

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SARA EMELIE LÖFGREN**

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIPARASITÁRIA E  
HEMOLÍTICA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
ISOLADOS DE ANIMAIS AQUÁTICOS**

**FLORIANÓPOLIS  
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SARA EMELIE LÖFGREN**

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIPARASITÁRIA E  
HEMOLÍTICA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS  
ISOLADOS DE ANIMAIS AQUÁTICOS**

Dissertação apresentada para obtenção  
do título de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia.

**Orientadora: Dra. Margherita Anna A. M. Barracco**

Florianópolis  
2007

*À minha linda família*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer à VIDA, por ter me proporcionado mais esta oportunidade tão enriquecedora e por ter colocado no meu caminho tantas pessoas que de diferentes formas me ajudaram a chegar até aqui, e às quais algumas aqui agradeço:

À Dra Margherita Barracco, por sua valiosa amizade, por ter me contagiado com sua paixão pela ciência, e por ter me orientado e incentivado em mais esta etapa, vou sentir muita saudade!!

Ao Dr Mário Steindel e ao pessoal do Laboratório de Protozoologia, por toda a ajuda e orientações em várias etapas deste trabalho.

Ao Dr Artur Smânia Jr e à Dra Elza Smânia, pela utilização do Laboratório de Antibióticos e auxílio nos ensaios antibacterianos e antifúngicos.

Ao Dr Luiz Miletti pela orientação e ajuda com os ensaios antiparasitários.

À Dra Sônia Carobrez e ao Dr Carlos Zanetti, pela gentileza de me disponibilizar a leitora de microplacas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual esses dois anos teriam sido bem mais duros.

À comunidade europeia, pelo financiamento do projeto IMMUNAQUA (INCO-DEV programme: ICA4CT2001-1), que permitiu a realização deste trabalho.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia da UFSC, pela dedicação e esforço em nos proporcionar sempre uma boa formação.

À Lígia e Joice, da secretaria da pós-graduação em Biotecnologia, pela ajuda e paciência em tantas ocasiões durante estes dois anos.

Aos meus colegas de aula e de laboratório, pelo companheirismo, ajuda e gostosa convivência, que contribuiu tanto para minha formação quanto para minha distração.

Às minhas grandes amigas Tita, Monka, Lu, Clau, Aliny e Bia, pelas festas, conversas e pelo incentivo.

Aos meus pais, Marianne e João, por terem me dado sempre as melhores oportunidades que puderam, além de todo o apoio e ajuda nas mais diferentes formas.

Ao Nelson, pelo apoio e incentivo, que me dão forças para continuar sempre, pelo companheirismo e ajuda, que tornou mais esse projeto viável, e principalmente por todo o amor, que é o que torna tudo possível.

Ao Gabi e à Emy, meus grandes amores, apenas por existirem na minha vida!!

## RESUMO

Peptídeos ou proteínas antimicrobianas (PAM) são componentes do sistema imune inato, presentes na maioria dos seres vivos, que vêm despertando um crescente interesse, uma vez que podem apresentar uma atividade antimicrobiana potente contra um amplo espectro de microrganismos, sendo usualmente atóxicos para células de mamíferos. No presente trabalho, foi investigada a atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e hemolítica, assim como a estabilidade em diferentes salinidades, de diferentes peptídeos isolados de animais aquáticos: *taquiplesina* (Taq), do limúlideo *Tachypleus tridentatus*, *magainina* (Mag), do anfíbio *Xenopus laevis*, *clavanina* (Clav), do tunicado *Styela clava*, *peneidina* (Pen), do camarão *Litopenaeus vannamei*, *mitilina* (Mit) do mexilhão *Mytilus edulis* e o *fator anti-lipopolissacarídeo* (ALF) do camarão *Penaeus monodon*. Os diferentes PAM foram testados contra bactérias marinhas do gênero *Vibrio*, leveduras e fungos filamentosos, de interesse médico e para aqüicultura. Para tanto, estes microrganismos foram incubados em microplacas (96 poços) com diluições seriadas dos diferentes PAM e o crescimento microbiano foi monitorado através de densidade óptica (630nm) e/ou ensaio colorimétrico (INT) no caso de bactérias, determinando-se a concentração mínima inibitória (MIC) e bactericida (MBC) para cada peptídeo. A Mag, Mit, e principalmente a Taq e o ALF (MIC < 1.5µM) apresentaram uma evidente atividade anti-vírio. Quanto à atividade antifúngica, a Mag e a Taq foram ativas contra a maioria dos fungos testados (com exceção do dermatófito *Microsporum canis*), enquanto a Clav e Pen não tiveram efeito contra nenhuma espécie avaliada. A Mit e o ALF foram ativos contra fungos do gênero *Fusarium* de importância para aqüicultura. De modo geral, os PAM investigados neste estudo mostraram uma tendência de diminuir ou perder sua atividade em altas salinidades (> 250mM NaCl), sendo a Taq e a Mit os peptídeos mais estáveis nas diferentes concentrações de NaCl testadas. Curiosamente, todos os PAM utilizados neste estudo perderam sua atividade em presença de água do mar. A atividade antiparasitária dos diferentes PAM foi avaliada contra formas promastigota de *Leishmania braziliensis* e epi e tripomastigota (infectiva para mamíferos) de *Trypanosoma cruzi*. Os parasitos foram incubados com diluições seriadas dos diferentes PAM por períodos de 5 a 7h (atividade parasiticida) e de 24 e 72h (atividade antiproliferativa), utilizando um ensaio colorimétrico de viabilidade celular (MTT). A Taq mostrou-se o peptídeo mais potente, inibindo em 100% o crescimento de *L. braziliensis* e de formas tripomastigota de *T. cruzi* a partir de 12,5µM. A Pen e a Clav foram ativas somente contra formas tripomastigota de *T. cruzi*, e a Mit contra *L. braziliensis*, porém apenas em altas concentrações (100µM). Dos PAM investigados, a Taq e a Mag apresentaram a maior atividade hemolítica em altas concentrações (>12,5µM), sendo que os demais causaram baixas taxas de hemólise (<10%) até 50µM. Os resultados obtidos neste estudo apontam para a Taq como um peptídeo promissor para uso terapêutico em aqüicultura e saúde humana, uma vez que mostrou uma acentuada atividade antimicrobiana e antiparasitária, sendo relativamente pouco hemolítico nas concentrações em que foi ativo e sendo ainda muito estável em diferentes salinidades. Já ALF e a Mit mostraram-se moléculas potencialmente interessantes mais especificamente para aqüicultura.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sistema imune inato, peptídeos antimicrobianos, aqüicultura, atividade antimicrobiana, atividade antiparasitária, atividade hemolítica.

## ABSTRACT

Antimicrobial proteins or peptides (AMPs) are components of the innate immune system, which are present in the majority of the living organisms and whose interest is growing due to their potent antimicrobial activity against a broad range of microorganisms, coupled with their usually low toxicity to mammalian cells. In the present study we investigated the antibacterial, antifungal, antiparasitic and haemolytic activity, of different peptides isolated from aquatic animals, as well as their stability at different salinities. These were: *tachyplestin* (Tach) from the limulid *Tachypleus tridentatus*, *magainin* (Mag) from the frog *Xenopus laevis*, *clavanin* (Clav) from the tunicate *Styela clava*, *penaeidin* (Pen) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*, *mytilin* (Myt) from the mussel *Mytilus edulis* and the *anti-lipopolisaccharide factor* (ALF) from the shrimp *Penaeus monodon*. The activity of the different AMPs was assayed against marine vibrios, yeast and filamentous fungi of medical and aquaculture interest. The microorganisms were incubated in 96-well microplates with the serially diluted AMPs and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by optical density (630nm) and/or by a colorimetric method (INT) for bacteria. Among the assayed AMPs, Mag, Myt and specially Tach and ALF (MIC<1.5µM), were active against different vibrio species. Regarding the antifungal activity, Mag and Tach were active against most of the tested fungi (except *Microsporium canis*), whereas Clav and Pen were completely inactive. Myt and ALF had an effect against *Fusarium* sp that can cause diseases in aquaculture. In general terms, all the assayed AMPs had a tendency to decrease or loose completely their activity at high salinity (>250mM) and Tach and Myt were the most stable peptides at all tested salinity range. Curiously, all AMPs lost their activity in the presence of seawater. The antiparasitic activity was evaluated against promastigote forms of *Leishmania braziliensis* and epi and tripomastigote (infective to mammalian) forms of *Trypanosoma cruzi*. The parasites were incubated with the serially diluted AMPs for 5-7h (parasiticidal effect) and 24h and 72h (anti-proliferative effect) and the cell viability was determined through the MTT colorimetric assay. Tach was the most potent peptide, being able to reduce in 100% the viability of *L. braziliensis* and the tripomastigote forms of *T. cruzi*, from 12.5µM. Pen and Clav had also an effect against tripomastigote forms of *T. cruzi*, and Mit against *L. braziliensis*, but only at high concentration (100µM). Among the tested AMPs, Tach and Mag were markedly haemolytic at high concentrations (>12.5µM), whereas the other peptides were poorly haemolytic (<10% of haemolysis) up to 50µM. According to our results, Tach appeared to be the most promising peptide for therapeutic use in human health and aquaculture, as it exhibited a broad range of antimicrobial and antiparasitic activity. Moreover, Tach was poorly haemolytic at its antimicrobial concentration and was highly stable at different saline conditions. Myt and ALF, on the other hand, appeared to be potentially interesting more specifically for aquaculture use.

KEY WORDS: Innate immune system, antimicrobial peptide, aquaculture, antimicrobial activity, antiparasitic activity, haemolytic activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Modelo de mecanismos de ação mais conhecidos dos PAM: (a) formação de poros do tipo 'barril' (b) formação de um 'tapete' de peptídeos na superfície da membrana, (c) formação de poros do tipo 'toroidais', (d) ação do tipo 'detergente' com a desestruturação total da membrana plasmática (e) formação de micelas resultantes dos dois últimos mecanismos (adaptado de BROGDEN, 2005). 19
- Figura 2:** Efeito da salinidade sobre a atividade dos peptídeos contra as bactérias *M. luteus* e *V. anguillarum*. A Pen e o ALF perderam sua atividade a partir de 145mM de NaCl contra *M. luteus* e a Clav a partir de 225mM NaCl. Mag foi inativa contra *V. anguillarum* a partir de 280mM de NaCl. A Pen e Clav não tiveram efeito contra *V. anguillarum* em todas as concentrações de NaCl testadas. 49
- Figura 3:** Atividade parasiticida e atividade inibitória sobre o crescimento parasitário dos diferentes PAM contra os protozoários *T. cruzi* (formas epimastigota) e *L. braziliensis* (formas promastigota) após 5, 24 e 72h de incubação com os peptídeos. 54
- Figura 4:** Efeito dos diferentes peptídeos sobre a viabilidade de formas tripomastigota de *T. cruzi* após 7h de incubação. 55
- Figura 5:** Atividade hemolítica dos diferentes peptídeos contra hemácias humanas do tipo O (4%) após 1h de incubação com os peptídeos. 56



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Atividade antibacteriana dos diferentes peptídeos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ . 47
- Tabela 2:** Atividade dos peptídeos contra bactérias marinhas do gênero *Vibrio*. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ . 48
- Tabela 3:** Atividade contra leveduras e fungos filamentosos dos diferentes peptídeos. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ . 51
- Tabela 4:** Avaliação do efeito do SBF (10%) sobre a atividade antibacteriana dos peptídeos contra *M. luteus*. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ . 52

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ALF	Fator Anti-lipopolissacarídeo (do inglês <i>anti-lipopolysaccharide factor</i> )
Clav	Clavanina
cm	Centímetro
DO	Densidade óptica
h	Hora
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
INT	<i>p</i> -iodo-nitrotetrazolium violeta
kDa	Quilodalton
LB	Meio Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
Mag	Magainina
MBC	Concentração mínima bactericida (do inglês <i>minimum bactericidal concentration</i> )
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês <i>minimum inhibitory concentration</i> )
min	Minuto
Mit	Mitilina
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PB	Meio pobre (do inglês <i>Poor broth</i> )
PBS	Tampão salina fosfato (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i> )
Pen	Peneidina
pH	Potencial de hidrogênio
PWS	Água peptonada salina (do inglês <i>peptonated water saline</i> )
SBF	Soro Bovino Fetal
Taq	Taquiplesina
v	Volume
x g	Força gravitacional

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	13
1.1 Peptídeos Antimicrobianos .....	14
1.2 Diversidade de PAM .....	15
1.3 Mecanismos de ação .....	18
1.4 PAM utilizados neste trabalho .....	25
1.5 Microrganismos e protozoários utilizados neste trabalho .....	28
<b>2. Objetivos</b> .....	34
2.1 Objetivo geral .....	34
2.2 Objetivos específicos .....	34
<b>3. Material e Métodos</b> .....	35
3.1 Material biológico .....	35
3.2 Peptídeos .....	36
3.3 Metodologias .....	38
3.3.1 Avaliação da atividade antibacteriana .....	38
3.3.1.1 Preparo das suspensões bacterianas .....	38
3.3.1.2 Ensaio antibacterianos .....	38
3.3.1.2.1 Confirmação da atividade dos peptídeos contra bactérias padrão .....	38
3.3.1.2.2 Atividade contra bactérias marinhas do gênero <i>Vibrio</i> .....	40
3.3.2 Estabilidade da atividade dos PAM em diferentes salinidades e água do mar .....	40
3.3.3 Avaliação da atividade antifúngica .....	41
3.3.3.1 Preparo das suspensões de fungos .....	41
3.3.3.2 Ensaio antifúngicos .....	41
3.3.4 Avaliação da atividade antiparasitária .....	42
3.3.4.1 Preparo das suspensões de parasitos .....	42
3.3.4.2 Interferência do Soro Bovino Fetal (SBF) na atividade dos peptídeos.....	42
3.3.4.3 Ensaio antiparasitários .....	43
3.3.5 Avaliação da atividade hemolítica .....	45
<b>4. Resultados</b> .....	46
4.1 Confirmação da atividade antibacteriana dos diferentes PAM .....	46
4.2 Atividade contra bactérias marinhas do gênero <i>Vibrio</i> .....	47

4.3 Estabilidade dos PAM em diferentes salinidades e água do mar .....	48
4.4 Atividade antifúngica.....	50
4.5 Atividade antiparasitária.....	51
4.5.1 Interferência do SBF na atividade dos peptídeos.....	51
4.5.2 Atividade antiparasitária contra formas promastigota de <i>L. braziliensis</i> e epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	52
4.5.3 Atividade parasiticida contra formas tripomastigota sanguíneas (infectivas) de <i>T. cruzi</i> .....	55
4.6 Atividade hemolítica.....	56
<b>5. Discussão .....</b>	<b>57</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>73</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Durante as últimas décadas, a disponibilidade de uma grande variedade de antibióticos e seu amplo uso no combate a infecções resultou em um aumento progressivo da resistência de linhagens de microrganismos patogênicos a estes compostos, limitando progressivamente seu uso no combate a infecções. Os genomas procarióticos caracterizam-se por uma elevada plasticidade e um enorme potencial evolutivo, incluindo a transmissão horizontal de genes, como os da resistência a antibióticos, o que contribui para um alto poder de adaptação. Nas últimas décadas, novas classes de antibióticos, incluindo peptídeos ou proteínas antimicrobianas (PAM) de origem animal, têm sido extensivamente investigadas como alternativas a esse problema emergente (MATSUZAKI et al., 1997). Atualmente, mais de 1000 PAM foram caracterizados a partir de microrganismos, plantas, vertebrados e invertebrados (BOMAN, 1995; BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004; BROGDEN, 2005). Os PAM são moléculas efetoras do sistema imune inato, presentes na maioria dos seres vivos, que podem apresentar uma atividade antimicrobiana potente contra um amplo espectro de microrganismos, ao mesmo tempo em que geralmente apresenta baixa, ou nenhuma, toxicidade para células animais (BACHÈRE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000). Os diferentes grupos de PAM isolados até o momento apresentam geralmente baixo peso molecular (abaixo de 10kDa) e se caracterizam por serem moléculas anfipáticas, possuindo tanto uma região hidrofóbica que interage com lipídeos quanto uma região hidrofílica carregada positivamente (com alto conteúdo lisina, arginina e/ou histidina) capaz de interagir com resíduos aniônicos. Muitas são também ricas em

resíduos de cisteína, o que favorece a formação de pontes de dissulfeto na estrutura molecular, tornando-as bastante resistentes às proteases presentes no soro/plasma (vide revisões de HOFFMANN; REICHART; HETRU, 1996 e BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

## 1.2 DIVERSIDADE DE PAM

A diversidade de PAM é tão grande que se torna difícil categorizá-los, exceto baseando-se em suas estruturas secundárias. O princípio estrutural fundamental subjacente a todas as classes de PAM consiste da habilidade da molécula em adotar uma forma na qual grupos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos estão espacialmente organizados em setores da molécula, formando um *design* anfipático. Peptídeos lineares, como a cecropina, isolada de mariposa, e a magainina, de anfíbio, adotam esta organização somente no momento da interação com a membrana, quando estes assumem uma estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice (BECHINGER; ZASLOFF; OPELLA, 1993). Já peptídeos como a batenecina, de neutrófilos bovinos, e as defensinas, encontradas em uma grande variedade de organismos, assumem uma estrutura relativamente rígida em  $\beta$ -folha anti-paralela, mantida por pontes de dissulfeto, em torno da qual organizam-se grupos de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004). Uma grande família de PAM também pode ser caracterizada pela predominância de um ou dois aminoácidos particulares, como a indolicina de neutrófilos bovinos, rica em resíduos de triptofano, e a PR39 de porco, com alto conteúdo de prolina (AGERBERTH et al., 1991; SELSTED et al., 1992). Alguns peptídeos podem ainda ser derivados da

proteólise de proteínas maiores, como a buforina II da histona 2A e lactoferricina da lactoferrina, ambos isolados de bovinos, e o fragmento carboxi-terminal da hemocianina de lagostin, denominada astacidina 1 (ULVATNE; VORLAND, 2001; LEE; LEE; SÖDERHÄLL, 2003; GIFFORD; HUNTER; VOGEL, 2005).

