCC (CIMBs = 16, 32, 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente). Atividade que corrobora com os resultados descritos nos estudos desenvolvidos por (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014), em que o peptídeo otimizado 1018 foi testado contra as bactérias *K. pneumoniae* e *E. coli*, nos quais as concentrações capazes de inibir a formação do biofilme de *K. pneumoniae* e *E. coli* (CIMBs = 2 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) foram menores do que as concentrações necessárias para inibir as células no estado planctônico (CIMs = 8 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Em outros estudos, Silva et al. (2016), também em ensaios de microdiluição de peptídeos em microplaca de 96 poços, demonstraram que o peptídeo clavanina A foi capaz de inibir a formação do biofilme bacteriano de *E. coli* (CIMB=16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na concentração inferior a sua CIM ($>64 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Em relação a atividade específica para inibição da formação do biofilme bacteriano de cepas resistentes a carbapenems, o PaDSBS1R1 foi o único dos quatro peptídeos testados que demonstrou atividade contra *E. coli* KPC (CIMB 8

vezes menor que a CIM) e *K. pneumoniae* KPC (CIMB de 64, incapaz de afetar o crescimento planctônico). Essa capacidade de inibir a formação de biofilmes de cepas resistentes caracteriza-se como um achado de extrema relevância. Posto que, cepas bacterianas produtoras de carbapenemase representam um sério problema mundial devido a sua fácil disseminação, resistência a múltiplos fármacos e, consequentemente poucas opções de tratamento disponíveis (CHEN et al., 2014). Ademais, o potencial dessas linhagens bacterianas em formar biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas contribui para agravar ainda mais esse cenário (RIBEIRO et al., 2015), uma vez que, a formação de biofilme por cepas resistentes contribui para infecções bacterianas altamente recalcitrantes (JUNG et al., 2012).

Também se torna importante ressaltar as vantagens implicadas na inibição específica para a formação de biofilmes. Pois essa atividade seletiva para esse estilo de vida microbiano pode limitar a adesão de células bacterianas a tecidos do hospedeiro no início do processo de infecção e, por sua vez, reduzir o risco para o estabelecimento de infecções crônicas (CEGELSKI et al., 2008; MARESSO; SCHNEEWIND, 2008). A inibição da formação do biofilme pode também manter as bactérias menos protegidas contra antimicrobianos e a fagocitose (CEGELSKI et al., 2008). Além disso, inibir a formação de biofilme sem matar células planctônicas, pode impedir a ativação de sistemas de secreção de toxinas e liberação de fatores danosos à célula hospedeira (KRACHLER; ORTH, 2013). Ademais, essa estratégia exerceria apenas uma baixa ou inexistente pressão para seleção de cepas resistentes aos antimicrobianos (RASKO; SPERANDIO, 2010). Assim, configurando-se como uma estratégia eficaz para prevenir infecções bacterianas decorrentes de biofilmes.

No que se refere a atividade de inibição tanto para células planctônicas como para a inibição da formação do biofilme de *P. aeruginosa*, os quatro peptídeos otimizados, guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4, foram ineficazes nas concentrações testadas. Resultados semelhantes foram descritos em estudos desenvolvidos por (DEAN et al., 2011), nos quais foram testados peptídeos otimizados sobre essa mesma bactéria, sendo um deles o NA-CATH:ATRA1-ATRA1, derivado da catelicidina helicoidal NA-CATH, da serpente *Naja atra*, o qual também não demonstrou inibição na formação do biofilme nas concentrações testadas. Adicionalmente, na literatura tem-se descrito que a terapia

