

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Instituto de Ciências Exatas
Escola de Engenharia
Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica

Júlio César Moreira de Brito

**Peptídeo Antimicrobiano PEGuilado como Potencial Biofármaco para o
Tratamento de Pneumonia Causada por *Acinetobacter baumannii***

Belo Horizonte
Agosto, 2020

Júlio César Moreira de Brito

**Peptídeo Antimicrobiano PEGuilado como Potencial Biofármaco para o
Tratamento de Pneumonia Causada por *Acinetobacter baumannii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica.

Orientadora: Prof^ª. Maria Elena de Lima Perez Garcia.

Belo Horizonte
Agosto, 2020

Ficha Catalográfica

B849p Brito, Júlio César Moreira de
2020 Peptídeo antimicrobiano PEGuilado como potencial biofármaco para o
T tratamento de pneumonia causada por Acinetobacter baumannii
[manuscrito] / Júlio César Moreira de Brito. 2020.
156 f. : il.

Orientadora: Maria Elena de Lima Perez Garcia.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Inovação
Tecnológica e Biofarmacêutica.

Bibliografia: f. 134-151.

Inclui anexos e apêndices.

1. Inovações tecnológicas – Teses. 2. Biofarmacêutica – Teses. 3.
Produtos de ação antimicrobiana – Teses. 4. Peptídeos – Teses. 5.
Infecções por Acinetobacter – Teses. 6. Pneumonia – Teses. 7. Drogas
– Resistência em microorganismos – Teses. I. Perez Garcia, Maria
Elena de Lima, Orientadora. II. Título.

CDU 043

Elaborada por Sérgio Ferreira da Silva – CRB6-2719.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós Graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG

"Peptídeo Antimicrobiano PEGuilado como Potencial Biofármaco para o Tratamento de Pneumonia Causada por *Acinetobacter baumannii*"

Júlio César Moreira de Brito, nº de registro 2016711609

Tese **Aprovada** pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:

Professora Doutora Maria Elena de Lima Perez Garcia (PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)

Professor Doutor Jorge Almeida Guimarães (Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS)

Professor Doutor Carlos Alberto Tagliati (PPG em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica da UFMG)

Professora Doutora Glória Regina Franco (Instituto de Ciências Biológicas da UFMG)

Professora Doutora Rachel Basques Caligorne (Hospital Santa Casa de Belo Horizonte/MG)

Belo Horizonte, 21 de Agosto de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Gloria Regina Franco, Professora do Magistério Superior**, em 21/08/2020, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **RACHEL BASQUES CALIGORNE, Usuário Externo**, em 21/08/2020, às 17:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Almeida Guimarães, Usuário Externo**, em



21/08/2020, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elena de Lima Perez Garcia, Presidente de comissão**, em 21/08/2020, às 21:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Alberto Tagliati, Membro**, em 24/08/2020, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ruben Dario Sinisterra Millan, Coordenador(a) de curso**, em 25/08/2020, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0223020** e o código CRC **1736D0AF**.

AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus por ter me dado as oportunidades que me fizeram chegar aqui e também agradeço ao pai Jayme (*in memoriam*), à minha mãe Jeannine, aos meus irmãos Carlos Eduardo e Leonardo e à tia Maria da Consolação, por estarem ao meu lado.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dra. Maria Elena de Lima, por acreditar em minhas ideias e pela orientação. Ao meu amigo e colega de doutorado, William Gustavo, pela ajuda e apoio em diversos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Aos colegas do Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG pela paciência e presteza, e à Prof^a Dra. Simone Odília e ao Prof. Dr. Valbert Nascimento, que abriram as portas dos seus laboratórios e contribuíram enriquecendo esta tese.

Agradeço ao meu colega Joaquim e à Prof^a. Dr^a. Elaine Fagundes pela orientação nas análises de citotoxicidade em células HEK-293, aos colegas Mariane Felipetto, Lídia, Cláudia, Breno e ao Prof. Dr. Jarbas do Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos (LASEP/UFMG), pelo apoio na síntese de peptídeos e nas análises de CD. Também agradeço à Eni, Secretária do Programa de Inovação, pelo apoio e atenção, e à técnica Adriana Campezatto do Laboratório Multiusuários de Proteômica ICB/UFMG, pelas análises no MALDI-TOF.

Agradeço à minha amiga Dra. Alexsandra da USP e aos meus colegas da FUNED, Paula, Lívia, Rânia, Leonardo, Milton, Laurenice, Vinícius, Vera Lúcia, Márcia Borges, Thiago, Thais, Cristine, Aline Melgaço, Sandra, Simone e Luciara pelo incentivo e apoio. Também deixo meu obrigado aos professores: Dr. Marcelo Pedrosa (UFPR), pelas dicas, colaborações e por diversos trabalhos feitos juntos, Dr^a. Magna Cristina (UFSJ) e Dr^a. Vera (ICB/UFMG), pelo fornecimento dos isolados clínicos, à Dr^a. Carlota Rangel (USP), por me receber em seu laboratório e pelas dicas de PEGuilação, à Dr^a. Jaqueline Maria Siqueira (UFSJ), pelos estudos de citotoxicidade em células VERO, ao Dr. Rodnei (ICEX/UFMG), pelos ensinamentos e dicas em Espectrometria de Massas, e à Dr^a. Débora Sampaio (UFMG), pelo suporte e dicas nos procedimentos para submissão do projeto ao CEUA.

Enfim, deixo meus agradecimentos também à FUNED, pelo incentivo e liberação, à FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro para a capacitação, e à UFMG, com seus professores e técnicos que trabalham em prol da inovação em educação e tecnologia, para que possamos construir um Brasil melhor a cada dia.

RESUMO

Os relatos de infecções e óbitos por bactérias resistentes aos antimicrobianos vêm crescendo diariamente no mundo e a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem alertado sobre a importância do desenvolvimento de novos fármacos efetivos contra essas superbactérias. Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos surgem como uma alternativa, pois muitos, além de estarem envolvidos na imunidade inata, também mostram sinergismo com antimicrobianos comerciais. LyeTx I é um peptídeo linear com 25 resíduos de aminoácidos, inicialmente isolado da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*, e posteriormente obtido por síntese química, que apresentou potente atividade antimicrobiana. Um de seus derivados, LyeTx I-b, similar ao LyeTx I, mas sem o resíduo Hys16, foi ativo frente a diversas bactérias multirresistentes, dentre elas a *Acinetobacter baumannii*, resistente aos carbapenêmicos. Entretanto, sabe-se que esses peptídeos, em geral, apresentam elevada atividade hemolítica e citotóxica, bem como reduzida atividade *in vivo*. Visando minimizar essas limitações, propôs-se neste trabalho modificar e PEGuilar LyeTx I-b, e avaliar sua atividade e toxicidade em modelos *in vitro* e *in vivo*. O modelo *in vivo* foi o de pneumonia bacteriana causada por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos. Paralelo a isso, um estudo de revisão sistemática e meta-análise foi feito para verificar a taxa de resistência de *A. baumannii* às polimixinas. Este estudo mostrou que a taxa de infecção dessa bactéria no período de 2010 a 2018 foi de 13% em todo o mundo, e, para a América do Sul, o valor chegou a 60%. A PEGuilação do peptídeo (LyeTx I-bPEG) levou à diminuição de atividade antimicrobiana *in vitro* para diversas bactérias, sendo essa redução menor em *A. baumannii*. LyeTx I-bPEG foi mais ativo que LyeTx I-b na atividade antibiofilme e na prevenção de indução de resistência. Comparando a segurança de LyeTx I-bPEG e LyeTx I-b, o primeiro apresentou redução de até doze vezes nos valores de hemólise, e cerca de dez e duas vezes na toxicidade *in vitro* para as células VERO e HEK-293, respectivamente. A diminuição da toxicidade *in vivo* para LyeTx I-bPEG em relação à LyeTx I-b foi de quatro vezes em camundongos. Os valores encontrados mostraram que a PEGuilação foi fundamental para a redução da toxicidade e para a atividade *in vivo* em modelo de pneumonia por *A. baumannii*, pois a administração endovenosa de LyeTx I-bPEG em animais combateu eficazmente a infecção em todas as concentrações testadas, enquanto LyeTx I-b não foi ativo nas concentrações de $0,5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, sendo possivelmente degradado e/ou eliminado antes de alcançar seus alvos. Estes resultados mostraram que a PEGuilação do peptídeo LyeTx I-b possibilitou seu uso *in vivo*, mantendo atividade significativa contra a pneumonia causada por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos.

Palavras-chave: PEGuilação, LyeTx I-b, peptídeo antimicrobiano, meta-análise, *Acinetobacter baumannii* resistente, pneumonia por *A. baumannii*.

ABSTRACT

Reports of bacterial infections and deaths caused by resistant bacteria have increased globally over time. The World Health Organization (WHO) has been warning about the importance of developing new drugs effective against these superbugs. In this context, antimicrobial peptides are considered an alternative since most of them are involved in innate immunity, acting in different ways, and some also show synergism with commercial antimicrobials. LyeTx I is a linear peptide, with 25 amino acid residues isolated from the spider venom *Lycosa erythrognatha*. Later, it was also obtained by chemical synthesis and has shown potent antimicrobial activity. LyeTx I-b, the LyeTx I derivative that lacks the Hys16 residue, was active against several multidrug-resistant bacteria, including *A. baumannii* resistant to carbapenems. However, it is known that, LyeTx I-b has high hemolytic, cytotoxic, and reduced *in vivo* activities. To overcome these limitations, this work proposes the conjugation of LyeTx I-b with mPEG-MAL and tested its activity and toxicity *in vitro* and *in vivo* models. The *in vivo* model was based on multi-resistant bacterial pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. In a review study and meta-analysis, there was a significant rate of resistance of *A. baumannii* to colistin, one of the most potent and toxic antimicrobials registered and used against this bacterium. This analysis showed that the infection rate of this polymyxin-resistant bacterium in the evaluated period (2010 to 2018) was 13% worldwide, with the value reaching 60% in South America. LyeTx I-bPEG showed decreased activity *in vitro* for several bacteria; however, this reduction was smaller in *A. baumannii*. In antibiofilm activity and resistance induction, LyeTx I-bPEG was more active than LyeTx I-b. Additionally, LyeTx I-bPEG reduced by up to 12 times the values of hemolysis and, approximately 10 and 2 times, the *in vitro* toxicity for VERO and HEK-293 cells, respectively. The decrease in toxicity for LyeTx I-bPEG *in vivo*, compared to LyeTx I-b, was 4-fold in mice. The values found showed that PEGylation was fundamental for the reduction of toxicity and for *in vivo* activity in a model of *A. baumannii* pneumonia, considering that LyeTx I-bPEG, injected in the animals effectively fought the infection. At the same time, LyeTx I-b was not active at $0,5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in this model, possibly due to its degradation/elimination before reaching its targets. These results show that the PEGylation of the LyeTx I-b peptide enabled its use *in vivo*, maintaining significant activity against pneumonia caused by multidrug-resistant *A. baumannii*.

Key-words: PEGylation, LyeTx I-b, antimicrobial peptide, Meta-analysis, *Acinetobacter baumannii* resistant, Pneumonia by *A. baumannii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Peptídeos aprovados e/ou em diferentes fases de estudos clínicos, em diversas áreas, nos Estados Unidos, Europa e Japão no período de 2000 a 2016	18
Figura 2 – Esquema mostrando o mecanismo de ação e de resistência dos antimicrobianos	24
Figura 3 – Número de casos de infecção nos Estados Unidos no ano de 2000 a 2015	26
Figura 4 – Padrões de resistência e suscetibilidade de isolados clínicos de <i>S. aureus</i> resistentes a antimicrobianos comumente usados na clínica.....	28
Figura 5 – Ilustração mostrando o mecanismo de ação das polimixinas	30
Figura 6 - Ilustração mostrando o mecanismo de resistência da <i>Acinetobacter baumannii</i> às polimixinas	31
Figura 7 – Representação esquemática dos principais mecanismos de ação antibacteriana dos peptídeos antimicrobianos	33
Figura 8 – Estrutura em alfa-hélice determinada por RMN de LyeTx I-b	35
Figura 9 – Estrutura química geral dos polímeros PEG-OH e mPEG-OH.....	37
Figura 10 – Fluxograma dos artigos selecionados para a revisão sistemática	47
Figura 11 – Gráfico de funil da associação entre o tamanho estimado do efeito e seu erro padrão em estudos individuais	48
Figura 12 – Número de artigos selecionados de acordo com o ano de publicação	50
Figura 13 – <i>Forest plot</i> da taxa de resistência de infecções associadas a serviços de saúde por <i>A. baumannii</i> resistente às polimixinas entre 2010 e 2019	51
Figura 14 – Reação de formação do formazan a partir da redução de MTT em células	68
Figura 15 – Cromatograma de purificação de LyeTx I-b _{cys}	72
Figura 16 – Espectros MALDI-TOF MS da fração purificada do peptídeo LyeTx I-b _{cys}	73
Figura 17 – Espectro MALDI-TOF MS/MS da fração purificada de LyeTx I-b _{cys}	74
Figura 18 – Atividade antimicrobiana por disco difusão de LyeTx I-b e LyeTx I-b _{cys} em <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	75
Figura 19 – Espectro de massas da solução reacional de PEGuilação de LyeTx I-b _{cys}	77
Figura 20 – Espectro de massas da solução reacional de PEGuilação de LyeTx I-bPEG _{cys}	78

Figura 21 – Cromatograma de análise de LyeTx I-b _{cys}	79
Figura 22 – Cromatograma de purificação de LyeTx I-b PEG com detalhe dos picos cromatográficos do mPEG-MAL e do LyeTx I-bPEG	80
Figura 23 – Espectro de massas dos picos cromatográficos I e II do cromatograma da purificação	82
Figura 24 – Espectros de Dicroísmo circular de LyeTx I-bPEG	84
Figura 25 – Experimento em disco difusão de LyeTx I-bPEG, I <i>S. Aureus</i> (ATCC 33591) e II <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	85
Figura 26 – Comparativo médio dos valores de HC ₅₀ de LyeTx I-b e o LyeTx I-bPEG	87
Figura 27 – Curva dose-resposta da citotoxicidade de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG.....	88
Figura 28 – Esquema mostrando a reação química de conjugação do mPEG-MAL com o LyeTx I-b _{cys}	92
Figura 29 – Percentual de redução de biofilme <i>A. baumannii</i> por colistina, LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG	110
Figura 30 – Isoblograma da associação entre o LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG com meropenem, colistina, gentamicina e levofloxacino.....	112
Figura 31 – Potencial de indução de resistência pelo ensaio de múltiplas passagens.....	114
Figura 32 – Curva de morte de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos após a exposição à colistina em diferentes intervalos de tempo	115
Figura 33 – Atividade antibacteriana <i>in vivo</i> de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG, em infecção pulmonar causada por <i>A. baumannii</i> em camundongos	117
Figura 34 – Representação do modelo de biofilme com barreira de muco para tobramicina e para a tobramicina PEGuilada	119
Figura 35 – Resumo gráfico	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre o número de pacientes infectados e mortos por milhão de habitantes nos Estados Unidos por bactérias resistentes, ano de 2016	27
Tabela 2 – Valores de atividade hemolítica 50% (HC ₅₀) em µmol.L ⁻¹ de alguns peptídeos	36
Tabela 3 – Comparativo entre o incremento no tempo de meia-vida e a atividade mantida de fármacos PEGuilados disponíveis no mercado	38
Tabela 4 – Principais características dos estudos incluídos na análise, como ano, país, isolados e totais de infecções por <i>A. baumannii</i> resistentes às polimixinas.....	49
Tabela 5 – Análise de subgrupos por região e país do estudo	52
Tabela 6 – Comparativo dos parâmetros químicos entre o peptídeo LyeTx I-b e seu derivado LyeTx I-b _{cys}	71
Tabela 7 – Comparativo dos valores da concentração inibitória mínima (µmol.L ⁻¹) para o LyeTx I e seus derivados	76
Tabela 8 – Comparativo dos valores da concentração inibitória mínima do peptídeo LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG	86
Tabela 9 – Comparativo entre citotoxicidade em células VERO e HEK-293 para os peptídeos LyeTx I-b e o LyeTx I-bPEG	87
Tabela 10 – Índice de seletividade de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG	95
Tabela 11 – Identificação, origem clínica e perfil de resistência dos isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i>	100
Tabela 12 – Protocolo utilizado em modelo de pneumonia por <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente, em camundongos Balb/c	107
Tabela 13 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em µM de LyeTx I-b, LyeTx I-bPEG e colistina contra <i>A. baumannii</i>	109
Tabela 14 – Concentração inibitória fracionária (CIF) e índice CIF (ICIF) da combinação do peptídeo LyeTx I-b ou LyeTx I-bPEG com diferentes antimicrobianos contra <i>A. baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos	111
Tabela 15 – Ensaio de ressensibilização do <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos para o meropenem, gentamicina e levofloxacino.....	113
Tabela 16 – Concentração inibitória mínima em µM de LyeTx I-b, LyeTx I-bPEG e colistina, na presença de sais, soro fetal bovino, albumina bovina sérica e plasma humano, contra <i>Acinetobacter baumannii</i> AC37 resistente aos carbapenêmicos	116

LISTA DE ABREVIATURAS

- [θ]** – Concentração da elipticidade molar;
- ATCC** – *American type culture collection*;
- BHI** – Meio de cultura – infuso de cérebro-coração;
- CD** – Dicroísmo circular;
- CDC** – *Centers for Disease Control and Prevention*;
- CEUA** – Comitê de Ética no Uso de Animais;
- CIM** – Concentração inibitória mínima;
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência;
- CLSI** – *Clinical & Laboratory Standards Institute*;
- CRAB** – *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos;
- d.C.** – Depois de Cristo;
- Da** – Dalton;
- DCM** – Diclorometano;
- DIC** – Diisopropilcarbodiimida;
- DMEM** – Meio *Dulbecco's modified Eagle*;
- DMF** – Dimetilformamida;
- ECDC** – *European Centre for Disease Prevention and Control*;
- EDT** – 1,2-etanoditiol;
- ESKAPE** – *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter sp*;
- EUCAST** – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- FDA** – *Food and Drug Administration*;
- HC₅₀** – Hemólise em 50% de eritrócitos;
- HEK-293** – *Human embryonic kidney*;
- Hobt** – Hidroxibenzotriazol;
- IC₅₀** – Índice onde há 50% de citotoxicidade;
- i.p.** – Intraperitoneal;
- IRAS** – Infecções relacionadas à assistência à saúde;
- LyeTx I** – *Lycosa erythrognatha* toxina 1;
- LyeTx I-b** – *L. erythrognatha* toxina 1 sem a histidina 16;
- LyeTx I-b_{cys}** – *L. erythrognatha* toxina 1 sem histidina 16, e leucina 21 substituída por cisteína;

LyeTx I-bPEG – *L. erythrogna*th toxin 1-b PEGuilada;

m/z – Unidade massa/carga;

MALDI – Dessorção a laser assistida por matriz;

ME – Membrana externa de Gram-negativa;

MH – Meio *Mueller-Hinton*;

MM – Massa molar;

mPEG-MAL – Metil polietileno glicol maleimida;

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina;

MS – Espectrometria de massa;

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium;

N_L – Número de ligações peptídicas;

N_r – Número de resíduos carregados;

°C – Graus celsius;

OMS – Organização Mundial da Saúde;

PAM – Peptídeo antimicrobiano;

PEG – Polietileno glicol;

PIP – Piperidina;

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina;

POPG – 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol;

PRAB – *Acinetobacter baumannii* resistente às polimixinas;

RMN – Ressonância magnética nuclear;

r/min – Rotação por minuto;

SDS – Dodecilsulfato de sódio;

TCEP – Tris (2-carboxietil) fosfina;

TFA – Ácido trifluoracético;

TIS – Triisopropilsilano;

TOF – Tempo de voo;

UFC – Unidade formadora de colônia;

UV – Luz ultravioleta;

VERO – Células epiteliais de rim de *Cercopithecus aethiops*;

VRSA – *S. aureus* resistente a vancomicina;

XDR – Extensivamente resistente;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA.....	21
2.2	ANTIMICROBIANOS E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA ...	23
2.3	<i>Acinetobacter baumannii</i> RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS (CRAB) ..	28
2.4	LYETX I-B COMO POTENCIAL BIOFÁRMACO.....	34
2.5	PEGUILAÇÃO.....	36
3	OBJETIVOS GERAIS	40
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	CAPÍTULO I – TAXA DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS ENTRE <i>Acinetobacter baumannii</i> OBTIDA DE PACIENTES HOSPITALIZADOS NO MUNDO: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE	44
4.1	PARTE EXPERIMENTAL	44
4.1.1	Estratégia de busca	44
4.1.2	Seleção dos estudos	45
4.1.3	Extração e análise de dados	46
4.1.4	Análise estatística	46
4.2	RESULTADOS.....	47
4.3	DISCUSSÃO.....	53
4.4	CONCLUSÃO	57
5	CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO E PEGUILAÇÃO DE LYETX I-B_{CYS}	59
5.1	PARTE EXPERIMENTAL	59
5.1.1	Materiais e microrganismos	59
5.1.2	Síntese do peptídeo LyeTx I-b _{cys}	60
5.1.3	Conjugação com o mPEG-MAL	62
5.1.4	Purificação e caracterização do LyeTx I-b _{cys} e LyeTx I-bPEG	62
5.1.5	Estimativa da concentração molar do peptídeo	64
5.1.6	Análise por dicroísmo circular (CD).....	64
5.1.7	Avaliação da atividade antimicrobiana: disco difusão e determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	66
5.1.8	Determinação da atividade hemolítica	67
5.1.9	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	68
5.1.10	Índice de seletividade.....	70

5.1.11	Toxicidade aguda <i>in vivo</i>	70
5.2	RESULTADOS.....	71
5.2.1	Síntese do peptídeo LyeTx I-b e LyeTx I-b _{cys} e purificação.....	71
5.2.2	Atividade de LyeTx I-b _{cys} em bactérias <i>Gram-positivas</i> e <i>Gram-negativas</i>	74
5.2.3	PEGuilação do peptídeo LyeTx I-b _{cys}	76
5.2.4	Purificação do peptídeo PEGuilado	78
5.2.5	Dicroísmo circular (CD)	83
5.2.6	Atividades do peptídeo PEGuilado contra bactérias <i>Gram-positivas</i> e <i>Gram-negativas</i> (disco difusão)	85
5.2.7	Concentração inibitória mínima (CIM) com o peptídeo PEGuilado	86
5.2.8	Atividade hemolítica	87
5.2.9	Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT para células VERO e HEK-293 tratadas com os peptídeos.....	87
5.2.10	Toxicidade aguda.....	89
5.3	DISCUSSÃO.....	89
5.4	CONCLUSÃO	96
6	CAPITULO III – ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE LYETX I-BPEG EM <i>Acinetobacter baumannii</i> RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS.....	98
6.1	PARTE EXPERIMENTAL	98
6.1.1	Materiais e microrganismos	98
6.1.2	Preparo do inóculo	99
6.1.3	Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	101
6.1.4	Eficácia dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG sobre biofilme maduro de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos	102
6.1.5	Avaliação de possível efeito sinérgico.....	103
6.1.6	Ressensibilização de <i>A. baumannii</i> (resistente aos carbapenêmicos) aos antimicrobianos convencionais pelos peptídeos	104
6.1.7	Ensaio de indução de resistência.....	105
6.1.8	Ensaio de curva de morte	105
6.1.9	Ensaio de estabilidade em diferentes meios	106
6.1.10	Modelo <i>in vivo</i> de pneumonia causada por <i>Acinetobacter baumannii</i>	107
6.2	RESULTADOS.....	108
6.2.1	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	108
6.2.2	Eficácia sobre biofilme maduro de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos	110
6.2.3	Sinergismo	111

6.2.4	Ressensibilização do <i>A. baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos a antimicrobianos convencionais pelos peptídeos	113
6.2.5	Indução de resistência	113
6.2.6	Curva de morte	114
6.2.7	Ensaio de estabilidade em diferentes meios	115
6.2.8	Tratamento de pneumonia causada por <i>Acinetobacter baumannii</i> , em modelo <i>in vivo</i>	116
6.3	DISCUSSÃO.....	118
6.4	CONCLUSÃO	124
7	CONCLUSÃO DA TESE E RESUMO GRÁFICO	127
8	PERSPECTIVAS	130
9	REFERÊNCIAS	132
10	ANEXOS	150
10.1	CEUA – TOXICIDADE AGUDA.	150
10.2	CEUA – MODELO PNEUMONIA <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	151
10.3	SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO – SISGEN.....	152
11	APÊNDICE.....	155

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

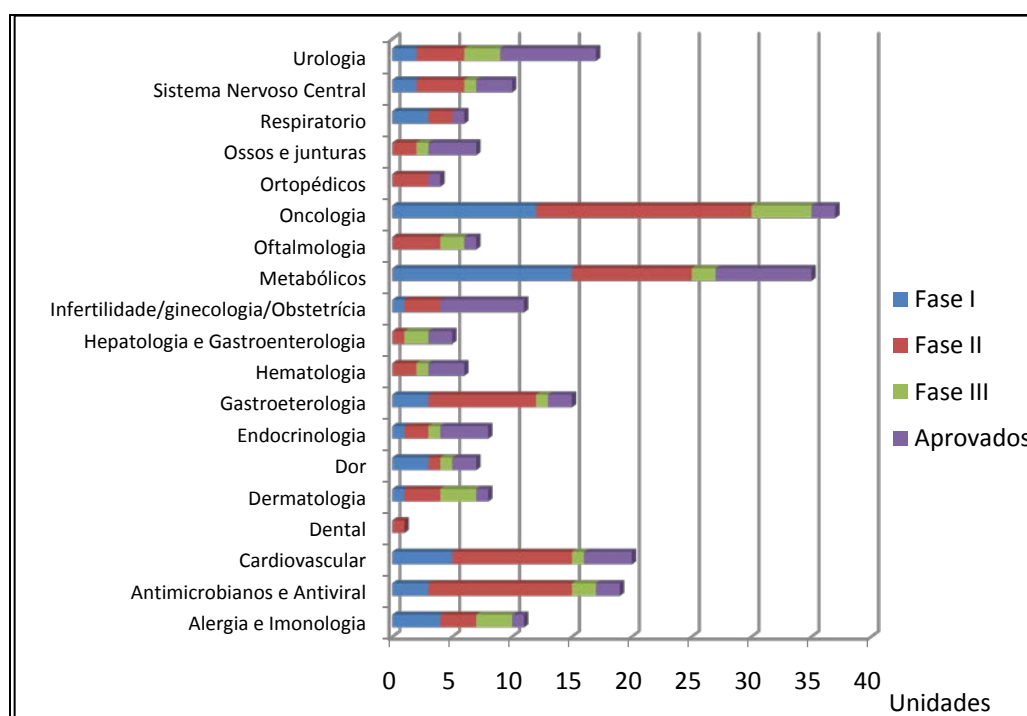
Em entrevista à imprensa espanhola, em 27 de maio de 2019, a cientista laureada com o prêmio Nobel em Química, Ada Yonath, afirmou: “Se não criarmos novos antimicrobianos, as pessoas morrerão aos 50 ou 60 anos, como antes”. Atualmente, morrem em média 700.000 pessoas por ano no mundo por infecções causadas por microrganismos resistentes (WHO, 2018; RODRÍGUEZ-VERDUGO *et al.*, 2020). Na maioria dos casos, essas infecções estão associadas às espécies de patógenos que formam o grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.), que recebe esse nome devido à notável habilidade que essas bactérias têm de se tornarem resistentes aos antimicrobianos convencionais (PLETZER, MANSOUR e HANCOCK, 2018).

Acinetobacter baumannii é uma bactéria Gram-negativa que causa até 20% das infecções em unidades de terapia intensiva (UTIs) em todo o mundo, sendo também hábil na aquisição de resistência aos antimicrobianos. Nas UTIs, as infecções por esse microrganismo normalmente estão associadas ao processo de ventilação mecânica, podendo essas atingir os pulmões e a corrente sanguínea (SOUZA *et al.*, 2014; HOWARD *et al.*, 2012).

Atualmente, os carbapenêmicos são os fármacos mais usuais no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* no ambiente hospitalar, e as polimixinas que são utilizadas quando há microrganismos resistentes a eles (RARO *et al.*, 2017). Entretanto, já foram identificados isolados de *A. baumannii* resistentes às polimixinas e, para eles, não há medicamento disponível na clínica atualmente (KO *et al.*, 2007; KO, CHOI e LEE, 2017; LIMA *et al.*, 2018). Nesse contexto, há necessidade premente pela busca de novos antimicrobianos contra esta e outras espécies de bactérias resistentes, como vêm destacando a OMS. Uma das opções promissoras são os peptídeos antimicrobianos (PAMs), que, além de possuírem atividade contra microrganismos multirresistentes, podem também apresentar efeito anti-inflamatório, o que contribui para o tratamento do processo infeccioso (CHEN e LU, 2020; FOSGERAU e HOFFMANN, 2015; KANG *et al.*, 2012; ZHANG e GALLO, 2016).

Há mais de 170 peptídeos em estudos em diferentes fases e diferentes abordagens clínicas, e mais de 50 foram registrados nos Estados Unidos, na Europa e no Japão nos últimos anos (FOSGERAU e HOFFMANN, 2015; HENNINOT, COLLINS e NUSS, 2017) (Figura 1).

Figura 1– Peptídeos aprovados e/ou em diferentes fases de estudos clínicos, em diversas áreas, nos Estados Unidos, Europa e Japão no período de 2000 a 2016



Fonte: Adaptado de Henninot, Collins e Nuss, (2017).

Em geral, peptídeos têm meia-vida plasmática circulante relativamente curta, pois são facilmente metabolizados e/ou excretados, o que impede ou dificulta o alcance aos seus alvos (MRSNY e DAUGHERTY, 2009). Porém, várias estratégias para extensão de meia-vida são conhecidas e utilizadas, tais como: identificação de possíveis locais de clivagem molecular, seguida de substituição dos aminoácidos-alvo, aumento da estrutura secundária dos peptídeos (dobragem) com a inserção de uma sonda indutora de estrutura (SIP), pontes de lactamas, grampeamento, clipagem de sequências peptídicas, ciclização e conjugação com albumina circulante ou com polímeros bionertes como, o polietileno glicol (PEG) (FOSGERAU e HOFFMANN, 2015).