De forma resumida, os PAM podem assim ser agrupados em 4 categorias:

- I. Estrutura linear, sem resíduos de cisteína e formando normalmente estrutura em  $\alpha$ -hélice.
- II. Estrutura cíclica ou cíclica com extremidade aberta, normalmente sob a forma de  $\beta$ -folha, mantida geralmente por pontes de dissulfeto.
- III. Com alto conteúdo de determinados (normalmente um ou dois) resíduos de aminoácidos, como glicina, prolina ou histidina.
- IV. Derivados da hidrólise parcial de uma proteína precursora maior.

De maneira geral, a maioria dos PAM descritos atualmente deriva de precursores maiores que incluem uma seqüência sinal, importante para seu direcionamento ao retículo endoplasmático rugoso. Modificações pós-traducionais levam à remoção proteolítica do peptídeo sinal, e podem incluir também, em alguns casos, glicosilação, amidação carboxi-terminal e isomerização aminoacídica (SIMMACO; MIGNOGNA; BARRA, 1998).

A maioria dos organismos multicelulares expressam um *cocktail* de peptídeos múltiplos das várias classes estruturais citadas nos seus tecidos de defesa, e a diversidade entre os diferentes PAM é tão significativa que a mesma seqüência do peptídeo raramente é encontrada em duas espécies de animais diferentes, mesmo estes sendo muito próximos. Entretanto, podem ser

reconhecidas, tanto entre PAM de uma mesma espécie quanto de diferentes grupos de organismos, seqüências de aminoácidos significativamente conservadas, o que as classifica dentre os diferentes grupos de PAM (SIMMACO; MIGNOGNA; BARRA, 1998). Diversos autores sugerem que essa significativa diversidade entre os diferentes PAM caracterizados até o momento deve-se a mutações pontuais, que em alguns casos podem alterar drasticamente sua atividade biológica, e reflete provavelmente a adaptação das diferentes espécies a um ambiente microbiano particular que caracteriza o nicho por elas ocupado (BOMAN, 2003).

Nos últimos anos, vem surgindo também uma grande variedade de PAM sinteticamente produzidos, com o objetivo de criar peptídeos com características desejáveis, com uma aumentada taxa de seletividade contra células microbianas, maior resistência à degradação por proteases ou ainda a produção de partes menores a partir de peptídeos complexos, mais facilmente sintetizadas para produção em larga escala (MALOY; KARI, 1995). Desta forma, PAM compostos exclusivamente de D- ao invés de L-aminoácidos encontrados em animais, vêm sendo desenvolvidos, mantendo total ou parcialmente sua atividade antimicrobiana ao mesmo tempo em que apresentam uma maior resistência a proteólise por enzimas do hospedeiro (MALOY; KARI; 1995). Pequenos peptídeos lineares ou cíclicos com diferentes concentrações de D- e L-aminoácidos também podem ser gerados com vários graus de seletividade e atividade antimicrobiana (OREN; SHAI, 2000). E, mais recentemente, PAM compostos unicamente de  $\beta$ -aminoácidos com alta resistência a proteólise e seletividade por células procarióticas foram obtidos (DEGRADO; SCHNEIDER; HAMURO; 1999). Foram ainda desenvolvidos



peptídeos chamados de quimeras ou híbridos, formados pela união de partes de peptídeos diferentes, com o objetivo de unir em uma só molécula, as características desejadas encontradas em mais de um peptídeo. Os peptídeos mais conhecidos assim desenvolvidos são compostos pela porção N-terminal da cecropina juntamente com diferentes partes da melitina, isolada de abelha (cecropina A-melitina) (RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2006), e a maioria dos peptídeos híbridos relatados até o momento apresentou atividade antibacteriana aumentada em relação aos seus precursores (BOMAN, 2003).

### **1.3 MECANISMOS DE AÇÃO**

Os diferentes PAM caracterizam-se pelo seu amplo espectro de atividade, podendo afetar o crescimento de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e algumas vezes vírus, protozoários e células tumorais (GANZ; LEHRER, 1998; BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004). Muitos PAM exibem atividade *in vitro* contra um grande número de microrganismos patogênicos resistentes a antibióticos convencionais. A sua grande vantagem refere-se à sua capacidade de destruir rapidamente as células-alvo (em alguns casos em minutos) e de exibir seletividade para padrões comuns a diversos grupos de microrganismos, apresentando assim um amplo espectro de ação antimicrobiana.

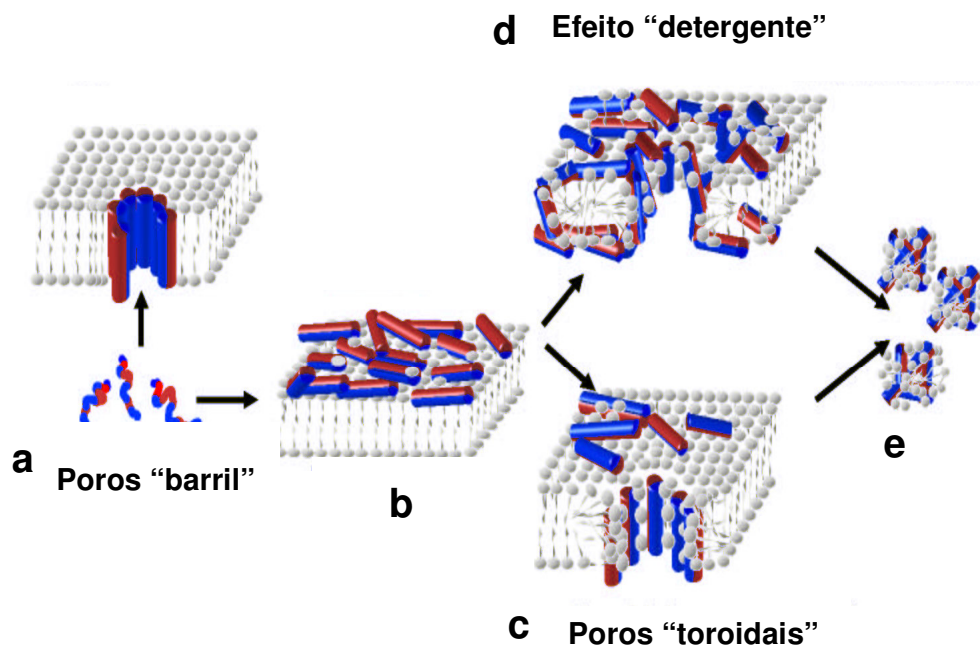
Com relação ao modo de ação dos PAM, foi demonstrado que estas moléculas possuem como alvo uma diferença sutil, porém fundamental, entre a organização das membranas dos microrganismos e dos animais, mecanismo este que está, atualmente, melhor conhecido para bactérias. As membranas bacterianas caracterizam-se por serem organizadas de tal forma que a face externa da bicamada lipídica, voltada para o meio extracelular, possui alto

conteúdo de fosfolípidos carregados negativamente, enquanto a mesma face da membrana plasmática dos animais é composta majoritariamente por fosfolípidos neutros, como fosfatidilcolina e esfingomielina, estando os fosfolípidos aniônicos, como fosfatidilserina e fosfatidilglicerol, voltados para o interior da célula (HANCOCK; LEHRER, 1998; MATSUZAKI, 1998). Dos PAM estudados até o momento, muito poucos apresentam toxicidade para células de mamíferos e essa seletividade dos PAM por microrganismos, ao invés de células do hospedeiro, parece resultar, além do alto conteúdo de fosfolípidos aniônicos na superfície externa da membrana plasmática, também da ausência de colesterol nas membranas de bactérias (HANCOCK; LEHRER, 1998). A presença de colesterol na membrana normalmente reduz a atividade de PAM, devido a uma maior estabilização da bicamada lipídica e/ou a possíveis interações entre o colesterol e os PAM (MATSUZAKI, 1998).

Alguns modelos sugerem que o mecanismo de ação destes peptídeos ocorra através da interação eletrostática com os fosfolípidos aniônicos da membrana plasmática e lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular, no caso de bactérias Gram-negativas. Após interação, ocorre a permeabilização da membrana bacteriana através da (1) formação de pequenos poros (denominados de poros do tipo “barril”), que podem atuar como canais iônicos de cerca 1nm de diâmetro e que permitem a entrada e saída indiscriminada de íons da célula; (2) formação de um “tapete” de PAM sobre a membrana, que se inserem perpendicularmente, formando complexos com os fosfolípidos e causando o dobramento destes para a formação de um poro do tipo ‘toroidal’, que permite a passagem de íons e macromoléculas; (3) formação de um “tapete” de PAM, porém com uma ação “detergente”, resultando na

desestruturação total da membrana plasmática e a formação de micelas à partir da membrana rompida (Fig. 1) (BROGDEN, 2005).

Esses modelos de atuação constituem os mecanismos mais comuns e melhor descritos para os PAM atualmente e, em geral, peptídeos que atuam através destes modelos de ação possuem capacidade de matar bactérias de forma rápida e em concentrações muito baixa (micromolar) (MATSUZAKI, 1998; DATHE et al., 2001).



**Figura 1:** Modelo de mecanismos de ação mais conhecidos dos PAM: (a) formação de poros do tipo "barril" (b) formação de um "tapete" de peptídeos na superfície da membrana, (c) formação de poros do tipo "toroidais", (d) ação do tipo "detergente" com a desestruturação total da membrana plasmática (e) formação de micelas resultantes dos dois últimos mecanismos (adaptado de BROGDEN, 2005).

No caso de bactérias Gram-negativas, a ação dos PAM implica na interação prévia com a parede celular destes microrganismos, que possui uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos (LPS) mantido por íons magnésio e cálcio, que formam pontes entre os açúcares fosforilados carregados negativamente. Foi sugerido que a adição de PAM catiônicos resultaria no deslocamento destes íons, danificando a membrana externa e facilitando a entrada de PAM para o espaço periplasmático permitindo então a interação dos peptídeos com a membrana plasmática bacteriana através dos mecanismos já citados (HANCOCK; FALLA; BROWN, 1995).

Entretanto, estudos recentes indicam que a perturbação em nível de parede ou membrana não seria o único mecanismo de ação desses peptídeos. Alguns PAM podem ser translocados para o interior do microrganismo, e agir sobre alvos intracelulares, podendo interferir em várias vias metabólicas, como na formação do septo na membrana plasmática, inibição da biossíntese de parede celular, de ácidos nucleicos, de proteínas ou inibição da atividade de enzimas bacterianas, além de outros mecanismos que também podem levar à inibição do crescimento e morte do microrganismo (KRAGOL et al., 2001; BROGDEN, 2005). A microcina B17, por exemplo, um PAM rico em glicina isolado da bactéria *Escherichia coli*, liga-se à DNA girase, formando um complexo que bloqueia a passagem da DNA polimerase e inibe, assim, a replicação de DNA na célula-alvo (PIERRAT; MAXWELL, 2005). Por outro lado, diversos PAM são capazes de se ligar ao DNA, como a indolicidina e batenecina isoladas de neutrófilos bovinos (SKERLAVAJ; ROMEO; GENNARO, 1990; HSU et al., 2005), e a taquiplesina de limúldeos (IMURA et al., 2004), inibindo a transcrição de RNA nas células-alvo.

Os PAM estão ainda sendo avaliados como moléculas de funções múltiplas no organismo que os produzem. Como exemplo, algumas  $\alpha$ -defensinas de mamíferos podem atuar como inibidores de receptores de adrenocorticotrofina e bloquear a produção de hormônios esteróides adrenais imunossupressores durante infecções agudas (SOLOMON et al., 1991). Defensinas humanas isoladas de neutrófilos podem atuar ativando a via clássica do sistema complemento e funcionar como quimiocinas, mobilizando linfócitos T imunocompetentes e outras células envolvidas em reações inflamatórias (CHERTOV et al., 1996). Por outro lado, análogos da taquipesina foram capazes de inibir receptores CXCR4, necessários à entrada do vírus HIV nas células, e mostraram-se efetivos contra a infecção por esse vírus (XU et al., 1999). Diferentes PAM, como a magainina e a CAP-18 humana, podem ainda induzir o processo apoptótico caspase-dependente em células tumorais humanas e inibir a angiogênese, relacionada ao progresso do processo tumoral (OKUMURA et al., 2004; CRUZ-CHAMORRO et al., 2006). Outros PAM, como a catelicidina e PR-18, de porco, podem, por outro lado, inibir a apoptose de neutrófilos e macrófagos, aumentando assim sua meia-vida e favorecendo a ação destas células no combate a patógenos (RAMANATHAN et al., 2004; NAGAOKA; TAMURA; HIRATA, 2006). Esses estudos indicam que em adição à sua atividade antimicrobiana direta sobre o patógeno, os PAM podem apresentar ainda habilidades diversas e complementares na modulação da resposta imune, podendo representar para os organismos que os produzem uma ferramenta-chave nas complexas vias imunológicas.

Quanto à atividade antifúngica e antiparasitária, encontram-se disponíveis escassos estudos avaliando o mecanismo de ação destes peptídeos contra

essas células. Acredita-se que o reconhecimento seja devido à presença de uma maior porcentagem de fosfolipídeos aniônicos e de ergosterol, ao invés do colesterol, nas membranas plasmáticas destas células (SILVA JR; DAFFRE; BULET, 2000; AVRAHAMI; SHAI, 2003). Foi relatado que a magainina, temporina, dermaseptina e a bombinina, todas isoladas de anfíbios, além do híbrido cecropina-melittina, podem causar a morte de diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* através de um processo que envolve o rompimento de sua membrana plasmática, resultando na lise osmótica da célula (DIAZ-ARCHIRICA et al., 1998). Por outro lado, foi sugerido que essa ação pode envolver ainda a indução de apoptose nestas células. Os protozoários podem sofrer morte por apoptose quando expostos a vários agentes conhecidos por provocar apoptose em células de mamíferos. De fato, em ensaios com *Leishmania*, utilizando o análogo da magainina, pexiganan, foi observada a diminuição do tamanho celular, desestabilização de membranas internas, exposição de fosfatidilserina na superfície celular e indução de moléculas homólogas à caspase, características que são observadas em células apoptóticas (KULKARNI et al., 2006). Outros autores, por outro lado, relatam a ação da indolicidina e análogos da seminalplasmina, também bovina, sobre *L. donovani* através de um processo autofágico, caspase independente (BERA et al., 2003). Entretanto, também já foi identificada, tanto em *Leishmania* quanto *Trypanosoma*, uma molécula denominada leishmanolisina, capaz de degradar PAM e evitar assim, a indução do processo apoptótico e/ou autofágico, podendo conferir a esses parasitos certa resistência à ação destes peptídeos (KULKARNI et al., 2006).

No entanto, de maneira geral a aquisição de resistência de um microrganismo a um determinado PAM parece ser bastante reduzida, apesar dos microrganismos estarem sendo expostos naturalmente a eles há muito tempo. Por outro lado, esse não parece ser o caso para diversos antibióticos comerciais, como a penicilina, contra a qual uma grande variedade de bactérias se tornou resistente após apenas algumas décadas de utilização (SAIDO-SAKANAKA et al., 2005). Conforme estudos com bactérias, os poucos casos de resistência a PAM descritos até o momento, incluem espécies que possuem membranas com baixo potencial elétrico, essencial para a interação e/ou entrada do peptídeo, como uma linhagem de *Staphylococcus aureus* (SAMUELSEN et al., 2005), ou outras que secretam proteínas inibidoras do sistema complemento e que também se ligam e inativam PAM extracelularmente, como uma cepa de *Streptococcus pyogenes* (FERNIE-KING; SEILLY; LACHMANN, 2006). Por outro lado, tentativas de tornar bactérias suscetíveis em resistentes a determinados PAM, através de mutações sucessivas não obtiveram sucesso. Da mesma forma, a resistência a um determinado PAM não lhe confere nenhuma prerrogativa de menor suscetibilidade a outros peptídeos e as bases deste fenômeno não estão esclarecidas até o momento (ZASLOFF, 2002). Entretanto, a grande dificuldade no desenvolvimento de mecanismos de resistência aos PAM resume-se principalmente ao fato do alvo destes peptídeos, de maneira geral, ser a membrana plasmática, e para deixar de ser reconhecida por um determinado peptídeo, seria necessário à bactéria redesenhar sua membrana, alterando sua composição e/ou organização lipídica, provavelmente uma solução muito onerosa para a maioria das espécies de microrganismos. A

destruição intracelular do peptídeo ou sua expulsão para fora da célula microbiana se torna também dificultada quando a sua ação é a nível de membrana, não requerendo sua entrada no microrganismo (ZASLOFF, 2002). Em adição, os organismos se defendem dos microrganismos com múltiplos PAM de diferentes classes estruturais e/ou mecanismos de ação, sendo que a destruição de um determinado PAM não o salvaria da ação dos demais.

Desta forma, existe um interesse crescente no desenvolvimento destes compostos como fármacos potenciais para uso terapêutico tanto em saúde humana quanto na agricultura, aqüicultura e veterinária. Além do mais, os PAM têm ainda estimulado o interesse na busca de reprodutores animais, e principalmente vegetais, mais resistentes a infecções, através de uma abordagem transgênica (BACHÈRE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000).