contra *P. aeruginosa* tem sido particularmente desafiadora (MULCAHY et al., 2014). Pois, cada vez mais as cepas desse patógeno tem demonstrado sensibilidade reduzida a vários antimicrobianos, mesmo em concentrações extremamente elevadas (XU et al., 2000). A alta resistência intrínseca à *P. aeruginosa* pode estar relacionada a alguns mecanismos específicos, seja a partir da mutação de uma gama de genes ou a partir de um estímulo ambiental (BREIDENSTEIN et al., 2011). Sendo que, a resistência associada ao biofilme dessa bactéria tem sido comumente associada à bombas de efluxo, enzimas de inativação de antimicrobianos, além de um específico regulador transcripcional denominado BrLR que altera especificamente a susceptibilidade de *P. aeruginosa* a múltiplas classes de antimicrobianos (LIAO; SAUER, 2012). Deste modo, fica evidente a necessidade de identificar novas opções de tratamento mais eficazes contra essa bactéria.

Quanto aos possíveis mecanismos de ação dos peptídeos otimizados guavanina13, guavanina14 e PaDSBS1R1 em relação a atividade inibitória de biofilmes, se faz necessário futuras investigações. Porém, efeitos antibiofilmes de peptídeos descritos, têm demonstrado que esses compostos podem atuar como quelantes de ferro e, assim inibir a adesão bacteriana (OVERHAGE et al., 2008; SINGH et al., 2002)— o ferro configura-se como um cofator essencial de enzimas envolvidas nos processos de adesão celular á superfícies (SINGH et al., 2002). Também podem atuar desregulando genes envolvidos no processo de formação das estruturas que desempenham função na motilidade e adesão bacteriana, como pili e flagelos (KÖHLER et al., 2000). Que foi o mecanismo observado por Fuente-Núñez et al. (2012) a partir do transcriptoma de biofilmes de *P. aeruginosa* cultivados na presença e ausência do peptídeo 1037. Outra possibilidade de atuação seria a inibição das moléculas que regulam a expressão dos genes envolvidos na formação do biofilme a partir do processo de *Quorum sensing* (LAZAR, 2011). Outros estudos têm demonstrado também que peptídeos otimizados podem atuar na inibição dos nucleotídeos sinalizadores denominados (p) ppGpp, importantes moléculas na resposta ao estresse, que permite o desenvolvimento de biofilmes bacterianos (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2014).

Na avaliação da propriedade antibiofilme dos peptídeos otimizados sobre biofilmes pré-formados, o peptídeo PaDSBS1R1 foi o único que apresentou além da atividade inibitória, uma atividade erradicatória significativa na concentração de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (contra biofilme estabelecido de *K. pneumoniae* KPC) (**Tab. 9**). Sendo que,

essa dupla atividade já tem sido descrita na literatura. Como é o caso dos peptídeos hexamérico e octamérico testados por Hou et al. (2010). Esses peptídeos exibiram um potencial inibitório e erradicatório sobre biofilmes pré-formados da bactéria Gram-negativa *E. coli*, estabelecidos em 24h (HOU et al., 2010). Ademais, o peptídeo PaDSBS1R1 também foi capaz de inibir a formação do biofilme de *K. pneumoniae* KPC (CIMB = 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) além de atuar sobre o biofilme pré-formado. Atividades semelhantes foram observadas por Fuente-Núñez et al. (2015) em pesquisas com os peptídeos D-enantioméricos DJK5 e DJK6 desenvolvidos a partir do peptídeo 1018. Os quais, foram capazes de inibir em 50% a formação do biofilme de *K. pneumoniae* suscetível a carbapenem (CIMBs₅₀ = 1,6 e 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), além de demonstrarem uma atividade erradicatória sobre o biofilme pré-formado dessa mesma bactéria já na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (para ambos os peptídeos). Entretanto, no presente estudo essa dupla atividade foi detectada sobre a bactéria Gram-negativa *K. pneumoniae* KPC (resistente a carbapenem).