Há cerca de uma década foram isolados peptídeos antimicrobianos da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*, e estes e seus derivados foram

sequenciados e sintetizados quimicamente (SANTOS *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2018, SILVA *et al.*, 2018, 2019, 2019, MELO-BRAGA *et al.*, 2020). O principal peptídeo obtido da aranha *L. erythrognatha* com atividade antimicrobiana denomina-se “LyeTx I” e desse surgiram outros derivados, como o peptídeo LyeTx I-b, obtido como subproduto de síntese e que possui uma histidina a menos que o LyeTx I. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a atividade deste peptídeo e de seus derivados (SANTOS *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2018).

Além da ação antimicrobiana, outros efeitos, tais como atividade antitumoral e antiinflamatória, também têm sido evidenciados nesses peptídeos (REIS *et al.*, 2018; ABDEL-SALAM *et al.*, 2019; MELO-BRAGA *et al.*, 2020). LyeTx I-b apresentou potente atividade antimicrobiana, *in vitro* e *in vivo*, inclusive para isolados multirresistentes, embora tenha apresentado considerável atividade hemolítica (REIS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019). Além disso, tem sido mostrado que peptídeos, em geral, são mais susceptíveis à lise em modelos *in vivo*. Assim, a estratégia escolhida para contornar esses pontos foi a PEGuilação. A conjugação de peptídeo com polietileno glicol poderia aumentar sua hidrossolubilidade e seu raio hidrodinâmico, protegendo-o contra ação de proteases plasmáticas, e também reduzir sua eliminação pelos glomérulos renais (PASUT e VERONESE, 2009). Portanto, a PEGuilação de LyeTx I-b poderia representar uma inovação radical por apresentar um novo produto com maior valor econômico devido à redução da toxicidade e ao aumento de estabilidade plasmática, o que possibilitaria formulações e o prosseguimento com os estudos de farmacocinética, pré-clínicos e clínicos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

O conceito de inovação (*kainotomia*) surgiu na Grécia Antiga e tinha como propósito “introduzir mudança na ordem estabelecida”. Porém, por ser considerado subversivo e/ou revolucionário, esse conceito foi proibido, perseguido e bastante combatido durante toda a Idade Média. Foi no Império Romano, século quatro, que se cunhou esse conceito como “*Inno*”, que em latim significa renovação, renascimento, regeneração e reforma. Contudo, somente por volta de 1297 d.C. foram encontrados em textos literários na França e na Inglaterra os primeiros relatos da grafia “inovação” como é conhecida atualmente, cujo conceito associava-se ao empreendedorismo e à criatividade (GODIN, 2015).

Inovação pode ser entendida como uma mudança intencional e planejada, podendo ser iniciada na pesquisa básica, passando para a aplicada e, então, seguir para o desenvolvimento do produto ou serviço (modelo linear de inovação) (GODIN, 2015). O economista Schumpeter tratou a inovação em seu livro “*Capitalism, Socialism and Democracy*”, em 1942, como um processo de destruição criadora nas economias. Ele afirmou que a inovação moderniza e favorece o crescimento econômico nas empresas. Esse conceito remete ao concebido na Grécia Antiga, que caracterizava a inovação como “mudança na ordem estabelecida”, porém planejada e necessária para o desenvolvimento das empresas (SCHUMPETER, 1942).

As ideias de Schumpeter sobre o tema foram estudadas por diversos pesquisadores contemporâneos e, dentre os chamados neo-schumpeterianos, Achilladelis e Antonakis (2001) foram os primeiros a dar foco à indústria farmacêutica. Eles afirmaram que a indústria farmacêutica, ao longo de seus anos de existência, se mostrou intensiva e inovadora com investimentos em pesquisa, e que, desde sua criação tem mantido estreita e fecunda relação bidirecional com instituições de pesquisas acadêmicas em Química, Biologia, Farmácia e Medicina. Eles ressaltaram que as inovações da indústria farmacêutica criaram negócios

prósperos e lucrativos, e que essas inovações, como por exemplo, a penicilina, podem afetar profundamente a natureza e a estrutura de nossa sociedade. Esse antibiótico, descoberto por Alexander Fleming em 1928, revolucionou o tratamento de diversas infecções bacterianas e impactou positivamente na demografia mundial. Os autores demonstraram em seus trabalhos que a inovação radical é a mais aplicada à indústria farmacêutica. Esse tipo de inovação implica processo, produto ou serviço, com características sem precedentes ou não conhecidas, e que promovem melhorias significativas de desempenho ou custo, transformando ou criando novos mercados (LETTL *et al.*, 2006).

A cadeia farmacêutica pode ser classificada em quatro estágios de maturidade tecnológica: o **estágio um**, onde são realizadas pesquisas e descobertas de novos fármacos, podendo partir da pesquisa básica até os testes clínicos; o **estágio dois**, onde a indústria realiza a produção do insumo farmacêutico ativo, ou seja, possui tecnologia aplicada em química fina; o **estágio três**, onde são realizadas a formulação e a produção, e o **estágio quatro**, quando se realiza a comercialização (VIEIRA e OHAYON, 2008). Os países que dominam os estágios um e dois encontram-se na vanguarda da inovação farmacêutica, como Estados Unidos, Reino Unido e Alemanha. No Brasil, de modo geral, há empresas que atuam nos estágios três e quatro (VIEIRA; OHAYON, 2008). Quanto à biotecnologia, cabe ressaltar que o Brasil se destaca internacionalmente pela inovação em áreas como: desenvolvimento e produção de vacinas, soros hiperimunes e produtos obtidos pela purificação de venenos e de outras matrizes biológicas (DE SOUZA *et al.*, 1988; STOLF 1998; LAROCCA *et al.*, 2016). A biotecnologia é o “conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos e/ou seus derivados para a produção ou modificação de produtos e processos para uso específico ou para a geração de novos serviços, em diversos segmentos industriais (MAYERHOFF *et al.* 2007). Para desenvolvimento da biotecnologia, além de uma ampla pesquisa acadêmica e científica associada a um setor produtivo hábil, é fundamental que o país possua ambiente regulamentador que incentive a pesquisa e a proteção da propriedade intelectual.

A propriedade intelectual pode ser definida como o ramo do Direito no qual a legislação do país assegure aos inventores ou criadores de uma invenção a exclusividade em um período de tempo. Essa abrange patente, marcas, desenho

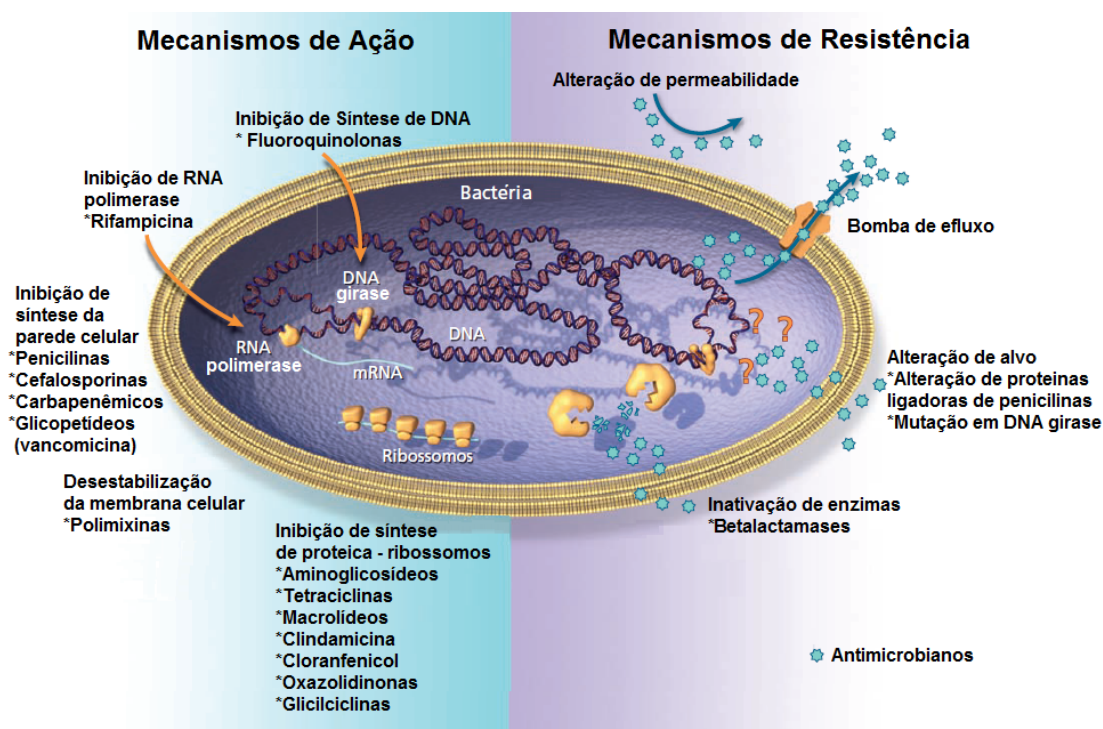
industrial e indicação geográfica (COTTIER, 2005). A patente é uma concessão pública, na qual seu titular tem o direito exclusivo de produção, comercialização e importação de um produto ou serviço dentro dos territórios. Essa deve ser registrada e concedida por órgãos definidos pelo governo, sendo, no Brasil, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial, INPI, e deve atender a três requisitos definidos pela Lei 9.279, de 14 de maio de 1996 (BRASIL, 1996): novidade, atividade inventiva e aplicação industrial.

2.2 ANTIMICROBIANOS E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA

Os antimicrobianos são medicamentos complexos e largamente utilizados no ambiente ambulatorial e na comunidade. Atualmente, conhecem-se treze diferentes classes de antimicrobianos, de acordo com sua origem e grupo farmacofórico, podendo algumas dessas classes se subdividir, como os betalactâmicos, que possuem quatro subclasses (ANVISA, 2020). Os mecanismos de ação dos antimicrobianos são distintos para cada classe e estão ilustrados na Figura 2.

Na última década, a humanidade tem experimentado a escalada alarmante de infecções por microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado, com destaque aos membros do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp) (TAUBES, 2008).

Figura 2 – Esquema mostrando o mecanismo de ação e de resistência dos antimicrobianos



Fonte: Adaptado de Mulvey, Simor, (2009).

Os mecanismos de resistência são complexos e podem ser específicos para cada classe de antimicrobianos, bem como para cada microrganismo. Esses podem ocorrer principalmente pela diminuição da permeabilidade do antimicrobiano (alteração das proteínas transportadoras), aumento da expulsão dos antimicrobianos (expressão de bombas de efluxo), alteração do alvo molecular (mutações em genes alvo), degradação do antibiótico (expressão de enzimas com afinidade por esses medicamentos) e criação de barreira física para o acesso do antibiótico a alvos intracelulares (aumento da síntese ou alteração da rota biossintética de vias metabólicas alvos de antimicrobianos) (AKLN, YAZAR, DOĞAN 2018; LIMA *et al.*, 2018; MUNITA, ARIAS 2016; WONG, CHAN, CHEN 2015; ZGURSKAYA, LOPEZ, GNANAKARAN 2015). Por fim, alguns microrganismos podem alterar suas taxas de replicação e permanecer na fase estacionária de crescimento; como os antimicrobianos agem em células em fase logarítmica, essas bactérias se tornam resistentes à ação desses compostos (Figura 2) (LIMA *et al.*, 2018; MUNITA e ARIAS 2016; WONG, CHAN e CHEN 2015; ZGURSKAYA, LOPEZ e GNANAKARAN, 2015).

As infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos levam a óbito cerca de 700 mil pessoas por ano em todo o mundo; e, se elas não forem contidas, esse número pode ultrapassar 10 milhões até 2050 e superar doenças crônicas como o diabetes e o câncer (HALL; MCDONNELL; O'NEILL, 2018).

Nessa direção, a OMS listou, em fevereiro de 2017, as superbactérias que ameaçam a saúde global (Quadro 01) e classificou os microrganismos resistentes em três classes de prioridade: crítica, alta e média, e, dentre elas, cita *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) como uma espécie de crítica necessidade para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (WHO, 2017). Esse alerta para a comunidade científica e para as empresas farmacêuticas sobre a urgência do tema também foi consolidado por diversos periódicos científicos. Uma dessas publicações destacou que, em setembro de 2016, existiam centenas de compostos antitumorais e apenas 40 antimicrobianos em estudos clínicos nos Estados Unidos (WILLYARD, 2017).

Quadro 01 – Lista das superbactérias divulgada pela OMS em 2017

Prioridade	Bactéria	Resistência
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenêmicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Enterobacterales</i>	
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina e Vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonella spp</i>	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolonas

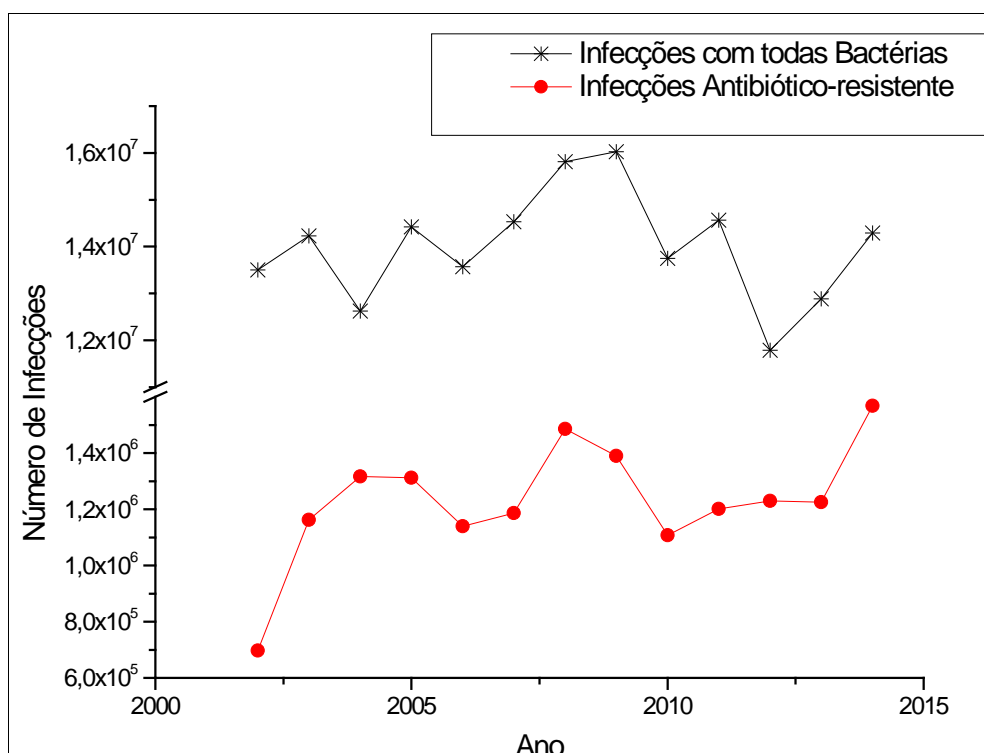
Fonte: WHO (2017).

De um modo geral, as empresas farmacêuticas consideram que as infecções atuais estão controladas pelos antimicrobianos registrados e que o número de casos de infecções causadas por bactérias multirresistentes apresenta baixa prevalência. Ademais, esses medicamentos são utilizados por curto período de tempo e

poderiam representar baixo volume em vendas se comparados com outros fármacos, por exemplo, os antitumorais (WILLYARD, 2017).

Na contramão, Thorpe, Joski e Johnston (2018) descreveram que a média anual de infecções por bactérias nos Estados Unidos, no período de 2000 a 2015, variou pouco, porém, o grupo das bactérias resistentes apresentou uma tendência crescente e que se duplicou entre os anos de 2002 e 2003, chegando a mais de 1,5 milhões de pacientes infectados (Figura 3). Os autores também estimaram que, para cada paciente infectado por bactéria resistente, há incremento médio nos gastos com o tratamento da infecção de 1.383 dólares. Portanto, somente os Estados Unidos gastaram mais de dois bilhões de dólares para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes em 2015, com quase 500 milhões de dólares somente para o custeio de antimicrobianos.

Figura 3 – Número de casos de infecção nos Estados Unidos no ano de 2000 a 2015



Fonte: Thorpe, Joski e Johnston (2018).

Outro estudo sobre infecções realizado nos Estados Unidos em 2016 isolou as principais bactérias resistentes, mediu a letalidade e calculou o custo do tratamento (Tabela 1). Esse estudo mostrou a alta prevalência do grupo ESKAPE, com destaque para a *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), que apresentou

maior taxa de infecção e letalidade em comparação com as demais. Esse microrganismo infectou mais 80 mil pessoas, com óbito de mais de 13% e com custo de mais de 115 milhões de dólares (SHRESTHA *et al.*, 2018). Já a *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) apresentou mais de 7.500 pacientes infectados e custo superior a 10 milhões de dólares (SHRESTHA *et al.*, 2018).

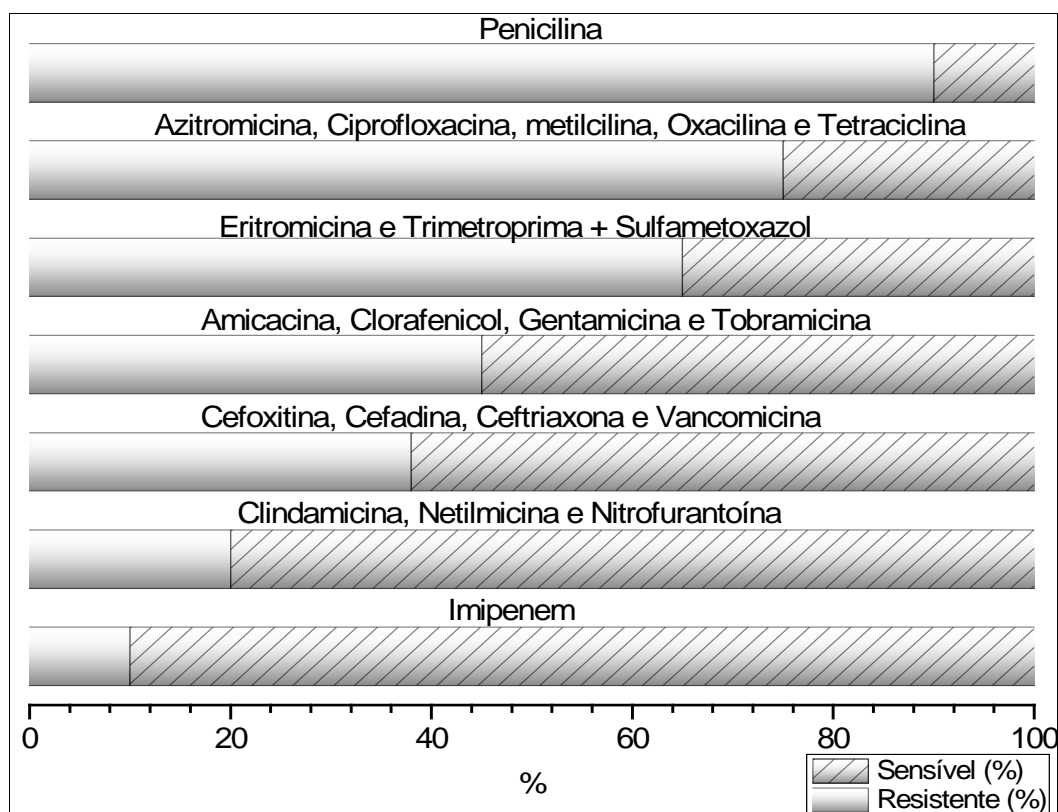
Tabela 1 – Comparação entre o número de pacientes infectados e mortos por milhão de habitantes nos Estados Unidos por bactérias resistentes, ano de 2016

Bactéria	Resistência	Nº. Infecções	Nº. Mortes
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina	252	35
<i>Escherichia coli</i>	Cefalosporinas de terceira geração	33	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		78	5
<i>A. baumannii</i>	Carbapenêmicos	23	2
<i>P. aeruginosa</i>		21	1

Fonte: Shrestha *et al.* (2018).

Munita e Arias (2016) destacaram que os microrganismos patogênicos *E. coli* e *S. aureus* são potencialmente resistentes a diversos antimicrobianos. Hasan *et al.* (2016) isolaram *S. aureus* na pele de pacientes queimados e avaliaram sua resistência a diversos antimicrobianos amplamente utilizados nos hospitais (Figura 4), e encontraram 20 isolados resistentes. Por exemplo, a penicilina, fármaco bastante prescrito em décadas passadas, não apresentou atividade para mais de 90% dos isolados e a vancomicina, que, além de possuir elevada potência e ser bastante utilizada na clínica, não foi eficaz para aproximadamente 40% dos isolados de *S. aureus* (HASAN *et al.*, 2016).

Figura 4 – Padrões de resistência e suscetibilidade de isolados clínicos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos comumente usados na clínica



Fonte: Hasan *et al.*, 2016.

2.3 *Acinetobacter baumannii* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS (CRAB)

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo Gram-negativo, não fermentador de glicose, não móvel, catalase positivo, oportunista e capaz de formar biofilmes em vários dispositivos médicos (HOWARD *et al.*, 2012; JUNG, PARK, 2015). Essa bactéria tem a capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies e adquirir resistência a vários antimicrobianos. Dentre estes, destacam-se os carbapenêmicos (CRAB), o que a torna um problema de saúde pública (ESPINAL, MARTÍ, VILA, 2012). A importância da *A. baumannii* se destaca em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) envolvendo praticamente todos os locais do organismo humano e com alta taxa de mortalidade (LIMA *et al.*, 2018).

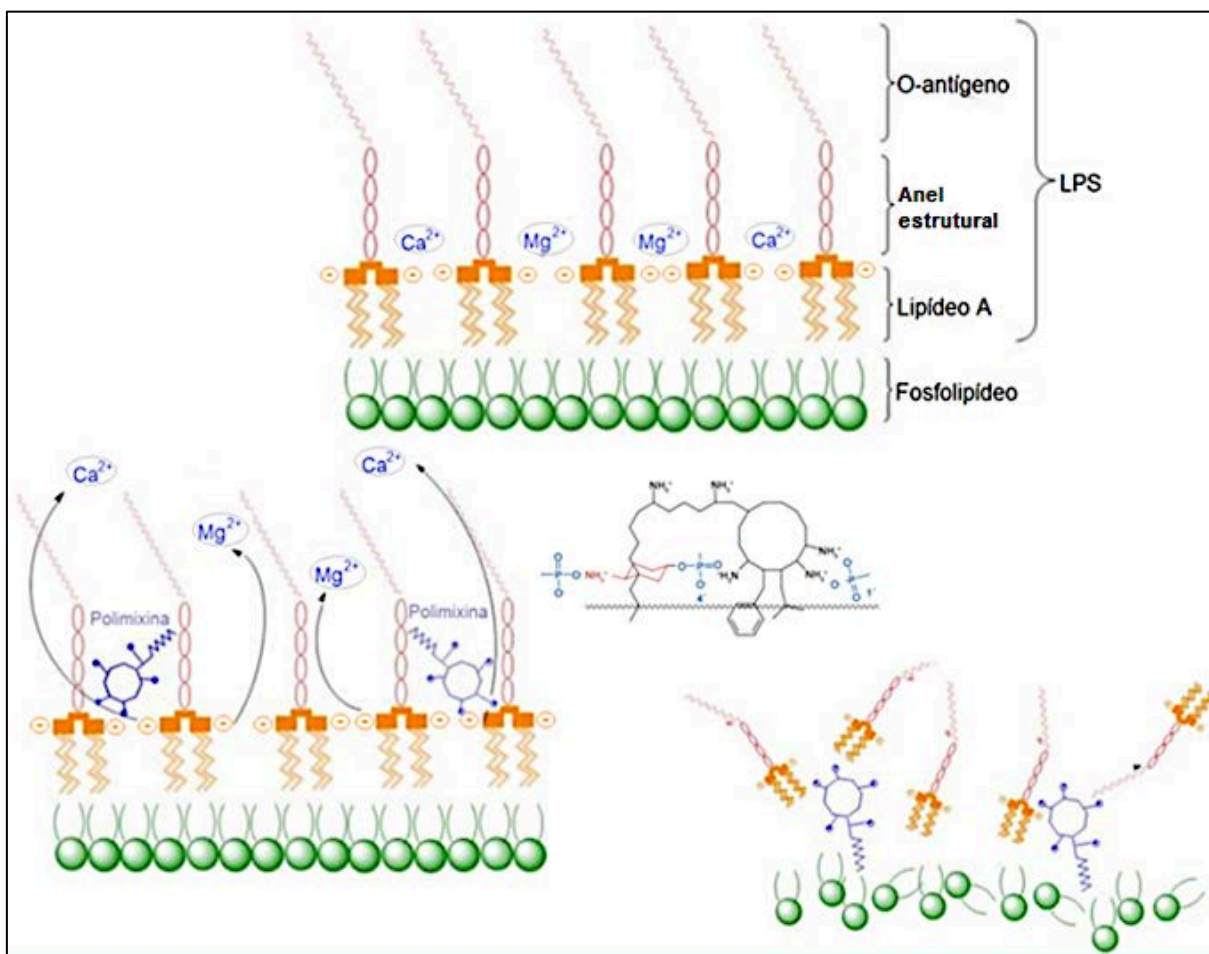
Os primeiros casos relacionados à CRAB foram relatados em 1991, porém suas taxas de infecção no mundo aumentam anualmente (URBAN *et al.*, 1993; LIMA

et al., 2018). Esses isolados exibem resistência a outras classes de antimicrobianos, como quinolonas, aminoglicosídeos e betalactâmicos (LIMA *et al.*, 2019a). Assim, com poucas opções terapêuticas para tratar infecções por CRAB, a única opção é o uso das polimixinas (ESPINA *et al.*, 2012; HOWARD *et al.*, 2012). Devido ao aumento da prevalência de CRAB, principalmente no ambiente ambulatorial, a polimixina B e a colistina (polimixina E) passaram a ser utilizadas de forma rotineira para o tratamento dessas infecções, mesmo estes antimicrobianos sendo nefrotóxicos e colocando em risco a vida do paciente (FALAGAS; KASIAKOU; SARAVOLATZ, 2005; ESPINAL, MARTÍ, VILA, 2012, HOWARD *et al.*, 2012; YUN *et al.*, 2017).

As polimixinas são polipeptídios cíclicos catiônicos que apresentam atividade contra bacilos Gram-negativos multirresistentes. Esses fármacos interagem com moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa das bactérias, retirando íons cálcio e magnésio, que são indispensáveis à estabilidade desses polissacarídeos, levando à desestabilização da membrana e morte bacteriana (OLAITAN, MORAND, ROLAIN, 2014; VOGLER, STUDER, 1996) (Figura 5).

Porém, a *Acinetobacter baumannii* pode apresentar resistência adquirida às polimixinas causada por mutações cromossômicas associadas ou não à membrana externa. Os principais mecanismos associados às alterações de membrana externa são: síntese da biotina (cofator para síntese de LPS) e mutações que envolvem os genes *pmr*, *lpx*, *lps*, *lptD* e *vacJ* (LIMA *et al.*, 2018). Outro mecanismo envolve a aquisição do gene plasmidial *mcr-1*, que também está associado às alterações da membrana externa (HAMEED *et al.*, 2019). Esses mecanismos são demonstrados com detalhes na Figura 6 (HAMEED *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2018; WONG, CHAN, CHEN, 2015).

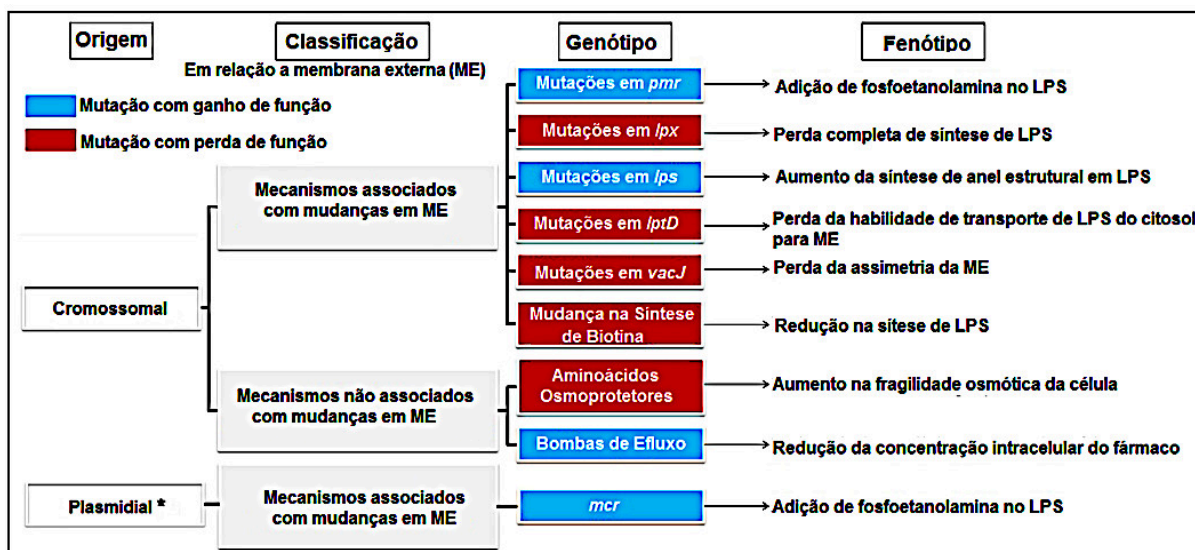
Figura 5 – Ilustração mostrando o mecanismo de ação das polimixinas



Fonte: Velkov, *et al.* (2013) e Deris, *et al.* (2014)

Os mecanismos de resistência da *A. baumannii* às polimixinas que não estão associados às alterações de membrana externa estão ligados à bomba de efluxo e ao acúmulo de aminoácidos osmoprotetores. A bomba de efluxo atua alterando a concentração intracelular do fármaco, e os aminoácidos osmoprotetores aspartato, glicina e prolina protegem as bactérias do estresse osmótico (Figura 6) (HAMEED *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2018; WONG, CHAN, CHEN, 2015).