#### **1.4 PAM UTILIZADOS NESTE TRABALHO**

Nosso laboratório participou de um projeto internacional, financiado pela União Européia (IMMUNAQUA – contrato ICA4 – CT-2001-10023), onde participaram diferentes países e cujo tema de pesquisa referiu-se ao uso potencial de PAM como agentes terapêuticos para aqüicultura e saúde humana. Dentre os vários PAM já caracterizados, foram selecionados seis para avaliar seu potencial terapêutico: *taquiplesina*, *magainina*, *peneidina*, *clavanina*, *mitilina*, e *fator anti-lipopolissacarídeo*. Esta seleção baseou-se no amplo espectro de atividade antimicrobiana destes PAM e na facilidade de produção por síntese química ou técnica de DNA recombinante em quantidades suficientes para os ensaios de atividade biológica.



As **peneidinas** (Pen) são peptídeos de aproximadamente 6,65kDa que foram inicialmente isolados a partir dos hemócitos do camarão peneídeo *Litopenaeus vannamei* e que atualmente acredita-se serem expressos em todas as espécies de camarões peneídeos (BARRACCO et al., 2005; GUEGUEN et al., 2006). No caso do *L. vannamei*, os trabalhos encontram-se particularmente avançados, sendo esses peptídeos caracterizados bioquímica e estruturalmente, além de algumas de suas atividades biológicas terem sido elucidadas (DESTOUMIEUX et al., 1999, 2000). Esses peptídeos, dos quais foram encontradas diversas isoformas, agrupadas em 4 sub-famílias (PEN-2 a 5), se caracterizam por possuírem uma região rica em prolina na extremidade N-terminal e uma outra região rica em cisteínas na extremidade C-terminal, formando três pontes de dissulfeto (KANG et al., 2006). Apresentam atividade principalmente contra bactérias Gram-positivas e fungos, e em muito menor escala contra bactérias Gram-negativas. Além do mais, as Pen têm a propriedade de ligar-se à quitina, o que sugere um mecanismo de proteção aos camarões nos estágios de muda (DESTOUMIEUX et al., 2000).

A **taquiplesina** (Taq) foi isolada (3 isoformas – I, II e III) dos hemócitos de limúlídeos, sendo a mais estudada a Taq I de *Tachypleus tridentatus* (NAKAMURA et al., 1988; MUTA et al., 1990). A Taq caracteriza-se por ser um peptídeo de 2,26kDa com estrutura em  $\beta$ -folha pregueada mantida por 2 pontes de dissulfeto, com amplo espectro de atividade antimicrobiana, apresentando ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, protozoários de interesse para aquicultura, células tumorais e vírus. Também já foi demonstrado que possui capacidade de se ligar fortemente aos lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e inibir significativamente a ativação do

fator C, mediada por LPS, que inicia a cascata de coagulação neste limúlideo (HIRAKURA; KOBAYASHI; MATSUZAKI, 2002).

As **magaininas** (Mag) representam uma classe de peptídeos antimicrobianos com estrutura em  $\alpha$ -hélice linear isolados da pele (glândula granular) do anfíbio *Xenopus laevis*. Foram isolados dois peptídeos com 23 resíduos de aminoácidos (2,49kDa), denominados magainina 1 e 2 (MATSUZAKI, 1998). A Mag apresenta amplo espectro de ação não só contra bactérias e fungos, como também contra protozoários e células tumorais (ALAN; BLOWERS; EARLE, 2004; BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

**Fator anti-lipopolissacarídeo** (ALF, do inglês *anti-lipopolysaccharide factor*), foi caracterizado inicialmente em limúlideos, e, mais recentemente, nos hemócitos de diversas espécies de crustáceos, principalmente camarões peneídeos (SOMBOONWIWAT et al., 2005; LIU et al., 2006), nos quais foram identificadas diversas isoformas. Consistem de proteínas de caráter básico de aproximadamente 11,3kDa que apresentam na sua estrutura uma ponte de dissulfeto, que permite a formação de uma “alça” com alta concentração de resíduos de aminoácidos com carga positiva em pH fisiológico, representando possivelmente o sítio de interação dessas moléculas com o microrganismo (CHABY, 2004). Essas proteínas apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos filamentosos, e vem recebendo também, assim como as taquiplesinas, grande destaque devido à sua propriedade de ligação e neutralização do LPS e potencial uso na prevenção de septicemias provocadas por essa endotoxina (SOMBOONWIWAT et al., 2005).

As **mitilinas** (Mit) formam um grupo de PAM de aproximadamente 3,85kDa, isoladas de moluscos do gênero *Mytilus* (*M. edulis* e *M. galloprovincialis*). Esse grupo consiste de cinco isoformas, sendo as formas A e B isoladas do plasma de *M. edulis* e as formas B, C, D e G1 isoladas dos hemócitos de *M. galloprovincialis*. Esse grupo se caracteriza por um alto conteúdo de cisteína, formando quatro pontes de dissulfeto, porém sua estrutura secundária ainda não foi elucidada, e pela sua atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (CHARLET et al., 1996, MITTA et al., 2000).

As **clavaninas** (Clav) constituem uma família de quatro isoformas, denominadas A, B, C e D, isoladas dos hemócitos do tunicado *Styela clava* e que se assemelham às Mag quanto ao tamanho (2,67kDa) e estrutura primária ( $\alpha$ -hélice linear) (LEE et al., 1997). Entretanto, distinguem-se dos outros PAM por serem ricas nos aminoácidos histidina, glicina e fenilalanina. Já foi mostrado que as Clav possuem atividade antibacteriana, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e foram relatados dois mecanismos de ação para esse peptídeo, dependendo das condições de pH. Em pH neutro, onde a Clav possui fraca carga positiva, esta é capaz de formar poros na membrana plasmática. Entretanto, em pH levemente ácido a Clav se torna muito mais catiônica e eficiente, podendo colapsar o potencial elétrico da membrana, provavelmente interagindo com proteínas envolvidas na translocação de prótons (VAN KAN et al., 2003).

Devido à sua ampla ocorrência, desde animais primitivos até plantas, acredita-se que os PAM devem ter assumido sua posição no sistema imune

dos seres vivos antes mesmo do surgimento dos seres pluricelulares e antes da divergência entre animais e plantas (LEE et al., 1997).

### **1.5 MICRORGANISMOS E PROTOZOÁRIOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO**

Como mencionado anteriormente, um dos objetivos do presente projeto foi o de buscar novos agentes terapêuticos para aqüicultura e saúde humana, através da avaliação do espectro de ação dos referidos PAM contra protozoários parasitos e fungos de interesse médico, além de bactérias do gênero *Vibrio* e um fungo do gênero *Fusarium* de interesse para a aqüicultura. Dentre os PAM conhecidos atualmente, muito poucos têm sido avaliados quanto a sua atividade contra protozoários parasitos e contra víbrios marinhos.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar uma possível atividade antiparasitária dos referidos PAM contra duas espécies de protozoários causadores de doenças graves na espécie humana, *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas e *Leishmania braziliensis*, causador da leishmaniose cutânea. Ambas constituem doenças amplamente distribuídas em países tropicais e subtropicais, com uma incidência mundial de mais de 20 milhões de pessoas infectadas, e são consideradas pela Organização Mundial da Saúde como importantes e iminentes problemas de saúde pública, principalmente na América Latina (NEVES, 2002; LUNARDI et al., 2003). *T. cruzi* constitui um parasito de múltiplos estágios de desenvolvimento no inseto vetor (triatomíneo) e no hospedeiro (mamífero). Formas tripomastigota sanguíneas não-replicativas e formas amastigota intracelulares e replicativas são encontradas em mamíferos, enquanto formas epimastigota replicativas e tripomastigota metacíclicas são encontradas no inseto, sendo as formas tripomastigota as

formas infectivas para mamíferos (OUAISSI; OUAISSI, 2005). Já no gênero *Leishmania*, *L. braziliensis* representa o mais importante causador de leishmaniose cutânea na América do Sul e Central. Trata-se de um parasito heteroxênico, com dois estágios de desenvolvimento principais, formas amastigota intracelular, encontradas no hospedeiro mamífero e a forma promastigota, replicativa e infectiva para mamíferos, encontrada no inseto vetor (flebotomíneo) (OUAISSI; OUAISSI, 2005). Até o momento, o único tratamento disponível para essas doenças parasitárias está baseado em quimioterapia com benznidazol para *T. cruzi* (e apenas na fase aguda) ou com antimoniais pentavalentes orgânicos para leishmaniose (CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; MANGONI et al., 2005). Além das sérias limitações com relação ao custo e dificuldade de administração destes agentes quimioterápicos, sua eficácia é variável e o tratamento normalmente acarreta em sérios efeitos colaterais e um crescente aparecimento de cepas resistentes (URBINA, 2002). Assim como para doenças parasitárias de maneira geral, não há, atualmente, nenhuma vacina desenvolvida para sua prevenção, situação atribuída tanto à complexidade do patógeno quanto às suas estratégias sofisticadas de evasão do sistema imune do hospedeiro (SACKS; SHER, 2002).

Um outro grave problema enfrentado na medicina atualmente são as infecções oportunistas causadas por fungos. Dentre esses, o gênero *Candida* se tornou nas últimas duas décadas um importante patógeno humano, sendo que atualmente é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas em ambiente hospitalar, podendo causar infecções superficiais em pacientes imunocompetentes e infecções sistêmicas graves em pacientes imunodeprimidos, como pacientes HIV positivos, diabéticos ou sob tratamento

com drogas imunossupressoras, sendo a espécie *Candida albicans* o patógeno mais comum nesses casos (KLEPSEK, 2001).

Já os fungos filamentosos dermatófitos são agentes causadores de micoses superficiais que estão relacionadas a três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Esses fungos possuem a habilidade de invadir tecidos queratinizados e normalmente são controlados pelo sistema imunológico do hospedeiro, impedindo assim que a infecção alcance tecidos mais internos. Entretanto, assim como *Candida*, podem causar graves infecções em pacientes imunocomprometidos. Essas infecções fúngicas revestem-se também de grande importância devido à alta frequência com que são diagnosticados, sendo que são extremamente contagiosas (SIQUEIRA et al., 2006).

Para controlar essas infecções, são necessários fármacos efetivos e com baixos efeitos colaterais, principalmente para pacientes imunossuprimidos. Entretanto, nos últimos anos, relatos de cepas resistentes a todas as modalidades de tratamentos disponíveis atualmente vêm se tornando cada vez mais frequentes, tornando estas doenças infecciosas um grande desafio para a medicina (PETERSON; WALKER, 2006).

Em aquicultura, por outro lado, um dos fatores mais limitantes para seu manejo sustentável em todo o mundo consiste também no controle de infecções por diferentes patógenos. As altas densidades de animais utilizadas nos cultivos intensivos permitem a rápida disseminação de agentes infecciosos, levando geralmente a altos níveis de mortalidade e, conseqüentemente, a grandes prejuízos econômicos. Entre os microrganismos causadores de doenças em aquicultura, bactérias do gênero *Vibrio* representam

indubitavelmente as bactérias patogênicas mais prejudiciais para larvas e juvenis de crustáceos, moluscos e peixes, sendo que a toxina produzida por estes vibrios, a hemolisina, pode acarretar altas mortalidades, recebendo assim especial destaque entre os agentes causadores de infecções em aquicultura (BACHÈRE, 2003). Apesar das doenças causadas por espécies de *Vibrio* serem conhecidas por quase um século e terem sido extensivamente estudadas, estas representam ainda um grande desafio para o cultivo de espécies aquáticas na maioria dos países produtores (MUÑOZ et al., 2004). Dentre as diferentes espécies de vibrios, *V. harveyi* representa o mais importante agente causador de vibrioses na maioria dos cultivos nas regiões tropicais, onde se encontra a maior produção mundial de camarões (LIU et al., 1996; ALVAREZ et al., 1998).

Os fungos, por outro lado, também representam potenciais patógenos para crustáceos em aquicultura, particularmente para animais estressados ou imunodeficientes, com especial destaque para o gênero *Lagenidium* para decápodos, camarões e lagostas (CRISP; BLAND; BAHNWEG, 1989) e o gênero *Fusarium*, incluindo *F. moniliforme* (ALDERMAN; POLGLASE, 1986), *F. tabacinum* (RHOOBUNJONGDE et al., 1991), *F. solani* (CHINAIN; VEY, 1988), *F. incarnatum* (VAN KHOA; HATAI; AOKI, 2004) e *F. oxysporum* (VAN KHOA; HATAI, 2005), que foram relacionados a grandes mortalidades em cultivos de crustáceos, tanto marinhos quanto de água doce.

Até recentemente, a prática mais comum dos cultivos de crustáceos e moluscos para superar estes problemas, era baseada no uso de antibióticos convencionais. Entretanto, o aumento de resistência de várias cepas de bactérias patogênicas contra os antibióticos comumente utilizados é alarmante.

Baticados e colaboradores (1990) relataram a ocorrência de cepas de *V. harveyi* e *V. splendidus* resistentes a eritromicina, kanamicina, penicillina G e estreptomicina, e Alvarez e colaboradores (2001) isolaram linhagens de *V. harveyi* de camarões e peixes resistentes a nada menos que 10 antibióticos diferentes. Além do mais, estas bactérias, juntamente com os antibióticos, eram descarregados como dejetos no meio ambiente, levando a sérias conseqüências ambientais. Um sério risco deve-se também ao fato de que diversos antibióticos administrados em aquicultura serem também utilizados em saúde humana, como fluoroquinolonas (norfloxacino e ciprofloxacino), resultando em uma seleção de resistência cruzada em bactérias que são importantes agentes infecciosos em humanos ou de microrganismos resistentes que podem ser passados de animais para humanos. Cabe salientar, que já foi demonstrada a disseminação de plasmídeos codificando para resistência a tetraciclina entre animais aquáticos cultivados e humanos na Europa, o que pode contribuir para o já alarmante problema de resistência a antibióticos afetando a medicina humana atualmente (HOLSTRÖM et al., 2003).

Frente ao exposto acima, novas alternativas e tecnologias devem ser desenvolvidas na tentativa de buscar a melhoria das condições de saúde das espécies cultivadas, sem prejuízos ao meio ambiente, assim como também para contornar o crescente problema de resistência dos microrganismos aos fármacos disponíveis, tanto na aquicultura como na saúde humana. Neste contexto, os PAM, moléculas efetoras naturais do sistema imune inato de diferentes seres vivos, são compostos bioativos potencialmente bons



candidatos para novos agentes terapêuticos, menos sujeitos aos fenômenos de resistência pelos microrganismos e inócuos para o meio ambiente.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antimicrobiana e antiparasitária, assim como a toxicidade para células sanguíneas humanas e a estabilidade em diferentes condições de salinidade, de diferentes PAM: taquiplesina (Taq), magainina (Mag), mitilina (Mit), clavanina (Clav), fator anti-lipopolissacarídeo (ALF) e peneidina (Pen), verificando, assim, seu interesse como novos agentes terapêuticos em aqüicultura ou saúde humana.

### **2.2 Objetivos específicos**

- I. Determinar a atividade antimicrobiana dos diferentes PAM contra bactérias do gênero *Vibrio*, de interesse para aqüicultura.
- II. Determinar a influência de diferentes condições de salinidade na atividade dos PAM.
- III. Determinar o potencial anti-fúngico dos PAM contra leveduras e fungos filamentosos.
- IV. Determinar o potencial anti-parasitário dos diferentes PAM contra os protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis*.
- V. Determinar a atividade hemolítica dos diferentes PAM contra eritrócitos humanos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

- a) Bactérias Gram-positivas: *Micrococcus luteus* A270 e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- b) Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *E. coli* SBS363 (bactérias padrão); *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* (bactérias marinhas)
- c) Fungos: *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis* e *Fusarium* sp. (filamentosos) e *Candida albicans* (levedura)
- d) Protozoários: *Trypanosoma cruzi*, cepa Y (formas epimastigota e tripomastigota) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Cepa Lb2904) (forma promastigota)
- e) Eritrócitos humanos do tipo O, Rh+

As bactérias e fungos foram em parte fornecidos pelo Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP – Dr. Artur Smânia Júnior) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que mantêm culturas destes microrganismos como rotina, em parte do Hospital Universitário de Florianópolis (*Fusarium* sp) e em parte (bactérias marinhas do gênero *Vibrio*) por colaboradores internacionais (Dra. Evelyne Bachère - Ifremer/CNRS, Laboratório de Defesa e Resistência de Invertebrados Marinhos, Montpellier, França). Os protozoários foram fornecidos pelo Laboratório de Protozoologia do MIP (Dr. Mário Steindel), UFSC, que mantêm culturas destes parasitos como rotina. Os eritrócitos humanos foram fornecidos

pelo banco de sangue do Hospital Universitário de Florianópolis, onde foram coletados de doadores saudáveis.

### 3.2 Peptídeos

#### **Sequências aminoacídicas :**

##### 1. **Peneidina** (*LitvanPEN3*)<sup>1</sup> (*Litopenaeus vannamei*)

**QGA:** QVYKGGYARPIRPPPPVRLPLGGPIGPYNGCFVSCRGISFSQARSCCSRLGRCCHVGKGYSG

**pEGA:**pEVYKGGYARPIRPPPPVRLPLGGPIGPYNGCFVSCRGISFSQARSCCSRLGRCCHVGKGYSG

Neste trabalho foi utilizada uma mistura (p/p) de dois análogos da Pen, denominados QGA e pEGA (DESTOUMIEUX et al., 1999), onde um resíduo de treonina foi substituído por um resíduo de alanina, para evitar a *O*-glicosilação no processo de síntese pela levedura, o que ocorre no aminoácido treonina. Além dessa substituição, o peptídeo recombinante QGA sofreu ainda uma substituição de um ácido piroglutâmico, que na forma nativa do peptídeo bloqueia a extremidade N-terminal, por um resíduo de glutamina na mesma posição. Esta alteração ocorreu naturalmente durante a síntese desse peptídeo pela levedura. Em estudo anterior, foi demonstrado que não há diferença na atividade antibacteriana e antifúngica entre as duas variantes (YANG et al., 2003).