Em relação ao mecanismo de ação do peptídeo PaDSBS1R1 envolvido na erradicação do biofilme maduro de *K. pneumoniae* KPC, também se faz necessário futuras investigações. Entretanto, na literatura tem-se elucidado que a erradicação ocasionada por peptídeos pode estar relacionada ao mecanismo de degradação da matriz extracelular do biofilme (GRASSI et al., 2017; SEGEV-ZARKO et al., 2015). Ou na inibição da síntese de substâncias poliméricas extracelulares que compõem o biofilme (FLEMING; RUMBAUGH, 2017).

Em relação a abordagem de combinação de moléculas, a potência antimicrobiana de peptídeos pode ser altamente aumentada a partir da combinação dos mesmos com moléculas convencionais (antimicrobianos) e, vice-versa (GRASSI et al., 2017). Reduzindo assim as concentrações necessárias de cada molécula e, portanto, reduzindo os custos, os efeitos colaterais e a probabilidade de desenvolvimento de resistência (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2016; WALKENHORST et al., 2014). Os tratamentos combinados parecem particularmente promissores no caso de biofilmes, uma vez que, a natureza heterogênea dessas comunidades microbianas requer a atuação contra as células em diferentes estados metabólicos (por exemplo, células em crescimento ativo, células dormentes) e condições ambientais (como pH ácido, falta de oxigênio ou nutrientes) (BATONI et al., 2016). Portanto, a combinação de diferentes moléculas

bioativas atuando contra componentes distintos do biofilme tem o potencial de facilitar o controle e/ou a erradicar o biofilme (GRASSI et al., 2017). Nesse entendimento, os peptídeos guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDSBS1R3F4 foram combinados com o antimicrobiano ciprofloxacina. Entretanto, não foi observado um efeito sinérgico após a combinações entre esses agentes sobre células planctônicas ou biofilmes bacterianos. O que sugere uma limitação da eficácia de um ou ambos na presença do outro, configurando assim uma interação desfavorável entre os agentes de tratamento (YEH et al., 2009).

Quanto a atividade hemolítica, os peptídeos guavanina13, guavanina14 e PaDSBS1R3F4 não apresentaram hemólise nas concentrações testadas (2,5 a 640 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Em contrapartida, o peptídeo PaDSBS1R1 apresentou uma atividade hemolítica de acordo com o aumento da concentração. Essa variação na atividade pode estar relacionada aos parâmetros físicos-químicos de cada peptídeo (WU et al., 2017), por exemplo, de acordo com Huang et al. (2010), uma maior hidrofobicidade pode estar correlacionada com uma atividade hemolítica mais forte. Isso poderia explicar o fato do PaDSBS1R1 apresentar hemólise, pois este demonstrou uma hidrofobicidade superior (0,530) quando comparado aos demais peptídeos, guavanina13, guavanina14 e PaDSBS1R3F4, sendo que estes apresentaram uma hidrofobicidade de 0,016; 0,136; 0,275 respectivamente. Contudo, torna-se importante ressaltar que o PaDSBS1R1 apresentou hemólise a partir da concentração de 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, concentração superior às CIMBs detectadas para *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* KPC, *E. coli* ATCC e *E. coli* KPC (8, 64, 2 e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Portanto, sugere-se que todos os peptídeos testados possam ter efeitos citotóxicos muito baixos ou ausentes sobre as células hospedeiras (RYADNOV et al., 2002). Consequentemente, isso poderia proporcionar uma margem de segurança maior em futuras terapias antibiofilmes.

8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Em conclusão, na avaliação das atividades de quatro peptídeos otimizados contra o crescimento planctônico e a formação de biofilme, bem como contra a biomassa de biofilmes pré-formados de bactérias patogênicas humanas. Verificou-se que, os peptídeos guavanina13, guavanina14 e PaDSBS1R1 foram eficientes na inibição de biofilmes e, constatou-se também que todos os quatro peptídeos (guavanina13, guavanina14, PaDSBS1R1 e PaDBS1R3F4) foram eficazes na redução da biomassa de biofilmes maduros de pelo menos uma das cepas testadas. Adicionalmente, esses peptídeos demonstraram atividade antibiofilme em concentrações que não foram hemolíticas contra células de camundongo. Assim, em relação às atividades apresentadas todos os peptídeos constituem-se como candidatos para futuras terapias de prevenção das infecções bacterianas ocasionadas por biofilmes.