Figura 6 - Ilustração mostrando o mecanismo de resistência da *Acinetobacter baumannii* às polimixinas



Fonte: Lima, *et al.* (2018)

O conhecimento da taxa de resistência da *A. baumannii* à colistina é de alta relevância, por identificar sua distribuição no mundo, bem como os fatores ligados à sua causa e controle. Essas informações contribuem para definição de políticas de Saúde Pública e para o desenvolvimento de novos antimicrobianos nas empresas e organismos públicos (VAN *et al.*, 2015). Nesse contexto, as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) causadas por *Acinetobacter baumannii* resistentes às polimixinas (PRABs) representam um problema premente, e se agravam pelo fato de não haver medicamentos registrados e disponíveis no mercado farmacêutico para seus tratamentos.

2.4. PEPTÍDEOS COMO FONTES DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos e proteínas são compostos formados por aminoácidos unidos por ligações amídicas, também chamadas de peptídicas, e se diferenciam pelo número de resíduos de aminoácidos, composição e ordem. Os peptídeos possuem de dois a cinquenta resíduos de aminoácidos, e as proteínas podem conter cadeias polipeptídicas com até vários milhares de resíduos de aminoácidos (WIELAND, BODANSZKY, 1991).

A aplicação das proteínas e peptídeos como moléculas terapêuticas é de grande importância para o tratamento de várias doenças devido às altas especificidades e atividades que apresentam, em concentrações relativamente pequenas quando comparadas aos fármacos convencionais (MEIBOHM, DERENDORF, 2006; MRSNY, DAUGHERTY, 2009).

Os peptídeos podem desempenhar diversas atividades biológicas, tais como: sinalizadoras, hormonais, antitumorais e antimicrobianas e podem ser encontrados em plantas e animais (FALCIANI *et al.*, 2014; OTVOS, 2008; SHAFER, 2006; SHIMONISHI, 2007; SPITZNAGEL, 1998).

A busca por peptídeos antimicrobianos (PAMs) se dá em distintas matrizes e os venenos apresentam-se como uma fonte conhecida e bastante explorada na bioprospecção de peptídeos. Por exemplo, os peptídeos licocitina 1, 2 e 3, obtidos da peçonha da aranha *Lycosa singoriensis* e seus peptídeos sintéticos homólogos inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*), Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e de fungos (*Candida albicans*) em baixas concentrações (BUDNIK *et al.*, 2004). No veneno de outra aranha, a *Cupiennius salei*, foram isolados cinco peptídeos com atividade antimicrobiana para *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. denitrificans* e *P. putida* (HAEBERLI *et al.*, 2000; VASSILEVSKI *et al.*, 2009; KUHN-NENTWIG *et al.*, 2013; GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 2016). Melo-Braga *et al.* (2020) abordou com detalhes em uma revisão os PAMs encontrados em venenos da Família Lycosidae, sendo um deles o LyeTx I, o qual derivou o LyeTx I-b e o LyeTx I-bPEG, alvo dessa tese.

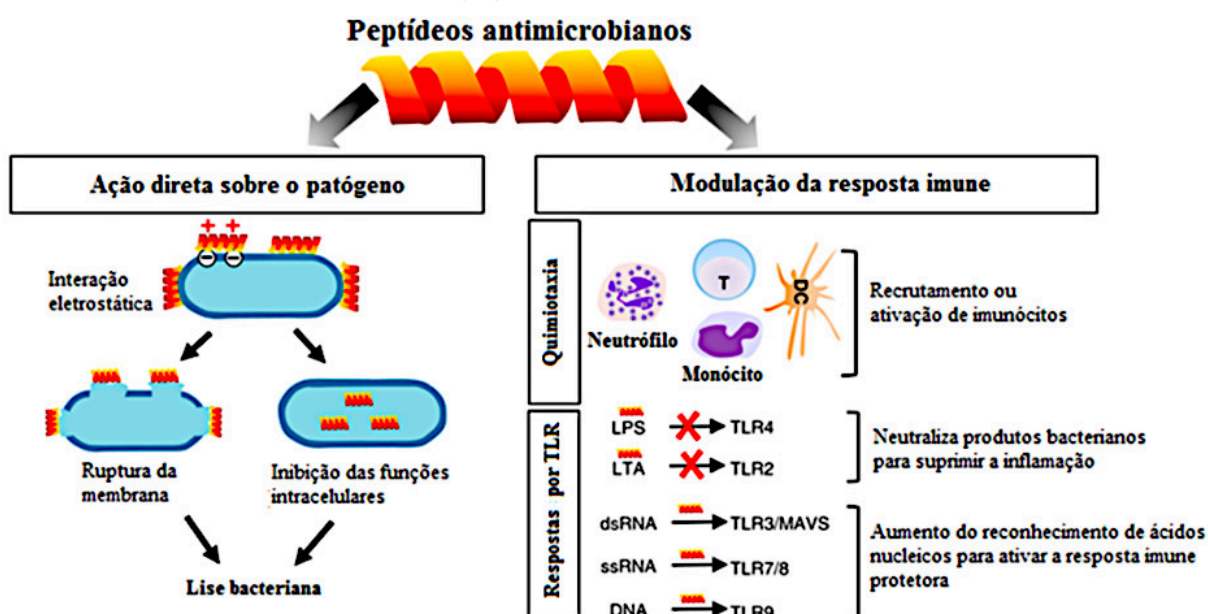
O número de PAMs é tão vasto, que a Universidade de Nebraska¹ mantém um banco de dados que conta, atualmente, com 3217 peptídeos antimicrobianos de seis reinos: 357 bacteriocinas/peptídeos antimicrobianos de bactérias, 5 de archaea, 8 de protistas, 20 de fungos, 360 de plantas e 2385 de animais, incluindo alguns peptídeos sintéticos com diversas atividades (APD, 2020).

Os peptídeos antimicrobianos se destacam em relação aos antimicrobianos tradicionais pelo seu potencial bactericida, atividade anti-inflamatória e na modulação do sistema imunológico (Figura 7) (CHEN, LU, 2020, FOSGERAU,

¹<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, acesso em 13 de julho de 2020.

HOFFMANN, 2015; KANG *et al.*, 2012; ZHANG, GALLO, 2016). Uma ação bastante conhecida refere-se à sua atividade sobre os fosfolipídios de membrana plasmática de bactérias e/ou de fungos, aumentando sua permeabilidade e levando ao extravasamento do material celular e à morte do microrganismo (SHAFER, 2006; GIULIANI, RINALDI, 2010; DRIDER, REBUFFAT, 2011; HIEMSTRA, ZAAT, 2013; BOBONE, 2014; FALCIANI *et al.*, 2014).

Figura 7 – Representação esquemática dos principais mecanismos de ação antibacteriana dos peptídeos antimicrobianos



Obs.: T: linfócito T; DC: células dendríticas; LPS: lipopolissacarídeo; LTA: ácido lipoteicoico; TLR: receptores do tipo Toll; dsRNA: ácido ribonucleico de fita dupla; ssRNA: ácido ribonucleico de fita simples; DNA: ácido desoxirribonucleico.

Fonte: Adaptado de Zhang e Gallo, 2016.

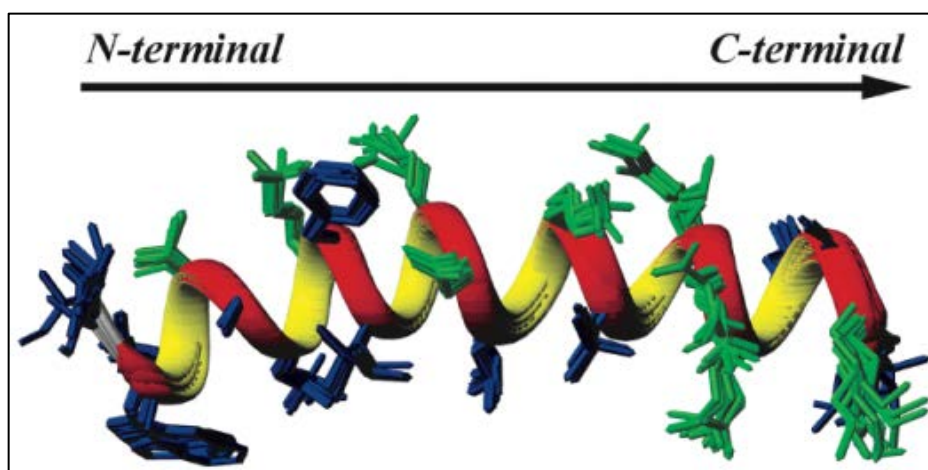
O principal mecanismo de ação dos peptídeos se dá por suas habilidades de interagir com a membrana bacteriana, pois os peptídeos catiônicos são carregados positivamente, e as membranas bacterianas possuem geralmente carga negativa. Essa interação leva à formação de poros na membrana, com consequente lise celular, resultando no efeito bactericida (Figura 7) (BAHAR, REN, 2013; LAZAREV, GOVORUN, 2010; MALMSTEN, 2014). Além disso, outros PAMs atravessam a membrana bacteriana e podem inibir enzimas essenciais ou interferir na síntese de ácidos nucleicos e proteínas (BROGDEN, 2005; ZHANG; GALLO, 2016).

2.4 LyeTx I-b COMO POTENCIAL BIOFÁRMACO

Santos *et al.* (2010) isolaram, sintetizaram e caracterizaram o peptídeo denominado “LyeTx I” a partir do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha* (Sundevall, 1833), conhecida como “aranha de jardim”. Esse peptídeo de 25 resíduos de aminoácidos (sequência H-IWLTALKFLGKNLKGHLAKQQLAKL-NH₂) mostrou-se ativo contra fungos como *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* e contra bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 2010). Contudo, apresentou elevada atividade hemolítica em sangue de coelho (HC₅₀ 1,3 x10⁻⁴ M). Análise de ressonância magnética nuclear (RMN) deste peptídeo feita por Santos *et al.* (2019) mostrou sua conformação em alfa-hélice e caráter anfipático. Também foi mostrado que a inclusão do LyeTx I em ciclodextrinas manteve sua atividade antimicrobiana nas bactérias Gram-negativas *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, associadas às doenças periodontais. Em algumas dessas linhagens, a atividade antimicrobiana foi significativamente aumentada em até mil vezes com o uso desse carboidrato (CONSUEGRA *et al.*, 2013). O peptídeo também inibiu a proliferação de células epiteliais, não alterou a viabilidade de condrócitos em cultura e se mostrou como potencial antimicrobiano para as infecções relacionadas à placa gengival (DE LIMA *et al.*, 2012).

Um subproduto da síntese de LyeTx I contendo uma histidina (H16) a menos que o peptídeo original, denominado “LyeTx I-b”, também foi caracterizado quimicamente e estudado quanto à sua atividade antimicrobiana. Santos *et al.* (2010) observaram por análises de bioinformática que o LyeTx I sem o resíduo de histidina apresentava maior caráter anfipático, e assim poderia apresentar maior atividade antimicrobiana, comparada ao peptídeo nativo. Tal hipótese foi confirmada por Afonso (2015) que demonstrou que o Des-His16-LyeTx I (LyeTx I-b) foi mais ativo como antimicrobiano do que seu precursor LyeTx I. A Figura 8 mostra a estrutura do peptídeo LyeTx I-b determinada por espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RNM), um antimicrobiano de amplo espectro com elevada atividade em isolados de bactérias resistentes Gram-positivas e Gram-negativas em condições planctônicas, biofilmes e em modelos de artrites sépticas em camundongo (REIS *et al.*, 2018).

Figura 8 – Estrutura em alfa-hélice determinada por RMN de LyeTx I-b



Obs.: Os resíduos hidrofílicos estão identificados na cor verde e hidrofóbicos na cor azul.

Fonte: Reis *et al.*, (2018).

O peptídeo LyeTx I e seus derivados já foram objeto de depósito de quatro patentes, três delas relativas às suas atividades antimicrobianas, e uma sobre atividade antitumoral. São elas: BR n. PI2348A – “Composições farmacêuticas compreendendo peptídeos catiônicos incluídos e/ou associados à ciclodextrinas e usos” (DE LIMA *et al.*, 2012); BR n. PI028133-7A – “Peptídeo antimicrobiano, composições farmacêuticas e usos” (DE LIMA *et al.*, 2017); BR n. PI070945-2A – “Composições farmacêuticas para o tratamento de artrite séptica e usos” (DE LIMA *et al.*, 2018); e BR n. 016318-3A – “Composição farmacêuticas para aplicação intravítrea e seu uso no tratamento de doenças da retina” (CUNHA-JR *et al.*, 2018). O peptídeo LyeTx I-b também exibiu atividade antitumoral contra células de glioblastoma em cultura (ABDEL-SALAM *et al.*, 2018), e recentemente foi demonstrada significativa atividade de LyeTx I-b contra células em cultura de câncer de células de mama triplo-negativo; essa atividade apresentou sinergismo com a cisplatina (AVELAR, 2019).

Muitos peptídeos antimicrobianos podem também apresentar alta atividade hemolítica. A concentração de peptídeo que lisa 50% dos glóbulos vermelhos é conhecida como atividade hemolítica HC_{50} e é usada para quantificar a toxicidade *in vitro* em eritrócitos (ODDO, HANSEN, 2017). O valor de HC_{50} dos peptídeos antimicrobianos hidrofóbicos é conhecidamente baixo, o que os torna produtos potencialmente tóxicos em administrações endovenosas (RUIZ *et al.*, 2014). Na

Tabela 2, são mostrados valores de HC₅₀ de alguns peptídeos, incluindo a melitina, que é um peptídeo antimicrobiano presente no veneno de abelhas e vespas.

Tabela 2 – Valores de atividade hemolítica 50% (HC₅₀) em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de alguns peptídeos

Peptídeos	Sequência	HC50
Melitina	GIGAVLKVLTGGLPALISWIKRKRQQ	1,7
MG-H1	GIKKFLHIIWKFIFAFVGEIMNS	2,9
Pis-1	FFHHIFRGIVHVGKTIHRLVTG	11

Fonte: Adaptado de Ruiz *et al.* (2014).

2.5 PEGUILAÇÃO

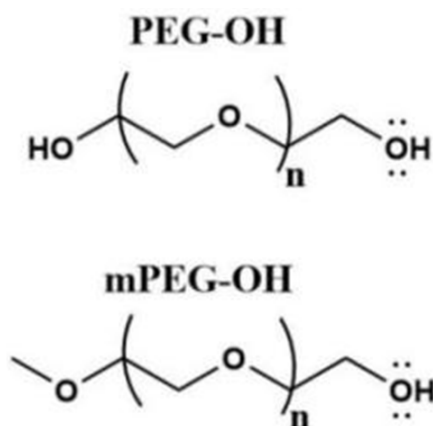
Proteínas e peptídeos são pouco estáveis em modelo *in vivo*; apresentam estrutura química complexa e podem apresentar baixa permeabilidade nos compartimentos biológicos (DAVIS, ILLUM, TOMLINSON, 2013). Essas moléculas podem também apresentar meias-vidas curtas devido à degradação enzimática em seus locais de administração ou durante o seu percurso para os locais de ação (DAVIS, ILLUM, TOMLINSON, 2013; OFFMAN, EDGINTON, 2015, 2017; PHOENIX *et al.*, 2012). Devido a esses fatores, manter a dose terapêutica com esses compostos é complexo; e para contornar esses desafios, faz-se uso de formulações farmacêuticas e/ou modificações químicas, por exemplo: alterar sua composição de resíduos de L-aminoácidos para D-aminoácidos ou conjugação com compostos bioinertes, como o polietileno glicol (VERONESE, 2009).

A conjugação química com polietileno glicol, conhecida como PEGuilação, é uma técnica utilizada para prolongar o tempo de permanência das proteínas e peptídeos no organismo, pois diminui a sua taxa de eliminação plasmática, a degradação metabólica e a endocitose (PASUT, VERONESE, 2009). Essa técnica iniciou-se em 1977 com a conjugação covalente de polietileno glicol (PEG) com albumina (ABUCHOWSKI *et al.*, 1977). O PEG é um poliéter de etileno glicol linear de 44Da $[-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-]$, solúvel em água e solventes orgânicos, podendo ser encontrado comercialmente na forma metoxilada (com grupo $-\text{CH}_3$ em uma de suas

extremidades) mPEG (HAMIDI, AZADI, RAFIEI, 2006; KUMAR *et al.*, 2011) (Figura 9). O mPEG comercial possui índice de dispersão (medida da heterogeneidade de tamanhos de moléculas de PEG) que geralmente pode estar entre 1,01 a 1,08 (VERONESE, 2001; ROBERTS, BENTLEY, HARRIS, 2002; NEKTAR, 2004; FEE, VAN ALSTINE, 2006).

A PEGuilação pode ocultar regiões imunogênicas de polipeptídios e proteínas, reduzindo assim o reconhecimento e o *clearance* pelo sistema reticuloendotelial e também a degradação por enzimas proteolíticas (JEVSEVAR *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2011). O PEG também aumenta o tamanho do polipeptídio e, conseqüentemente, reduz sua filtração renal, alterando sua biodistribuição (KUMAR *et al.*, 2011).

Figura 9 – Estrutura química geral dos polímeros PEG-OH e mPEG-OH



Fonte: Cordeiro, *et al.* (2020).

A PEGuilação de proteínas é obtida por reações químicas entre a proteína ou peptídeo e o PEG anteriormente ativados. Ela se dá entre o grupo químico reativo presente na biomolécula e o presente no PEG ativado (VERONESE, 2001). Existem vários grupos químicos reativos presentes nos aminoácidos que podem conjugar com o mPEG, tais como: $-NH_2$, $-NH-$, $-COOH$, $-OH$, $-SH$ e $-SS$ (KUMAR *et al.*, 2011; LAWRENCE, PRINCE, 2016). Assim, informações como o local de ligação da proteína com o mPEG, tamanho, presença ou não de ramificação e natureza de ligação (podendo ser permanente ou não) são importantes para preservação da atividade do produto final (LAWRENCE, PRINCE, 2016). Um exemplo é o antimicrobiano PEG-lisostafina, apresentado na tabela 3, que é uma endopeptidase

de 27 kDa conjugada com PEG de 40 kDa e teve sua meia-vida aumentada em mais de cinco vezes após a PEGuilação.

Tabela 3 – Comparativo entre o incremento no tempo de meia-vida e a atividade mantida de fármacos PEGuilados disponíveis no mercado

<i>Fármaco PEGuilado</i>	<i>Uso</i>	<i>Atividade mantida in vitro (%)</i>	<i>Meia-Vida (h)</i>		
			<i>Sem PEG</i>	<i>Com PEG</i>	<i>Espécie testada</i>
PEGvisiomant	Acromegalia	22	0,5	100	Ratos
PEG-Lisostafina	Antimicrobiano	57	5	>>25	Camundongos
PEG-Metioninase	Antitumoral	70	2	38	Primatas
PEG-Superoxidodismutase		51	0,01	38	Camundongos
PEG-G-CSF	Neutropenia	41	1,8	7	Ratos
PEG-Tricosantina	Antiviral	14	3,3	8,3	Ratos
PEG-Arginina Deiminase	Artrite	48	2,8	50	Ratos
PEG-TNF α		80	0,07	0,7	Ratos
Anti-VEGF RNA aptamer	Câncer	25	24	94	Primatas
PEG-hGH	Crescimento	24	0,34	10	Ratos
EG-GLP	Diabetes	83	0,04	0,56	Camundongos
PEG-IL6	Espondilite	51	0,05	48	Ratos
PEG-Uricase	Gota	100	3	72	Humanos
PEG-IFN- α 2a	Hepatite	7	0,7	51	Camundongo
PEG-IFN- β 1a		50	0,98	13	Ratos
PEG-IFN- β 1b		50	1,1	16,3	Ratos
PEG-Cacitonina	Osteoporose	50	3,31	15,4	Ratos
PEG- Catalase	Radicais Livres	9	1	10	Camundongos

Fonte: Adaptado de Veronese, (2009).

Muitos produtos PEGuilados já se encontram disponíveis no mercado farmacêutico, como: Adagen[®], Adynovate[®], Cimzia[®], Asparlas[™], Krystexxa[®], Macugen[®], Mircera[®], Movantik[®], Neulastim[®], Oncaspar[®], Omontys[®], Palynziq[™], Pegasys[®], PegIntron[®], Plegridy[®], Rebinyn[®], Revcovi[™] e Somavert[®] (MEIBOHM, DERENDORF, 2006; PASUT, VERONESE, 2009; TURECEK *et al.*, 2016).

Com o advento do aumento da resistência bacteriana, o peptídeo LyeTx I-b se apresenta como uma opção como novo antimicrobiano de uso hospitalar para bactérias multirresistentes. Porém, esse peptídeo é relativamente citotóxico e hemolítico. Assim, a PEGuilação poderia contribuir na redução da citotoxicidade, hemólise e aumento da estabilidade *in vivo* desse peptídeo antimicrobiano.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS GERAIS

Obter um antimicrobiano PEGuilado com reduzida atividade citotóxica e hemolítica, que possa ser aplicado ao tratamento da pneumonia causada por *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos. Estudar a taxa de infecção por *Acinetobacter baumannii* resistente às polimixinas por meio de revisão sistemática e meta-análise.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I – Taxa de resistência às polimixinas entre *Acinetobacter baumannii* obtida de pacientes hospitalizados no mundo: revisão sistemática e meta-análise

- ❖ Definir os descritores, critérios de inclusão e de exclusão, participantes, intervenções e comparações, desfechos, delineamento dos estudos e qualidade metodológica para a realização da meta-análise proposta;
- ❖ Realizar buscas sistemáticas de artigos que abordem resistência às polimixinas em *Acinetobacter baumannii* e selecionar os artigos obtidos segundo os critérios de inclusão e exclusão preestabelecidos;
- ❖ Executar a leitura completa dos artigos e a extração dos dados por mais de um observador;
- ❖ Tratar os dados extraídos e tabulados para se obter a taxa de infecção no mundo, em continentes e em regiões mundiais, considerando-se a amostra de referência.

Capítulo II – PEGuilação e caracterização de LyeTx I-b_{cys}

- ❖ Modificar a região C terminal de LyeTx I-b pela substituição do resíduo de leucina na posição 21 por um resíduo de cisteína (Leu21/Cys21), bem como verificar a atividade antimicrobiana desse peptídeo modificado;
- ❖ Realizar a conjugação do peptídeo modificado (Leu21/Cys21) com mPEG-MAL nesse resíduo substituído;
- ❖ Avaliar a massa e a conformação dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG, por MALDI-TOF e dicroísmo circular;
- ❖ Medir e comparar as atividades antimicrobianas do peptídeo PEGuilado e não PEGuilado *in vitro* frente a bactérias ATCC e isolados resistentes;
- ❖ Avaliar e comparar a atividade hemolítica e a citotoxicidade, *in vitro*, dos peptídeos PEGuilado e não PEGuilado;
- ❖ Medir a toxicidade aguda em modelo murino do LyeTx I-b e seu derivado PEGuilado.

Capítulo III – Atividade *in vitro* e *in vivo* do LyeTx I-bPEG em *Acinetobacter baumannii* sensível e resistente aos carbapenêmicos

- ❖ Avaliar a concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) de LyeTx I-b, LyeTx I-bPEG e colistina em diferentes isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes;
- ❖ Avaliar se a PEGuilação comprometeu a atividade de LyeTx I-b_{CIS}, bem como comparar os valores obtidos com os de colistina, nos seguintes ensaios:
 - Cinética de morte;
 - Biofilme maduro;
 - Sinergismo com outros antimicrobianos;
 - Ressensibilização de *A. baumannii* resistente;
 - Indução de resistência.
- ❖ Avaliar e comparar a estabilidade dos peptídeos PEGuilado e não PEGuilado, incubados em diferentes condições;
- ❖ Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana *in vivo* dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG utilizando o modelo de infecção pulmonar em camundongos por *A. baumannii* resistente.

CAPÍTULO I

Taxa de resistência às polimixinas entre *Acinetobacter baumannii* obtida de pacientes Hospitalizados no mundo: revisão sistemática e meta-análise

4 **CAPÍTULO I – TAXA DE RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS ENTRE *Acinetobacter baumannii* OBTIDA DE PACIENTES HOSPITALIZADOS NO MUNDO: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE**

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 Estratégia de busca

Para a construção desta revisão sistemática e meta-análise, artigos sobre as taxas de infecção por *Acinetobacter baumannii* resistente às polimixinas (PRABs) associadas a serviços de saúde foram obtidos por pesquisas nos bancos de dados internacionais *PubMed/Medline*, *Scopus* e *Web of Science*. A pesquisa foi realizada até 1º de setembro de 2019 por dois pesquisadores independentes, e limitou-se a estudos escritos em Inglês, Português e Espanhol, com data de publicação a partir de 1º de janeiro de 2010. Todos os descritores empregados nos bancos de dados foram definidos de acordo com os termos do *Medical Subject Heading* (MeSH).

Para realização da pesquisa, os termos "*Acinetobacter baumannii*" OU "*Acinetobacter*" OU "*Infecções por Acinetobacter*" foram combinados com as palavras-chave "resistência às polimixinas" OU "resistência à polimixina B" OU "resistência à colistina" pelo uso de operador booleano "E" entre os termos, por exemplo, "*Acinetobacter baumannii*" E "Resistência às polimixinas". As referências de todos os estudos incluídos foram examinadas para identificar possíveis estudos elegíveis.

4.1.2 Seleção dos estudos

Para determinar a taxa de resistência de PRABs em IRAS na última década foi utilizada a estratégia PEOS (ERIKSEN E FRANDSEN, 2018), como segue: “População (*Population*)”: isolados bacterianos de pacientes de ambos os sexos e todas as faixas etárias; “Exposição” (*Exposition*): IRAS por *Acinetobacter baumannii*; “Resultados (*Outcomes*)”: resistência às polimixinas (polimixina B e colistina); “Desenho do estudo (*Study design*): estudos observacionais e de vigilância epidemiológica hospitalar.

Inicialmente, o título, o resumo e as palavras-chave dos artigos foram avaliados de acordo com os critérios de elegibilidade do PEOS por dois pesquisadores. Nessa etapa, os estudos foram incluídos se: (i) as espécies clínicas foram corretamente isoladas e caracterizadas como *Acinetobacter baumannii*; (ii) os estudos avaliaram o padrão de suscetibilidade às polimixinas usando o método padrão de micro ou macrodiluição em caldo de acordo com as diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST); (iii) o artigo apresentava material original; (iv) o estudo estava escrito em Inglês, Português ou Espanhol, e (v) o artigo foi publicado a partir de 2010. Foram excluídas críticas, notas, *e-mails*, editoriais, cartas e pôsteres.

Outros critérios de exclusão foram os estudos que incluíram apenas isolados resistentes às polimixinas e também aqueles que usaram isolados identificados somente como gênero *Acinetobacter* spp. Após a busca e a seleção dos estudos, outro pesquisador foi consultado para resolver qualquer discrepância. O coeficiente de concordância de *Kappa* (intervalo de confiança de 95%) foi utilizado para analisar o grau de concordância entre os avaliadores (LANDIS, KOCH, 1977). Por fim, todos os artigos pré-selecionados foram submetidos a uma avaliação de todo o seu conteúdo, a fim de decidir se deveriam ser incluídos no estudo.

4.1.3 Extração e análise de dados

Todos os dados de interesse foram extraídos dos artigos selecionados e resumidos em tabelas para posterior análise e interpretação, com as seguintes informações: (i) primeiro autor e ano de publicação; (ii) país de estudo; (iii) total de isolados analisados; (iv) número de isolados resistentes às polimixinas. Todas as etapas de extração de dados foram realizadas por pelo menos dois pesquisadores independentes e as inconsistências foram resolvidas por meio da análise de outro pesquisador.

4.1.4 Análise estatística

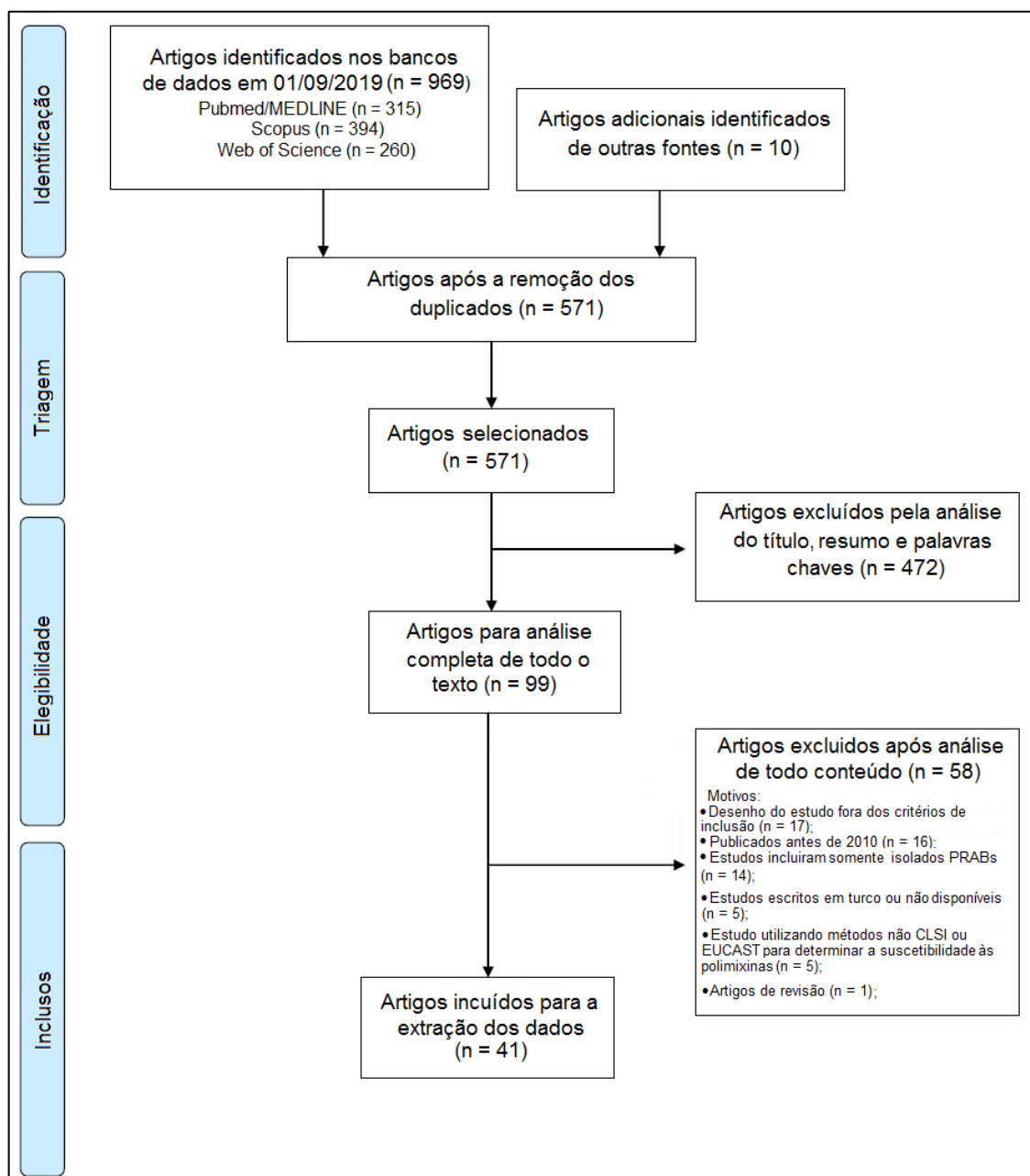
As taxas de infecção nosocomial por PRABs na última década levantadas nesse capítulo foram analisadas pelo *software RStudio*[®], utilizando-se o pacote *meta* e o comando *metaprop*. Para avaliar a significância da heterogeneidade dos dados, foi empregado o teste do qui-quadrado com nível de significância $p < 0,05$. Sua magnitude foi verificada pelo cálculo do i-quadrado, podendo variar de 0 a 100%. Valores de i-quadrado superiores a 50% indicam heterogeneidade substancial, e acima de 75%, considerável (PEREIRA, GALVÃO, 2014).