##### 2. **Magainina** (MSI-94)<sup>2</sup> (*Xenopus laevis*)

GIGKFLKKAKKFGKAFVKMIKK

##### 3. **Taquiplesina I**<sup>2</sup> (*Tachypleus tridentatus*)

KWCFRVCYRGICYRRCR

#### 4. **Mitilina-A**<sup>2</sup> (*Mytilus edulis*)

GCASRCKAKCAGRRCKGWASASFRGRRCYCKCFRC

#### 5. **Fator anti-lipopolissacarídeo (ALFPm3)**<sup>3</sup> (*Penaeus monodon*)

QGWEAVAAVASKIVGLWRNEKTELLGHECKFTVKPYLKRQVYYKGRMWCPGWTAIRGEASTRS 65

QSGVAGKTAKDFVRKAFQKGLLSQQEANQWLSS 98

#### 6. **Clavanina-A**<sup>2</sup> (*Styela clava*)

VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF

<sup>1</sup> Produzida através de técnica de expressão recombinante em *Saccharomyces cerevisiae* (TGY) (DESTOUMIEUX et al., 1999).

<sup>2</sup> Produzida através de síntese química (Dr. Philippe Bulet - ATHERIS Laboratories, Suíça), purificados através de cromatografia (HPLC) semi-preparativo de fase reversa e a pureza (>80%) confirmada através de espectrometria de massa (MALDI-TOF) (Voyager).

<sup>3</sup> Produzida através de técnica de expressão recombinante em *Pichia pastoris* (KM71) (SOMBOONWIWAT et al., 2005).

Todos os peptídeos foram reconstituídos em água milli-Q estéril a uma concentração estoque de 1 mM e estocados a -20 °C até o uso.

### **3.3 METODOLOGIA**

#### **3.3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

##### **3.3.1.1 Preparo das suspensões bacterianas**

As diferentes espécies de bactérias foram cultivadas em meio de cultura Luria Bertani ou LB (1% peptona bacteriológica, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, pH 7,2), no caso de bactérias padrão, e em PWS (do inglês *peptonated water saline*) (1,5% peptona bacteriológica, 1% NaCl, pH 7,2) no caso das bactérias marinhas, e a fase de crescimento exponencial monitorada pela leitura da densidade óptica (DO) a 630nm. Nesta fase, as soluções foram diluídas em meio PB (do inglês *Poor broth*) (1% peptona bacteriológica, 0,5% NaCl, pH 7,2) para bactérias padrão ou em PWS para as bactérias marinhas, para uma DO de 0,001 (630nm), correspondente a  $10^6$  UFC (unidades formadoras de colônias) por ml, e assim utilizadas nos ensaios de atividade antibacteriana (adaptado de CHARLET et al., 1996, DESTOUMIEUX et al., 1999). Todas as bactérias foram cultivadas no Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP).

##### **3.3.1.2 Ensaios antibacterianos**

###### **3.3.1.2.1 Confirmação da atividade dos peptídeos contra bactérias padrão**

Procedeu-se inicialmente à confirmação da atividade dos diferentes peptídeos, produzidos sinteticamente ou pela técnica recombinante, contra bactérias sabidamente sensíveis a cada peptídeo. Estes ensaios serviram

ainda para selecionar espécies bacterianas simultaneamente sensíveis aos seis peptídeos utilizados neste estudo, para posterior uso nos testes de estabilidade (dos peptídeos) em diferentes salinidades (vide item 3.3.2). Nesta etapa, foram utilizadas as bactérias *M. luteus*, *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) e *E. coli* SBS363.

Os ensaios de inibição do crescimento bacteriano consistiram na incubação das bactérias em fase exponencial de crescimento com uma diluição seriada (0,02-50 $\mu$ M) dos PAM, em microplacas de 96 poços estéreis. Após um período de incubação de 24h a 30°C sob vigorosa agitação, o crescimento bacteriano foi monitorado através da DO (630nm) em leitora de microplaca (EL-800, BIOTEK) (adaptado de DESTOUMIEUX et al.,1999) e através de ensaio colorimétrico utilizando *p*-iodo-nitrotetrazolium violeta (INT), um reagente que é convertido a um composto de cor púrpura por células viáveis. A concentração mínima inibitória (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) foi representada por um intervalo de valores (a e b), no qual *a* representa a máxima concentração do peptídeo onde ainda se observa crescimento bacteriano e *b* a menor concentração do peptídeo capaz de causar 100% de inibição do crescimento bacteriano (adaptado de CASTEELS et al., 1993). Controles negativos foram realizados substituindo-se os peptídeos por igual volume de água milli-Q. A atividade bactericida foi determinada retirando-se uma alíquota de cada poço das placas do ensaio anterior e colocando-a em uma nova placa com meio de cultura estéril, sem adição de peptídeos. A concentração mínima bactericida (MBC, do inglês *minimum bactericidal concentration*) foi calculada da mesma forma que para MIC, após 24h de incubação nas condições descritas para os ensaios bacteriostáticos.

### **3.3.1.2.2 Atividade contra bactérias marinhas do gênero *Vibrio***

Após confirmar a atividade dos diferentes peptídeos, estes foram testados contra as bactérias marinhas *V. harveyi*, *V. alginolyticus* e *V. anguillarum*. Os diferentes vibrios foram cultivados em meio PWS e os ensaios antibacterianos foram realizados como acima descrito para as bactérias padrão.

### **3.3.2 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DOS PAM A DIFERENTES SALINIDADES E NA ÁGUA DO MAR**

Os diferentes peptídeos foram incubados com bactérias que se mostraram sensíveis a eles (*M. luteus* e *V. anguillarum*), em diferentes condições de salinidade (0-450mM, sendo 450mM aproximadamente a concentração salina marinha), assim como em água do mar estéril peptonada (1,5% peptona, pH 8,2). O crescimento bacteriano foi analisado através da leitura da DO (630nm) e através da utilização do reagente INT como acima descrito. Foram realizados ensaios prévios do efeito da salinidade no crescimento de cada microrganismo, e selecionados aqueles que apresentaram crescimento normal em um maior espectro de salinidades, no caso a bactéria *M. luteus* (0-450mM NaCl) e *V. anguillarum* (28-450mM NaCl). Nos controles, os ensaios foram realizados com os microrganismos crescendo nas mesmas condições de salinidade ou água marinha, sem adição dos peptídeos. Foram realizados também controles substituindo-se os diferentes peptídeos por água milli-Q.



### **3.3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**

#### **3.3.3.1 Preparo das suspensões de fungos**

Os diferentes fungos filamentosos foram cultivados a 28°C em meio de cultura Ágar Batata (DIFCO) por sete dias. Após esse período os esporos foram diluídos em solução fisiológica (0,9% NaCl) para uma concentração de  $10^4$  esporos/ml, estimada através da leitura da DO a 530nm. As suspensões da levedura foram preparadas através da mesma metodologia empregada para as soluções bacterianas, porém utilizando meio de cultura Müller-Hinton (DIFCO). Todos os fungos foram cultivados no Laboratório de Antibióticos do MIP.

#### **3.3.3.2 Ensaio antifúngicos**

Nos ensaios antifúngicos, foi testada uma espécie de levedura *C. albicans*, duas espécies de fungos filamentosos dermatófitos de interesse médico (*T. mentagrophytes* e *M. canis*) e um fungo do gênero *Fusarium*, à qual pertencem diversas espécies de fungos patogênicos em aquicultura.

No caso dos fungos filamentosos, suspensões de esporos preparadas como descrito acima foram incubadas em meio de cultura NB (Nutrient Broth) DIFCO com diluições seriadas dos diferentes PAM (0,02-50 $\mu$ M) em microplacas de 96 poços. Após um período de incubação de 48h no escuro a 28°C, o crescimento dos fungos foi monitorado através de observações em microscópio óptico e também por leitura da DO (630nm) (DESTOUMIEUX et al., 1999). Os valores de MIC foram calculados como acima descrito para as bactérias. Nos controles, os peptídeos foram substituídos por água milli-Q.

Nos ensaios contra *Candida albicans* foi utilizada a mesma metodologia empregada para bactérias, porém utilizando meio de cultura Müller-Hinton.

### **3.3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA**

#### **3.3.4.1 Preparo das suspensões de parasitos**

As culturas de parasitos, formas epimastigota de *T. cruzi* e promastigota de *L. braziliensis*, foram lavadas em tampão fosfato (PBS - GIBCO) por centrifugação ( $2.500 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ ) e suspendidas nos meios de cultura TC-100, no caso de *T. cruzi*, e meio Schneider para *L. braziliensis*, ambos suplementados com 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado por calor ( $56^{\circ}\text{C}$ , 30min). Após contagem em câmara de Neubauer, a concentração dos parasitos foi ajustada para  $2 \times 10^7$  células/ml, para os ensaios de inibição de crescimento, ou  $4 \times 10^7$  células/ml, para os ensaios de lise celular, nos respectivos meios de cultura.

Para as formas tripomastigota de *T. cruzi*, parasitos mantidos em cultura de tecido com meio de cultura DMEM (SIGMA) foram isolados por centrifugação após 4 dias de infecção. Os parasitos foram lavados como descrito acima, suspensos em meio RPMI (SIGMA) suplementado com 2% SBF inativado por calor, para uma concentração final de  $2 \times 10^7$  parasitos/ml.

#### **3.3.4.2 Interferência do soro-bovino fetal (SBF) na atividade dos peptídeos**

Para a investigação de uma potencial atividade citostática (anti-proliferativa) dos peptídeos contra os protozoários parasitos *T. cruzi* e *L.*

*braziliensis*, os meios de cultura devem ser suplementados com SBF, requerido para a proliferação parasitária *in vitro*. Desta forma, foi necessário inicialmente descartar uma possível inativação dos peptídeos pelo SBF, que poderia interferir com a integridade e/ou atividade dos peptídeos, como já relatado para outros PAM (GE et al., 1999). Para tal, a atividade antibacteriana dos diferentes peptídeos foi avaliada em presença de 10% de SBF e comparada com sua atividade na ausência deste composto. Controles de crescimento bacteriano foram realizados na presença de SBF, além de um controle onde os peptídeos foram substituídos por água milli-Q estéril.

#### **3.3.4.3 Ensaio Antiparasitários**

A atividade antiparasitária foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico do sal de tetrazolium (MTT), através da incubação dos protozoários com diluições seriadas dos diferentes peptídeos (0,78-100 $\mu$ M) em meio de cultura (TC-100 para formas epimastigota de *T. cruzi* e Schneider para *L. braziliensis*, ambos contendo 5% de SBF (adaptado de ELLIS et al., 1993). Foram analisadas tanto a ação parasiticida quanto a inibição do crescimento dos parasitos. Para tanto, os parasitos foram incubados, em microplacas de 96 poços, a 28°C por períodos de 5h para avaliar atividade parasiticida, e 24 e 72h para verificar uma potencial atividade anti-proliferativa após um (24h) ou três (72h) ciclos de proliferação dos parasitos. As microplacas foram periodicamente analisadas em microscópio invertido para avaliar o comportamento e possíveis alterações morfológicas dos parasitos. Após incubação, as microplacas foram centrifugadas (1000 x g, 10min), o sobrenadante descartado e a cada poço foi acrescido MTT (4mg/ml). As

microplacas foram então incubadas no escuro por um período de 2h (para *L. braziliensis*) ou 4h (para *T. cruzi*), as células permeabilizadas com DMSO e a viabilidade celular avaliada em leitora de microplacas a 540nm.

A viabilidade das formas tripomastigota de *T. cruzi* foi também determinada através do ensaio de MTT, com algumas adaptações. Para tal, as suspensões de parasitos foram preparadas como descrito acima e incubadas com os diferentes peptídeos (0,78-100 $\mu$ M) a 37°C por 7h. Após incubação, foi adicionado 1ml de meio RPMI às suspensões de parasitos, as microplacas foram centrifugadas (1000 x g, 10min) e o sobrenadante descartado. Os parasitos foram então suspendidos em 100 $\mu$ l de uma solução com MTT (0,1mg/ml) e incubados por 4h a 37°C. As células foram então permeabilizadas e a DO determinada como descrito acima. A integridade e motilidade dos parasitos foram também analisadas após 5, 15, 45, 90 e 180min através de observações em microscópio óptico.

Nos controles negativos, os peptídeos foram substituídos por um volume igual de água milli-Q e nos positivos, os parasitos foram tratados com etanol 70% (30min) ou com os fármacos de uso clínico Rochagan® (benznidazol, 500 $\mu$ M), para *T. cruzi*, e Anfotericina B (10 $\mu$ M) para *L. braziliensis*, em substituição aos peptídeos.

A percentagem de células viáveis foi calculada através da fórmula:

$$\frac{(\text{DO obtida} - \text{DO contr. negativo})}{(\text{DO contr. positivo} - \text{DO contr. negativo})} \times 100$$

### **3.3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA**

A atividade hemolítica dos diferentes peptídeos foi monitorada incubando-se, em tubos de ensaio, suspensões de eritrócitos humanos do tipo O a 4% em PBS (DIFCO) com diluições seriadas dos diferentes PAM (0,2-100 $\mu$ M) por 1h a 37°C. As suspensões de eritrócitos foram então centrifugadas (800 x g, 5min) e a DO de alíquotas (100 $\mu$ l) do sobrenadante mensurada em leitora de microplaca (540nm) (adaptado de ASTHANA; YADAV; GHOSH, 2004). Nos controles positivos, os eritrócitos foram incubados com igual volume de água milli-Q (lise por choque hipotônico) e nos controles negativos os peptídeos foram substituídos pelo mesmo volume de PBS.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Confirmação da atividade antibacteriana dos diferentes PAM

A atividade antibacteriana dos diferentes peptídeos foi inicialmente testada contra bactérias sabidamente sensíveis (de acordo com a literatura), com o objetivo de confirmar sua atividade após síntese química (Taq, Mag, Clav e Mit) ou expressão recombinante (Pen e ALF). Todos os PAM utilizados neste estudo mostraram atividade muito semelhante à descrita na literatura, com exceção da Clav, cujo espectro de atividade foi bastante reduzido, inibindo apenas o crescimento de *Micrococcus luteus* (Tab.1). A atividade da Clav foi também testada em pH 6,4, uma vez que foi relatada uma atividade aumentada deste peptídeo em condições mais ácidas (LEE, CHO, LEHRER, 1997). Contudo, não houve alteração de sua atividade (dados não mostrados). Por outro lado, somente a Taq e Mit tiveram efeito sobre *Staphylococcus aureus*, o que era esperado para todos os outros PAM, e a Taq mostrou-se o peptídeo mais potente contra todas as bactérias testadas. Os valores de MBC (ação bactericida) foram idênticos aos valores de MIC na maioria dos casos, ou ligeiramente diferentes (da ordem de uma unidade de diluição serial) mostrando que a MIC reflete, de um modo geral, a ausência de bactérias viáveis.

**Tabela 1.** Atividade antibacteriana dos diferentes peptídeos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ .

	Clav	Mag	Taq	Pen	ALF	Mit
MIC (a-b)						
<b>Gram +</b>						
<i>M. luteus</i>	6,25-12,5	0,20-0,39	0,20-0,39	3,12-6,25	0,78-1,56	0,39-0,78
<i>S. aureus</i>	>50	>50	1,56-3,12	nd	>40	10
<b>Gram -</b>						
<i>E. coli ATCC</i>	>50	3,12-6,25	0,39-0,78	nd	nd	0,78-1,56
<i>E. coli SBS</i>	>50	3,12-6,25	0,39-0,78	6,25-12,5	0,05-0,10	nd

\*nd = Não determinado.

#### 4.2 Atividade contra bactérias marinhas do gênero *Vibrio*

Os diferentes PAM foram avaliados quanto a seu efeito inibitório no crescimento de várias espécies de *Vibrio* marinhos. Destes, a Mag, a Mit e principalmente o ALF e a Taq mostraram atividade inibitória e bactericida contra estas bactérias (Tab. 2). Os valores de MBC foram iguais ou ligeiramente superiores (uma unidade de diluição serial) aos de MIC. A Taq foi o peptídeo mais potente (MIC 0,39-0,78 $\mu\text{M}$ ) contra as diferentes espécies de *Vibrio* testados.

**Tabela 2** – Atividade dos peptídeos contra bactérias marinhas do gênero *Vibrio*. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ .

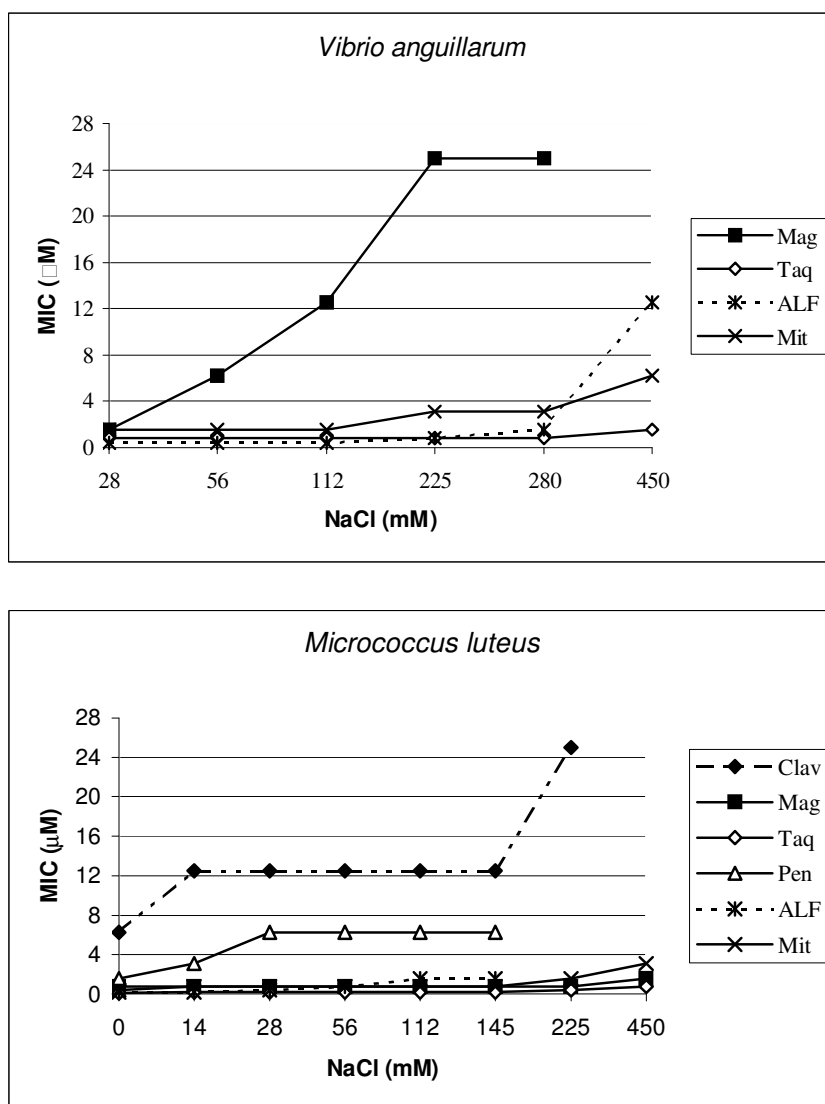
	<b>Clav</b>	<b>Mag</b>	<b>Taq</b>	<b>Pen</b>	<b>ALF</b>	<b>Mit</b>
	<b>MIC (a-b)</b>					
<i>V. harveyi</i>	>50	25-50	0,39-0,78	>50	0,69-1,37	3,12-6,25
<i>V. anguillarum</i>	>50	6,25-12,5	0,39-0,78	>50	0,69-1,37	1,56-3,12
<i>V. alginolyticus</i>	>50	6,25-12,5	0,39-0,78	>50	0,20-0,40	6,25-12,5

#### 4.3 Estabilidade dos PAM em diferentes salinidades e água do mar

Para avaliar o efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade dos peptídeos, foram utilizadas bactérias que, em ensaios prévios, mostraram-se capazes de crescer adequadamente em um amplo espectro de salinidades (resultados não mostrados). Nestes ensaios, destacaram-se a bactéria Gram-positiva *M. luteus* e a Gram-negativa *V. anguillarum*, que crescem perfeitamente a 0-450 e 28-450mM NaCl, respectivamente. Os resultados mostraram que, para ambas as bactérias testadas, os diferentes PAM diminuíram, ou perderam totalmente, sua atividade em salinidades altas e aumentaram em salinidades baixas (Fig. 2). No caso de *V. anguillarum*, a Mag perdeu totalmente sua atividade na presença de 450mM NaCl (salinidade semelhante à marinha) e o ALF sofreu perda significativa em sua atividade em salinidades altas. A Mit, e principalmente a Taq, mostraram-se os peptídeos mais estáveis, diminuindo muito pouco sua atividade em alta salinidade. Já contra *M. luteus*, a Mit e a Taq apresentaram o mesmo comportamento observado para *V. anguillarum* em altas salinidades, sendo que nessas



condições a Mag também apresentou grande estabilidade. Por outro lado, tanto a Taq, a Mit, a Clav e o ALF atingiram melhor atividade na ausência de NaCl (Fig. 2). Já a Pen, a Clav e o ALF perderam suas atividades em altas salinidades (entre 225 e 450mM NaCl).



**Figura 2:** Efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade dos peptídeos contra as bactérias *M. luteus* e *V. anguillarum*. A Pen e o ALF perderam sua atividade a partir de 145mM de NaCl contra *M. luteus* e a Clav a partir de 225mM NaCl. Mag foi inativa contra *V. anguillarum* a partir de 280mM de NaCl. A Pen e Clav não tiveram efeito contra *V. anguillarum* em todas as concentrações de NaCl testadas.

O efeito da água do mar sobre a atividade dos peptídeos foi estudado apenas para a bactéria *V. anguillarum*, uma vez que *M. luteus* não foi capaz de crescer de forma satisfatória neste meio. Surpreendentemente, nenhum dos peptídeos investigados apresentou atividade contra esse vibrião na presença de água do mar, mesmo quando esta foi diluída para 50 e 25% (dados não mostrados). Com o objetivo de descartar a possibilidade do pH da água do mar (8,2) interferir ou inativar os peptídeos, já que o meio de cultura (PWS) para essa bactéria apresenta um valor de pH inferior (7,2), o pH foi também ajustado para 7,2. Contudo, os resultados obtidos não sofreram alteração, mostrando que a inativação dos diferentes PAM não era devida às condições de pH. Além do mais, em nossos ensaios utilizamos ainda água do mar artificial, porém as bactérias não foram capazes de crescer nesse meio.

#### **4.4 Atividade antifúngica**

Apenas Mag, Mit, e de forma mais significativa, Taq, apresentaram atividade contra a levedura *Candida albicans*, sendo o MIC da Taq contra esse fungo de 0,8 $\mu$ M (Tab. 3). Entre os dermatófitos testados, apenas *Tricophyton mentagrophytes* foi sensível à ação dos peptídeos, e apenas à Taq (a partir de 6,25 $\mu$ M) e, em menor escala, à Mag. Já contra *Fusarium* sp, os peptídeos Mag, ALF Mit e Taq mostraram-se ativos contra este fungo, sendo que a ação dos dois últimos foi mais expressiva (a partir de 6,25 $\mu$ M) (Tab. 3).

**Tabela 3** – Atividade contra leveduras e fungos filamentosos dos diferentes peptídeos. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ .

	Clav	Mag	Taq	Pen	ALF	Mit
<b>FUNGOS</b>	<b>MIC (a-b)</b>					
<b>Levedura</b>						
<i>C. albicans</i>	>50	25-50	0,8-1,6	>20	>50	12,5-25
<b>Filamentosos</b>						
<i>T. mentagrophytes</i>	>50	12,5-25	3,12-6,25	>50	>50	>50
<i>M. canis</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Fusarium sp.</i>	>50	25-50	3,12-6,25	>50	12,5-25	3,12-6,25

#### 4.5 Atividade antiparasitária

##### 4.5.1 Interferência do soro bovino fetal (SBF) na atividade dos peptídeos

Como ensaio preliminar aos testes de atividade antiparasitária, foi primeiramente investigada a sensibilidade dos PAM ao SBF (10%), componente necessário para o crescimento dos parasitos *in vitro*. Para tanto, foi utilizada a bactéria *M. luteus*, sensível a todos os peptídeos e cujo crescimento normal não foi alterado pela presença deste composto no meio de cultura (dados não mostrados). Nossos resultados mostraram que dentre os peptídeos testados, apenas a Clav perdeu totalmente sua atividade na presença de SBF (Tab. 4), mesmo quando utilizado em concentrações mais baixas (5%) (dados não mostrados). Os ALF, Pen e Mit tiveram sua atividade

parcialmente reduzida (ALF: 2x) (Pen e Mit: 4x) e a atividade da Mag e Taq não foi afetada. Frente a estes resultados, optou-se por utilizar uma suplementação de apenas 5% de SBF nos meios de cultura dos ensaios antiparasitários, para reduzir sua interferência na atividade dos peptídeos.

**Tabela 4.** Efeito do SBF (10%) sobre a atividade antibacteriana (*M. luteus*) dos peptídeos. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ .

<i>Micrococcus luteus</i>		
	MIC*	MIC + 10%SBF
<b>Taq</b>	0,20-0,39	0,20-0,39
<b>Mag</b>	0,39-0,78	0,39-0,78
<b>ALF</b>	3,12-6,25	6,25-12,5
<b>Pen</b>	3,12-6,25	12,5-25
<b>Mit</b>	0,39-0,78	1,56-3,12
<b>Clav</b>	6,25-12,5	>50

\*Ausência de SBF (controle).

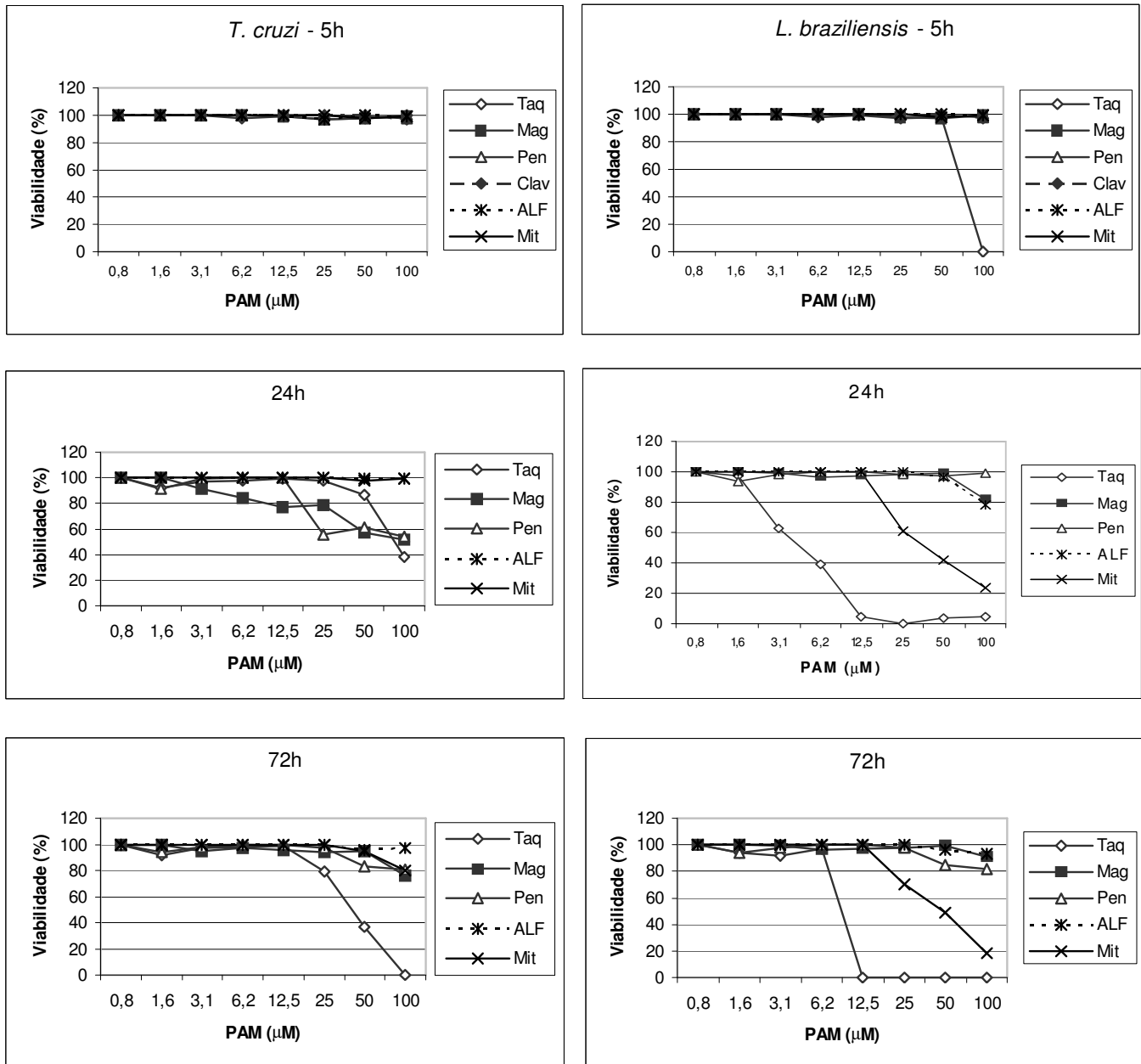
#### **4.5.2 Atividade antiparasitária contra formas promastigota de *L. braziliensis* e epimastigota de *T. cruzi***

Nenhum dos PAM testados apresentou atividade parasiticida contra formas epimastigota de *T. cruzi* após 5h de incubação (Fig. 3). Entretanto, através de análise microscópica em placa, foi possível visualizar alterações na forma e motilidade celular nos protozoários incubados com Taq, a partir de 25 $\mu\text{M}$ . Já a Pen, por outro lado, aparentemente causou um aumento na motilidade deste parasito em concentrações a partir de 50 $\mu\text{M}$ . Nos ensaios utilizando *L. braziliensis*, apenas a Taq apresentou atividade parasiticida (100% de morte

dos parasitos), mas apenas na mais alta concentração (100 $\mu$ M). Entretanto, apesar de ainda viáveis, os parasitos apresentaram alterações morfológicas também na concentração de 50 $\mu$ M, assim como ocorreu com *T. cruzi*.

Na avaliação da atividade inibitória sobre o crescimento dos parasitos (após 24 e 72h de incubação com os peptídeos), a Clav não foi utilizada, uma vez que perdeu totalmente sua atividade na presença de SBF. Após 24h de incubação (correspondente a um ciclo celular), a Taq, a Mag e a Pen, causaram inibição do crescimento de *T. cruzi*, sendo a Taq o peptídeo mais potente, reduzindo a proliferação celular em 62%, a 100 $\mu$ M (Fig. 3). ALF e Mit não apresentaram atividade contra esse parasito. Já contra *L. braziliensis*, a Taq foi capaz de abolir praticamente integralmente (97%) seu crescimento, a 12,5 $\mu$ M, enquanto a Mit inibiu em 78%, porém apenas em altas concentrações (100 $\mu$ M). Já a Mag e ALF foram fracamente ativos contra *L. braziliensis* (cerca de 20% de inibição) e a Pen não teve efeito algum.

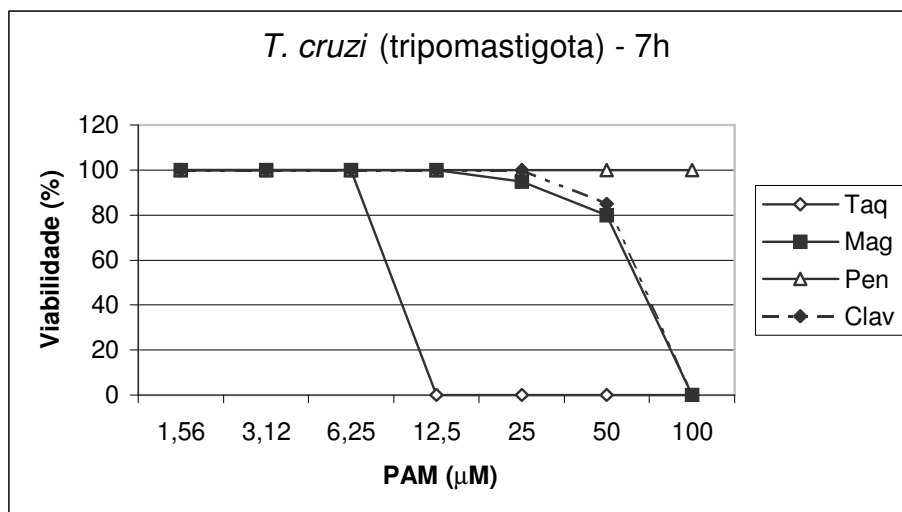
Após 72h de incubação (cerca de três ciclos celulares), a Taq causou perda total da viabilidade de *T. cruzi* na concentração mais alta (100 $\mu$ M) e de *L. braziliensis* a partir de 12,5 $\mu$ M, assim como observado após 24h (Fig. 3). A Mag e Pen, por outro lado, apresentaram apenas uma pequena atividade anti-proliferativa contra *T. cruzi*, e Pen também contra *L. braziliensis*, a partir de 50 $\mu$ M e a Mit teve uma ação significativa somente contra *L. braziliensis*, a partir de 25 $\mu$ M. O ALF não apresentou atividade significativa contra nenhum dos dois parasitos neste ensaio.



**Figura 3:** Atividade parasiticida e atividade inibitória sobre o crescimento parasitário dos diferentes PAM contra os protozoários *T. cruzi* (formas epimastigota) e *L. braziliensis* (formas promastigota) após 5, 24 e 72h de incubação com os peptídeos.

### 4.5.3 Atividade parasiticida contra formas tripomastigota sanguíneas (infectivas) de *T. cruzi*

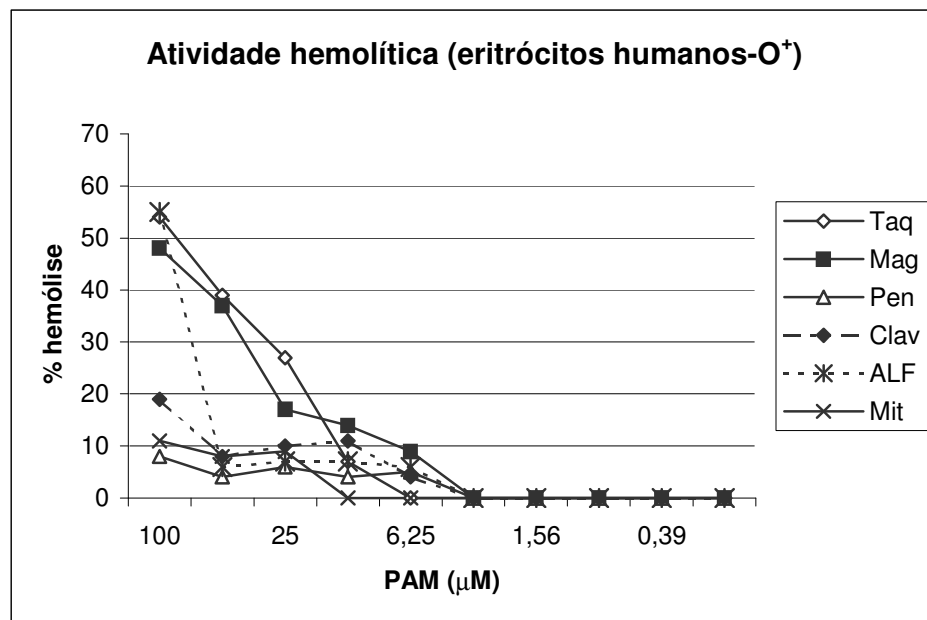
Dentre os diferentes PAM testados, a Pen mostrou-se totalmente inativa contra as formas tripomastigota infectivas de *T. cruzi*, sendo que causou inclusive um aumento na motilidade do parasito nas concentrações acima de 25 $\mu$ M, como também observado para as formas epimastigotas. Já a Mag foi capaz de reduzir totalmente a motilidade dos parasitos após 5min de incubação a 50 $\mu$ M e após 15min a 25 $\mu$ M. A Clav teve o mesmo efeito que a Mag, porém apenas após 3h (a 50 $\mu$ M). Com relação à Taq, esta foi, mais uma vez, o peptídeo mais potente contra esta forma de *T. cruzi*, abolindo completamente sua motilidade (após 5min de incubação) e sua viabilidade (após 7h) a 12,5 $\mu$ M (Fig. 4), resultado que também foi observado para a Mag e a Clav, porém somente na concentração mais alta testada (100 $\mu$ M). Não houve quantidade suficiente dos peptídeos ALF e Mit para realizar este ensaio.