Quanto as combinações dos peptídeos com a ciprofloxacina, todas foram incapazes de demonstrar um efeito sinérgico para inibição de células planctônicas ou para a formação de biofilmes, ou então para a inibição/erradicação dos biofilmes bacterianos maduros. Em vista disso, estudos adicionais sobre os efeitos de combinação com outros agentes antimicrobianos, bem como, o mecanismo de ação envolvido nas atividades demonstradas ajudarão a reforçar o potencial desses peptídeos otimizados como futuros agentes terapêuticos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697–705, 2005.
- ALIPOUR, M.; SUNTRES, Z. E.; OMRI, A. Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 317–325, 2009.
- BATONI, G.; MAISETTA, G.; ESIN, S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1858, n. 5, p. 1044–1060, 2016.
- BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.-M. *Escherichia coli* biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 249–289, 2008.
- BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **ACTA PATHOLOGICA, MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA SCANDINAVICA**, v. 121, p. 1–58, 2013.
- BJARNSHOLT, T.; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. 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.
- BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcal* biofilm disassembly. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 449–455, 2011.
- BOWDISH, D. M. E.; DAVIDSON, D. J.; LAU, Y. E.; et al. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 4, p. 451–459, 2005.
- BRANDA, S. S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20–26, 2005.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419–426, 2011.
- BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1–18, 2008.
- BRYERS, J. D.; RATNER, B. D. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, v. 70, n. 5, p. 232–237, 2004.
- BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 3–11, 2005.
- CAPELETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Unicamp, Campinas, 2006.

CEGELSKI, L.; MARSHALL, G. R.; ELDRIDGE, G. R.; HULTGREN, S. J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 17–27, 2008.

CERCA, N.; MARTINS, S.; CERCA, F.; et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 331–336, 2005.

CHANG, C.-M.; LEE, H. C.; LEE, N.-Y.; et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* complicated skin and soft-tissue infections of extremities: emphasis on cirrhotic patients and gas formation. **Infection**, v. 36, n. 4, 2008.

CHEN, L.; CHAVDA, K. D.; MELANO, R. G.; et al. Molecular survey of the dissemination of two blaKPC-harboring IncFIA plasmids in New Jersey and New York hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2289–2294, 2014.

COLE, S. J.; RECORDS, A. R.; ORR, M. W.; LINDEN, S. B.; LEE, V. T. Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 5, p. 2048–2058, 2014.

CORTÉS, G.; ÁLVAREZ, D.; SAUS, C.; ALBERTÍ, S. Role of Lung Epithelial Cells in Defense against *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 3, p. 1075–1080, 2002.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

DAROUCHE, R. O. Treatment of infections associated with surgical implants. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1422–1429, 2004.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–122, 2003.

DEAN, S. N.; BISHOP, B. M.; VAN HOEK, M. L. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 128, 2011.

DECAFFMEYER, M.; LINS, L.; CHARLOTEAUX, B.; et al. Rational design of complementary peptides to the betaAmyloid 29-42 fusion peptide: an application of PepDesign. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 3, p. 320–327, 2006.

DHARMAPRAKASH, A.; THANDAVARAYAN, R.; JOSEPH, I.; THOMAS, S. Development of broad-spectrum antibiofilm drugs: strategies and challenges. **Future Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1035–1048, 2015.

DI LUCA, M.; MACCARI, G.; MAISETTA, G.; BATONI, G. BaAMPs: the database of biofilm-active antimicrobial peptides. **Biofouling**, v. 31, n. 2, p. 193–199, 2015.

DI LUCA, M.; MACCARI, G.; NIFOSÌ, R. 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.