A frequência de infecções nosocomiais por PRABs foi obtida através dos modelos de efeitos fixos ou aleatórios, sendo o primeiro utilizado para i-quadrado abaixo de 50%. Acima deste valor, o modelo escolhido foi o de efeitos aleatórios (VAEZ, 2019). A análise de subgrupos foi realizada para avaliar a influência geográfica (continente e subcontinente) no resultado estudado.

4.2 RESULTADOS

O resultado da busca sistemática e as devidas exclusões utilizando os descritores citados na metodologia estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma dos artigos selecionados para a revisão sistemática



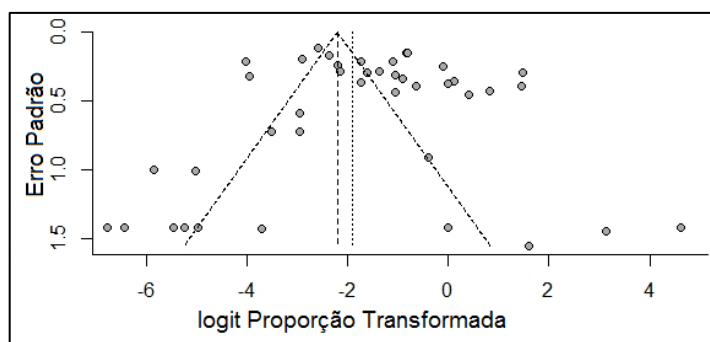
Obs.: Utilizados os critérios do PRISMA (LIBERATI *et al.*, 2009).

Fonte: Lima *et al.*, 2020.

As principais razões de exclusão foram: estudos que avaliaram a sensibilidade às polimixinas pelos métodos de difusão em ágar ($n = 17$), artigos anteriores a 2010 ($n = 16$), e estudos que incluíram dados de resistência à polimixina de *A. baumannii* juntamente com isolados de outras espécies ($n = 14$). Ao final da seleção e da avaliação dos artigos, 41 estudos foram incluídos na revisão e seguiram para a segunda leitura completa e extração dos dados de interesse. O grau de concordância entre os dois pesquisadores que executaram a busca e seleção dos artigos foi considerado forte devido ao valor calculado do índice de concordância *Kappa* de 0,715 (LANDIS e KOCH, 1977).

Com relação à avaliação do risco de viés, os estudos apresentaram boa qualidade e nenhum dos 41 estudos selecionados foram excluídos devido à qualidade metodológica. Já o risco de viés de estudos individuais, representado pelo gráfico de funil, mostrou boa simetria, sugerindo baixo viés de publicação (Figura 11). Somado a isso, os testes de *Begg* e *Egger* mostraram valores de p de 0,8048 e 0,6452 respectivamente, reforçando a baixa probabilidade de viés de publicação neste estudo.

Figura 11 – Gráfico de funil da associação entre o tamanho estimado do efeito e seu erro padrão em estudos individuais



Fonte: Lima *et al*, 2020.

As principais características de cada estudo selecionado na revisão sistemática estão resumidas na Tabela 4. A maioria dos estudos foi realizada na Ásia (Irã, Turquia, Índia, Arábia Saudita, Coreia do Sul, Omã, Malásia, China, Rússia e Taiwan), seguidos pela Europa (Grécia, Itália, Croácia e República Tcheca), América (Brasil e EUA) e África (África do Sul e Egito). Dos 7.529 isolados de *A. baumannii* incluídos, 748 isolados demonstraram ter baixa suscetibilidade contra a colistina e/ou polimixina B. Em termos de número de isolados, destacam-se os

estudos realizados em países asiáticos, que incluem mais da metade dos isolados, com 3.951 *A. baumannii* analisados (52,5%).

Tabela 4 – Principais características dos estudos incluídos na análise, como ano, país, isolados e totais de infecções por *A. baumannii* resistentes às polimixinas

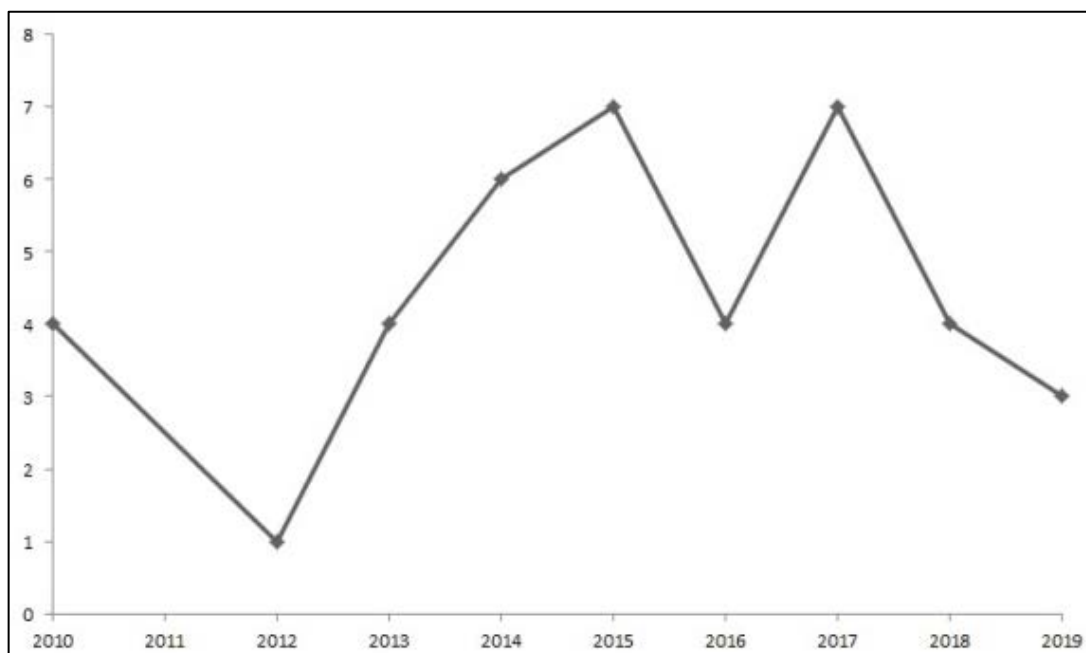
Primeiro autor	Ano	País	Totais isolados	PRABS	
				Total	Freq. (%)
Gomes	2016	Brasil	42	34	81
Cakirlar	2015	Turquia	72	0	0
Balkhair	2019	Oman	117	0	0
Lean	2014	Malasia	54	14	26
Baadani	2013	Arábia Saudita	1.307	23	2
Oikonomou	2015	Grécia	1.228	86	7
Agodi	2014	Itália	26	18	69
Durdu	2018	Turquia	350	1	0,3
Manohar	2017	Índia	5	2	40
Li	2017	China	202	20	9,9
Leung	2019	EUA	451	39	8,6
Brkic	2015	Croácia	151	1	0,7
Lowe	2018	África do Sul	69	2	3
Guvensen	2017	Turquia	50	50	100
Alaei	2016	Iran	85	14	16
Uzun	2014	Turquia	313	0	0
Simar	2017	EUA	60	9	15
Hindler	2013	EUA	27	7	30
Ramesh	2014	Índia	2	1	50
Dafopoulou	2015	Grécia	20	12	60
Queenan	2010	EUA	514	27	5
Lee	2014	Coreia do Sul	11	11	100
Mavroidi	2015	Grécia	42	12	29
Nemec	2010	República Checa	20	0	0
Park Apud. Ko	2010	Coreia do Sul	214	65	30
Samonis	2010	Grécia	2	2	100
Chang	2012	Taiwan	134	14	10,4
Grupta	2016	Índia	32	17	53,1
Meletis	2015	Grécia	436	0	0
Akin	2018	Turquia	60	3	4
Rodriguez	2019	Brasil	165	25	15,1
Rezai	2017	Iran	29	10	34,5
Genteluci	2016	Brasil	75	61	81,5
Vourli	2017	Grécia	117	29	24,8
Bahador	2013	Iran	79	16	20,5
Vakili	2014	Iran	214	66	30,6
Nowak	2017	Europa	65	31	47,7
Abdulzahra	2018	Egito	40	2	5
Selasi	2015	Coreia do Sul	94	0	0
Lesho	2013	EUA	28	14	50
Sheck	2017	Rússia	527	10	1,2
Total			7.529	748	10

Fonte: Lima *et al*, 2020.

Os estudos na Europa e América incluíram 2.107 (28%) e 1.362 (18%) de isolados respectivamente, e os estudos na África contribuíram com apenas 1,5% (109 / 7.529) dos isolados considerados na análise.

Mais da metade dos estudos foram publicados entre 2015 a 2019 (25/40; 62,5%) com destaque para 2015 e 2017, que possuem sete artigos cada (7/41; 17%). Entre 2012 e 2017, observou-se um considerável aumento de publicações relacionadas às IRAS por PRABs, exceto pela queda nos anos de 2016 e 2018. No ano de 2019 foram obtidos três artigos em apenas nove meses (Figura 12).

Figura 12 – Número de artigos selecionados de acordo com o ano de publicação



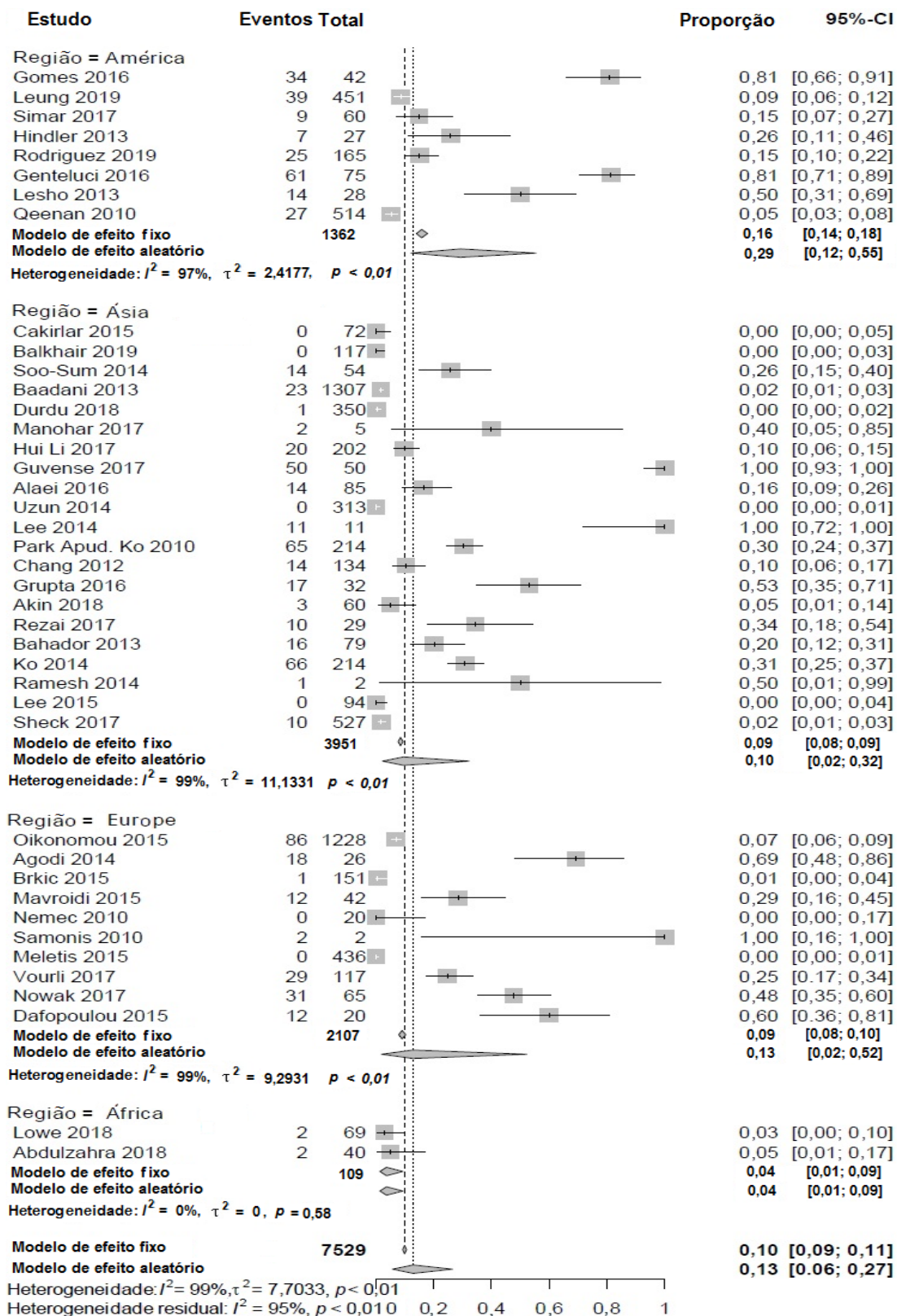
Obs.: Conforme observado, a maioria dos artigos selecionados concentra-se de 2015 a 2017.

Fonte: Lima *et al*, 2020.

Observou-se alta heterogeneidade na meta-análise entre os estudos incluídos com o índice *i*-quadrado igual a 99% (Figura 13). Portanto, foi utilizado o modelo de efeitos aleatórios para definição das taxas de infecção, exceto para o continente africano, para o qual foi utilizado o modelo de efeitos fixos, devido ao valor do *i*-quadrado ter sido de 0%.

A prevalência de IRAS por PRABs foi estimada em 13% (IC95%: 0,06-0,27) (Figura 13). Entre os continentes, a maior taxa foi observada no americano (29%; IC95%: 0,12-0,55), seguida pelo europeu (13%; IC95%: 0,02; 0,52), e asiático (10%; IC95%: 0,02; 0,32) (Figura 13). A exceção foi para o continente africano, que mostrou uma baixa taxa de IRAS por PRABs (4%; IC95%: 0,01-0,09).

Figura 13 – *Forest plot* da taxa de resistência de infecções associadas a serviços de saúde por *A. baumannii* resistente às polimixinas entre 2010 e 2019



Obs.: Intervalo de confiança (CI); heterogeneidade (I^2); p -value da heterogeneidade (p).

Fonte: Adaptado de Lima *et al*, 2020.

A análise de subgrupos mostrou que a taxa de incidência de PRABs nas IRAS é variável em diferentes regiões de um mesmo continente (Tabela 5), e que a região com a taxa mais alta foi a América do Sul (60%; IC95%: 0,21-0,89), com valor quase quatro vezes maior que a encontrada na América do Norte (16%; IC95%: 0,07-0,31).

Na região sul da Ásia, representada pelo Afeganistão, Bangladesh, Butão, Maldivas, Nepal, Índia, Paquistão e Sri Lanka, a taxa de IRAS por PRABs foi estimada em 51% (IC95%: 0,07-0,31), valor significativamente maior que a taxa de IRAS por PRABs observada na região leste desse mesmo continente (18%; IC95%: 0,07-0,31), e no Oriente Médio (4%; IC95%: 0,00-0,34).

No sul da Europa, a taxa de IRAS por PRABs foi de 23% (IC95%: 0,02-0,84), e no leste europeu, 1% (IC95%: 0,00-0,04). A análise de subgrupos para estudos de países africanos não foi possível, porque apenas dois artigos deste continente foram incluídos.

Tabela 5 – Análise de subgrupos por região e país do estudo

Subgrupo	Resultados		meta-análise		
	PRABs	Total de isolados	Proporção	5% IC	
América	sul	120	282	0,60	0,21-0,89
	norte	96	1080	0,16	0,07-0,31
	médio	183	2676	0,04	0,00; 0,34
Asia	sul	20	39	0,51	0,36-0,66
	Leste	110	655	0,18	0,01-0,86
Europa	sul	130	1754	0,23	0,02-0,84
	Leste	1	171	0,01	0,00-0,04

Fonte: Adaptado de Lima *et al*, 2020.

4.3 DISCUSSÃO

Atualmente, a *Acinetobacter baumannii* resistente às polimixinas (PRABs) é considerada uma grande ameaça à Saúde Pública, pois as polimixinas representam a "última linha" terapêutica nesses casos (KAYE *et al.*, 2016), e é provável que a resistência seja devido a distintos fatores, associados ou não, com alterações em sua membrana externa (LIMA *et al.*, 2018).

Apesar de pesquisadores terem identificado isolados de PRABs em ambulatórios de diversos países, a taxa de resistência desses isolados no mundo ainda é baseada em estudos descentralizados e não se sabe como está distribuída. Nesse sentido, este estudo foi realizado para estimar a taxa de resistência geral de infecções por PRABs no ambiente hospitalar e descrever os impactos de fatores geográficos na prevalência dessa infecção.

Após a busca e a seleção dos artigos, foram obtidos 41 estudos que avaliaram 7.529 isolados de *A. baumannii* de pacientes com IRAS. Embora tenham sido considerados microrganismos isolados por um período de 10 anos, a maioria dos estudos se concentrou em amostras obtidas entre 2015 e 2017. Isso aponta para o crescente interesse em estudos ligados à resistência às polimixinas por bactérias Gram-negativas nos últimos anos (MENDES OLIVEIRA, PAIVA, LIMA, 2019a).

Para garantir a confiabilidade dos dados obtidos, métodos preconizados para detecção e definição da sensibilidade aos antimicrobianos são importantes, levando-se em conta a rápida disseminação de resistência às polimixinas pela *A. baumannii* em ambiente hospitalar (DAFOPOULOU *et al.*, 2019). Para padronizar os testes de suscetibilidade às polimixinas, o CLSI e EUCAST criaram um grupo de trabalho de polimixina. Esse grupo emitiu recomendações indicando que a microdiluição em caldo padrão sem aditivos, até o momento, é o único método válido para análise da CIM para polimixinas (EUCAST, 2016). Assim, nesta análise foram incluídos apenas os estudos que realizaram a identificação da resistência às polimixinas entre isolados de *A. baumannii* pelo método recomendado pelas

diretrizes oficiais (DAFOPOULOU *et al.*, 2019; EZADI, ARDEBILI, MIRNEJAD, 2018).

Os resultados levantados revelaram que 13% dos isolados de *A. baumannii* envolvidos em IRAS são resistentes às polimixinas em todo o mundo, e estes são distintos para cada continente e região no globo. Isso pode ser explicado sob várias hipóteses, como o aumento das prescrições e uso excessivo de polimixinas na saúde humana e veterinária. Nas IRAS por *A. baumannii*, os carbapenêmicos tornaram-se a principal opção terapêutica (WONG, CHAN, CHEN, 2015), mas a taxa de resistência dessa bactéria aos carbapenêmicos é devido ação das carbapenemases do tipo oxacilinases (OXA), que são betalactamases de classe D que inativam o anel betalactâmico presente nos carbapenêmicos (RARO *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2019a). Na Grécia, por exemplo, as taxas de resistência ao meropenem aumentaram 12% em cinco anos, variando de 82,6% em 2010 a 94,8% em 2015. Além disso, nos hospitais norte-americanos, a taxa de resistência aos carbapenêmicos por *A. baumannii* aumentou 57% no período entre 2003 e 2008 (DAFOPOULOU *et al.*, 2019).

Um estudo do *The Surveillance Network da Eurofins* que incluiu 39.320 espécimes de *A. baumannii* isoladas entre 2003 e 2012 (81,1% provenientes do sistema respiratório e 18,9% da corrente sanguínea de indivíduos infectados) revelou que a resistência de *A. baumannii* à colistina mais que dobrou no período de 2006 a 2012, passando de 2,8% para 6,9% (ZILBERBERG *et al.*, 2016). Como a maioria dos isolados de *A. baumannii* resistentes ao carbapenêmicos apresentam também fenótipos de resistência a múltiplas drogas (MDR) ou resistência extensiva a outros antimicrobianos (XDR), as opções de tratamento atuais para infecções associadas a esses patógenos permanecem limitadas às polimixinas (REDDY *et al.*, 2010).

O padrão de distribuição geográfica das IRAS por PRABs encontrado na meta-análise deste capítulo apresentou resultados próximos aos observados em um estudo sobre a epidemiologia global de CRAB (KIM *et al.*, 2014). Tal estudo demonstrou que as regiões com maior prevalência de CRAB eram a América do Sul, o sul da Ásia e o sul da Europa, todas com taxa de resistência aos carbapenêmicos maior ou igual a 50% dos isolados estudados. Devido à similaridade entre os

resultados encontrados aqui e os encontrados e por KIM *et al.* (2014), pode-se inferir que a resistência às polimixinas em *A. baumannii* esteja associada ao uso desses antimicrobianos contra infecções causadas por cepas resistentes ao carbapenêmicos.

A análise de subgrupos apontou grande variabilidade nas taxas de prevalência de PRABs entre as diferentes regiões do mundo, fato também observado em recente revisão feita por Li *et al.* (2019). Com base nesse estudo, a América foi o continente com maior taxa de infecção de PRABs (29,30%) entre todos os continentes analisados. O destaque se dá na América do Sul, onde a prevalência foi quase cinco vezes maior que a média mundial (60% contra 13%). No continente europeu, foi observada uma taxa de IRAS por PRABs de 12%, valor próximo ao observado no mundo, seguido pela Ásia (10%) e África (4%). Este último continente pode estar subavaliado, frente à escassez de dados.

A divisão dos estudos por subcontinentes mostrou que a Europa em sua porção sul, representada por Albânia, Andorra, Bósnia e Herzegovina, Croácia, Chipre, Gibraltar, Grécia, Itália, Kosovo, Malta, Montenegro, Macedônia do Norte, São Marinho, Sérvia, Eslovênia, Espanha, Turquia e Vaticano, foi a região que mais incrementou o valor nominal da taxa de IRAS por PRABs na Europa, com valor calculado em 23%.

Já na Ásia, mais da metade dos casos de infecção por PRABs (51%) foram encontrados nos países do sul, ou seja, Afeganistão, Bangladesh, Butão, Maldivas, Nepal, Índia, Paquistão e Sri Lanka, enquanto a taxa de infecção nas regiões da sua porção oriental (China, Mongólia, Coreia do Norte, Coreia do Sul, Japão e Taiwan) foi de 18%.

O Oriente Médio (Egito, Síria, Israel, Líbano, Jordânia, Iraque, Arábia Saudita, Kuwait, Bahrein e Catar) apresentou uma taxa de 4%, consideravelmente mais baixos.

Corroborando os resultados obtidos nessa meta-análise, um estudo multicêntrico e abrangente sobre vigilância de resistência a antimicrobianos em países europeus (EARS-Net 2013), que incluiu 2.217 isolados de *A. baumannii*, demonstrou que dois países localizados no sul da Europa (Grécia e Itália)

apresentaram maior prevalência de PRABs entre todos os 17 países europeus avaliados (GIAMARELLOU, 2016; ECDC, 2014).

Dados do *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY) mostraram que, entre os anos de 2006 e 2009, foram obtidos 4.686 isolados de *Acinetobacter spp.* de hospitais dos Estados Unidos, 14 países da Europa, Israel, 4 países da América Latina e 12 da Ásia. Esses isolados mostraram as maiores taxas de infecção de PRABs na América e na região do Pacífico Asiático (GALES *et al.*, 2011).

No entanto, em contraste com a baixa prevalência encontrada nesta meta-análise para países do leste da Ásia, a Coreia do Sul (30,6%) foi o país com a maior taxa de resistência à polimixina entre os isolados de *Acinetobacter spp.*, incluindo dados do SENTRY (KO *et al.*, 2007). Porém, a baixa frequência de resistência às polimixinas foi demonstrada em países do Oriente Médio, como no Irã, com o valor de 0%, (MAHMOUDI *et al.*, 2017) e Europa Oriental, como na Bulgária, com a taxa de 0% (STRATEVA *et al.*, 2019). Esses baixos valores de prevalência encontrados pelos autores citados corroboram as taxas de IRAS por PRABs encontrados nessa meta-análise nessas regiões.

As variações nos resultados das taxas de IRAS por PRABs em distintas áreas geográficas podem estar diretamente correlacionadas ao resultado do uso indiscriminado de antimicrobianos na saúde humana e nas atividades veterinárias. Essas práticas contribuem para a maior disseminação de resíduos antimicrobianos e seleção de microrganismos resistentes. Preocupado com a disseminação dessa resistência, o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) elaborou um relatório sobre a vigilância do consumo de antimicrobianos na Europa durante o ano de 2012. Esse relatório revelou que os países do sul europeu foram os que mais consumiram antimicrobianos em toda a Europa, e que a Grécia foi o país que apresentou a maior taxa de prescrição e uso desses fármacos (ECDC, 2014).

Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) e da Europa (ECDC) alertaram sobre a importância do consumo racional dos antimicrobianos e da necessidade de redução do uso dos mesmos. Apontaram também que, na contramão dessas medidas estão os países emergentes e/ou subdesenvolvidos (LOUREIRO *et al.*, 2016), com especial atenção à América Latina

(VALENZUELA, DE QUADROS, 2009) e à Ásia (KAKKAR *et al.*, 2018). O Brasil, Peru, Uruguai e Venezuela apresentam aumento significativo na dose diária de antimicrobianos por 1000 habitantes (WIRTZ, DRESER, GONZALES, 2010). O sul da Ásia é uma região de alto consumo de polimixinas nas atividades agrícolas e criação de animais, e estima-se que, em todo a esse continente, o consumo de antimicrobianos em aves e suínos cresça 129% e 124%, respectivamente, até o ano de 2030 (VAN BOECKE *et al.*, 2015).

Dadas essas estimativas, espera-se que as taxas de resistência à polimixina entre *A. baumannii* nessas regiões sejam elevadas, devido à considerável pressão seletiva no campo humano e veterinário.

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados desta meta-análise revelaram a alta taxa de PRABs em ambiente hospitalar em todo o mundo no período de 2010-2019, apontando para um alarmante problema de saúde pública mundial. Essa análise mostrou também que, em algumas regiões, essa taxa de resistência é muito superior à mundial, e que os valores encontrados são corroborados por trabalhos feitos para CRABs. Somado a isso, as regiões com a maior taxa de PRABs também são aquelas que apresentaram os maiores consumos médios de antimicrobianos em todo o mundo.

Nesse sentido, é fundamental observar maior rigor no controle do uso dos antimicrobianos e realizar pesquisas para a obtenção de produtos substitutos das polimixinas como opção no tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos e às polimixinas.

CAPÍTULO II

Caracterização e PEGuilação de LyeTx I-b_{cys}

5 CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO E PEGUILAÇÃO DE LyeTx I-b_{cys}

5.1 PARTE EXPERIMENTAL

5.1.1 Materiais e microrganismos

Derivados de L-aminoácidos com o grupo fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) e resina Fmoc (Rink amida PEG-MAL 0,52 mmol.g⁻¹) foram adquiridos da *Iris BiotechGmbH* (Marktredwitz, Alemanha). O peptídeo LyeTx I-b foi sintetizado pela *GenOne* (Rio de Janeiro, Brasil). Seringa de 10mL de polietileno de baixa densidade (PEBD) foi adquirida da *Becton Dickinson* (Juiz de Fora, Brasil). Cloreto de sódio (NaCl), diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), éter diisopropílico, etanol, fosfato de sódio monobásico e isopropanol (IPA) foram adquiridos da Quimica Moderna (São Paulo, Brasil). 1,2-etanoditiol (EDT), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), anidrido acético, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), cianeto de potássio (KCN), diisopropilcarbodiimida (DIC), dodecil sulfato de sódio (SDS), *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), fenol, glicerol, hidroxibenzotriazol (Hobt), iodo-ciano-4-hidroxicínico (alfa-ciano), nihnidrina, piperidina (PIP), piridina, triisopropilsilano (TIS), tris (2-carboxietil) fosfine (TCEP) e triton X-100 foram obtidos da *Sigma* (São Paulo, Brasil). Metil PEG maleimida 2 kDa (mPEG-MAL) foi adquirido da empresa *Polysciences Inc.* (Warrington, EUA). Acetonitrila e ácido trifluoroacético (TFA) foram obtidos da *J.T. Baker* (São Paulo, Brasil). Padrão de calibração de peptídeo II foi adquirido da empresa *Bruker Daltonics* (Hamburgo, Alemanha). Ágar *Mueller-Hinton* (MH) e caldo de “*brain heart infusion*” (BHI) foram obtidos da Prolab (São Paulo, Brasil).