**Figura 4:** Efeito dos diferentes peptídeos sobre a viabilidade de formas tripomastigota de *T. cruzi* após 7 horas de incubação.

#### 4.6 Atividade hemolítica

Dentre os peptídeos testados, a Pen, a Mit e a Clav apresentaram fraca atividade hemolítica (menos de 20% na concentração mais alta testada - 100 $\mu$ M), enquanto que Taq e Mag foram os mais tóxicos para estas células (Fig. 5). O ALF também apresentou atividade hemolítica fraca (<10%) até a concentração de 50 $\mu$ M, mas esta atividade aumentou drasticamente a 100 $\mu$ M. Todos os peptídeos apresentaram menos de 10% de efeito hemolítico a uma concentração de 6,25 $\mu$ M e nenhum dos peptídeos apresentou atividade hemolítica a 3,12 $\mu$ M.



**Figura 5:** Atividade hemolítica dos diferentes peptídeos contra hemácias humanas do tipo O (4%) após 1 hora de incubação com os peptídeos.



## 5. DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, PAM são componentes do sistema imune inato que vêm despertando grande interesse na pesquisa de novos agentes antimicrobianos, uma vez que podem apresentar amplo espectro de atividade e baixa toxicidade para células animais. Neste trabalho, foi investigada a atividade *in vitro* de seis diferentes PAM de animais aquáticos, contra bactérias marinhas, parasitos e fungos, assim como sua estabilidade em diferentes salinidades e toxicidade contra células sanguíneas humanas, com o objetivo de avaliar seu potencial como novos agentes terapêuticos para saúde humana e aqüicultura.

Como primeira etapa, buscamos inicialmente confirmar se todos os peptídeos, tanto os produzidos sinteticamente (Taq, Mag, Clav e Mit), como os gerados por técnica recombinante (Pen e ALF), eram ativos contra pelo menos algumas das espécies bacterianas descritas na literatura como sensíveis a esses peptídeos. A Clav foi o peptídeo que mostrou a menor atividade contra as diferentes bactérias testadas, tendo efeito apenas contra *Micrococcus luteus*, enquanto a Taq foi o peptídeo mais potente contra as diferentes espécies de bactérias. Cabe ainda salientar que apenas a Taq e a Mit apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, bactéria sabidamente sensível a todos os PAM utilizados neste estudo. Este resultado pode ter ocorrido devido ao uso de uma linhagem de *S. aureus* distinta das utilizadas em outros trabalhos. Lee e colaboradores (1997) também observaram ausência de atividade da Clav e Mag contra três diferentes linhagens desta mesma bactéria, também resistentes a vários antibióticos comerciais.

Os valores de MIC e MBC encontrados para os diferentes PAM utilizados neste estudo foram condizentes com os relatados na literatura, com exceção da Clav (LEE et al., 1997; HAUKLAND et al, 2001; HIRAKURA; KOBAYASHI; MATSUZAKI, 2002). Esse peptídeo, assim como outros PAM ricos em resíduos de histidina, possui carga líquida positiva fraca em pH neutro. Como já citado anteriormente, a carga positiva dos PAM tem indubitavelmente grande importância no reconhecimento e na interação destes peptídeos com a membrana e/ou parede de bactérias. Efetivamente, Lee e colaboradores (1997) observaram um aumento da atividade da Clav em pH mais ácido, o que nos levou a testar a efeito deste peptídeo também em pH levemente ácido (6,4). Contudo, não houve alteração de sua atividade, resultados esses que até o momento não estão esclarecidos.

Com relação à Mag, o peptídeo utilizado neste estudo foi um análogo (MSI-94) amidado por ocasião de sua síntese química, contrariamente ao peptídeo nativo que não apresenta essa modificação. Como citado na introdução, a amidação da extremidade C-terminal é uma modificação pós-traducional comum a muitos PAM, porém sua importância não foi ainda claramente estabelecida (BACHÈRE et al., 2004). Foi sugerido que essa modificação, em PAM com estrutura em alfa-hélice, estaria associada à manutenção de sua estrutura, proteção contra degradação por proteases e podendo ainda contribuir na interação entre o peptídeo e a membrana dos microrganismos, uma vez que confere um caráter ainda mais catiônico ao peptídeo (LEE et al., 1997). Foi ainda relatado que análogos de peneidinas e taquicitinas de limúlídeos, sem amidação na extremidade C-terminal, não perdem sua atividade antifúngica, mas reduzem ou perdem totalmente sua

atividade antibacteriana (SUETAKE et al., 2002; BACHÈRE et al., 2004). Em nossos ensaios, o análogo amidado da Mag não mostrou uma maior atividade do que sua forma nativa não amidada (DATHE et al., 2001), sugerindo que para esse peptídeo a amidação não esteja relacionada com sua atividade antibacteriana *in vitro*, podendo, porém, estar associada à proteção contra degradação e/ou manutenção de sua estrutura.

Após confirmar a atividade dos diferentes PAM, estes foram avaliados quanto à sua atividade contra bactérias marinhas do gênero *Vibrio*. Essas bactérias podem viver como comensais e em equilíbrio com moluscos e crustáceos marinhos, que possuem a capacidade natural de manter as infecções sob controle. Entretanto, em condições estressantes, como nos cultivos de altas densidades, no desequilíbrio nutricional e na presença de poluentes, pode haver uma ruptura desse equilíbrio, favorecendo o desenvolvimento de infecções ou vibrioses. Este gênero abriga, assim, as bactérias de maior impacto em aquicultura, sendo *V. harveyi* uma das principais espécies capazes de causar infecções em moluscos e camarões cultivados (BACHÈRE et al., 2004).

Nossos resultados mostraram que a Mag, a Mit, e principalmente o ALF e a Taq, possuem atividade contra as três espécies de *Vibrio* testadas. Foi observado ainda que os diferentes peptídeos mostraram atividades distintas entre as diferentes espécies testadas, sendo mais ativos contra umas e menos contra outras, com exceção da Taq, que apresentou a mesma atividade contra todas as espécies testadas. Já a Clav e a Pen não tiveram efeito algum sobre os vibrios.

Atividade contra vibrios marinhos já havia sido relatada para a Taq (MORVAN et al., 1997) e muito recentemente (durante a realização deste trabalho) para o ALF (SOMBOONWIWAT et al., 2005), sendo esta atividade muito semelhante à observada em nosso estudo. Por outro lado, o trabalho de Destoumieux e colaboradores (1999) descreve que a Pen foi inativa contra vibrios, o que foi também confirmado em nosso estudo. No que diz respeito à Mag, a Clav e a Mit A, não há, em nosso conhecimento, estudos que avaliaram a atividade destes peptídeos contra vibrios marinhos, sendo este aparentemente o primeiro relato. Entretanto, algumas diferentes isoformas de mitilinas (B, C e D), isoladas de outra espécie de mexilhão, *Mytilus galloprovincialis*, apresentaram atividade anti-vibrio, inclusive mais potente do que a Mit-A aqui testada (MITTA et al., 2000). Em suma, dos PAM testados neste estudo, a Mit e principalmente a Taq e o ALF mostraram-se as moléculas mais promissoras no controle de vibrioses em aqüicultura e merecem um estudo mais amplo neste contexto.

Um dos principais requisitos para o potencial uso destes PAM em cultivos refere-se à estabilidade destas moléculas em altas salinidades, como as marinhas ( $\geq 450\text{mM}$ ), uma vez que a atividade antibacteriana de diversos PAM decresce ou é totalmente abolida em salinidades já a partir de 100-150mM NaCl (TAM; LU; YANG, 2000). Em nossos resultados, foi observada uma clara diminuição progressiva da atividade dos peptídeos com o aumento da salinidade, chegando até a perda total desta atividade, em alguns casos, nas salinidades mais altas (112-450mM). A Taq e a Mit foram os peptídeos mais estáveis em altas salinidades, seguidas pela Mag e ALF, cuja atividade

mostrou-se estável apenas contra uma das bactérias testadas (*M. luteus* e *V. anguillarum*, respectivamente).

Em um estudo anterior, Lee e colaboradores (1997), comparando a atividade da Clav e Mag, sugeriram que devido à Clav ser originária de um organismo marinho (*Styela clava*) deveria apresentar maior estabilidade a condições de altas salinidades que a Mag, proveniente de uma rã de água doce (*Xenopus laevis*). Contudo, tanto os resultados obtidos por estes autores, utilizando bactérias *Listeria monocytogenes* EGD e *Escherichia coli* ML-35p, quanto os encontrados neste trabalho com *M. luteus*, mostraram surpreendentemente que a Mag é mais estável a altas salinidades do que a Clav nas mesmas condições experimentais. Nossos resultados mostraram inclusive que a Mag foi um dos PAM mais estáveis a altas salinidades frente à bactéria *M. luteus*. Contra *V. anguillarum*, entretanto, esse peptídeo sofreu perda significativa de sua atividade em alta salinidade, sendo que neste caso foi menos estável que os outros PAM isolados de animais marinhos (Taq, Mit e ALF).

A Taq, por outro lado, que foi o peptídeo mais estável nas diferentes salinidades, é um peptídeo com estrutura secundária relativamente simples, constituído apenas de um grampo de duas folhas- $\beta$  mantida por duas pontes de dissulfeto. Hancock e Lehrer (1998) relataram que os PAM com esta estrutura são os mais estáveis a altas salinidades. Harwig e colaboradores (1996), comparando a atividade da protegrina-1 nativa (isolada de leucócitos de porco) com análogos desprovidos de uma ou duas pontes de dissulfeto, constataram que estes variantes assumiam uma estrutura linear e perdiam totalmente sua atividade antibacteriana em altas salinidades. Os autores

sugeriram, assim, que a estrutura em grampo, mantida por pelo menos uma ponte de dissulfeto, era necessária para a manutenção da atividade antimicrobiana em altas concentrações de NaCl.

Por outro lado, já é bem estabelecido que o aumento da força iônica em altas salinidades leva a uma diminuição nas interações eletrostáticas em geral. Considerando que a interação inicial dos PAM com componentes aniônicos na membrana dos microrganismos parece ser eletrostática, haveria assim, uma conseqüente diminuição da atividade do PAM nessas condições (TAM; LU; YANG, 2000).

Esses estudos são especialmente importantes na busca de PAM que mantenham sua atividade em diferentes salinidades, e que possam assim ter aplicação em uma maior gama de condições, como o já citado cultivo de animais marinhos, ou ainda no tratamento de doenças que levam a um aumento da salinidade no organismo, como a fibrose cística (FRIEDRICH et al., 1999). Por outro lado, podem também nortear estudos futuros quanto à possibilidade de desenvolver análogos destes peptídeos que mantenham sua atividade em altas concentrações salinas, como já descrito para um análogo da Taq (TAM; LU; YANG, 2000).

A estabilidade dos diferentes PAM foi também avaliada em presença de água do mar, uma vez que esta contém uma grande abundância de íons, além do sódio ( $\text{Na}^+$ ) que poderia interferir ou modular a atividade antimicrobiana dos PAM. Surpreendentemente, nenhum dos peptídeos testados mostrou atividade contra *V. anguillarum* na presença de água do mar, independentemente do pH, que foi ajustado para 7,2 (semelhante aos meios de cultura), ou após diluir a água do mar até 25%. A inativação dos diferentes PAM pela água do mar

permanece sem explicação, uma vez que a maioria dos peptídeos utilizados neste estudo, com exceção da Mag, é proveniente de invertebrados marinhos, todos osmoconformistas, e que supostamente deveriam estar ativas na hemolinfa destes animais, protegendo-os contra infecções.

Alguns estudos foram realizados avaliando a estabilidade de PAM em diferentes concentrações de íons que estão presentes na água do mar. Cole e colaboradores (2000), analisando a estabilidade da pleurocidina, isolada de um peixe marinho, observaram que os íons divalentes Magnésio ( $Mg^{2+}$ ) e Cálcio ( $Ca^{2+}$ ) eram capazes de inativar este PAM em concentrações a partir de 10mM. Cabe ressaltar que nos ambientes marinhos a concentração do íon magnésio ultrapassa 50mM (e a de cálcio está em torno de 10 mM). Entretanto, no caso da pleurocidina, este foi ativo nas concentrações fisiológicas da mucosa do animal, de onde o peptídeo foi isolado. A defensina humana, algumas bacteriocinas de bactérias e análogos do híbrido cecropina-melitina também são sensíveis a altas concentrações de cálcio e magnésio, perdendo sua atividade antibacteriana já a partir de 5mM  $Mg^{2+}$ , sendo que esse efeito foi relacionado a um aumento da estabilidade da membrana bacteriana por parte do  $Mg^{2+}$  (FRIEDRICH et al., 1999; HOULIHAN; RUSSELL, 2006). Esses autores afirmam ainda que o  $Mg^{2+}$  tem um efeito muito mais acentuado (cerca de 50 vezes maior) do que o  $Na^{2+}$  sobre a atividade dos PAM, apesar da força iônica de uma solução de  $MgCl_2$  ser apenas três vezes maior do que a de uma solução equivalente de NaCl. Esse efeito mais potente do magnésio em relação ao sódio sobre a estabilidade dos PAM pode ser explicado pelas diferenças de afinidade destes íons pela superfície bacteriana, já que a afinidade do  $Mg^{2+}$  por LPS, por exemplo, é muito superior à do  $Na^{2+}$  (LEHRER

et al., 1988; FRIEDRICH et al., 1999). Assim, no caso de bactérias Gram-negativas, uma alta concentração de  $Mg^{2+}$  com alta afinidade pela parede poderia interferir na ação do peptídeo. Apesar de não termos estudado o efeito específico do magnésio na atividade dos diferentes PAM utilizados neste estudo, poder-se-ia supor que a alta concentração deste íon na água do mar (mesmo diluída a 25%), ou sua combinação com outros íons, pudesse resultar na inativação destas moléculas. Entretanto, não fica claro como esses peptídeos manteriam sua ação *in vivo*, na hemolinfa dos animais marinhos, cuja concentração de íons é muito próxima à da água do mar.

Como descrito previamente, vários trabalhos têm demonstrado a afinidade dos PAM por membranas e/ou parede de bactérias. Entretanto, há muito pouca informação sobre o reconhecimento e mecanismos de ação desses peptídeos contra fungos. Neste trabalho, a Taq apresentou a maior atividade contra a levedura e os fungos filamentosos *Tricophyton mentagrophites* e *Fusarium* sp, sendo que a Mag também apresentou atividade contra esses fungos, porém somente em altas concentrações. De acordo com a literatura, a Mag possui uma atividade antifúngica bem estabelecida contra uma grande variedade de fungos patogênicos para plantas, anfíbios e humanos, sendo seu efeito bastante variável dependendo da espécie testada (ALAN; EARLE, 2002; ROLLINS-SMITH et al., 2002). Já a Mit apresentou atividade contra a levedura e principalmente contra *Fusarium* sp. e o ALF somente contra *Fusarium* sp., porém de forma menos potente. Até a realização do presente trabalho, não havia relatos sobre a atividade antifúngica do ALF, mas a recente publicação (SOMBOONWIWAT et al., 2005) que referiu pela primeira vez sua atividade contra vibrios, referiu também sua ação antifúngica, inclusive contra fungos do



gênero *Fusarium*. Por outro lado, em nosso conhecimento, este é o primeiro relato de atividade anti-fúngica da Mit-A de *M. edulis*, apesar de já ter sido relatado para a Mit-B de *M. galloprovincialis* (MITTA et al., 2000).

A Clav e a Pen não apresentaram atividade contra nenhuma das espécies de fungos testadas. Entretanto, de acordo com a literatura, é conhecido que a Clav apresenta atividade contra a levedura *Candida albicans* (LEE; CHO; LEHRER, 1997) e a Pen é ativa tanto contra algumas espécies de fungos filamentosos quanto contra leveduras, incluindo espécies fitopatogênicas de interesse para a agricultura (DESTOUMIEUX et al., 1999). A ausência de atividade antifúngica por parte destes peptídeos pode ser resultado de problemas na sua síntese/produção já que foi relatado que pequenas alterações na estrutura dos PAM podem fazê-los perder sua atividade contra um grupo de microrganismos, mas mantê-la contra outros (SUETAKE et al., 2002; BACHÈRE et al., 2004).