DIBDIN, G. H.; ASSINDER, S. J.; NICHOLS, W. W.; LAMBERT, P. A. Mathematical model of beta-lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released beta-lactamases. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 38, n. 5, p. 757–769, 1996.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Phenotypic research on *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme in Enterobacteriaceae from hospitals. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277–281, 2001a.

DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387–1392, 2001b.

DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

DUTTA, P.; DAS, S. Mammalian Antimicrobial Peptides: Promising Therapeutic Targets Against Infection and Chronic Inflammation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 99–129, 2016.

EVANS, B. C.; NELSON, C. E.; YU, S. S.; et al. Ex Vivo Red Blood Cell Hemolysis Assay for the Evaluation of pH-responsive Endosomolytic Agents for Cytosolic Delivery of Biomacromolecular Drugs. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, , n. 73, p. 50166–50166, 2013.

FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E. W.; SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37–51, 2011.

FJELL, C. D.; JENSSEN, H.; CHEUNG, W. A.; HANCOCK, R. E. W.; CHERKASOV, A. Optimization of antibacterial peptides by genetic algorithms and cheminformatics. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 77, n. 1, p. 48–56, 2011.

FLEMING, D.; RUMBAUGH, K. P. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, 2017.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 2º ed. Porto Alegre: Artmed. 2013.

FUENTE-NÚÑEZ, C.; CARDOSO, M. H.; CÂNDIDO, E. DE S.; FRANCO, O. L.; HANCOCK, R. E. W. Synthetic Antibiofilm Peptides. **Biochimica et biophysica**

acta, v. 1858, n. 5, p. 1061–1069, 2016.

FUENTE-NÚÑEZ, C. DE LA; REFFUVEILLE, F.; HANEY, E. F.; STRAUS, S. K.; HANCOCK, R. E. W. Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. **PLOS Pathog**, v. 10, n. 5, p. e1004152, 2014.

FUENTE-NÚÑEZ, C.; KOROLIK, V.; BAINS, M.; et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2696–2704, 2012.

FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. 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.

FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; HANEY, E. F.; STRAUS, S. K.; HANCOCK, R. E. W. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 5, 2014.

FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; MANSOUR, S. C.; et al. D-Enantiomeric Peptides that Eradicate Wild-Type and Multidrug-Resistant Biofilms and Protect against Lethal *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 2, p. 196–205, 2015.

GARNETT, J. A.; MATTHEWS, S. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 739–755, 2012.

GRASSI, L.; MAISETTA, G.; ESIN, S.; BATONI, G. Combination Strategies to Enhance the Efficacy of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

GUPTA, S.; SHARMA, A. K.; JAISWAL, S. K.; SHARMA, V. K. BIOFIN. Prediction of Biofilm Inhibiting Peptides, 2016.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.

HAN, J.; ZHAO, S.; MA, Z.; et al. The antibacterial activity and modes of LI-F type antimicrobial peptides against *Bacillus cereus* in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 602–614, 2017.

HANCOCK, R. E. W. Rethinking the Antibiotic Discovery Paradigm. **EBioMedicine**, v. 2, n. 7, p. 629–630, 2015.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, 2006.

HANCOCK, R. E. W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**

States of America, v. 97, n. 16, p. 8856–8861, 2000.

HARMSEN, M.; YANG, L.; PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 253–268, 2010.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; et al. ESCMID * guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p. 1–25, 2015.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1663–1674, 2010.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H. K.; et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 55–65, 2011.

HOIBY, N.; FLENSBORG, E. W.; BECK, B.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. **Scandinavian Journal of Respiratory Diseases**, v. 58, n. 2, p. 65–79, 1977.

HOU, S.; LIU, Z.; YOUNG, A. W.; 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.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein & Cell**, v. 1, n. 2, p. 143–152, 2010.

JACQUELINE, C.; CAILLON, J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 37–40, 2014.