Staphylococcus aureus (ATCC 33591), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e 8 isolados multiresistentes que foram cedidos pelo ICB/UFMG, sendo: 2 amostras de

Acinetobacter baumannii, 2 amostras de *Escherichia coli*, 3 amostras de *Serratia marcescens* e 1 amostra de *Staphylococcus aureus*.

Células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (VERO, ATCC CCL-81) foram fornecidas pela Universidade Federal de São João del-Rei/MG. Células embrionárias de rim humano (*Human Embryonic Kidney*) (HEK-293, ATCC CRL-3216) foram cedidas pelo ICB/UFMG. Cetamina solução injetável e xilazina solução injetável foram adquiridas da empresa CEVA (Paulínia, SP). O sangue humano utilizado no ensaio de atividade hemolítica foi fornecido por voluntário integrante deste trabalho.

5.1.2 Síntese do peptídeo LyeTx I-b_{cys}

A síntese do peptídeo foi feita pelo protocolo Fmoc (CHAN, WHITE, 2000) adaptado, como descrito a seguir: Foram pesados 160mg da resina Fmoc *Rink* amida e colocados em uma seringa de 10mL PEBD contendo um filtro de poliuretano. Esse conjunto passou por três lavagens sucessivas com 2mL de DCM. Após a lavagem, adicionaram-se 3mL de DCM, deixando-se a mistura sob agitação a 240 r/min por trinta minutos em mesa agitadora Fanem (São Paulo, Brasil). Para a desproteção da resina (retirada do grupo protetor Fmoc), o DCM foi retirado da seringa e, em seguida, foram adicionados 2mL de solução de PIP 20% em DMF. A mistura permaneceu sob agitação por 15 minutos a 240 r/min em mesa agitadora. Em seguida, foi lavada com 2mL de DMF e 2mL de IPA, por três vezes e de forma alternada, e então, com 2mL de DCM, por duas vezes. Após essa etapa, a mistura foi secada em bomba a vácuo *ThermoFisher Scientific* (*Osterode Am Harz*, Alemanha) e realizou-se o teste de *Kaiser*. Esse teste é feito para avaliar o acoplamento do derivado de aminoácido ou sua desproteção, e consiste em colocar pequena quantidade de peptidil-resina (resina contendo os resíduos de aminoácidos acoplados) em um tubo de ensaio. Então, são acrescentadas: uma gota de solução de KCN em piridina, duas gotas de solução de fenol em etanol a 80% e uma gota de solução de ninidrina 5% em etanol. O tubo de ensaio é colocado na chapa de

aquecimento de tubos a 100°C por cinco minutos. Transcorrido este tempo, a peptidil-resina deve apresentar coloração parda ou azulada, indicando a desproteção; ou transparente, indicando acoplamento.

Os respectivos derivados de aminoácidos foram pesados para os acoplamentos em excesso de quatro vezes a massa molar e respeitando-se a sequência proposta, solubilizados em 1,5mL de DCM e 1,5mL de DMF destilado, juntamente com 56mg de *Hobt* e 57µL de DIC, e então, a solução final foi adicionada à seringa contendo a peptidil-resina desprotegida. Todo esse conjunto foi colocado sob agitação (240 r/min) por duas horas, e após esse período foi feito o teste de *Kaiser* descrito anteriormente, verificando-se se a resina permaneceu transparente. Os derivados de aminoácidos a partir da arginina (13º resíduo) foram desprotegidos com uma solução de piperidina contendo *Hobt* 0,1mol.L⁻¹.

Após o acoplamento do último resíduo de aminoácido, a isoleucina, a sequência fixada à peptidil-resina foi desprotegida e acetilada com a adição de 2µL de DMF e 30µL de anidrido acético sob agitação por duas horas. A acetilação foi confirmada pelo teste de *Kaiser* com a resina tendo permanecido transparente.

Para a clivagem, inicialmente a peptidil-resina foi secada em nitrogênio gasoso e pesada. Uma solução ácida (94% de TFA, 2,5% de água, 1% de TIS e 2,5% v/v de EDT) foi preparada na proporção de 8mL de solução ácida por grama da resina seca. A solução ácida foi aspirada pela seringa PEBD, que continha a resina e o filtro, e mantida sob agitação a 240 r/min em mesa agitadora por 3 horas. Em seguida, a solução ácida foi transferida para um tubo de centrífuga e a seringa com a resina foi lavada duas vezes com 1mL de TFA.

A solução ácida extraída da seringa foi secada em fluxo de nitrogênio gasoso. O produto seco foi recristalizado e pré-purificado com três ciclos de lavagem seguidos com 5mL de éter diisopropílico gelado, seguido de resfriamento com nitrogênio líquido e centrifugação a 4000 r/min em centrífuga *ThermoFisher Scientific* (*Osterode Am Harz*, Alemanha) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o produto precipitado foi seco em nitrogênio gasoso e liofilizado por 24 horas (Terroni Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil).

A síntese de LyeTx I-b_{cys} foi feita no Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos do Departamento de Química – ICEx/UFMG.

A purificação foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que será descrita em detalhes no subitem 5.1.4.

5.1.3 Conjugação com o mPEG-MAL

Cinco miligramas (1,83 μ mol) de LyeTx I-b_{cys} purificado foram solubilizados em 0,5mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹, pH 7,3) contendo 10mmol.L⁻¹ de TCEP sob agitação (Burg *et al.*, 2012). Após a completa solubilização do peptídeo, a solução foi mantida sob agitação em agitador magnético por 30 minutos, em atmosfera com gás N₂.

Foram solubilizados 18mg do mPEG-MAL em 0,4mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹, pH 7,3) e esta mistura foi adicionada à solução de peptídeo com o TCEP, e mantida em ambiente inerte sob agitação por 60 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,1mL de água acidificada com solução de TFA 30% reduzindo-se o valor do pH para a faixa de 4 a 5 (BENINCASA *et al.*, 2015).

A PEGuilação de LyeTx I-b_{cys} foi feita no Laboratório de Físico-química do Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos (SRVO) da DPD/FUNED.

5.1.4 Purificação e caracterização do LyeTx I-b_{cys} e LyeTx I-bPEG

O produto sintético bruto e o PEGuilado foram purificados por CLAE LC20AD/SPDM20A/RID20 *Shimadzu* (Kyoto, Japão) com coluna semipreparativa *Phenomenex C18*, 10 μ m, 250mm, 10mm, previamente equilibrada com nove partes de TFA em água 0,1% v/v (fase A) 90% e uma parte de TFA 0,08% v/v em acetonitrila (fase B) 10% e comprimento de onda de 214nm (REIS *et al.*, 2018).

O LyeTx I-b_{cys} foi purificado em gradiente linear quanto à fase B, da seguinte forma: 10% até os 5 minutos iniciais; dos 5 aos 30 minutos chegando a 60%; dos 30 aos 45 minutos chegando em 100%; dos 45 aos 50 minutos permanecendo em

100%; e dos 50 aos 60 minutos retornando aos 10% iniciais. O LyeTx I-bPEG foi purificado em gradiente linear quanto à fase B, da seguinte forma: 10% até os 5 minutos iniciais; dos 5 aos 40 minutos chegando 60%; dos 40 aos 45 minutos chegando em 100%; dos 45 aos 50 minutos permanecendo em 100%; e dos 50 aos 60 minutos retornando aos 10% iniciais. A confecção e análises dos cromatogramas foram feitas por meio do *software OriginPro 8.5*.

A purificação dos peptídeos LyeTx I-b_{cys} e LyeTx I-b_{cys}PEG foi feita no Laboratório de Físico-química do Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos (SRVO) da DPD/FUNED.

As frações dos picos cromatográficos com maiores absorções foram coletadas e avaliadas por análise de ionização por dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrômetro de massa de tempo de voo (MALDI-TOF-MS), modelo *AutoFlex III (Bruker Daltonics, Hamburgo, Alemanha)*. Resumidamente, as amostras foram colocadas em uma placa MTP 384 *Anchorchip Bruker Daltonics* (Hamburgo, Alemanha), misturadas com uma solução saturada de alfa-ciano e deixadas para secar em temperatura ambiente. Estas e os padrões foram lidos no equipamento MALDI-TOF-MS com método *pepmix* (até 4kDa) e o *protomix* (4 kDa a 8kDa) (STROHALM *et al.*, 2008).

Os espectros de massas (MS) foram adquiridos no modo positivo, após calibração utilizando padrão de calibração de peptídeo. A espectrometria de massas também foi usada para sequenciar o peptídeo LyeTx I-b_{cys} pela técnica MS/MS, onde os íons formados passaram por fragmentação induzida por decaimento pós-fonte (o produto, ao ser atingido pelos pulsos de laser, sofre fragmentação ao longo do tubo de voo). Os espectros de massas foram gerados e analisados pelo *software mMass Data Miner* (STROHALM *et al.*, 2008). As análises de MALDI-TOF foram feitas no Laboratório de Multiusuários de Proteômica ICB/UFMG.

5.1.5 Estimativa da concentração molar do peptídeo

As proteínas geralmente apresentam absorção entre 275nm a 280nm devido à presença de triptofano e tirosina, portanto, sua concentração molar pode ser predita baseando-se na lei de *Lambert-Beer*, em que a absorbância “A” é igual ao produto do coeficiente de extinção molar do peptídeo “ ϵ ” multiplicado pela concentração “C” e pelo comprimento do caminho ótico “L”, como se segue: $A = \epsilon CL$ (SCHMID, 2001). Para proteínas e peptídeos, o valor de ϵ foi calculado pela equação 01:

$$\epsilon_{280} (\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}) = 5500 \times nW + 1490 \times nY + 125 \times nSS \quad (01)$$

Em que: nW é o número de resíduos do aminoácido triptofano, nY é o número de resíduos do aminoácido tirosina, e nSS o número de pontes dissulfeto do peptídeo ou proteína (SCHMID, 2001).

5.1.6 Análise por dicroísmo circular (CD)

A metodologia de CD possibilita analisar a estrutura secundária de peptídeos e proteínas (α -hélice, folha- β e randômica) por meio de cromóforos, como resíduos aromáticos, ou seja, tirosina, triptofano e fenilalanina, bem como pela ligação amídica (SREERAMA, WOODY, 2000, 2003). A técnica mede a diferença de luz circulante polarizada à esquerda e à direita por cromóforos que possuem quiralidade intrínseca ou estão localizados em condições quirais, para proteínas que estão no UV distante, na faixa de 190nm a 240nm (absorção da ligação peptídica). Assim, foram preparadas soluções de TFE e água ultrapura nas proporções de 0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50 e 60:40, com LyeTx I-bPEG na concentração de 0,18mg.mL⁻¹ (SREERAMA, WOODY, 2000, 2003; REIS *et al.*, 2018).

Para os testes com SDS, foram preparadas soluções de SDS e água ultrapura nas seguintes concentrações: 1, 5, 10, 20 e 30mol.L⁻¹ de SDS com 0,18mg.mL⁻¹ de LyeTx I-bPEG.

Para a análise de dicroísmo circular utilizando-se lipossomas de POPC:POPG (3:1), foram preparadas soluções de lipossomas e água ultrapura nas seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 e 1,8mmol.L⁻¹ de POPC:POPG (3:1) com 0,18mg.mL⁻¹ de LyeTx I-bPEG.

Para o preparo da solução de POPC:POPG (3:1), foram pesados 4,6mg de POPC e 1,5mg de POPG, que foram adicionados em um balão de fundo redondo juntamente com 2mL de diclorometano. O diclorometano foi secado em rotaevaporador, para formação de filme fino na parede do balão. Em seguida, foram adicionados 4mL de água e a solução foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada em banho a 37°C, o que foi repetido por 3 vezes. A solução foi extrudada em filtro de 100kDa por 11 vezes (SREERAMA, WOODY, 2000, 2003).

Também foram preparadas soluções dos respectivos brancos, e todas foram colocadas em cubetas de quartzo de 0,2mm perfazendo-se 300µL de volume final. Foi utilizado espectropolarímetro *Jasco J-815* e a leitura foi feita por varredura a 100nm.min⁻¹ com coleta de dados de 0,2nm com 1nm de largura de banda e tempo de resposta de 1 segundo. Essas análises foram feitas do Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos no Departamento de Química – ICEX/UFMG.

Os espectros obtidos com os controles negativos foram subtraídos dos espectros contendo as amostras em todos os experimentos. Foi feito o cálculo para a concentração da elipticidade molar “[θ]” utilizando-se as seguintes equações (02 e 03) (SREERAMA, WOODY, 2000, 2003):

$$[\theta] = [\text{LyeTx I-bPEG}] / MM_{\theta} \quad (02)$$

$$MM_{\theta} = (MM_{(\text{LyeTx I-bPEG})} + N_r \times MM_{(\text{TFA}_d)}) / N_L \quad (03)$$

Sendo: “MM_(LyeTx I-bPEG)” a massa molar do LyeTx I-bPEG; “N_r” o número de resíduos carregados do peptídeo PEGuilado, “MM_(TFA_d)” a massa molar do ácido trifluoroacético desprotonado e “N_L” o número de ligações peptídicas.

Os espectros foram processados com auxílio do *software Spectra Manager*, sendo posteriormente analisados com auxílio do *software CDPPro* (SREERAMA, WOODY, 2000, 2003).

5.1.7 Avaliação da atividade antimicrobiana: disco difusão e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de disco difusão foi realizado para avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana e o método de microdiluição foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Para o teste de disco difusão, foi utilizado meio ágar MH, com 2% de dextrose e $0,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azul de metileno, como recomendado pelo protocolo do CLSI M44–A2. O experimento foi realizado em três repetições com as linhagens *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) nas concentrações de $7,81\mu\text{M}$ a $1000\mu\text{M}$ dos peptídeos, solubilizados em água e aplicados diretamente no ágar.

Para a determinação do CIM, foram utilizadas as mesmas bactérias testadas nos ensaios de disco difusão, além dos isolados bacterianos hospitalares. As linhagens e isolados foram mantidos a -80°C em caldo BHI acrescido de glicerol 10% v/v. Estas foram cultivadas em ágar MH e incubadas por 24 horas a 37°C em condições de aerobiose, de acordo o protocolo do CLSI (2018).

No preparo de cada inóculo, foram retiradas, com o auxílio de uma alça, colônias cultivadas em ágar BHI, que foram transferidas para um tubo de centrífuga de 15mL contendo 10mL de solução de NaCl 0,9% m/v estéril. Esse inóculo foi verificado em espectrofotômetro com leituras a 600nm. Foram adicionadas colônias até se obter a absorbância de 0,190 a 0,210, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ células. mL^{-1} . Em seguida, fez-se uma diluição de 150 vezes, obtendo-se a concentração de 5×10^6 células. mL^{-1} .

Em placas de microdiluição contendo caldo MH, foram adicionados 50 μL das suspensões bacterianas e 50 μL dos peptídeos PEGuilados ou não, diluídos em concentrações decrescentes de 32 a $0,156\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Durante os ensaios, os seguintes controles foram utilizados: positivo do caldo (90 μL de caldo MH e 10 μL de inóculo 10^4 células), negativo do caldo (100 μL de caldo MH) e salina (90 μL de caldo MH e 10 μL de salina).

A avaliação da atividade antimicrobiana por disco difusão e determinação da concentração inibitória mínima descritas neste capítulo foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do ICB/UFMG.

5.1.8 Determinação da atividade hemolítica

Para avaliação da hemólise, 2,5mL de sangue humano obtido de voluntário saudável foi pipetado em um tubo de centrifugação de 15mL, contendo 5mL de solução salina a $0,1\text{mol.L}^{-1}$ com tampão fosfato de sódio $1,45\text{mol.L}^{-1}$ e pH 6,9 (PBS). A suspensão foi centrifugada durante cinco minutos a $300g$ e o sobrenadante, descartado. Foram adicionados 5mL do tampão fosfato com salina, e a suspensão foi centrifugada, descartando-se o sobrenadante por duas vezes para lavagem das hemácias (COOPER *et al.*, 1964; EVANS *et al.*, 2013). Em seguida, o concentrado de hemácias foi cuidadosamente transferido para um balão volumétrico de 250mL e este foi avolumado com solução salina ($0,1\text{mol.L}^{-1}$ e tampão fosfato de sódio, $1,45\text{mol.L}^{-1}$ e pH 6,9) em temperatura ambiente. Os peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG foram isoladamente solubilizados na concentração de $640\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão PBS e identificados. Em uma microplaca de microtitulação contendo 96 poços estéreis, foram pipetados $190\text{ }\mu\text{L}$ de salina e PBS com hemácias e $10\text{ }\mu\text{L}$ de salina e PBS contendo o peptídeo ou o peptídeo PEGuilado, sendo feitas as diluições seriadas dos mesmos (COOPER *et al.*, 1964; EVANS *et al.*, 2013).

A placa foi incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante uma hora e então foi centrifugada, em uma centrífuga de placas, durante 5 minutos a $300g$. Os sobrenadantes de cada poço foram transferidos, utilizando-se uma pipeta automática, para outra microplaca de 96 poços, estéril, a qual foi lida em leitor de placas (Multiskan FC – ThermoScientific, *Osterode am Harz*, Alemanha) a 405nm (COOPER *et al.*, 1964; EVANS *et al.*, 2013).

Foram feitos experimentos independentes e em triplicata. Como controle negativo, usou-se o PBS e, como controle positivo, o Triton X-100 (0,1% em PBS).

Os resultados do controle positivo foram considerados iguais a 100% de hemólise (EVANS *et al.*, 2013).

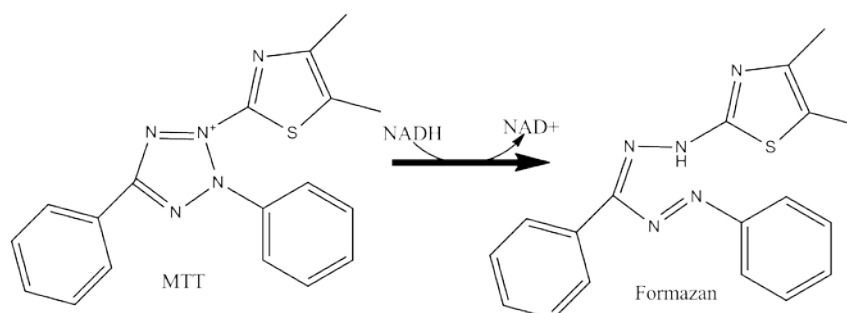
Foi feita a análise estatística de regressão binomial com a respectiva análise de significância e de variância (Anova), que utiliza o teste F, a fim de determinar a dose que causa a lise de 50% dos eritrócitos, HD_{50} .

As atividades hemolíticas de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG foram feitas no Laboratório de Físico-química do Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos (SRVO) da DPD/FUNED.

5.1.9 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

As citotoxicidades de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG foram avaliadas em células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (VERO ATCC CCL-81) e células embrionárias de rim humano (*Human Embryonic Kidney*) (HEK-293, ATCC CRL-3216), ambas originárias da *American Type Culture Collection* (ATCC). Os ensaios de citotoxicidade foram feitos pela determinação da atividade de desidrogenases mitocondriais pelo método que utiliza o MTT. A viabilidade mitocondrial, ou seja, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas (RISS, *et al.*, 2013). Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (Figura 14).

Figura 14 – Reação de formação do formazan a partir da redução de MTT em células



Fonte: Riss, *et al.* (2013).

Foi preparada a garrafa inicial T75 com células HEK-293 ou VERO, e, a partir dessa, foram preparadas três outras garrafas, quando foi atingida a confluência adequada, da seguinte forma: o meio de cultura da garrafa inicial foi removido e a garrafa foi lavada uma vez com 5mL de tampão fosfato, pH 7, com descarte do tampão. Em seguida, adicionou-se 1,4mL de tripsina. Após 5 minutos, 9mL de meio de cultura DMEM foram adicionados. Em seguida, as células com o meio foram transferidas para um tubo de centrífuga estéril de 15mL. A contagem das células foi feita utilizando-se câmara de *Neubauer* (70 μ L de PBS, 2 μ L de azul de tripan e 10 μ L da suspensão de células). O seguinte fator de contagem foi utilizado: $F = \bar{A}_q \cdot d \cdot 10^{-4}$, onde: " \bar{A}_q " é média dos quadrantes, "d" o fator de diluição (10 vezes) e " 10^4 " é o fator da câmara (RISS, *et al.*, 2013).

A solução com células foi homogeneizada e o volume retirado foi calculado com base na equação acima para se obter 10^4 células.cm⁻², considerando o volume de 75cm² para a garrafa T75. Em seguida, foi adicionado volume de meio DMEM suficiente para completar 9mL de volume final e as garrafas foram colocadas na estufa de CO₂. O teste de citotoxicidade teve cada replicata feita em uma garrafa diferente, portanto, foram produzidas três garrafas, tratadas com 1,4mL de tripsina, como descrito acima, e tiveram seu número de células contado através da câmara de *Neubauer*. As células foram diluídas para se obter 16mL de uma suspensão de 125.000 células.mL⁻¹ em DMEM. Foram pipetados 200 μ L dessa suspensão em cada poço de uma placa de 96 poços e esta foi incubada por 24 horas em estufa de CO₂. Em seguida, foram adicionados à placa 10 μ L do LyeTx I-b ou LyeTx I-bPEG, diluídos em tampão PBS. As placas foram então incubadas por 24 horas (RISS, *et al.*, 2013).

Após esse tempo, a solução de MTT foi adicionada e as placas foram incubadas por 4 horas, observando-se em seguida a formação ou não dos cristais de formazan (Figura 14). Em seguida, o meio foi retirado e 200 μ L de álcool isopropílico foram adicionados em cada poço, procedendo-se então à leitura em leitor multimodal modular para microplacas *Varioskan Lux* (*ThermoFisher Scientific, Osterode am Harz, Alemanha*) a 595nm (RISS, *et al.*, 2013). Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se os programas Prisma e R (R CORE TEAM, 2017).

A avaliação da citotoxicidade em células HEK-293 foi feita no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do ICB/UFMG, e, em células VERO, na UFSJ Campus Centro-Oeste Dona Lindu (CCO) em Divinópolis/MG.

5.1.10 Índice de seletividade

Para quantificar a seletividade do composto para o patógeno testado em relação às células HEK-293, VERO e eritrócitos humanos, o índice de seletividade foi calculado conforme descrito por LYU *et al.* (2016). Para calcular o índice de seletividade, o IC_{50} obtido com as células VERO ou HEK-293 e o HC_{50} com eritrócitos foram divididos pela CIM de cada isolado de bactéria testada. O número encontrado representou o valor numérico proporcional de seletividade do composto testado em célula bacteriana em relação à célula de mamífero.

5.1.11 Toxicidade aguda *in vivo*

Para o teste de toxicidade aguda, foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, sadios, oriundos do Biotério Central da UFMG, de aproximadamente seis semanas de idade e 20 g de peso. Foi realizado o estudo de toxicidade aguda por via intravenosa do peptídeo LyeTx I-b e de seu derivado PEGuilado nas concentrações de 2,5; 5; 10 e 20mg.kg⁻¹ (OCDE 423, 2001). Foram utilizados três animais para cada uma das três concentrações de peptídeo, totalizando 12 camundongos para o peptídeo LyeTx I-b e 12 animais para o peptídeo LyeTx I-bPEG.

Os animais foram avaliados visualmente nos primeiros 30 minutos após a administração dos peptídeos e, periodicamente, durante as primeiras 24 horas, com especial atenção para as quatro primeiras horas três vezes por dia, durante 14 dias. No décimo quarto dia os camundongos foram eutanasiados com injeção de sobredose de cetamina (240mg.kg⁻¹) e xilazina (45mg.kg⁻¹) (BRUNETTI *et al.*, 2016).

O teste de toxicidade aguda foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo 116/2019 (Anexo 1).

Os ensaios de toxicidade aguda de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG foram feitos no Laboratório de Imunofarmacologia e Reumatologia Experimental do ICB/UFMG.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Síntese do peptídeo LyeTx I-b e LyeTx I-b_{cys} e purificação

Para preparar o peptídeo LyeTx I-b para conjugação direcionada com o polietileno glicol, optou-se por substituir o resíduo de Leu21 por Cys21, permitindo a PEGuilação diretamente nesse resíduo. Os peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-b_{cys} foram sintetizados no Laboratório de Síntese e Estrutura de Peptídeos (LASEP/UFMG) e apresentaram rendimento bruto (antes da purificação) de aproximadamente 50% (100mg). Na Tabela 6, é possível avaliar as diferenças entre LyeTx I-b e o LyeTx I-b_{cys}, bem como o coeficiente de extinção molar calculado de acordo com a equação 01, subitem 5.1.5.

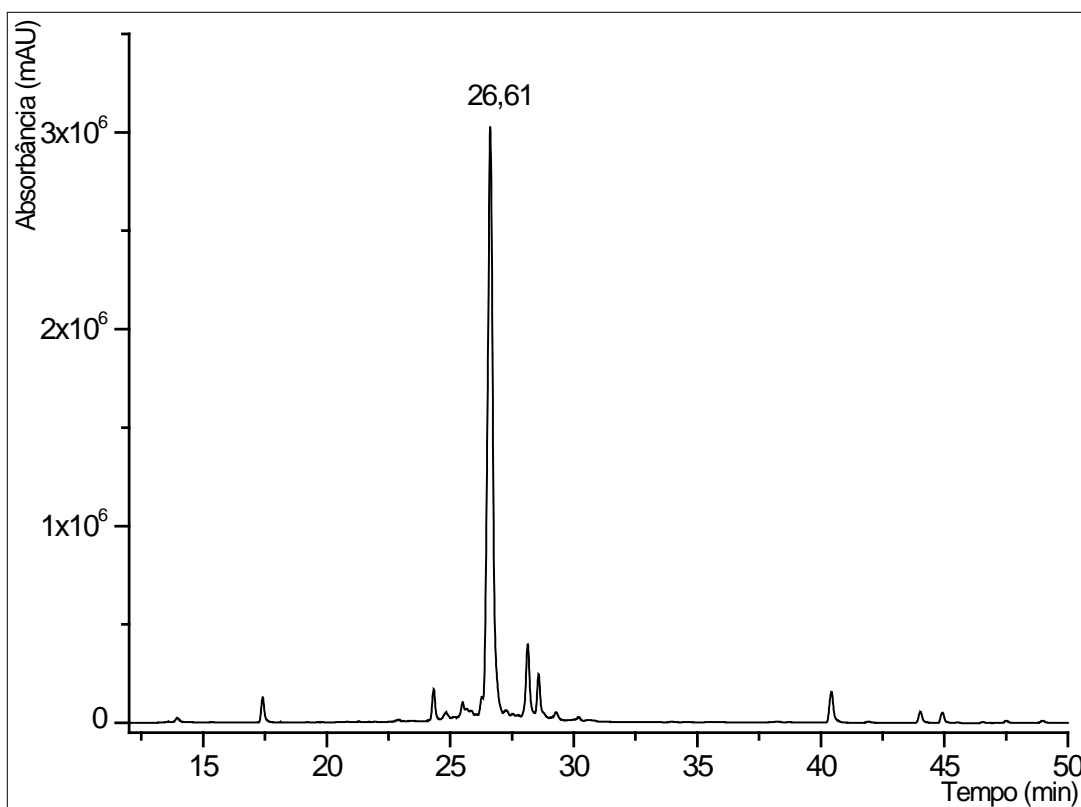
Tabela 6 – Comparativo dos parâmetros químicos entre o peptídeo LyeTx I-b e seu derivado LyeTx I-b_{cys}

	LyeTx I-b	LyeTx I-b _{cys}
Sequência	IWLTALKFLGKNLGKLAQQLAKL	IWLTALKFLGKNLGKLAQQCAKL
Massa (g.mol⁻¹)	2737,4	2727,4
Fórmula Molecular	C ₁₃₁ H ₂₂₂ N ₃₄ O ₂₉	C ₁₂₈ H ₂₁₆ N ₃₄ O ₂₉ S
C-terminal	-NH ₂ (amida)	-NH ₂ (amida)
N-terminal	-CH ₃ CO (acetil)	-CH ₃ CO (acetil)
Coef. Absort. Molar	5500	5500

Obs. O resíduo substituído está indicado em vermelho.