Por outro lado, nenhum dos peptídeos foi ativo contra o dermatófito *Microsporum canis*. Com relação a esse fungo, já foi relatado que este é capaz de produzir e secretar proteases potentes durante a invasão tecidual (DESCAMPS et al., 2002), o que poderia afetar a integridade, e conseqüentemente a atividade dos peptídeos. Já o outro dermatófito, *T. mentagrophites*, também é capaz de secretar enzimas proteolíticas, entretanto a atividade ótima destas enzimas ocorre em pH ácido (pH 5), que não foi a condição deste estudo.

Com relação ao mecanismo de ação dos PAM contra fungos, como já citado, muito poucos estudos encontram-se disponíveis. A Mag, por exemplo, parece atuar através da desestruturação e rompimento da membrana

plasmática dos fungos, de forma semelhante à observada para bactérias (ROLLINS-SMITH et al., 2002; PARK; LEE; HAHM, 2004). Giudici e colaboradores (2006) também mostraram que a viscotoxina, isolada de plantas, causa a morte de esporos fúngicos (*F. solani*) através da formação de canais iônicos, geração de peróxido de hidrogênio e aumento na concentração citoplasmática de cálcio livre. Sugere-se, ainda, que a seletividade dos PAM para os fungos envolveria também a presença de ergosterol nas suas membranas plasmáticas (AVRAHAMI; SHAI, 2003).

Quanto aos protozoários parasitos aqui testados, a detecção de uma atividade contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis*, principalmente contra suas formas infectivas, é especialmente importante devido à falta de agentes quimioterápicos totalmente eficientes contra estes protozoários, causadores de doenças humanas graves em países tropicais (doença de Chagas e leishmaniose), apontadas atualmente como um grave problema de saúde pública, particularmente na América Latina. Além de medicamentos pouco eficientes, os tratamentos contra estas doenças muitas vezes são dispendiosos, podem requerer longo prazo e/ou provocar graves efeitos colaterais aos pacientes (LUNARDI et al., 2003).

Nos ensaios anti-parasitários, foi necessário reduzir (de 10 para 5%) a suplementação com SBF, uma vez que este causou a inativação parcial da Pen, Mit e ALF e total da Clav, que foi utilizada apenas nos ensaios de 5h de incubação com o parasito, na ausência de SBF.

Em nossos resultados, a Mit teve uma atividade considerável contra *L. braziliensis* (após 24 e 72h) e a Clav e a Mag contra formas tripomastigota de *T. cruzi*, porém em concentrações relativamente altas, enquanto o ALF e a Pen

não tiveram efeito significativo sobre os parasitos testados. Em nosso conhecimento, este é o primeiro relato de atividade antiparasitária da Mit-A, Clav, ALF e Pen. Já no que se refere à Mag e seus análogos, diversos trabalhos relatam sua atividade contra uma ampla variedade de protozoários parasitos, incluindo *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis hominis* e *T. cruzi* (HUANG; CHEN; ZIERDT, 1990), *Leishmania donovani* (GUERRERO et al., 2004), *Cryptosporidium parvum* (GIACOMETTI et al., 2000) e *Acantamoeba polyphaga* (SCHUSTER; JACOB, 1992). Neste trabalho, a atividade antiparasitária do análogo amidado MSI-94 utilizado foi semelhante a dos outros análogos ou sua forma nativa. Isso sugere que sua amidagem não esteja relacionada à sua atividade contra protozoários, podendo, porém, como já citado, estar relacionada à proteção contra degradação e/ou manutenção de sua estrutura.

Por outro lado, a Taq foi indubitavelmente o peptídeo mais ativo contra ambos protozoários testados, inibindo em 100% a viabilidade de *L. braziliensis* e formas tripomastigota (infectivas) de *T. cruzi* já a partir de 12,5µM. Este é um peptídeo relativamente pequeno (17 resíduos de aminoácidos), com fraca carga positiva (5 resíduos catiônicos em sua estrutura), que poderia facilmente difundir-se através do glicocálice do protozoário e agir sobre a sua membrana plasmática, diferentemente de outros peptídeos maiores e com carga positiva mais alta, que poderiam facilmente ficar retidos por componentes altamente aniônicos do glicocálice do parasito (MANGONI et al., 2005). Se considerarmos, por exemplo, a superfície celular de *Leishmania*, esta apresenta algumas particularidades interessantes quando comparada a outras células eucarióticas. Sua superfície é fortemente carregada negativamente

devido ao alto conteúdo de lipofosfoglicana (LPG), polissacarídeo aniônico que reveste cerca de 60% da superfície deste parasito (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Além do mais, sua membrana é caracterizada por uma porcentagem ligeiramente mais alta de fosfolípídeos aniônicos do que a das células animais (DIAZ-ACHIRICA et al., 1998).

Já com relação a *T. cruzi*, cada forma de desenvolvimento possui uma composição de membrana distinta e também uma carga característica. A forma tripomastigota apresenta uma grande quantidade de moléculas do tipo mucinas capazes de incorporar um alto conteúdo de ácido siálico do hospedeiro. Estas moléculas formam assim uma capa carregada negativamente sobre todo o parasito e que aparentemente estaria relacionada à sua infectividade e proteção contra o sistema imune do hospedeiro (DE LEDERKREMER et al., 1991). Já a forma epimastigota de *T. cruzi* apresenta um glicocálice relativamente denso, rico em lipo-peptideo-fosfatidil-inositol (LPPG), e também expressam essas mucinas em sua superfície, porém estas são aparentemente menores e menos abundantes em relação à forma tripomastigota (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000). Como os PAM aqui testados são todos catiônicos e possuem capacidade de interagir com componentes aniônicos, uma maior carga negativa na superfície celular dos parasitos poderia facilitar a atração e interação destes peptídeos com essas células. Em nossos resultados, tanto a Clav, Mag e principalmente Taq, foram claramente mais ativas contra as formas tripomastigota do que para formas epimastigota de *T. cruzi*, sendo que essa maior suscetibilidade poderia estar relacionada a estas diferenças de superfície celular entre essas duas formas de desenvolvimento.

Como mencionado anteriormente, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação de PAM contra protozoários. Os estudos realizados até o momento sugerem que o reconhecimento e seletividade dos PAM por protozoários podem ser resultado da presença do ergosterol, além de fosfolipídios aniônicos, em suas membranas. Por outro lado, os protozoários teriam uma porcentagem menor de fosfolipídios aniônicos em relação ao encontrado nas bactérias, o que poderia explicar a maior suscetibilidade destas últimas à ação desses peptídeos (SILVA JR; DAFFRE; BULET, 2000). Alguns autores sugerem ainda que poderia haver também o envolvimento de alvos intracelulares, assim como mecanismos distintos daqueles descritos para procariontes (DIAZ-ACHIRICA et al., 1998; ZASLOFF, 2002). No entanto, de acordo com Chicharro e colaboradores (2001), o efeito sobre organelas poderia estar relacionado a uma perda da homeostase da célula após a perturbação da membrana, ao invés de uma ação direta do peptídeo sobre uma determinada organela. Até o momento, os aspectos moleculares de reconhecimento e modo de ação dos PAM contra células eucarióticas não estão totalmente elucidados.

No entanto, uma crescente variedade destes peptídeos vem se mostrando ativos contra esses parasitos. No caso de *Leishmania*, resultados promissores foram obtidos *in vitro* usando cecropinas, melitinas, híbridos de ambos peptídeos (cecropina-A-melitina) (AKUFFO et al., 1998; CHICHARRO et al., 2001), gomesinas isoladas de aranha (SILVA JR; DAFFRE; BULET, 2000), indolicidina (BERA et al., 2003), dermaseptinas (FEDER; DAGAN; MOR, 2000), temporinas (MANGONI et al., 2005), e, mais recentemente, bombininas (MANGONI et al., 2006). No caso de *T. cruzi*, por outro lado, atividades antiparasitárias foram relatadas para diferentes análogos da magainina

(HUANG; CHEN; ZIERDT, 1990), peptídeos semelhantes à cecropinas (BARR; ROSE; JAYNES, 1995), dermaseptinas (BRAND et al., 2002) e filoseptinas isoladas de anfíbio (LEITE JR et al., 2005).

No que se refere à aquicultura, poucas doenças de origem parasitária têm sido relatadas em camarões. Já em moluscos, os protozoários são agentes causadores de várias doenças endêmicas, destacando-se os gêneros *Ascetospora* e *Marteilia*, e as espécies *Bonamia ostreae* e *Perkinsus marinus* (BACHÈRE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000). Já foi descrito que a Taq e a Mag apresentam atividade contra estas últimas espécies de parasitos, reduzindo drasticamente sua viabilidade e não sendo tóxicos para os hemócitos da ostra *Ostrea edulis*, as células hospedeiras para *B. ostreae* (HUANG; CHEN; ZIERDT, 1990; MORVAN et al., 1997). Pela sua capacidade de afetar os protozoários e não serem tóxicos para as células de bivalves, estes peptídeos estão sendo avaliados também quanto à sua propriedade de aumentar a resistência de bivalves a parasitos, por abordagem transgênica (MORVAN et al., 1997; BACHÈRE et al., 2000), assim como já realizado em plantas (DeGRAY et al., 2001; ALAN; BLOWERS; EARLE, 2004).

Quanto à toxicidade dos peptídeos utilizados neste estudo contra células de vertebrados, o ensaio de atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos revelou uma baixa taxa de hemólise (menos de 10%) causada pela Clav, Pen, Mit e ALF mesmo em altas concentrações (50 $\mu$ M). Já a Taq e a Mag tiveram uma ação hemolítica mais significativa (em torno de 50%) em altas concentrações (100 $\mu$ M). Entretanto, cabe ressaltar que os peptídeos que apresentaram atividade antibacteriana contra víbrios, o fizeram em faixas de concentrações de baixa ação hemolítica (<20% hemólise). Já contra fungos e

protozoários, que são organismos eucariontes, torna-se mais problemático a busca de agentes terapêuticos que afetem especificamente o metabolismo celular do patógeno e não do hospedeiro. Assim, muito poucos fármacos estão disponíveis contra esses organismos, com baixa toxicidade e causando poucos efeitos colaterais, comparativamente à ampla variedade de agentes antibacterianos hoje conhecidos. Neste estudo, a Taq aboliu completamente a viabilidade de *L. braziliensis* e de formas tripomastigota de *T. cruzi* a 12,5 $\mu$ M, ao mesmo tempo em que causou menos de 10% de hemólise nesta concentração. Da mesma forma, contra os fungos aos quais a Taq, Mit e ALF apresentaram atividade, esta ocorreu em concentrações em que a atividade hemolítica correspondeu a menos de 10%. Por outro lado, os peptídeos que apresentaram atividade antiparasitária e antifúngica menos expressivas em nosso estudo (Clav, Pen e ALF) foram também os que tiveram menor atividade hemolítica contra eritrócitos humanos, sugerindo que esses peptídeos poderiam apresentar menor afinidade por células eucarióticas.

Com relação à Taq, que foi indubitavelmente o peptídeo mais ativo contra os diversos microrganismos testados, cabe ainda ressaltar que esse peptídeo não se mostrou citotóxico contra diferentes linhagens celulares de mamífero (VERO, MA-104 e Hep-2) (dados não publicados). Além do mais, dois análogos da Taq, um totalmente cíclico e outro sem pontes de dissulfeto, com atividade antimicrobiana semelhante ao seu precursor e com atividade hemolítica diminuída ou totalmente abolida já foram desenvolvidos (TAM; LU; YANG, 2000; RAMAMOORTHY et al., 2006), dando uma boa perspectiva à possibilidade de desenvolvimento de análogos de PAM com altos índices de seletividade para células microbianas e de baixa citotoxicidade.

Desta forma, tendo em vista a necessidade emergente de novas classes de agentes antimicrobianos e antiparasitários, os PAM naturalmente encontrados nos seres vivos, representam uma nova alternativa de moléculas protótipo para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos, podendo apresentar grandes vantagens devido a (1) serem normalmente pequenos e, portanto passíveis de síntese em grandes quantidades, (2) apresentarem normalmente ação sistêmica, (3) terem amplo espectro de ação e normalmente alta afinidade por membranas de microrganismos, (4) serem geralmente bastante resistentes a proteases, (5) apresentarem ação rápida e (6) limitarem o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos, devido ao seu mecanismo de ação normalmente a nível de membrana (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

Dentre os peptídeos analisados neste estudo, o ALF e a Mit se mostraram moléculas promissoras no desenvolvimento de agentes terapêuticos em aquicultura, já que foram significativamente ativas contra os gêneros de bactérias e fungos patogênicos *Vibrio* e *Fusarium*, mantendo ainda sua atividade contra *Vibrio* em altas salinidades. Já a Taq foi a que mostrou a mais potente atividade não só contra *Vibrio* marinhos e fungos de interesse para aquicultura, sendo sua atividade estável em altas salinidades, como também contra leveduras, fungos dermatófitos e protozoários parasitos de grande importância para a saúde humana. Além do mais, apresentou atividade hemolítica baixa, ou ausente, nas concentrações em que se mostrou ativa contra os microrganismos aqui testados. Estas características fazem com que a Taq seja uma molécula promissora como agente terapêutico não só em aquicultura como também em saúde humana, sendo que seu potencial merece maiores estudos para melhor avaliar sua possível aplicação.



## 6. CONCLUSÕES

- A Mag, Mit, e principalmente a Taq e o ALF apresentaram uma evidente atividade antibacteriana contra *Vibrio* marinhos, causadores de infecções em aqüicultura.
- Todos os PAM avaliados diminuíram ou perderam totalmente a sua atividade antibacteriana em altas concentrações salinas (NaCl) e a aumentaram em baixas salinidades. Taq e Mit foram os peptídeos que apresentaram maior estabilidade nas diferentes condições de salinidade testadas.
- Todos os peptídeos avaliados perderam sua atividade em presença de água do mar, mesmo esta diluída a 25% e tendo seu pH ajustado para estas bactérias.
- A Mag e a Taq foram os PAM que apresentaram maior atividade contra os fungos testados, seguidos pela Mit e o ALF, que apresentaram ação sobre apenas uma ou duas espécie de fungos testados, respectivamente.
- A Taq foi o peptídeo mais ativo contra os protozoários testados, apresentando forte atividade contra *L. braziliensis* e formas tripomastigota (infectiva para mamíferos) de *T. cruzi*. A Pen, a Clav e a Mit também apresentaram atividade antiparasitária, porém somente em altas concentrações.

- A Taq e a Mag foram os peptídeos que apresentaram maior atividade hemolítica em altas concentrações, sendo que as demais causaram baixas taxas de hemólise até 50µM.
- Dentre os peptídeos analisados, a Taq, a Mit e o ALF parecem ser os mais promissores para aplicação em aqüicultura, apresentando atividade contra bactérias e fungos patogênicos *Vibrio* e *Fusarium*.
- A Taq apresentou ainda atividade significativa contra fungos e protozoários de interesse médico, além de grande estabilidade em diferentes condições de salinidade, mostrando-se, portanto fortemente promissor para uso terapêutico tanto em aqüicultura como em saúde humana.

## 6. REFERÊNCIAS

AGERBERTH B, LEE JY, BERGMAN T, CARLQUIST M, BOMAN HG, MUTT V, JORNVALL H. Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur. J. Biochem.*, v.202, p.849-854, 1991.

AKUFFO H, HULTMARK D, ENGSTOM A, FROHLICH D, KIMBRELL D. *Drosophila* antibacterial protein, cecropin A, differentially affects non-bacterial organisms such as *Leishmania* in a manner different from other amphipathic peptides. *Int. J. Mol. Med.*, v.1, 77-82, 1998.

ALAN AR, BLOWERS A, EARLE ED. Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease. *Plant Cell Rep.*, v.22, p.388-396, 2004.

\_\_\_\_\_, EARLE ED. Sensitivity of bacterial and fungal plant pathogens to the lytic peptides, MSI-99, magainin II, and cecropin B. *Mol. Plant Microbe Interact.* v.15, p.701-708, 2002.

ALDERMAN DJ, POLGLASE JL. *Phanomyces astaci* - isolation and culture. *J. Fish Dis.*, v.9, p.367-379, 1986.

ALVAREZ JD, AUSTIN B, ALVAREZ AM, AGURTO CP. Antimicrobial resistance of vibrios isolated from fish and marine shrimp in Venezuela. *Rev. Cient.-Fac. Cien. Vet.*, v.11, p.139-148, 2001.

\_\_\_\_\_, AUSTIN B, ALVAREZ AM, REYES H. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *J. Fish Dis.*, v.21, p.313-317, 1998.

ASTHANA N, YADAV SP, GHOSH JK. Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin: a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. *J. Biol. Chem.*, v.279, p.55042-55050, 2004.

AVRAHAMI D, SHAI Y. Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D, L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. *Biochemistry*, v.42, p.14946-14956, 2003.

BACHÈRE E, DESTOUMIEUX D, BULET P. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*, v.191, p.71-88, 2000.

\_\_\_\_\_. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*, v.227, p.427-438, 2003.

\_\_\_\_\_, GUEGUEN Y, GONZALEZ M, DE LORGERIL J, GARNIER J, ROMESTAND B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.*, v.198, p.149-168, 2004.

BARR SC, ROSE D, JAYNES JM. Activity of lytic peptides against intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes *in vitro* and parasitemias in mice. *J. Parasitol.*, v.81, p.974-978, 1995.

BARRACCO MA, DE LORGERIL J, GUEGUEN Y, BACHÈRE E. Molecular characterization of penaeidins from two Atlantic Brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.250, p.117-120, 2005.

BATICADOS MCL, LAVILLAPITOGO CR, CRUZLACIERDA ER, DELAPENA LD, SUNAZ NA. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Organ.*, v.9, p.133-139, 1990.

BECHINGER B, ZASLOFF M, OPELLA SJ. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.*, v.2, p.2077-2084, 1993.

BERA A, SINGH S, NAGARAJ R, VAIDYA T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.127, p.23-35, 2003.