JOO, H.-S.; OTTO, M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 12, p. 1503–1513, 2012.

JORGE, P.; LOURENÇO, A.; PEREIRA, M. O. 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.

JUNG, C.-J.; YEH, C.-Y.; SHUN, C.-T.; et al. Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 7, p. 1066–1075, 2012.

KÖHLER, T.; CURTY, L. K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHÈRE, J. C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 21, p. 5990–5996, 2000.

KOŚCIUCZUK, E. M.; LISOWSKI, P.; JARCZAK, J.; et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 12, p. 10957–10970, 2012.

- KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, 2013.
- KRACHLER, A. M.; ORTH, K. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. **Virulence**, v. 4, n. 4, p. 284–294, 2013.
- LAZAR, V. Quorum sensing in biofilms--how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 280–285, 2011.
- LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M. Infections associées aux biofilms - Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? **médecine/sciences**, v. 28, n. 8–9, p. 727–739, 2012.
- LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 510–543, 2014.
- LEE, J.-K.; CHANG, S. W.; PERINPANAYAGAM, H.; et al. Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 12, p. 1625–1629, 2013.
- LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General Principles of Antimicrobial Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 2, p. 156–167, 2011.
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48–56, 2007.
- LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. **Handbook of Experimental Pharmacology**, , n. 211, p. 121–133, 2012.
- LIAO, J.; SAUER, K. The MerR-like transcriptional regulator BrlR contributes to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 4823–4836, 2012.
- LIPSKY, B. A.; HOLROYD, K. J.; ZASLOFF, M. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 47, n. 12, p. 1537–1545, 2008.
- LOOSE, C.; JENSEN, K.; RIGOUTSOS, I.; STEPHANOPOULOS, G. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 867–869, 2006.
- LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415–428, 2008.
- MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. **Cell**, v. 157, n. 3, p. 539–548, 2014.

MARESSO, A. W.; SCHNEEWIND, O. Sortase as a target of anti-infective therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 128–141, 2008.

MARTIN, C. A.; HOVEN, A. D.; COOK, A. M. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 635–642, 2008.

MCDougald, D.; RICE, S. A.; BARRAUD, N.; STEINBERG, P. D.; KJELLEBERG, S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 39–50, 2011.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. S. Pessoa com ferida complexa. **Journal of Aging and Innovation**, v. 1, n. 3, 2012.

MOODY, J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. **Clinical microbiology procedures handbook**. v. 2, p.1–5. American Society for Microbiology, Washington, DC: H. D. Isenberg, 2004.

MOOKHERJEE, N.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 7–8, p. 922–933, 2007.

MORENO, M. G.; LOMBARDI, L.; DI LUCA, M. Antimicrobial peptides for the control of biofilm formation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 1965–1986, 2017.

MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1–12, 2014.

NAVES, P.; DEL PRADO, G.; HUELVES, L.; et al. Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-L-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. **The Journal of Hospital Infection**, v. 76, n. 2, p. 165–170, 2010.

NEIDELL, M. J.; COHEN, B.; FURUYA, Y.; et al. Costs of Healthcare- and Community-Associated Infections With Antimicrobial-Resistant Versus Antimicrobial-Susceptible Organisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 807–815, 2012.

NIYONSABA, F.; MADERA, L.; AFACAN, N.; et al. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 1, p. 159–170, 2013.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 411–412, 2012.

ONG, C.-L. Y.; ULETT, G. C.; MABBETT, A. N.; et al. Identification of Type 3 Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals a Role in Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1054–1063, 2008.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 322, p. 207–228, 2008.

OTVOS, L. J.; CASSONE, M.; INACIO, V. DE O.; et al. Synergy Between a Lead Proline-rich Antibacterial Peptide Derivative and Small Molecule Antibiotics. In: S. D. Valle; E. Escher; W. D. Lubell (Orgs.); **Peptides for Youth**, Advances in Experimental Medicine and Biology. p.375–378. Springer New York, 2009.