Fonte: Elaborado pelo autor

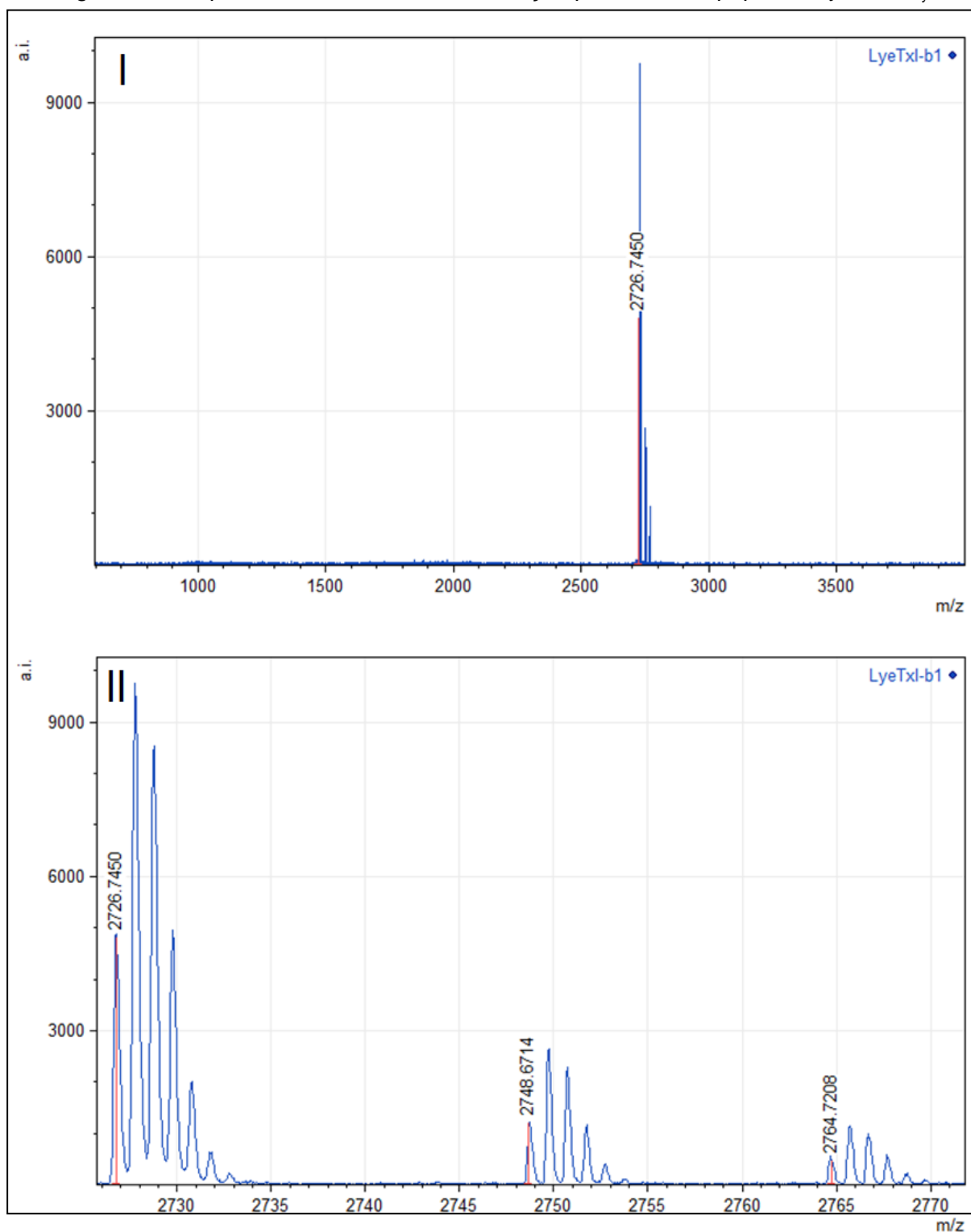
Após a purificação (Figura 15), os peptídeos foram coletados e avaliados em MALDI-TOF MS (Figura 16) e, então, liofilizados.

Figura 15 – Cromatograma de purificação de LyeTx I-b_{cys}.

Obs.: O eixo Y representa a absorbância em mAU medida no comprimento de onda a 214 nm e o eixo X, o tempo em minutos. Coluna semipreparativa Phenomenex C18, 10 μ m, 250mm, 10mm. Fase móvel TFA em água 0,1% v/v (fase A) e TFA 0,08% v/v em acetonitrila (fase B). Pico cromatográfico com tempo de eluição do LyeTx I-bPEG em 26,61 minutos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No espectro de massas, verificou-se que a purificação foi eficaz. No espectro de massas à direita (Figura 16), mostra-se a distribuição isotópica onde o íon A+1 apresenta intensidade muito superior àquela do íon A, o que aponta para uma molécula orgânica contendo elevado número de carbonos. A presença de vários íons (com suas respectivas distribuições isotópicas) indica que esse peptídeo foi ionizado não apenas por protonação, mas também pela formação de adutos de sódio e potássio. A provável fonte de sódio e potássio é oriunda da matriz com a qual a solução foi preparada.

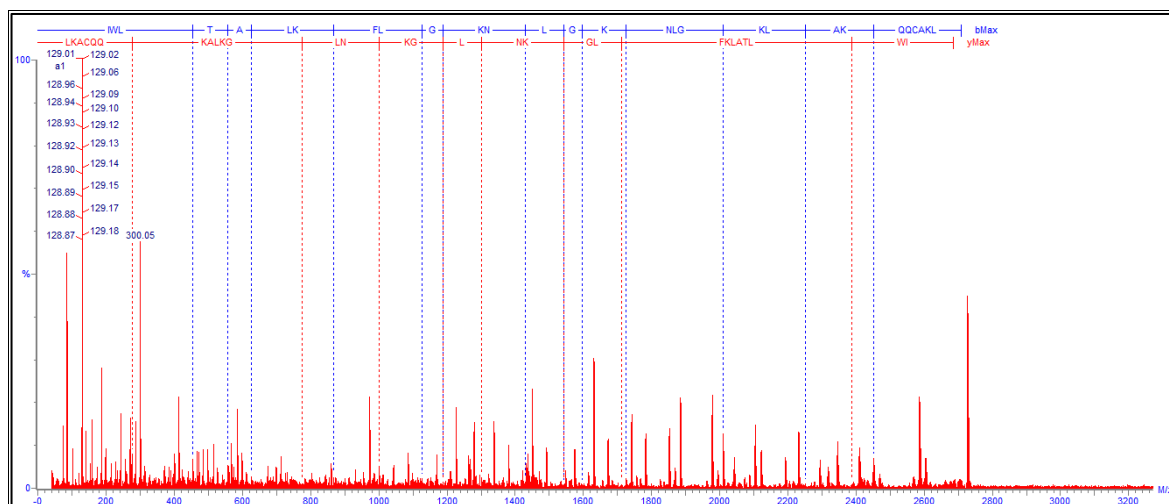
Figura 16 – Espectros MALDI-TOF MS da fração purificada do peptídeo LyeTx I-b_{cys}

Obs.: Espectro de massa do pico da Fig.15 (26,31 minutos) onde I mostra LyeTx I-b_{cys} m/z de 2.726,7450 e II as distribuições isotópicas de LyeTx I-b_{cys}. MALDI-TOF-MS com método pepmix (até 4kDa). O eixo Y absorvância em a.i e eixo X a massa carga em m/z.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A confirmação da sequência dos resíduos de aminoácidos de LyeTx I-b_{cys} foi obtida por MS/MS (Figura 17). Após a purificação por cromatografia líquida, o produto foi liofilizado e apresentou rendimento final de aproximadamente 65%.

Figura 17 – Espectro MALDI-TOF MS/MS da fração purificada de LyeTx I-b_{cys}



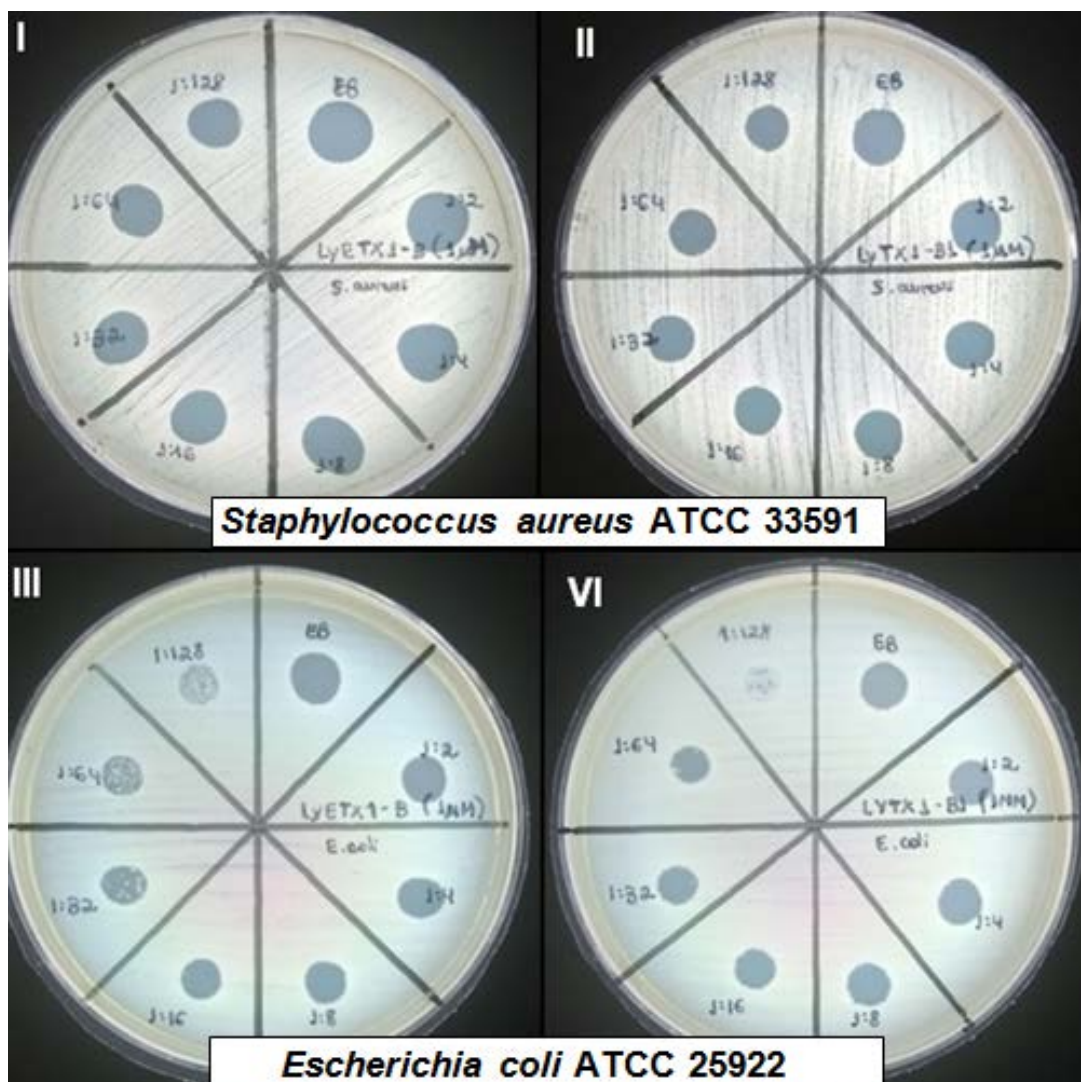
Obs.: Análise e sequenciamento através do programa PepSeq®.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Atividade de LyeTx I-b_{cys} em bactérias *Gram-positivas* e *Gram-negativas*

Para avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do LyeTx I-b_{cys} comparada à do LyeTx I-b, foram feitos testes de disco difusão e seus resultados (formação de halo de inibição) estão expostos na Figura 18, onde se verifica que houve a formação de halo para ambos os microrganismos e peptídeos testados. Este teste exploratório mostrou que há preservação da atividade antimicrobiana do peptídeo modificado com o resíduo de cisteína, mesmo em baixas concentrações, tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas.

Figura 18 – Atividade antimicrobiana por disco difusão de LyeTx I-b e LyeTx I-b_{cys} em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*



Obs.: Concentrações dos peptídeos de $7,81\mu\text{mol.L}^{-1}$ a $1000\mu\text{mol.L}^{-1}$. I) LyeTx I-b e II) LyeTx I-b_{cys}, testados em *S. aureus* (ATCC 33591), e III) LyeTx I-b e IV) LyeTx I-b_{cys}, testados em *E. coli* (ATCC 25922). Peptídeos foram solubilizados em água e pipetados diretamente no gel.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para verificar com mais precisão se a substituição do resíduo de Leu21 por Cys21 poderia comprometer a atividade antimicrobiana, avaliaram-se as concentrações inibitórias mínimas de ambos os peptídeos, com oito concentrações diferentes entre $64\mu\text{mol.L}^{-1}$ e $0,25\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os resultados revelaram valores idênticos de CIM para os peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-b_{cys}, de $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ para *E. coli* ATCC e $2\mu\text{mol.L}^{-1}$ para *S. aureus* ATCC, Tabela 7.

Tabela 7 – Comparativo dos valores da concentração inibitória mínima ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para o LyeTx I e seus derivados

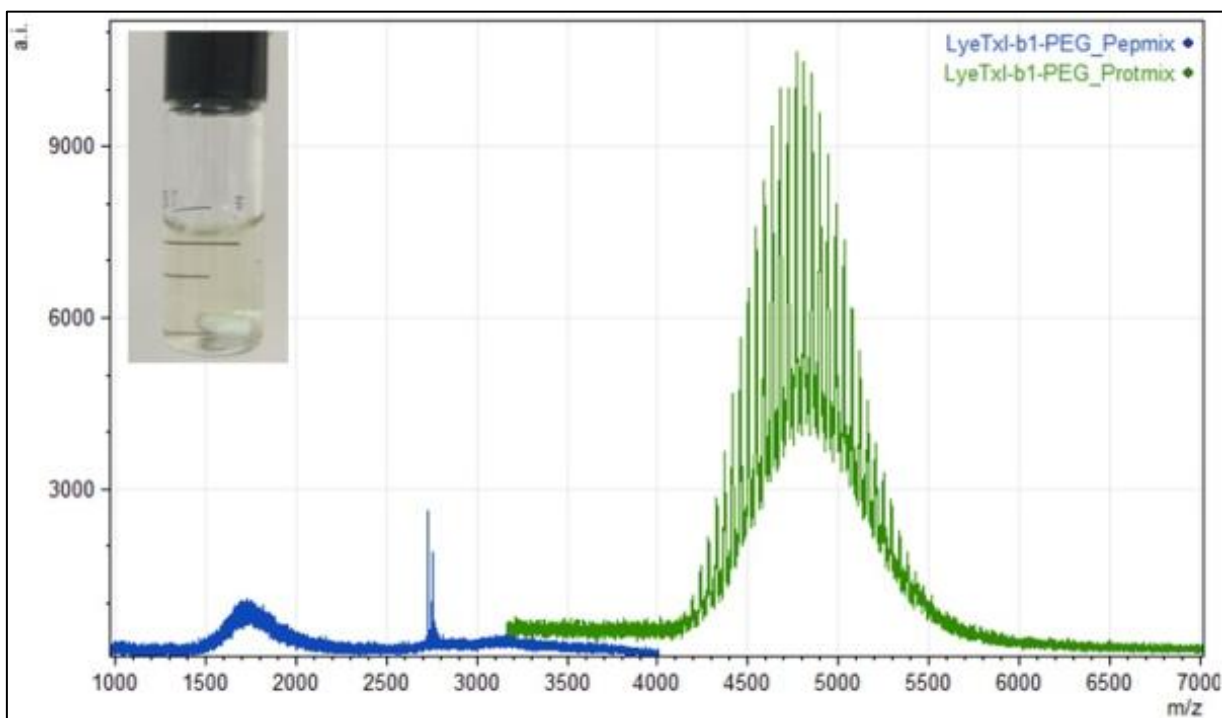
Microrganismo	Reis <i>et al.</i> (2018)	Fuscaldi <i>et al.</i>	Santos <i>et al.</i>	LyeTx I-b
	LyeTx I-b	(2016) LyeTx I	(2010) LyeTx I	LyeTx I-b _{cys}
<i>S. aureus</i> ATCC	2,85	5,52	3,19	2,00
<i>E. coli</i> ATCC	0,71	5,52	7,81	1,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3 PEGuilação do peptídeo LyeTx I-b_{cys}

A mistura contendo solução tampão fosfato de sódio, LyeTx I-b_{cys}, acetonitrila, TCEP e mPEG-MAL apresentou coloração levemente amarelada, densa e translúcida (vide canto superior esquerdo da Figura 19), o que demonstra a completa solubilização, tanto do peptídeo, quanto do mPEG-MAL, e demais reagentes no meio. Após a reação, uma alíquota foi avaliada no equipamento MALDI-TOF MS e observou-se padrão típico da PEGuilação. O espectro de massas obtido é mostrado na Figura 19, que também mostra íons com intensidade mais de três vezes acima à do peptídeo, mesmo estando disperso em intervalo de quase m/z 1000 (m/z 4300 a 5300).

Figura 19 – Espectro de massas da solução reacional de PEGuilação de LyeTx I-b_{cys}

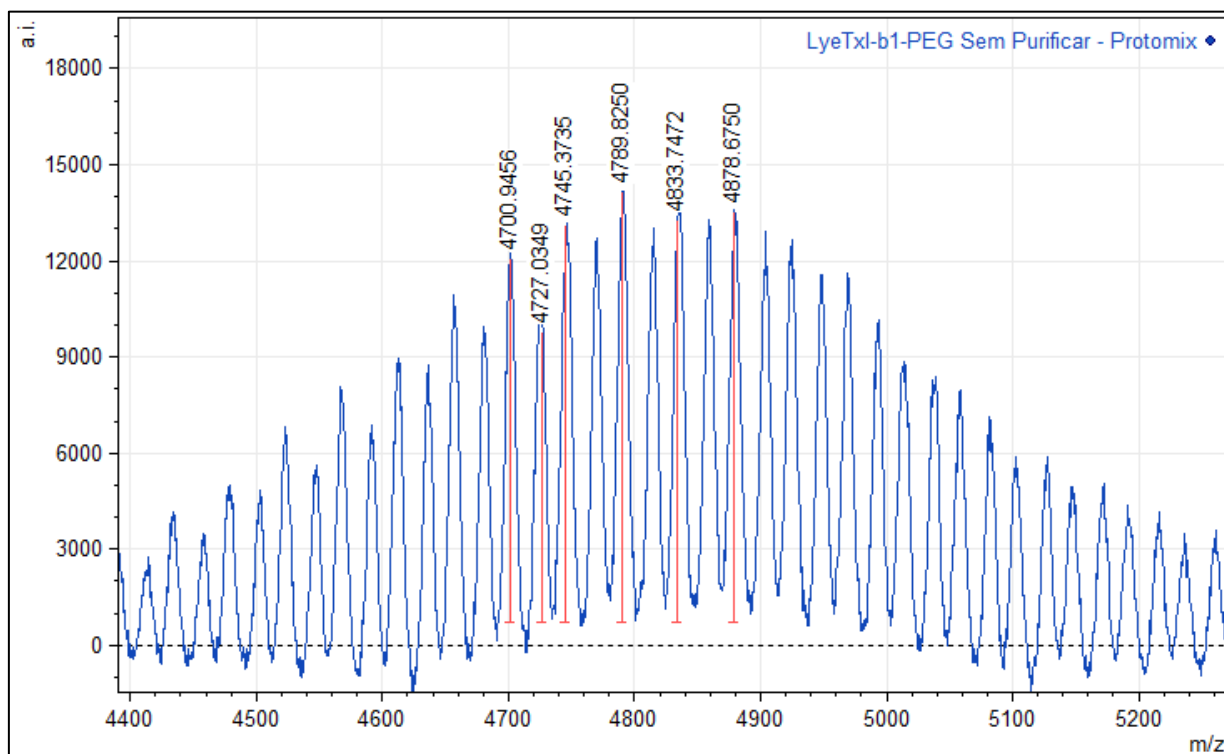


Obs.: Método *pepmix* (até m/z 4000) e *protmix* (até m/z 7000), onde se observam m/z entre 1500 a 2000 e m/z 2726 indicam o mPEG-MAL e o peptídeo que não reagiram. LyeTx I-bPEG é mostrado com m/z entre 4400 a 5200 kDa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 19, pode-se observar com mais detalhes o espectro de massas da mistura reacional. Na região de m/z 4400 a 5200, localiza-se o LyeTx I-bPEG. Uma vez que o método utilizado de ionização produz íons com apenas uma carga, tais valores podem ser associados à massa molar.

A Figura 20 apresenta a ampliação na região de m/z 4400 a 5200. Nesse espectro de massas, nota-se uma diferença de 44 unidades entre os íons adjacentes de maior intensidade.

Figura 20 – Espectro de massas da solução reacional de PEGuilação de LyeTx I-bPEG_{cys}

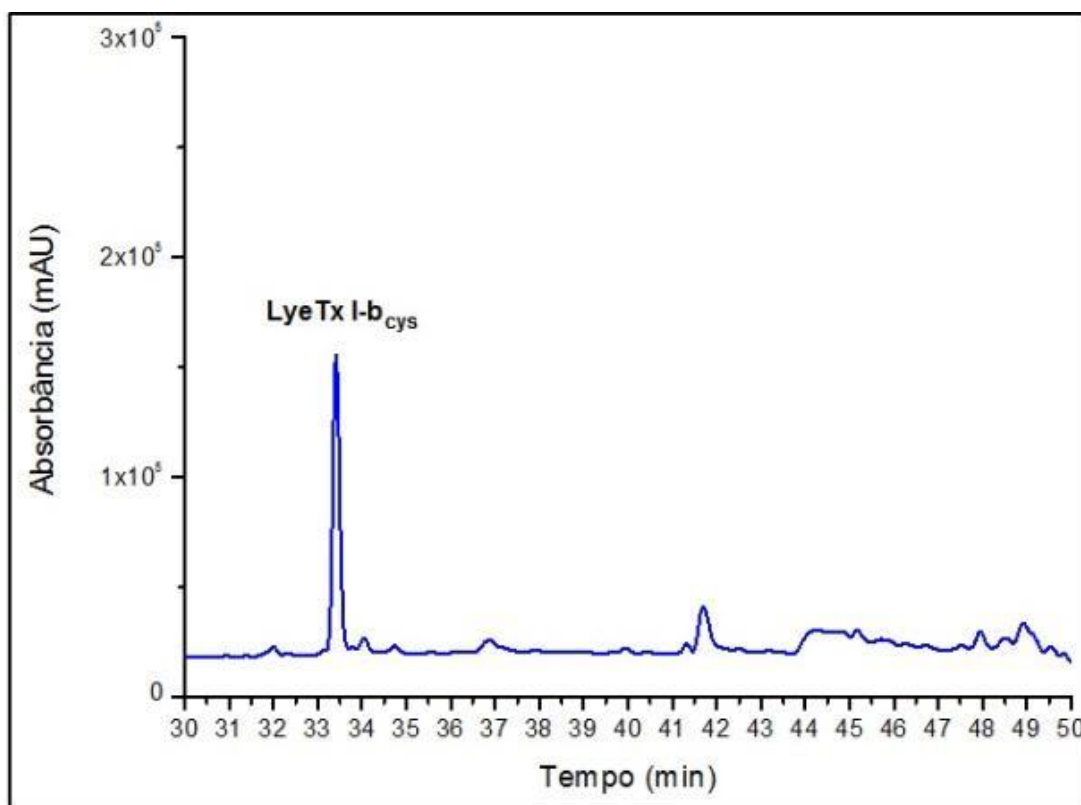
Obs.: Foi utilizado o método *protmix*, com detalhe do peptídeo após a conjugação do mPEG-MAL, LyeTx I-bPEG, na região de m/z 4400 a 5200. Observado diferenças de 23 m/z que demonstra moléculas sodiadas e de 44 m/z que apontando a diferença entre os monômeros de etilenoglicol no polímero.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.4 Purificação do peptídeo PEGuilado

Para a purificação, foi utilizado cromatógrafo líquido com detector PDA e coluna preparativa C18. As fases móveis utilizadas foram: água com TFA 0,1% (fase móvel A) e acetonitrila com TFA 0,08% (fase móvel B), em gradiente de 10 a 100% da fase B em 40 minutos e leitura a 214nm. Injetou-se o mPEG-MAL para avaliar o seu tempo de retenção e pureza. A pureza do mPEG-MAL foi de aproximadamente 76%, e seu tempo de retenção de 32,5 minutos.

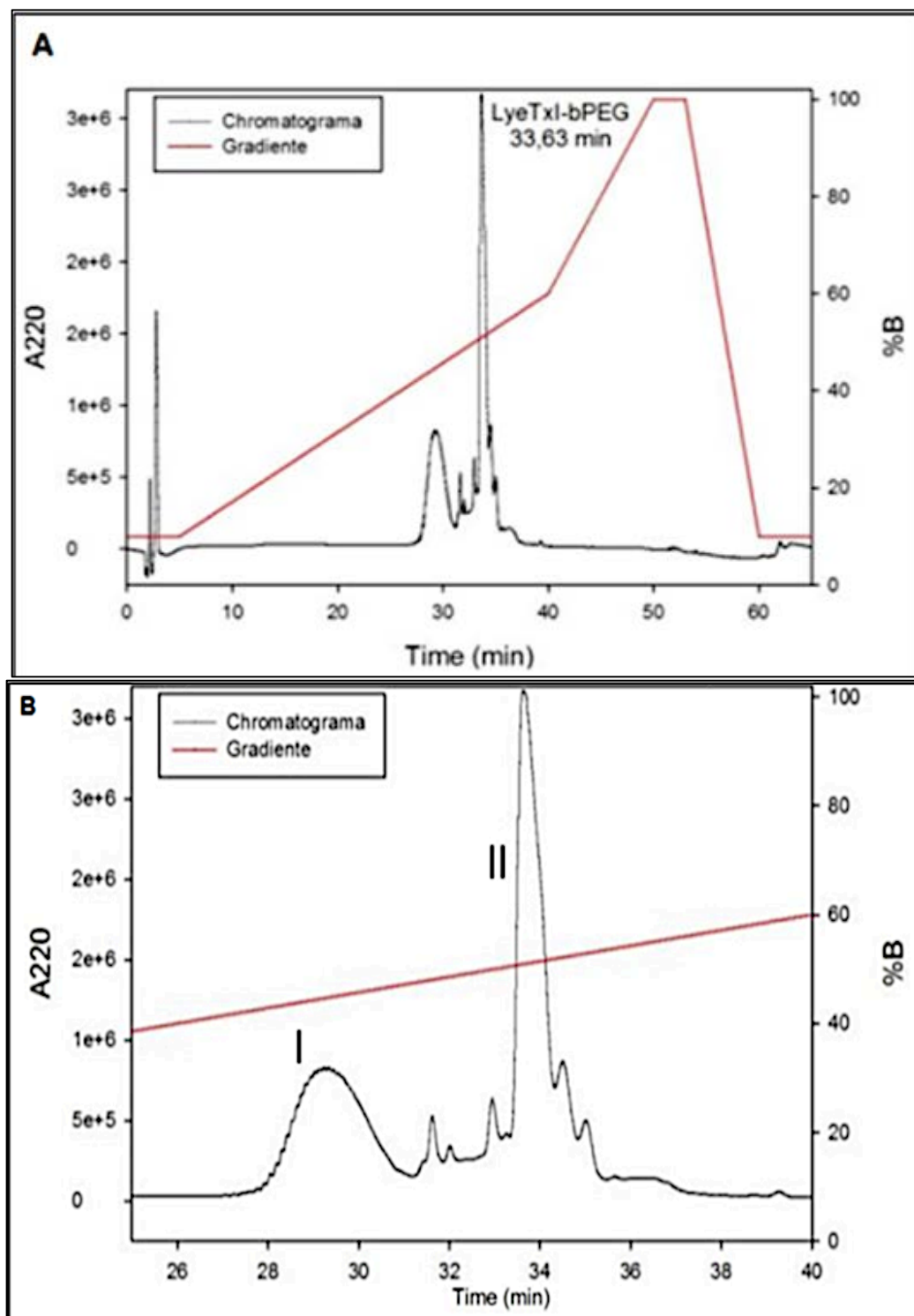
Foi injetado também o LyeTx I-b_{cys} para avaliar o tempo de retenção e sua pureza (Figura 21). A pureza do peptídeo foi acima de 90% e seu tempo de retenção foi de 33,5 minutos. A purificação do produto PEGuilado é mostrada no cromatograma da Figura 22.

Figura 21 – Cromatograma de análise de LyeTx I-b_{cys}

Obs.: Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, coluna C18, e pelo método de purificação do peptídeo PEGuilado. Leitura em comprimento de onda em 214nm. O tempo de retenção foi de 33,25 minutos

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Cromatograma de purificação de LyeTx I-b PEG com detalhe dos picos cromatográficos do mPEG-MAL e do LyeTx I-bPEG



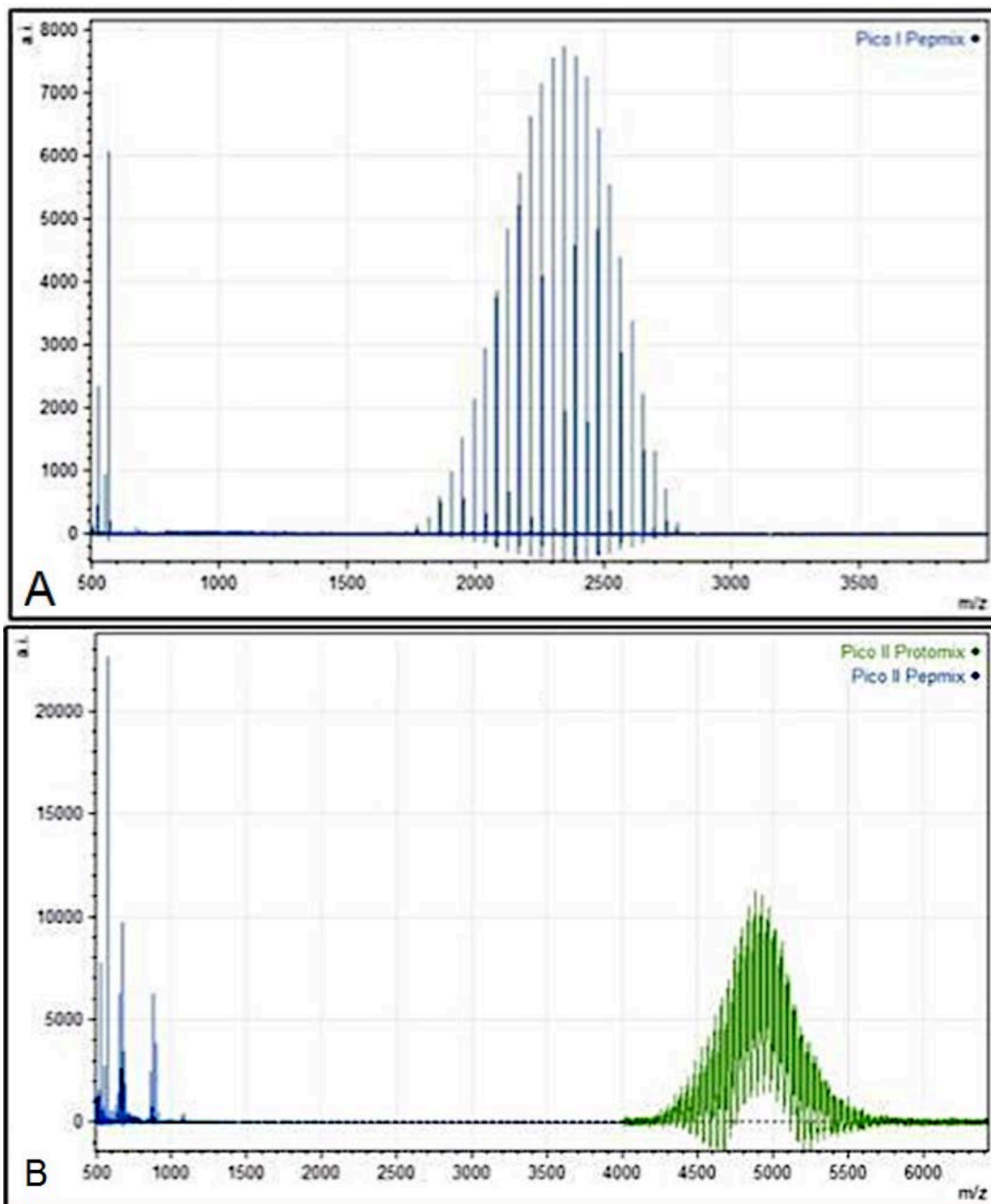
Obs.: (I) pico cromatográfico do mPEG-MAL, tempo de retenção de 29,24 minutos; (II) pico cromatográfico do LyeTx I-bPEG, tempo de retenção de 33,63 minutos. (I) pico cromatográfico do mPEG-Mal e tempo de retenção de 29,24 minutos; (II) pico cromatográfico do LyeTx I-bPEG, comprimento de onda 214nm e tempo de retenção de 33,63 minutos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A pureza do peptídeo PEGuilado foi acima de 80% e seu tempo de retenção foi de 33,63 minutos. Os picos cromatográficos I e II são, respectivamente, o mPEG-MAL e o LyeTx I-bPEG (Figura 22 – B), confirmado com os espectros de massas.