BOMAN HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, v.13, p.61-92, 1995.

\_\_\_\_\_. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.*, v.254, p.197-215, 2003.

BRAND GD, LEITE-JR SA, SILVA LP, ALBUQUERQUE S, PRATES, MV, AZEVEDO RB, CARREGARO V, SILVA JS, SA VCL, BRANDÃO RA, BLOCH, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta* - anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p.49332-49340, 2002.

BROGDEN KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Rev. Microbiol.*, v.3, p.238-250, 2005.

BULET P, STÖCKLIN R, MENIN L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, v.198, p.169-184, 2004.

CASTEELS P, AMPE C, JACOBS F, TEMPST P. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.*, v.268, p.7044-7054, 1993.

CHABY R. Lipopolysaccharide-binding molecules: transporters, blockers and sensors. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.61, p.1697-1713, 2004.

CHARLET M, CHERNYSH S, PHILIPPE H, HETRU C, HOFFMANN JA, BULET P. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.21808-21813, 1996.

CHERTOV O, MICHIEL DF, XU L, WANG JM, TANI K, MURPHY WJ, LONGO DL, TAUB DD, OPPENHEIM JJ. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.2935-2940, 1996.

CHICHARRO C, GRANATA C, LOZANO R, ANDREU D, RIVAS L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.45, p.2441-2449, 2001.

CHINAIN M, VEY A. Experimental study of *Fusarium solani* infections in *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus* (crustacea, decapoda). *Dis. Aquat. Organ.*, v.5, p.215-223, 1988.

COLE AM, DAROUICHE RO, LEGARDA D, CONNELL N, DIAMOND G. Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.2039-2045, 2000.

CRISP LM, BLAND CE, BAHNWEIG G. Biosystematics and distribution of *Lagenidium callinectes*, a fungal pathogen of marine crustacea. *Mycologia*, v.81, p.709-716, 1989.

CROFT SL, BARRETT MP, URBINA JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v.21, p.508-512, 2005.

CRUZ-CHAMORRO L, PUERTOLLANO MA, PUERTOLLANO E, DE CIENFUEGOS GA, DE PABLO MA. In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. *Peptides*, v.27, p.1201-1209, 2006.

DATHE M, NIKOLENKO H, MEYER J, BEYERMANN M, BIENERT M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.*, v.501, p.146-150, 2001.

DEGRADO WF, SCHNEIDER JP, HAMURO Y. The twists and turns of beta-peptides. *J. Pept. Res.*, v.54, p.206-217, 1999.

DeGRAY G, RAJASEKARAN K, SMITH F, SANFORD J, DANIELL H. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol.*, v.127, p.852-862, 2001.

DeLEDERKREMER RM, LIMA C, RAMIREZ MI, FERGUSON MAJ, HOMANS SW, THOMAS-OATES JE. Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* epimastigote. *J. Biol. Chem.*, v.266, p.23670-23675, 1991.

DESCAMPS F, BROUTA F, MONOD M, ZAUGG C, BAAR D, LOSSON B, MIGNON B. Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, v.119, p.830-835, 2002.

DESTOUMIEUX D, BULET P, STRUB J-M, BACHÈRE E. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur. J. Biochem.*, v.266, p.335-346, 1999.

\_\_\_\_\_, MUNOZ M, COSSEAU C, RODRIGUEZ J, BULET P, COMPS M, BACHÈRE E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.*, v.113, p.461-469, 2000.

DIAZ-ACHIRICA P, UBACH J, GUINEA A, ANDREU D, RIVAS L. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin a-melittin hybrid peptide. *Biochem. J.*, v.330, p.453-460, 1998.

ELLIS JA, FISH WR, SILEGHEM M, McODIMBA F. A colorimetric assay for Trypanosome viability and metabolic function. *Vet. Parasitol.*, v.50, p.143-149, 1993.

FEDER R, DAGAN A, MOR A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.4230-4238, 2000.

FERNIE-KING BA, SEILLY DJ, LACHMANN PJ. Inhibition of antimicrobial peptides by group A streptococci: SIC and DRS. *Biochem Soc Trans.*, v.34, p.273-275, 2006.

FRIEDRICH C, SCOTT MG, KARUNARATNE N, YAN H, HANCOCK RE. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, p.1542-1548, 1999.

GANZ T, LEHRER RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.*, v.10, p.41-44, 1998.

GE Y, MACDONALD DL, HOLROYD KJ, THORNSBERRY C, WEXLER H, ZASLOFF M. In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, p.782-788, 1999.

GIACOMETTI A, CIRIONI O, DEL PRETE MS, BARCHIESI F, SCALISE G. Short-term exposure to membrane-active antibiotics inhibits *Cryptosporidium parvum* infection in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.3473-3475, 2000.

GIFFORD JL, HUNTER HN, VOGEL HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.62, p.2588-2598, 2005.

GIUDICI M, POVEDA JA, MOLINA ML, DE LA CANAL L, GONZALEZ-ROS JM, PFULLER K, PFULLER U, VILLALAIN J. Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxin A3. *FEBS J.*, v.273, p.72-83, 2006.

GUEGUEN Y, GARNIER J, ROBERT L, LEFRANC M-P, MOUGENOT I, DE LORGERIL J, JANECH M, GROSS PS, WARR GW, CUTHBERTSON B, BARRACCO MA, BULET P, AUMELAS A, YANG Y, BO D, XIANG J, TASSANAKAJON A, PIQUEMAL D, BACHÈRE, E. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Dev. Comp. Immunol.*, v.30, p.283-288, 2006.

GUERRERO E, SAUGAR JM, MATSUZAKI K, RIVAS L. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.48, p.2980-2986, 2004.

HANCOCK RE, FALLA T, BROWN M. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microb. Physiol.*, v.37, p.135-175. 1995.

\_\_\_\_\_, LEHRER RI. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, v.21, p.82-88, 1998.

HARWIG SS, WARING A, YANG HJ, CHO Y, TAN, L, LEHRER RI. Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. *Eur. J. Biochem.*, v.240, p.352-357, 1996.

HAUKLAND HH, ULVATNE H, SANDVIK K, VORLAND LH. The antimicrobial peptides lactoferrin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Lett.*, v.508, p.389-393, 2001.

HIRAKURA Y, KOBAYASHI S, MATSUZAKI K. Specific interactions of the antimicrobial peptide cyclic  $\beta$ -sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1562, p.32-36, 2002.

HOFFMANN JA, REICHART JM, HETRU C. Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.*, v.8, p.8-13, 1996.

HOLMSTRÖM K, GRÄSLUND S, WAHLSTRÖM A, POUNGSHOMPOO S, BENGTSSON BE, KAUTSKY N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v.38, p.255-266, 2003.

HOULIHAN AJ, RUSSELL JB. The effect of calcium and magnesium on the activity of bovicin HC5 and nisin. *Curr. Microbiol.*, v.53, p.365-369, 2006.

HSU CH, CHEN C, JOU ML, LEE AY, LIN YC, YU YP, HUANG WT, WU SH. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Res.*, v.33, p.4053-4064, 2005.

HUANG CM, CHEN HC, ZIERDT CH. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.34, p.1824-1826, 1990.

IMURA Y, NISHIDA M, OGAWA Y, TAKAKURA Y, MATSUZAKI K. Effects of PEGylation on the activity of tachyplesin I. *YAKUGAKU ZASSHI-J. Pharmac. Soc. Jap.*, v.124, p.117-120, 2004.

KANG CJ, XUE JF, LIU N, ZHAO XF, WANG JX. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Immunol.*, v.44, p.1546-1554, 2006.

KLEPSE ME. Antifungal resistance among *Candida* species. *Pharmacotherapy*, v.21, p.124S-132S, 2001.

KRAGOL G, LOVAS S, VARADI G, CONDIE BA, HOFFMANN R, OTVOS L JR. The antibacterial peptide pyrrococin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, v.40, p.3016-3026, 2001.

KULKARNI MM, MCMASTER WR, KAMYSZ E, KAMYSZ W, ENGMAN M, MCGWIRE BS. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*,



protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol. Microbiol.*, v.62, p.1484-1497, 2006.

LEE SY, CHO Y, LEHRER RI. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect Immunol.*, v.65, p.2898-903, 1997.

\_\_\_\_\_, LEE BL, SÖDERHÄLL K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.*, v.278, p.7927-7933, 2003.

LEE IH, ZHAO C, CHO Y, HARWIG SSL, COOPER EL, LEHRER RI. Clavanins,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett.*, v.400, p.158-162, 1997.

LEHRER RI, GANZ T, SZKLAREK D, SELSTED ME. Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J. Clin. Invest.*, v.81, p.1829-1835, 1988.

LEITE-JR SA, SILVA LP, RODRIGUES MIS, PRATES MV, BRAND GD, LACAVALA BM, AZEVEDO RB, BOCCA AL, ALBUQUERQUE S, BLOCH C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*, v.26, p.565-573, 2005.

LIU H, JIRAVANICHPAISAL P, SÖDERHÄLL I, CERENIUS L, SÖDERHÄLL K. Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication *in vitro* and *in vivo* in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Virol.*, v. 80, p. 10365-10371, 2006.

LIU PC, LEE KK, YII KC, KOU GH, CHEN SN. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.*, v.33, p.129-132, 1996.

LUNARDI F, GUZELA M, RODRIGUES AT, CORREA R, EGER-MANGRICH I, STEINDEL M, GRISARD EC, ASSREUY J, CALIXTO JB, SANTOS AR. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.47, p.1449-1451, 2003.

MALOY WL, KARI UP. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, v.37, p.105-122, 1995.

MANGONI ML, SAUGAR JM, DELLISANTI M, BARRA D, SIMMACO M, RIVAS L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *J. Biol. Chem.*, v.280, p.984-990, 2005.

\_\_\_\_\_, PAPO N, SAUGAR JM, BARRA D, SHAI Y, SIMMACO M, RIVAS L. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. *Biochemistry*, v.45, p.4266-4276, 2006.

MATSUZAKI K, SUGISHITA K-I, HARADA M, FUJII N, MIYAAJIMA K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1327, p.119-130, 1997.

\_\_\_\_\_. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1376, p.391-400, 1998.

MITTA G, VANDENBULCKE F, HUBERT F, SALZET M, ROCH P. Involvement of mitilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.12954-12962, 2000.

MORVAN A, IWANAGA S, COMPS M, BACHÈRE E. In vitro activity of the limulus antimicrobial peptide tachyplesin I on marine bivalve pathogens. *J. Invert. Pathol.*, v.69, p.177-182, 1997.

MUÑOZ M, VANDENBULCKE F, GARNIER J, GUEGUEN Y, BULET P, SAULNIER D, BACHÈRE E. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.61, p.961-972, 2004.

MUTA T, FUJIMOTO T, NAKAJIMA H, IWANAGA S. Tachyplesins isolated from hemocytes of Southeast Asian horseshoe crabs (*Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus gigas*): identification of a new tachyplesin, tachyplesin III, and a processing intermediate of its precursor. *J. Biochem. (Tokyo)*, v.108, p.261-266, 1990.

NAKAMURA T, FURUNAKA H, MIYATA T, TOKUNAGA F, MUTA F, IWANAGA S. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). *J. Biol. Chem.*, v.263, p.16709-16713, 1988.

NAGAOKA I, TAMURA H, HIRATA M. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *J. Immunol.*, v.176, p.3044-3052, 2006.

NEVES DP. *Parasitologia Humana*. 10<sup>a</sup> edição. São Paulo: Ed. Atheneu, 2002. 428 pp.

OKUMURA K, ITOH A, ISOGAI E, HIROSE K, HOSOKAWA Y, ABIKO Y, SHIBATA T, HIRATA M, ISOGAI H. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett.*, v.212, p.185-194, 2004.

OREN Z, SHAI Y. Cyclization of a cytolytic amphipathic alpha-helical peptide and its diastereomer: effect on structure, interaction with model membranes, and biological function. *Biochemistry*, v.39, p.6103-6114, 2000.

OUAISSI A, OUAISSI M. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* v.53, p.102-114, 2005.

PARK Y, LEE DG, HAHM KS. HP(2-9)-magainin 2(1-12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. *J. Pept. Sci.*, v.10, p.204-209, 2004.

PEREIRA-CHIOCCOLA VL, ACOSTA-SERRANO A, CORREIA DE ALMEIDA I, FERGUSON MA, SOUTO-PADRON T, RODRIGUES MM, TRAVASSOS LR, SCHENKMAN S. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J. Cell Sci.*, v.113, p.1299-1307, 2000.

PETERSON AM, WALKER PH. Hospital-acquired infections as patient safety indicators. *Annu. Rev. Nurs. Res.*, v.24, p.75-99, 2006.

PIERRAT OA, MAXWELL A. Evidence for the role of DNA strand passage in the mechanism of action of microcin B17 on DNA gyrase. *Biochemistry*, v.44, p.4204-4215, 2005.

RAMAMOORTHY A, THENNARASU S, TAN A, GOTTIPATI K, SREEKUMAR S, HEYL DL, AN FY, SHELBURNE CE. Deletion of all cysteines in tachyplesin I abolishes hemolytic activity and retains antimicrobial activity and lipopolysaccharide selective binding. *Biochemistry*, v.45, p.6529-6540, 2006.

RAMANATHAN B, WU H, ROSS CR, BLECHA F. PR-39, a porcine antimicrobial peptide, inhibits apoptosis: involvement of caspase-3. *Dev. Comp. Immunol.*, v.28, p.163-169, 2004.

RHOOBUNJONGDE W, HATAI K, WADA S, KUBOTA SS. *Fusarium moniliforme* (sheldon) isolated from gills of kuruma prawn *Penaeus japonicus* (bate) with black gill disease. *Nippon Suisan Gakk.* v.57, p.629-635, 1991.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ MJ, SAUGAR J, DOCOBO-PEREZ F, DE LA TORRE BG, PACHON-IBANEZ ME, GARCIA-CURIEL A, FERNANDEZ-CUENCA F, ANDREU D, RIVAS L, PACHON J. Studies on the antimicrobial activity of cecropin A-melittin hybrid peptides in colistin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.58, p.95-100, 2006.

ROLLINS-SMITH LA, CAREY C, LONGCORE J, DOERSAM JK, BOUTTE A., BRUZGAL JE, CONLON JM. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Dev. Comp. Immunol.*, v.26, p.471-479, 2002.

SACKS D, SHER A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol.*, v.3, p.1041-1047, 2002.

SAIDO-SAKANAKA H, ISHIBASHI J, MOMOTANI E, YAMAKAWA M. Protective effects of synthetic antibacterial oligopeptides based on the insect defensins on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. *Dev. Comp. Immunol.* v.29, p.469-477, 2005.

SAMUELSEN O, HAUKLAND HH, JENSSEN H, KRAMER M, SANDVIK K, ULVATNE H, VORLAND LH. Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.*, v.579, p.3421-3426, 2005.

SCHUSTER FL, JACOB LS. Effects of magainins on ameba and cyst stages of *Acanthamoeba polyphaga*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.36, p.1263-1271, 1992.

SELSTED ME, NOVOTNY MJ, MORRIS WL, TANG YQ, SMITH W, CULLOR JS. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.4292-4295, 1992.

SILVA-JR PI, DAFFRE S, BULET P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.33464-33470, 2000.

SIMMACO M, MIGNOGNA G, BARRA D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers*, v.47, p.435-450, 1998.

SIQUEIRA ER, FERREIRA JC, MAFFEI CM, CANDIDO RC. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, p.269-271, 2006.

SKERLAVAJ B, ROMEO D, GENNARO R. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactenecins. *Infect. Immun.*, v.58, p.3724-3730, 1990.

SOLOMON S, HU J, ZHU Q, BELCOURT D, BENNETT HP, BATEMAN A, ANTAKLY T. Corticostatic peptides. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*,v.40, p.391-398, 1991.

SOMBOONWIWAT K, MARCOS M, TASSANAKAJON A, KLINBUNGA S, AUMELAS A, ROMESTAND B, GUEGUEN Y, BOZE H, MOULIN G, BACHÈRE E. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipoplysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.*, v.29, p.841-851, 2005.

SUETAKE T, AIZAWA T, KOGANESAWA N, OSAKI T, KOBASHIGAWA Y, DEMURA M, KAWABATA S, KAWANO K, TSUDA S, NITTA K. Production and characterization of recombinant tachycitin, the Cys-rich chitin-binding protein. *Protein Eng.*, v.15, p.763-769, 2002.

TAM JP, LU YA, YANG JL. Marked increase in membranolytic selectivity of novel cyclic tachyplesins constrained with an antiparallel two-beta strand cystine knot framework. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.267, p.783-790, 2000.

TURCO SJ, DESCOTEAUX A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.46, p.65-94, 1992.

ULVATNE H, VORLAND LH. Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scand. J. Infect Dis.*, v.33, p.507-511, 2001.

URBINA JA. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.*, v.8, p.287-295, 2002.

VAN KAN EJM, DEMEL RA, VAN DER BENT A, BRUIJFF B. The role of abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavanin. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1615, p.84-92, 2003.

VAN KHOA L, HATAI K, AOKI T. *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. *J. Fish Dis.*, v.27, p.507-515, 2004.

\_\_\_\_\_, HATAI K. First case of *Fusarium oxysporum* infection in cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathol.*, v.40, p.195-196, 2005.

XU Y, TAMAMURA H, ARAKAKI R, NAKASHIMA H, ZHANG X, FUJII N, UCHIYAMA T, HATTORI T. Marked increase in anti-HIV activity, as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4, linked to enhancement of the binding ability of tachyplesin analogs to CXCR4. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v.15, p.419-427, 1999.

YANG Y, PONCET J, GARNIER J, ZATYLNKY C, BACHÈRE E, AUMELAS A. Solution structure of the recombinant Penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem.*, v.278, p.36859-36867, 2003.

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