OVERHAGE, J.; CAMPISANO, A.; BAINS, M.; et al. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4176–4182, 2008.

PAI, R. K.; WALL, T. S.; MACGREGOR, J. F.; ABEDIN, M.; FREEDMAN, R. A. *Klebsiella pneumoniae*: a rare cause of device-associated endocarditis. **Pacing and clinical electrophysiology**, v. 29, n. 5, p. 540–542, 2006.

PELEGRINI, P. B.; MURAD, A. M.; SILVAL, P.; et al. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. **Peptides**, v. 29, n.8, p. 1271-9, 2008.

PERCIVAL, S. L.; HILL, K. E.; WILLIAMS, D. W.; et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 5, p. 647–657, 2012.

PILLONG, M.; HISS, J. A.; SCHNEIDER, P.; et al. Rational Design of Membrane-Pore-Forming Peptides. **Small**, v. 13, n. 32, p. 1–11, 2017.

PINKNER, J. S.; REMAUT, H.; BUELENS, F.; et al. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 17897–17902, 2006.

PLETZER, D.; HANCOCK, R. E. W. Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 19, p. 2572–2578, 2016.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.

PORTO, W. F. **Grammatical e joker**: duas novas ferramentas para desenho racional de peptídeos antimicrobianos. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - UCB, Brasília - DF, 2013.

PORTO, W. F. **Predição e desenho racional assistido por computador para bioprospecção de novos peptídeos antimicrobianos**. 2017. 209 f. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - UCB, Brasília - DF, 2017.

POZO, J. L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, n. 2, p. 204–209, 2007.

PRATES, M. V.; BLOCH JUNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos: uma alternativa

no combate a microrganismos resistentes. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 30–6, 2000.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, 1998.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; EL JAZIRI, M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117–128, 2010.

REFFUVEILLE, F.; FUENTE-NÚÑEZ, C.; MANSOUR, S.; HANCOCK, R. E. W. A Broad-Spectrum Antibiofilm Peptide Enhances Antibiotic Action against Bacterial Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5363–5371, 2014.

REVDIWALA, S.; RAJDEV, B. M.; MULLA, S. Characterization of Bacterial Etiologic Agents of Biofilm Formation in Medical Devices in Critical Care Setup. **Critical Care Research and Practice**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

RIBEIRO, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de pequenos peptídeos catiônicos contra *Klebsiella pneumoniae***. 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - UCB, Brasília - DF, 2015.

RIBEIRO, S. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; BAQUIR, B.; 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.

ROBERTS, M. E.; STEWART, P. S. Modeling Antibiotic Tolerance in Biofilms by Accounting for Nutrient Limitation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 48–52, 2004.

ROBINSON, J. A. Protein epitope mimetics as anti-infectives. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 379–386, 2011.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541–561, 2012.

ROSSOLINI, G. M.; ARENA, F.; PECILE, P.; POLLINI, S. Update on the antibiotic resistance crisis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 18, p. 56–60, 2014.

ROY, S.; ELGHARABLY, H.; SINHA, M.; et al. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function. **The Journal of Pathology**, v. 233, n. 4, p. 331–343, 2014.

RYADNOV, M. G.; DEGTYAREVA, O. V.; KASHPAROV, I. A.; MITIN, Y. V. A new

synthetic all-D-peptide with high bacterial and low mammalian cytotoxicity. **Peptides**, v. 23, n. 10, p. 1869–1871, 2002.

SANDERS, J. A. *Klebsiella pneumoniae* osteomyelitis: demonstration by three-phase radionuclide bone imaging. **Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 30, n. 8, p. 1412–1414, 1989.

SANTOS, N. DE Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & contexto enferm**, v. 13, n. n.esp, p. 64–70, 2004.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140–1154, 2002.

SEGEV-ZARKO, L.; SAAR-DOVER, R.; BRUMFELD, V.; MANGONI, M. L.; SHAI, Y. Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides. **The Biochemical Journal**, v. 468, n. 2, p. 259–270, 2015.