O espectro de massas da Figura 23 (A) correspondente ao pico cromatográfico I do cromatograma de purificação da Figura 22 (B), onde são observados íons com diferenças de massas simétricas na faixa de 2 a 2,7kDa, características de polietileno glicol. Sendo assim, esse pico cromatográfico refere-se ao excesso de mPEG-Mal que não reagiu. O espectro de massas da Figura 23 – B refere-se ao pico cromatográfico II da Figura 22 (B), e nele são observadas repetições simétricas, características de polietileno glicol, na faixa de 4400 a 5200kDa, portanto, este pico corresponde ao peptídeo PEGuilado e purificado.

Figura 23 – Espectro de massas dos picos cromatográficos I e II do cromatograma da purificação



Obs.: Método *pepmix* (até m/z 4000) e *protmix* (até m/z 7000), onde se observam A) m/z entre 2000 a 2600 sendo o mPEG- MAL e B) m/z entre 4400 a 5200 kDa o LyeTx I-bPEG. Métodos *pepmix*, para m/z de 4000 (azul) e *protmix* (verde) para m/z acima de 4000.

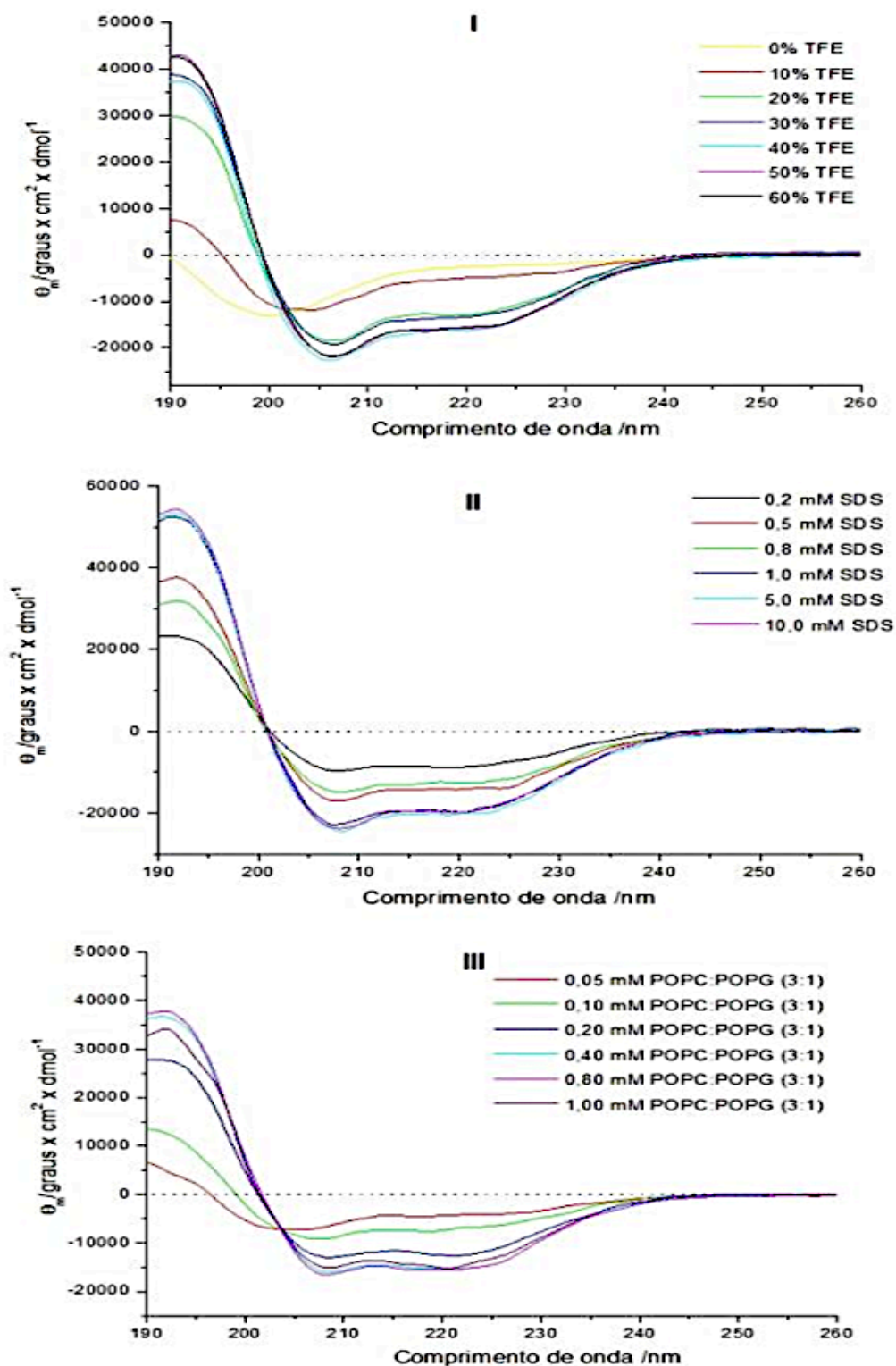
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.5 Dicroísmo circular (CD)

Pela análise de CD, tanto com TFE, quanto com SDS, e lipossomas, é possível verificar que a PEGuilação preservou a estrutura secundária em α -hélice do peptídeo LyeTx I-b_{cys} (Figura 24). O CD do peptídeo não PEGuilado já foi demonstrado por Reis *et al.* (2018). Esta preservação de estrutura após a conjugação com o polietileno glicol deve ser importante para o peptídeo e será fundamental nas atividades *in vitro* e *in vivo*.

O LyeTx I-bPEG apresentou conformação desordenada (*random coil*) em solução aquosa, 0% TFE, ou com 10% TFE e 0,05% mM POPC:POPG (3:1), como pode ser visto na menor absorção próxima de 200nm na Figura 24. Com a adição de TFE, SDS ou POPC:POPG (3:1), o peptídeo PEGuilado adotou conformação em alfa hélice, atestado pelas absorções por volta de 208 e 222nm e máxima próxima em 192nm (Figura 24).

Figura 24 – Espectros de Dicroísmo circular de LyeTx I-bPEG



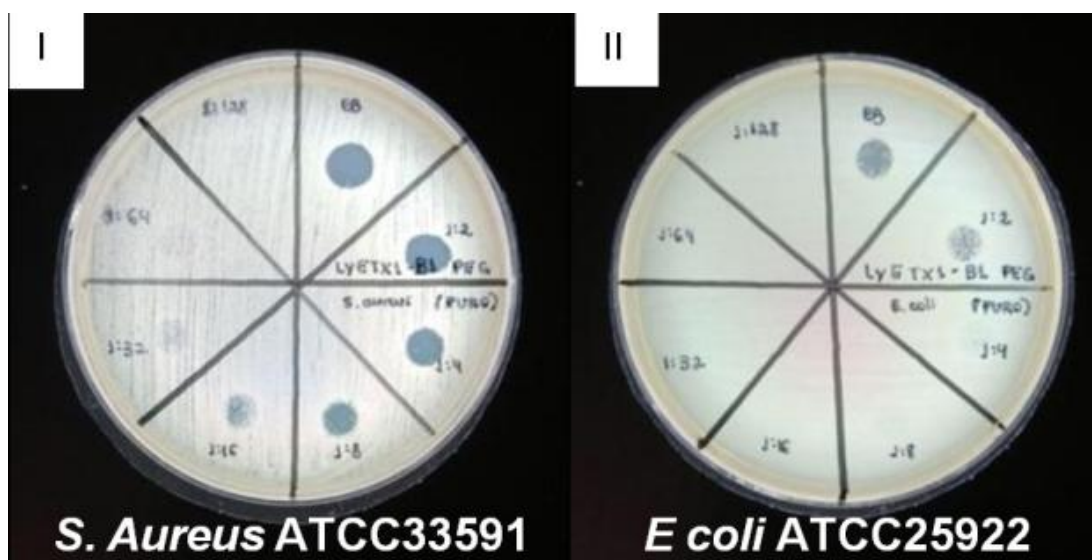
Obs.: Comparação dos espectros de Dicroísmo Circular obtidos para a LyeTx I-bPEG em diferentes meios I) TFE, II) SDS e III) POPC:POPG (3:1). Para cada condição foram utilizadas distintas concentrações do meio com a concentração fixa do peptídeo peguado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.6 Atividades do peptídeo PEGuilado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (disco difusão)

Para avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do peptídeo LyeTx I-bPEG, foram feitos os testes de disco difusão e seus resultados (formação de halo de inibição) são mostrados na Figura 25 (I *Gram-positivo*) e Figura 25 (II Gram-negativo).

Figura 25 – Experimento em disco difusão de LyeTx I-bPEG, I *S. Aureus* (ATCC 33591) e II *E. coli* (ATCC 25922)



Obs.: O peptídeo PEGuilado foi solubilizado em água e utilizado nas concentrações mostradas diretamente na placa ($7,81\mu\text{mol.L}^{-1}$ a 1mmol.L^{-1}), nas bactérias indicadas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O peptídeo PEGuilado apresentou atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Na placa contendo *S. aureus*, observou-se atividade nas diluições de até 1:16, enquanto, para *E. coli*, foi observada atividade até a diluição 1:2. Entretanto, a concentração inibitória mínima (CIM) foi também verificada (item 5.2.7), pois a conjugação com o mPEG-MAL poderia ter levado à alteração na capacidade de migração do peptídeo no gel da placa, comprometendo a formação do halo de inibição. Os resultados preliminares na placa podem ser visualizados na Figura 25, onde se observam halos com pontos de crescimento do microrganismo. Observou-se também que o peptídeo conjugado apresentou melhor

atividade contra *S. aureus*, o que também é observado na Figura 18, com o peptídeo não PEGuilado.

5.2.7 Concentração inibitória mínima (CIM) com o peptídeo PEGuilado

O peptídeo LyeTx I-b_{cys} conjugado com o mPEG-MAL apresentou perda de atividade de quatro vezes para *Escherichia coli* ATCC e *Staphylococcus aureus* ATCC, se comparada ao não PEGuilado, conforme visto na Tabela 7. A perda de atividade foi verificada também nos isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*. Mas, nos isolados de *A. baumannii*, a redução de atividade do LyeTx I-bPEG comparada à do LyeTx I-b foi muito menor, e no isolado ISOL_9, não foi verificado perda de atividade *in vitro* (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparativo dos valores da concentração inibitória mínima do peptídeo LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG

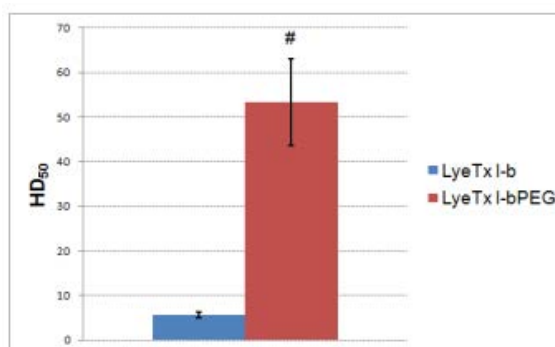
Microrganismo	LyeTx I-b ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	LyeTx I-bPEG ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
<i>Acinetobacter baumannii</i> ISOL_9	1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ISOL_34	0,5	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	4
<i>Escherichia coli</i> ISOL_10	1	4
<i>Escherichia coli</i> ISOL_11	1	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	2	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ISOL_8	2	8
<i>Serratia marcescens</i> ISOL_5	4	128
<i>Serratia marcescens</i> ISOL_7	2	64
<i>Serratia marcescens</i> ISOL_10	2	16

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.8 Atividade hemolítica

Os valores médios de HC_{50} (relativos à hemólise) em sangue humano foram de $5,60 \pm 0,64 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o LyeTx I-b e de $53,19 \pm 9,70 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para LyeTx I-bPEG (Figura 26).

Figura 26 – Comparativo médio dos valores de HC_{50} de LyeTx I-b e o LyeTx I-bPEG



Obs.: Eixo y representa o valor da concentração que leva a lise de 50% das hemácias (HD_{50}) em $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A barra azul representa o peptídeo LyeTx I-b e a vermelha representa LyeTx I-bPEG. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio padrão, p de 0,05.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.9 Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT para células VERO e HEK-293 tratadas com os peptídeos

O peptídeo PEGuilado, quando comparado ao não PEGuilado, aumentou em mais de dez vezes o IC_{50} em células VERO, e em duas vezes para células HEK-293, o que indica redução da atividade citotóxica, tanto em células renais de macaco, quanto em células renais humanas (Tabela 9 e Figura 27).

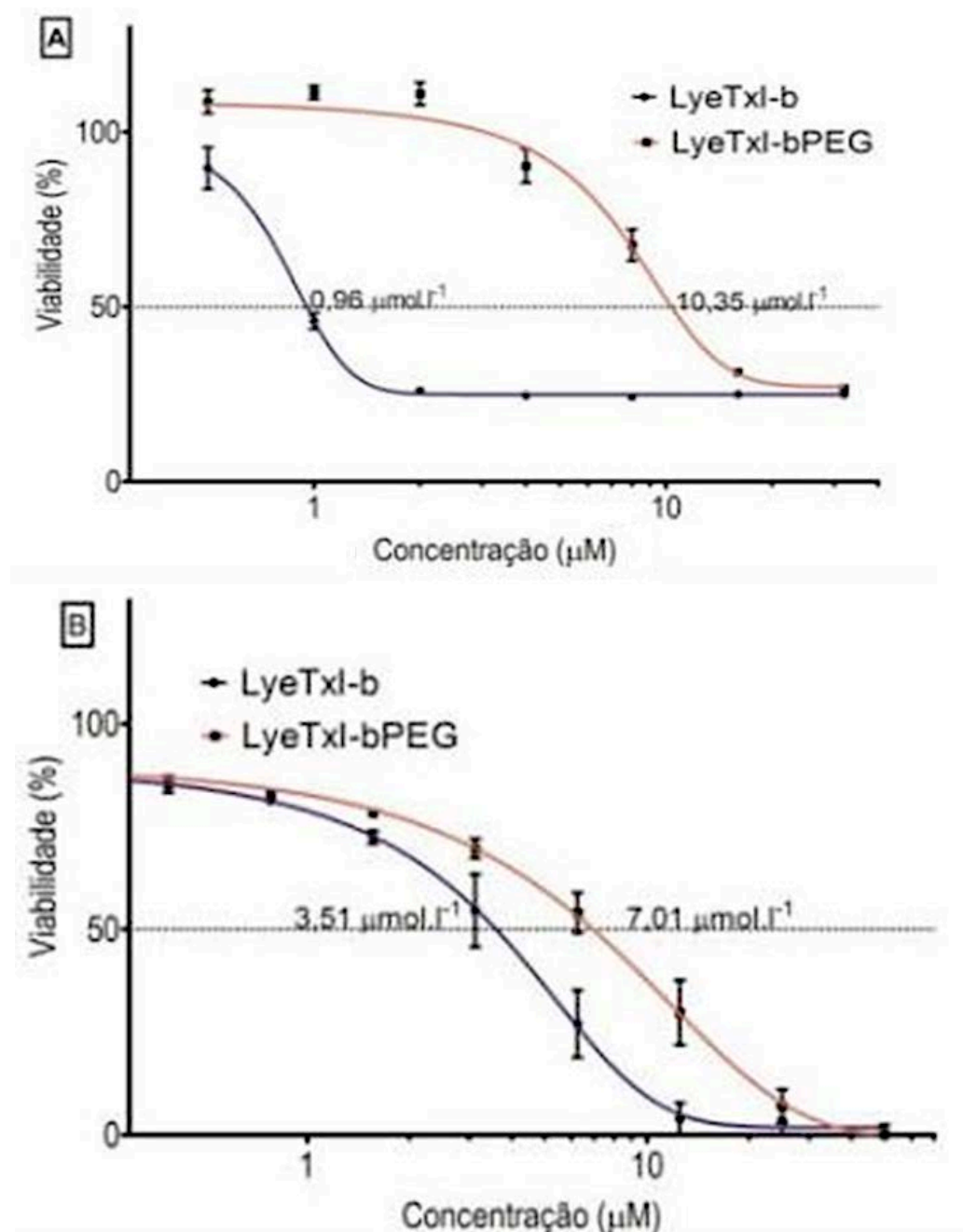
Tabela 9 – Comparativo entre citotoxicidade em células VERO e HEK-293 para os peptídeos LyeTx I-b e o LyeTx I-bPEG

Peptídeo	Célula VERO IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Célula HEK-293 IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
LyeTx I-b	$0,96 \pm 0,31$	$3,51 \pm 0,21$
LyeTx I-bPEG	$10,35 \pm 0,75$	$7,01 \pm 0,46$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Essa redução da atividade citotóxica é importante, pois os medicamentos devem possuir baixa citotoxicidade para células dos diversos órgãos, incluindo as células renais, utilizadas aqui como modelo *in vitro*. Porém, é necessário que os testes em modelos *in vivo* sejam realizados para avaliar a toxicidade aguda do peptídeo e de seu derivado PEGuilado.

Figura 27 – Curva dose-resposta da citotoxicidade de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG



Obs.: Percentual de viabilidade celular (eixo Y) versus a concentração do peptídeo em µM (eixo x). Células VERO (A) e HEK-293 (B) com as devidas barras de desvios. As concentrações onde houve 50% de morte celular (IC₅₀) são indicadas nos gráficos pelas linhas pontilhadas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.10 Toxicidade aguda

Depois de avaliada a toxicidade *in vitro* em células HEK-293, VERO e em eritrócitos humanos, avaliou-se também a toxicidade aguda *in vivo* em camundongos. Neste modelo, o peptídeo LyeTx I-b apresentou toxicidade aguda, via endovenosa, na dosagem de 5mg.kg^{-1} , e o peptídeo PEGuilado, na dosagem de 20mg.kg^{-1} , mostrando uma redução de quatro vezes dessa toxicidade em relação ao LyeTx I-b (Quadro 02).

Quadro 02 – Comparativo entre a toxicidade aguda em camundongos C57/BL para os peptídeos LyeTx I-b e o LyeTx I-bPEG

2.5 mg.kg⁻¹									
LyeTxI-b									
t 5 min	t 15 min	t 60 min	t 24 h	t 14 days					
●●●	●○○	○○○	○○○	○○○					
LyeTxI-bPEG									
t 5 min	t 15 min	t 60 min	t 24 h	t 14 days					
○○○	○○○	○○○	○○○	○○○					
10 mg.kg⁻¹									
LyeTxI-b									
t 5 min	t 15 min	t 60 min	t 24 h	t 14 days					
●●●	●●●	●●●							
LyeTxI-bPEG									
t 5 min	t 15 min	t 60 min	t 24 h	t 14 days					
●●●	●●●	○○○	○○○	○○○					
5 mg.kg⁻¹									
LyeTxI-b									
t 5 min	t 15 min	t 60 min	t 24 h	t 14 days					
●●●	●●●	●●●	●●●	○	○				
LyeTxI-bPEG									
t 5 min	t 15 min	t 60 min	t 24 h	t 14 days					
○○○	○○○	○○○	○○○	○○○					
20 mg.kg⁻¹									
LyeTxI-b									
t 5 min	t 15 min	t 60 min	t 24 h	t 14 days					
LyeTxI-bPEG									
t 5 min	t 15 min	t 60 min	t 24 h	t 14 days					
●●●	●●●	●●●	●●●						
Legenda: ○ camundongos sem sinais, ● camundongos com leves sinais, ●● camundongos com sinais, ●●● camundongos mortos devido a efeitos toxicos									

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 DISCUSSÃO

A modificação do peptídeo LyeTx I-b com a substituição da leucina na posição 21 por um resíduo de cisteína foi feita para favorecer a ligação do mPEG-MAL na região da sequência mais distante do N-terminal da molécula. Sabe-se que essa região é fundamental para a interação do peptídeo com a membrana alvo (FUSCALDI *et al.*, 2016). Essa modificação reduziu a toxicidade do peptídeo *in vitro*

e *in vivo*, preservando sua atividade, principalmente para isolados clínicos de *A. baumannii*. Desse modo, o peptídeo sintetizado com a cisteína, aqui chamado de LyeTx I-b_{cys}, foi purificado por cromatografia líquida e apresentou tempo de retenção de 26,61 minutos. Esse teve sua pureza e identificação confirmadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, cujo espectro apresentou sinal em m/z 2726,7450 (Figura 16), ficando em consonância com sua forma monoisotópica protonada (m/z [2725,7450 +1]/1]) devido à protonação feita pela matriz utilizada na análise MALDI-TOF.

A Tabela 6 indica a massa média do LyeTx I-bPEG, que é obtida pelo somatório das massas médias dos átomos constituintes do peptídeo (WILSON e WALKER, 2010).

O espectro de massas na Figura 16 (II) mostra outros íons: adutos de sódio (m/z 2748,6714) e potássio (m/z 2764,7208) do mesmo peptídeo. A distribuição isotópica do íon protonado é consistente com moléculas que apresentam elevado número de átomos de carbono, como os peptídeos (Tabela 6) (LEITE *et al.*, 2004). Por exemplo, o primeiro íon de referência de m/z 2726,7450 (íon A) apresentou intensidade próxima de 5.000 a.i. (intensidade absoluta). Para seu isotópologo (A+1), a intensidade foi maior, próxima de 10.000 a.i. O isotópologo A+2 também mostra intensidade relativamente elevada. Isso ocorre devido, principalmente, à presença de um ou dois átomos de ¹³C nesses isotópologos, respectivamente. Destaca-se que o ¹³C constitui por volta de 1,1% de todo o carbono existente (ROSMAN, TAYLOR, 1998).

Com a confirmação do peptídeo sintetizado e purificado (Figura 17), sua atividade antimicrobiana foi verificada por disco difusão (Figura 18), sendo então quantificado por CIM (Tabela 7). O peptídeo LyeTx I-b_{cys} apresentou valores de CIM próximos aos obtidos por Reis *et al.* (2018) para o LyeTx I-b, e menores que os valores encontrados para o peptídeo original, LyeTx I, por Santos *et al.* (2010) e Fuscaldi *et al.* (2016) (Tabela 9). Estes resultados mostram que houve preservação da atividade antimicrobiana com a troca dos resíduos de leucina 21 para cisteína 21 (Tabela 9). Os valores da CIM encontrados aproximam-se daqueles obtidos por Fuscaldi *et al.* (2016), Reis *et al.* (2018) e Santos *et al.* (2010), com os peptídeos

LyeTx I e LyeTx I-b, testados em *S. aureus* e *E. coli*, conforme ilustrado na Tabela 9 abaixo.

Assim, a modificação com a substituição do resíduo de leucina por cisteína preservou a atividade do peptídeo. Isso era esperado, pois Fuscaldi *et al.* (2016) já haviam verificado que uma modificação próxima à região C-terminal, acoplando um grupo HYNIC, não comprometia a atividade antimicrobiana nesse peptídeo.

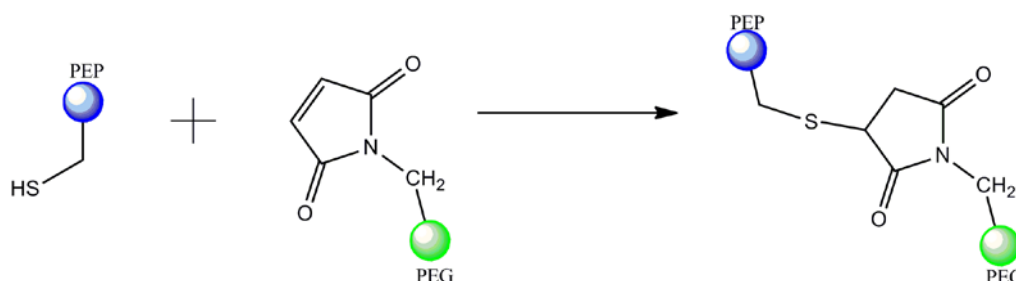
A conjugação de um mPEG-MAL contendo o grupo funcional maleimidil foi feita ao grupo tiol presente na cisteína, conforme ilustrado na Figura 28. A escolha do mPEG-MAL com o grupo funcional se deu com base no tipo de grupo reativo disponível na molécula que seria acoplada ao mPEG-MAL, que, para os peptídeos, são os aminoácidos reativos típicos, que incluem: lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina, tirosina bem como o grupo amino N-terminal e o ácido carboxílico C-terminal. Essa escolha é fundamental quando se conhece a região ativa do peptídeo e se quer uma PEGuilação direcionada, evitando-se conjugações indesejadas que possam ocorrer em regiões ativas do peptídeo (VERONESE, 2009).

A alternativa escolhida neste trabalho foi a PEGuilação de resíduos de cisteína livre, pois geralmente o número de cisteínas livres em peptídeos é muito baixo, e o LyeTx I-b não possui nenhuma. A PEGuilação em cisteínas já foi feita em outros peptídeos e proteínas, como o Bac7(1-35) e a serina protease uroquinase (BENINCASA *et al.*, 2015; VINE *et al.*, 2015). Com a substituição do resíduo de aminoácido, foi obtido o LyeTx I-b_{cys} (Tabela 6). Essa estratégia não deixa de ter suas limitações, pois a adição, principalmente, de cisteínas livres, aumenta as reações de dimerização dos peptídeos (TYURYAEVA *et al.*, 2017).

Foi utilizado o reagente tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), agente redutor forte que rompe pontes dissulfeto, trinta minutos antes da adição do mPEG-MAL. Também, a reação foi realizada em ambiente inerte, uma vez que os grupos tiólicos livres em presença de oxigênio tendem a formar íons superóxido, o que favorece a dimerização (BAGIYAN *et al.*, 2003). A escolha do mPEG-MAL foi devido à sua reatividade com grupos tiól (presentes na cadeia lateral de cisteínas), mesmo em valores de pH entre 6 e 7 (PASUT, VERONESE, 2009). Nessa condição de reação, os grupos amino das cinco lisinas presentes, que estariam majoritariamente na

forma protonada devido aos valores de seus pKa serem acima de oito, seriam muito pouco reativos (ROBERTS, BENTLEY, HARRIS, 2002; VERONESE, 2009).

Figura 28 – Esquema mostrando a reação química de conjugação do mPEG-MAL com o LyeTx I-b_{cys}



Obs.: A esfera em azul representa o peptídeo e a esfera em verde representa o mPEG-MAL. O sítio de ligação do peptídeo é o grupo tiol da cisteína e o do mPEG-MAL é o grupo maleimidil.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A reação de PEGuilação apresentou rendimento satisfatório, acima de 90%, apontando que as condições de reação definidas foram adequadas e favoreceram a conversão e obtenção do LyeTx I-bPEG. Isso pode ser observado na Figura 22, onde o pico cromatográfico do produto PEGuilado apresentou, visualmente, a maior área comparada aos demais picos cromatográficos, e também na Figura 19, que apresenta o espectro de massas do produto reacional após a conjugação com o mPEG-MAL. Nesse espectro, observa-se que o íon do LyeTx I-b_{cys} protonado, m/z 2.726, apresentou uma baixa intensidade, mesmo para o íon do excesso de mPEG-MAL que não conjugou, identificado no espectro de massas pelos íons na faixa de m/z 1500 e 2.000. Porém, o produto PEGuilado, com m/z entre 4500 e 5500, se destacou devido à sua maior intensidade.

No espectro de massas apresentado na Figura 20, é possível verificar uma diferença frequente de 44 unidades entre os íons. Isso é uma assinatura comum de polímeros em espectrometria de massas. Essa diferença se refere a polímeros contendo números diferentes de grupos -O-CH₂-CH₂. Além disso, a presença de íons com uma diferença de 22 unidades em relação às espécies protonadas se deve à formação de adutos de sódio, fenômeno comumente observado em polímeros como o mPEG-MAL (VERONESE, 2009). Esse tipo de espectro de massas é característico para polímeros e também retrata o índice de polidispersão do polímero. Assim, pode-se inferir que houve uma alta conversão na reação de PEGuilação

proposta. Também ficou demonstrada a não ocorrência de multipeguilação, um dos principais problemas nesse tipo de reação, pois não foram observados íons acima de m/z 6000 (Figura 20).

O rendimento satisfatório também pode ser confirmado pelos cromatogramas de purificação do peptídeo (Figura 21) e seu derivado PEGuilado (Figura 22), pois mostram o tempo de retenção do LyeTx I-b_{cys} não conjugado de 33,25 minutos e do conjugado de 33,65 minutos. A Figura 22 – B apresenta a ampliação do cromatograma da Figura 22 – A no tempo de eluição do mPEG-MAL, peptídeo e peptídeo PEGuilado, onde é possível verificar um pico cromatográfico de baixa intensidade no TR de 33,65 min, sendo esse referente ao peptídeo que não reagiu, o que evidencia a sua baixa concentração no produto final.