SEIFI, K.; KAZEMIAN, H.; HEIDARI, H.; et al. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 1, 2016.

SILVA, O. N.; ALVES, E. S. F.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; et al. Structural Studies of a Lipid-Binding Peptide from Tunicate Hemocytes with Anti-Biofilm Activity. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27128, 2016.

SIMÕES, M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 2129–2145, 2011.

SINGH, P. K.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P.; WELSH, M. J. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. **Nature**, v. 417, n. 6888, p. 552–555, 2002.

STEWART, P. S. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2517–2522, 1996.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

SUTHERLAND, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3–9, 2001.

TAKAHASHI, D.; SHUKLA, S. K.; PRAKASH, O.; ZHANG, G. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. **Biochimie**, v. 92, n. 9, p. 1236–1241, 2010.

THWAITE, J. E.; HIBBS, S.; TITBALL, R. W.; ATKINS, T. P. Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Bacillus anthracis* may contribute to virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2316–2322, 2006.

TOLKER-NIELSEN, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. **APMIS. Supplementum**, n. 138, p. 1–51, 2014.

TORRENT, M.; NOGUÉS, M. V.; BOIX, E. Discovering new in silico tools for antimicrobial peptide prediction. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 9, p. 1148–1157, 2012.

TRAMPUZ, A.; ZIMMERLI, W. Antimicrobial agents in orthopaedic surgery: Prophylaxis and treatment. **Drugs**, v. 66, n. 8, p. 1089–1105, 2006.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, p. 113–238, 2013.

VAN HOUDT, R.; MICHELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

VASILEV, K.; COOK, J.; GRIESSE, H. J. Antibacterial surfaces for biomedical devices. **Expert Review of Medical Devices**, v. 6, n. 5, p. 553–567, 2009.

VOS, W. M. Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 1, p. 15005, 2015.

VUOTTO, C.; LONGO, F.; BALICE, M. P.; DONELLI, G.; VARALDO, P. E. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743–758, 2014.

WALKENHORST, W. F.; SUNDRUD, J. N.; LAVIOLETTE, J. M. Additivity and synergy between an antimicrobial peptide and inhibitory ions. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1838, n. 9, p. 2234–2242, 2014.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1087-1093, 2016.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.

WILSON, J. W.; SCHURR, M. J.; LEBLANC, C. L.; et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216–224, 2002.

WON, S. Y.; MUÑOZ-PRICE, L. S.; LOLANS, K.; et al. Emergence and rapid regional spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 53, n. 6, p. 532–540, 2011.

WU, D.; GAO, Y.; TAN, Y.; et al. Discovery of Distinctin-Like-Peptide-PH (DLP-PH) From the Skin Secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*, a Prototype of a Novel Family of Antimicrobial Peptide. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

- WU, X.; PAN, J.; WU, Y.; et al. PSN-PC: A Novel Antimicrobial and Anti-Biofilm Peptide from the Skin Secretion of *Phylomedusa-camba* with Cytotoxicity on Human Lung Cancer Cell. **Molecules**, v. 22, n. 11, 2017.
- XU, K. D.; MCFETERS, G. A.; STEWART, P. S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology**, v. 146, p. 547–549, 2000.
- YANG, D.; BIRAGYN, A.; HOOVER, D. M.; LUBKOWSKI, J.; OPPENHEIM, J. J. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 181–215, 2004.
- YEH, P. J.; HEGRENESS, M. J.; AIDEN, A. P.; KISHONY, R. Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 460–466, 2009.
- YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 127–138, 2013.
- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 15, p. 5449–5453, 1987.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, 2002.
- ZHU, C.; TAN, H.; CHENG, T.; et al. Human β -defensin 3 inhibits antibiotic-resistant *Staphylococcus* biofilm formation. **The Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 204–213, 2013.