Os picos cromatográficos desse mesmo cromatograma nas faixas de 28,0-31,0; 33,20-33,30; e 33,5-34,1 minutos foram coletados e analisados por espectroscopia de massa para confirmação de sua identidade. Essa análise indicou que os picos correspondiam ao mPEG-MAL, LyeTI-b_{cys} e PEGuilado, nesta ordem, e os resultados apontam para a obtenção do produto PEGuilado puro, que pode seguir para os testes de atividade e toxicidade.

Além da caracterização do peptídeo LyeTx I-bPEG por espectroscopia de massa, foi avaliada sua estruturação em TFE, SDS e lipossomas a fim de verificar se a modificação e a PEGuilação preservaram ou não a estrutura secundária em α -hélice já conhecida do peptídeo, segundo Reis *et al.* (2018). Conforme os resultados apresentados na Figura 24, nas três condições testadas, o peptídeo PEGuilado apresentou perfil característico de se estruturar em α -hélice, na presença de TFE, SDS e lipossomas, mesmo em baixas concentrações, mas que se desestruturam em solução aquosa. Essa característica é comum para PAMs catiônicos, como o LyeTx I-b, que perdem a conformação em solução aquosa, mas que apresentam conformação definida na presença de co-solvente orgânico ou de outras substâncias que mimetizam condições de membrana plasmática, como SDS e a mistura de POPC e POPG, com comportamento semelhante ao LyeTx I-b observado por Reis *et al.* (2018).

O produto PEGuilado teve sua atividade antimicrobiana avaliada, inicialmente, por disco difusão, em que se observou a preservação da atividade para

o peptídeo PEGuilado, tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Figura 25). A confirmação dos valores foi realizada pela determinação da CIM em quatro microrganismos distintos sendo um Gram-positivo e três Gram-negativos (Tabela 7).

Os resultados de CIM mostraram perda parcial da atividade antimicrobiana *in vitro* após a PEGuilação, o que já era esperado, uma vez que a PEGuilação pode levar à perda de atividade *in vitro*, como já verificada por Kodera *et al.* (1998). De acordo com esses autores, a PEGuilação do peptídeo antimicrobiano lisostafina preservou 47% da sua atividade inicial. Para o LyeTx I-bPEG, a preservação da atividade foi menor, próxima de 25% da atividade *in vitro* para *E. coli* e *S. aureus* e menos de 10% para *S. marcescens*.

Porém, foi verificado que quase não houve perda de atividade *in vitro* para os isolados testados de *A. baumannii* (Tabela 7), que é uma bactéria muito prevalente em infecções das vias respiratórias que acometem pacientes com sistema imunológico debilitado e de difícil tratamento devido à sua resistência aos antimicrobianos convencionais. Esse perfil de atividade nos motivou a investir e explorar essa atividade frente a esse microrganismo, porém, para ser potencial candidato a fármaco, o peptídeo deve possuir, além da atividade, baixa toxicidade.

Nessa direção, a toxicidade foi avaliada *in vitro* contra células VERO, HEK-293 e hemácias humanas, bem como em estudos *in vivo* com a avaliação da toxicidade aguda em camundongos. Em todos estes ensaios, verificou-se a redução da toxicidade do peptídeo PEGuilado se comparado ao não modificado.

A toxicidade dos PAMs está diretamente ligada à sua hidrofobicidade, portanto, quanto mais hidrofóbico for o PAM, maior sua toxicidade. Uma vez que o mPEG-MAL é uma molécula que aumenta a hidrofilicidade de compostos a ele conjugados, essa poderia ser uma hipótese para a redução da toxicidade do LyeTx I-bPEG. Comportamento semelhante foi observado com o peptídeo PEGuilado SET-M33L-PEG (Brunetti *et al.*, 2016), em que a PEGuilação aumentou de forma significativa sua segurança, reduzindo a mortalidade e a toxicidade para os animais testados.

No caso do LyeTx I-b, a redução na taxa de hemólise também foi muito significativa, ou seja, o HC₅₀ do peptídeo PEGuilado foi dez vezes maior que o de

LyeTx I-b, apontando maior segurança para uso de doses maiores. Portanto, a PEGuilação trouxe ganho expressivo para o peptídeo, considerando seu uso em formulações para administração pela via endovenosa, pois houve redução significativa da hemólise, aproximadamente dez vezes em relação ao peptídeo não PEGuilado.

Com os resultados de citotoxicidade e de CIM, foram determinados os respectivos índices de seletividade (SI) (Tabela 10), e foi avaliada a PEGuilação, comparando atividade e toxicidade para ensaios *in vitro*. A PEGuilação aumentou a seletividade do LyeTx I-b, mesmo com a perda parcial da atividade *in vitro*, com destaque para *A. baumannii*.

Tabela 10 – Índice de seletividade de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG

	LyeTx I-b				LyeTx I-bPEG			
	CIM	SI HEK-293	SI VERO	SI HEM	CIM	SI HEK-293	SI VERO	SI HEM
<i>Acinetobacter baumannii</i> ISOL_09	1	1,27	0,96	5,6	1	7,01	10,35	53,19
<i>Acinetobacter baumannii</i> ISOL_34	0,5	2,54	1,92	11,2	1	7,01	10,35	53,19
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	1,27	0,96	5,6	4	2,11	2,59	13,30
<i>Escherichia coli</i> ISOL_10	1	1,27	0,92	5,6	4	2,11	2,59	13,30
<i>Escherichia coli</i> ISOL_11	1	1,27	0,96	5,6	4	2,11	2,59	13,30
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	2	0,63	0,48	2,8	8	1,05	1,29	6,65
<i>Staphylococcus aureus</i> ISOL_1	2	0,63	0,48	2,8	8	1,05	1,29	6,65
<i>Serratia marcescens</i> ISOL_5	4	0,31	0,24	1,4	128	0,06	0,08	0,42
<i>Serratia marcescens</i> ISOL_7	2	0,63	0,48	2,8	64	0,13	0,16	0,83
<i>Serratia marcescens</i> ISOL_10	2	0,63	0,48	2,8	16	0,52	0,65	3,62

Obs.: Citotoxicidade em células VERO, HEK-293 (SI CIT) e hemólise (SI HEM) para os peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG no CIM para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A compreensão da toxicidade aguda após administração de fármaco pela via endovenosa é fundamental para o desenvolvimento de fármacos, principalmente quando ele tem essa via como alvo de administração. E, nesse teste, o produto PEGuilado apresentou uma redução de quatro vezes o valor da toxicidade, em relação ao LyeTx I-b. Esse resultado era esperado, uma vez que o peptídeo PEGuilado apresentou também redução de toxicidade nos testes *in vitro*. A

toxicidade aguda da colistina (um peptídeo antimicrobiano registrado e utilizado em ambiente hospitalar) testada por Brunetti *et al.* (2016) em camundongos, via endovenosa, na concentração de 10 mg.kg^{-1} levou 70% dos animais a óbito e todos os animais testados nessa concentração apresentaram sinais claros de intoxicação. Esse resultado sugere que a colistina possui toxicidade aguda abaixo dessa dose, ou seja, seria inferior à do peptídeo PEGuilado utilizado no presente trabalho, demonstrando que o LyeTx I-bPEG apresentou toxicidade aguda menor que a colistina em camundongos.

5.4 CONCLUSÃO

A PEGuilação do LyeTx I-b utilizando o mPEG-MAL e a substituição da leucina 21 por um resíduo de cisteína apresentaram rendimentos satisfatórios, não sendo detectadas multiPEGuilações.

O peptídeo LyeTx I-bPEG apresentou perda parcial de atividade, tanto para bactérias Gram-negativas, quanto para Gram-positivas, mas teve atividade contra todas as linhagens e isolados testada, tendo destaque para isolados clínicos de *A. baumannii*, na qual não foi evidenciada perda significativa de atividade.

A conjugação com o mPEG-MAL também favoreceu a segurança do peptídeo por reduzir de forma significativa a sua atividade hemolítica e sua citotoxicidade em células HEK-293 e VERO, bem como sua toxicidade aguda em modelo murino.

Portanto, o LyeTx I-b mostrou-se como possível candidato a biofármaco antimicrobiano para tratamento de infecções de superbactérias, e a conjugação com o mPEG-MAL foi essencial para aumentar sua segurança.

CAPÍTULO III

Atividade *in vitro* e *in vivo* do LyeTx I-bPEG em *Acinetobacter baumannii* sensível e resistente aos carbapenêmicos

6 CAPITULO III – ATIVIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LYETX I-BPEG EM *Acinetobacter baumannii* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS.

6.1 PARTE EXPERIMENTAL

6.1.1 Materiais e microrganismos

Os seguintes compostos foram adquiridos de fornecedores comerciais, como indicado: colistina, meropenem, levofloxacino, gentamicina e albumina sérica bovina da *Inlab* (São Paulo, SP, Brasil). Colistimetato de sódio da *ABL* (São Paulo, Brasil). Cloreto de sódio (NaCl), dimetilsulfóxido (DMSO) e glicose da *Synth* (São Paulo, SP, Brasil). Tripsina e soro fetal bovino do *Gibco ThermoFisher Scientific* (São Paulo, Brasil). Reagentes de ensaio MTT e cristal violeta da *Sigma-Aldrich* (São Paulo, Brasil). O peptídeo LyeTx I-bPEG foi sintetizado em fase sólida, PEGuilado e purificado de acordo com os itens 5.1.2, 5.1.3 e 5.1.4. O peptídeo LyeTx I-b foi obtido da *GenOne* (Rio de Janeiro, Brasil). BHI (*brain heart infusion*), caldo de *Mueller-Hinton*, ágar e caldo triptona de soja (TSB) utilizados foram da *Kasvi* (São José dos Pinhais, Brasil). Caldo e ágar nutriente e caldo soja triptocaseína foram adquiridos da *Himedia* (Mumbai, Índia). Glicerol foi adquirido da *Dinâmica* (São Paulo, Brasil). Para a realização dos ensaios de atividade antibacteriana, foram empregados 20 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* cedidos pela bacterioteca do Laboratório de Diagnóstico Laboratorial e Microbiologia Clínica (LAMIA) da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) Divinópolis/MG.

O perfil de sensibilidade para diversos antimicrobianos de uso clínico foi caracterizado pelo método de microdiluição em caldo, empregando a plataforma do *VITEK2*[®]. A identificação de todos os isolados foi realizada inicialmente por testes bioquímico-fisiológicos utilizando-se o *VITEK2*[®] (*Biomérieux*, França) na Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis/MG, e, posteriormente, pela caracterização dos padrões de fragmentação por MALDI-TOF (MALDI *Biotepy*, *Bruker*, Alemanha) na Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

As características fenotípicas de todas as linhagens empregadas são mostradas na Tabela 11. Foi utilizada também linhagem de referência (*A. baumannii* ATCC 19606) originária da *American Type Culture Collection* (ATCC), gentilmente cedida pelo Laboratório de Referência em Microbiologia da Fundação Oswaldo Cruz/RJ (FIOCRUZ-RJ).

Os microrganismos foram mantidos em estoque no *ultrafreezer* a -80°C em caldo nutriente suplementado com 20% de glicerol. Para o uso, os microrganismos foram reativados em caldo BHI e incubados por 24h, a 37°C . Após o crescimento em caldo, estrias compostas de cada microrganismo foram confeccionadas em ágar nutriente para confirmação da pureza e as placas foram mantidas em geladeira de 2 a 8°C até o uso. A manutenção do estoque de geladeira foi feita com novas estrias a cada quinze dias, sendo permitidas no máximo três passagens (CLSI, 2018).

Todos os ensaios deste capítulo foram feitos no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

6.1.2 Preparo do inóculo

O inóculo de bactéria empregado nos testes de susceptibilidade foi padronizado de acordo com o documento M07-A10 do CLSI (CLSI, 2018). Entre três a cinco colônias isoladas de *Acinetobacter baumannii*, partindo de uma cultura de 24h em ágar nutriente, foram ressuspendidas em 10mL de solução salina (NaCl 0,9% p/v) com o auxílio de alças de repicagem. A suspensão resultante foi então ajustada à escala 0,5 de *McFarland*, que corresponde a 10^8 UFC.mL⁻¹. Para isso, foi utilizado espectrofotômetro para verificar o valor de absorbância a 625nm, que deve estar entre 0,190 a 0,210. Posteriormente, 50µL dessa suspensão foram transferidos para 10mL de caldo *Mueller-Hinton* produzindo inóculo de trabalho correspondente a 10^6 UFC.mL⁻¹, empregado nos ensaios de atividade antibacteriana.

Tabela 11 – Identificação, origem clínica e perfil de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii*

Isolado	Origem clínica	Identificação		APS	PPT	CAZ	CPM	IMP	MER	AMI	GEN	CIP	AMP	CFX	CEFT	TIG	CFR	CFR/AX	
		VITEK2®	MALDI-TOF																
ATCC	NA	Complexo AB	AB	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AC09	Secreção da pele	Complexo AB	AB	≤2/S	≤4/S	4/S	2/S	≤0,25/S	≤0,25/S	≤2/S	≤1/S	≤0,25/S	8/R	≥64/R	16/I	≤0,5/S	32/R	32/R	32/R
AC36	Aspirado traqueal	Complexo AB	AB	≤2/S	NT	16/I	2/S	≤0,25/S	0,5/S	NT	≤1/S	≤0,25/S	≥32/R	≥64/R	16/I	≤0,5/S	32/R	32/R	32/R
AC10	Secreção da pele	Complexo AB	AB	16/I	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	32/R	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≤4/S	≥64/R	2/I	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC37	Ponta de catéter	Complexo AB	AB	≥32/R	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	32/R	8/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	4/I	64/R	≥64/R	≥64/R
AC30	Sangue (Hemocultura)	Complexo AB	AB	≥32/R	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	16/I	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	4/I	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC31	Sangue (Hemocultura)	Complexo AB	AB	≥32/R	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	NT	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	4/I	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC35	Aspirado traqueal	Complexo AB	AB	16/I	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	NT	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	2/S	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC03	Líquor	Complexo AB	AB	16/I	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	8/S	≥16/R	≥4/R	≥32/R	64/R	≥64/R	1/S	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC04	Aspirado traqueal	Complexo AB	AB	≤2/S	32/I	16/I	8/S	≤0,25/S	0,5/S	≤2/S	≤1/S	0,5/S	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
AC25	Secreção da pele	Complexo AB	AB	16/I	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	4/S	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	1/S	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC26	Aspirado traqueal	Complexo AB	AB	≥32/R	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	16/I	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	4/I	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC52	Aspirado traqueal	Complexo AB	AB	≤2/S	NT	16/I	4/S	≤0,25/S	1/S	≤2/S	2/S	≤0,25/S	≥32/R	≥64/R	32/I	≤0,5/S	32/R	32/R	32/R
AC40	Aspirado Traqueal	Complexo AB	AB	≥32/R	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	16/I	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	4/I	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC43	Escarro	Complexo AB	AB	≥32/R	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	16/I	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	≤0,5/S	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC47	Urina	Complexo AB	AB	NT	≥128/R	NT	≥64/R	NT	≥16/R	16/I	≥16/R	≥4/R	≥32/R	NT	≥64/R	NT	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC45	Aspirado Traqueal	Complexo AB	AB	≥32/R	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	16/I	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	2/S	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC39	Urina	Complexo AB	AB	NT	≥128/R	≥64/R	≥64/R	NT	≥16/R	≥64/R	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	NT	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC55	Secreção da pele	Complexo AB	AB	≥32/R	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	16/I	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	4/I	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC23	Sangue (Hemocultura)	Complexo AB	AB	16/I	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	NT	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	4/I	≥64/R	≥64/R	≥64/R
AC24	Sangue (Hemocultura)	Complexo AB	AB	16/I	≥128/R	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥16/R	NT	≥16/R	≥4/R	≥32/R	≥64/R	≥64/R	4/I	≥64/R	≥64/R	≥64/R

Obs.: APS: ampicilina/sulbactam; PPT: piperacilina/tazobactam; CAZ: ceftazidima; IMP: imipenem; MER: meropenem; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; AMP: ampicilina; CFX: cefoxitina; CEFT: ceftriaxona; TIG: tigeciclina; COL: colistina; CFR: cefuroxima; CFR/AX: cefuroxima/axetil; AMC: amoxicilina/Clavulanato; ANL: ácido nalidíxico; NOR: norfloxacin; NIT: nitrofurantoína; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; AC: *Acinetobacter baumannii*.

NT: não testado; R: resistente; I: intermediário; S: sensível.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.1.3 Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

A atividade antibacteriana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), empregando o método de microdiluição em caldo, segundo o documento M07-A10 do CLSI (CLSI, 2018), com modificações (LIMA *et al.*, 2019b). Em microplacas estéreis de 96 poços, foram adicionados 100µL de caldo *Mueller-Hinton* suplementado com *Tween-80* (0,002%) contendo os compostos a serem testados previamente diluídos na faixa de concentração de 0,125µM a 32µM. A seguir, 100µL do inóculo de trabalho preparado anteriormente foram adicionados aos poços, e as placas foram incubadas a 37 °C por 18 h. Os poços relativos ao controle de crescimento (caldo *Mueller-Hinton* e inóculo) e ao controle de esterilidade do meio (caldo *Mueller-Hinton* somente) foram incluídos em cada ensaio.

Após o período de incubação, as placas foram inspecionadas visualmente para verificar a validade dos controles e a CIM foi considerada como a menor concentração da droga ou peptídeo onde não foi observado o crescimento visível dos microrganismos. O antimicrobiano colistina foi empregado como controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata e com no mínimo dois experimentos independentes entre si.

O efeito bactericida dos compostos foi estudado pela determinação da concentração bactericida mínima (CBM), segundo Lima *et al.* (2019b). Resumidamente, 10µL da solução proveniente dos poços opticamente livres de crescimento no ensaio de CIM foram aliqüotados e dispensados na superfície de placas contendo ágar *Mueller-Hinton*. Posteriormente, o material foi semeado pela técnica de *spread plate*, com auxílio da alça de *Drigalski* e a placa foi incubada em estufa a 37°C, por 24h. A CBM foi determinada como a menor concentração da droga ou peptídeo capaz de inibir 99% das colônias em relação ao controle não tratado (em geral, se consideram até três colônias isoladas).

A colistina foi incluída como controle e os controles de esterilidade do meio e de viabilidade do inóculo também foram realizados. O experimento foi conduzido em triplicata com pelo menos dois ensaios independentes.

6.1.4 Eficácia dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG sobre biofilme maduro de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos

O efeito dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG sobre o biofilme maduro foi avaliado pelo método do cristal violeta, conforme descrito anteriormente (LIMA *et al.* 2019b). Uma suspensão de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (isolado AC37 com densidade celular de 10^8 UFC.mL⁻¹) foi preparada conforme descrito no subitem 6.1.2. Dessa suspensão, 50µL foram transferidos para 10mL de caldo soja triptocaseína suplementado com 1% de glicose. Em seguida, 100µL da suspensão resultante foram pipetados em microplacas de 96 poços, e posteriormente incubadas a 37°C por 24h para formação do biofilme.

Após o período de incubação, o sobrenadante das placas foi descartado e as células planctônicas removidas com duas lavagens de salina isotônica (NaCl 0,9%). Em seguida, 100µL de caldo *Mueller-Hinton* contendo concentrações seriadas dos peptídeos LyeTx I-b ou LyeTx I-bPEG (32µM a 0,5µM) foram adicionados sobre os biofilmes e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h e 48 h. Ao fim de cada período de incubação, o sobrenadante das placas foi novamente descartado e as células planctônicas removidas com duas lavagens de salina isotônica (NaCl 0,9%). Para a revelação do biofilme, 125µL de solução de cristal violeta 0,1% foram aplicados nos poços e as microplacas incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o excesso de corante removido por duas lavagens com solução salina isotônica (NaCl 0,9%). A microplaca foi então deixada para secar na posição invertida em temperatura ambiente por uma hora.

Posteriormente, foram pipetados 125µL de etanol 95% em cada poço da placa de 96 poços e inserida em leitora de placas a 550nm (O'TOOLE, 2010). O resultado foi então expresso graficamente como o valor percentual de inibição de biofilme em função da concentração do composto.

A colistina nas concentrações de 0,5µM a 32µM foi empregada como controle positivo e poços contendo células não tratadas foram incluídos como controle de crescimento.

6.1.5 Avaliação de possível efeito sinérgico

Os possíveis efeitos sinérgicos dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG com os antimicrobianos foram avaliados após suas combinações com meropenem, colistina, levofloxacino e gentamicina pela metodologia de *checkerboard* (tabuleiro de damas) (ORHAN *et al.*, 2005; OROOJALIAN *et al.*, 2010).

Inicialmente, foram preparadas placas espelho com diluições seriadas (na faixa de 1µM a 32µM) dos compostos a serem combinados em caldo *Mueller-Hinton*. O ensaio foi realizado em uma segunda microplaca, procedendo-se da seguinte forma: 50µL de cada composto (peptídeos e antimicrobianos) foram adicionados a partir das placas espelho. A seguir, foram adicionados 100µL de inóculo de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (isolado AC37) preparado conforme o subitem 6.1.2 e com densidade de 10^6 UFC.mL⁻¹. Então, as placas foram incubadas a 37°C durante 48 h. Como havia 50µL de cada composto em 200 µL de volume total de poço, os antimicrobianos foram diluídos mais quatro vezes, resultando na faixa de concentração de 0,25µM a 8µM ao final de cada experimento.

Após a incubação, as placas foram avaliadas visualmente quanto à ausência ou presença de crescimento. O resultado foi interpretado pela concentração inibitória fracionada (CIF), calculada como segue:

$$\text{Índice CIF (ICIF)} = \text{ICIF (A)} + \text{ICIF (B)}$$

Em que,

$$\text{ICIF(A)} = \frac{\text{CIM}_{\text{peptideo combinado}}}{\text{CIM}_{\text{peptideo sozinho}}} \quad \text{ICIF(B)} = \frac{\text{CIM}_{\text{antibiótico combinado}}}{\text{CIM}_{\text{antibiótico sozinho}}}$$

Segundo OROOJALIAN *et al.* (2010), os valores de ICIF devem ser interpretados da seguinte forma: para $ICIF \leq 0,5$, o efeito é **sinérgico**; para $0,5 < ICIF \leq 1$, o efeito é **aditivo**; para $1 < ICIF \leq 4$, o efeito é **indiferente** e para $ICIF > 4$, o efeito é dito **antagônico**.

Os resultados do ensaio de *checkerboard* foram também representados graficamente, plotando-se os valores de ICIF dos compostos envolvidos nas combinações. Assim, foram gerados isobogramas, cujo formato das curvas é **côncavo**, se os compostos testados agem de forma sinérgica; em linha **reta**, se os compostos têm efeitos aditivos e ou indiferentes; e **convexo**, se os compostos têm efeitos antagônicos (OROOJALIAN; ORAFEE e AZIZI 2017).

6.1.6 Ressensibilização de *A. baumannii* (resistente aos carbapenêmicos) aos antimicrobianos convencionais pelos peptídeos

O ensaio da possível ressensibilização de uma linhagem de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (isolado AC37) para antimicrobianos convencionais (meropenem, levofloxacino e gentamicina) foi realizado de acordo com metodologia descrita por Mohammad *et al.* (2015), com modificações. Em resumo, foi preparado o inóculo de *A. baumannii* a 10^6 UFC.mL⁻¹ em caldo *Mueller-Hinton* contendo os peptídeos LyeTx I-b ou LyeTx I-bPEG, na concentração de 0,25 ou 4µM. Essa concentração representa a metade dos respectivos valores de CIM para o AC37. A suspensão bacteriana foi então incubada à temperatura ambiente durante 1h e, então, as bactérias expostas aos peptídeos foram submetidas a ensaios de CIM com os antimicrobianos meropenem, levofloxacino e gentamicina.

Os antimicrobianos foram diluídos na faixa de concentração de 0,125µg.mL⁻¹ a 32µg.mL⁻¹ e, após a adição do inóculo, as placas foram incubadas por 24h a 37°C para a determinação da CIM. Os valores de CIM dos antimicrobianos também foram determinados em exemplar da linhagem AC37 não exposta ao peptídeo, como controles.

6.1.7 Ensaio de indução de resistência

O potencial dos peptídeos e do antimicrobiano usado como controle (colistina) em induzir resistência em bactérias foi determinado pelo estudo de indução de resistência com múltiplas passagens. O inóculo de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos, contendo aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹, foi preparado em solução salina isotônica (NaCl 0,9%). Em seguida, 10µL dessa suspensão bacteriana foram adicionados em tubos de vidro contendo 1mL de caldo *Mueller-Hinton* livre de antimicrobianos ou contendo os compostos antimicrobianos na concentração de 1/4 do valor da CIM de cada composto (BOGDANOVICH *et al.*, 2005).

Os tubos foram incubados a 37°C por 24h antes de cada passagem serial. As passagens foram realizadas em intervalos de 24 horas e por 21 dias consecutivos, transferindo-se uma alíquota de 10µL dos tubos do dia anterior para o novo tubo com as mesmas condições iniciais. Antes de cada passagem, uma estria composta pelos microrganismos presentes nos tubos em tese foi utilizada para a determinação da CIM de cada composto pelo método de microdiluição em caldo. Finalmente, o resultado foi expresso graficamente, considerando-se o número de vezes de aumento da CIM em função do tempo em dias (BOGDANOVICH *et al.*, 2005).

6.1.8 Ensaio de curva de morte

O ensaio de curva de morte foi realizado conforme Ling *et al.*, (2015). Um isolado de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (isolado AC37) foi cultivado a partir de estrias compostas e incubado a 37°C, por 24 horas. Posteriormente, foi realizado o preparo do pré-inóculo, no qual colônias isoladas foram coletadas (escolheu-se cinco colônias com diâmetro aproximado de 1mm) e transferidas para um tubo de ensaio contendo 10mL de solução salina (NaCl 0,9% p/v).

A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador de tubos durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada pela leitura em espectrofotômetro, a 625nm, até atingir turvação equivalente a escala 0,5 de *McFarland* (10^8 UFC.mL⁻¹). Em tubo de ensaio contendo 10mL de caldo *Mueller-Hinton*, foram adicionados 50µL do pré-inóculo e os peptídeos LyeTx I-b ou LyeTx I-bPEG nas concentrações referentes a duas vezes a CIM, e cinco vezes a CIM de cada peptídeo. Como controles, utilizaram-se células não tratadas e a colistina, na concentração equivalente a cinco vezes a CIM. Os tubos foram incubados a 37°C, nos tempos 0; 0,5; 1; 3; 6; 12 e 24 horas. Alíquotas de 100µL foram diluídas em série (10^{-1} a 10^{-5} UFC.mL⁻¹) em solução salina (NaCl 0,9% p/v) estéril e plaqueadas em ágar *Mueller-Hinton*, utilizando alça de *Drigalski*, por meio da técnica *spread plate*. As placas foram incubadas por 24 horas. Após esse período, realizou-se a contagem das colônias e o cálculo de UFC.mL⁻¹ conforme a fórmula abaixo, descrita por ANDRADE *et al.* (2018) com modificações:

$$\text{Cálculo UFC.mL}^{-1} = \text{Número de colônias} \times \text{Fator de diluição} / \text{Volume plaqueado}$$

6.1.9 Ensaio de estabilidade em diferentes meios

As atividades de LyeTx I-b, LyeTx I-bPEG e colistina contra *Acinetobacter baumannii* isolado AC37 foram determinadas em meios de cultura preparados com diferentes condições, incluindo a adição de cloreto de sódio 100mM, cloreto de cálcio 8µM, cloreto de potássio 1mM, soro fetal bovino 2%, 5% e 10%, albumina bovina sérica a 30mg.mL⁻¹ e 10mg.mL⁻¹, plasma humano a 2% e 5%, em diferentes faixas de pH (5, 6 e 8) (MOHAMED *et al.*, 2016).

6.1.10 Modelo *in vivo* de pneumonia causada por *Acinetobacter baumannii*

O teste *in vivo* para a pneumonia por *A. baumannii* em camundongos foi feito segundo metodologia de Gandhi *et al.*, (2014). O protocolo desse teste foi aprovado pelo CEUA/UFMG, número 367/2019 (Anexo 2). Utilizaram-se camundongos (*Mus musculus*) BalbC fêmeas, oriundos do Biotério Central da UFMG, com aproximadamente seis semanas de vida e 20g de peso. Para a infecção dos animais, preparou-se uma suspensão bacteriana contendo *Acinetobacter baumannii* multirresistente AC37, cultivada em ágar nutriente, a 37°C, durante 24 horas antes do experimento. A suspensão bacteriana foi ressuspensa em solução salina 0,9% para a infecção dos animais. Para a indução de pneumonia bacteriana, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (80mg.kg⁻¹) e xilazina (15mg.kg⁻¹) injetada via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, instilou-se pela via intranasal nos camundongos (cinco por grupo) uma suspensão bacteriana (40µL) contendo 10⁸ UFC. Após duas horas da infecção, os animais receberam tratamento endovenoso (pela veia caudal) de acordo com os grupos mostrados na Tabela 12.

Após 24 horas, os animais foram eutanasiados, e os macerados dos pulmões em condições estéreis foram plaqueados em ágar *Mueller-Hinton* e incubados a 37°C. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram analisadas 24 horas após o plaqueamento com os resultados expressos em Log₁₀UFC do pulmão.

Tabela 12 – Protocolo utilizado em modelo de pneumonia por *Acinetobacter baumannii* multirresistente, em camundongos Balb/c

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8
Substância	Salina	Colistina	LyeTx I-b	LyeTx I-b	LyeTx I-b	LyeTx I-bPEG	LyeTx I-bPEG	LyeTx I-bPEG
Dose mg.kg ⁻¹	NA	2	0,5	1	2	0,5	1	2

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A atividade antibacteriana do LyeTx I-bPEG, do LyeTx I-b e da colistina contra *A. baumannii* sensível e resistente aos carbapenêmicos foi avaliada por determinação da CIM e CMB. Conforme mostrado na Tabela 13, LyeTx I-bPEG foi ativo contra todos isolados de *A. baumannii* testados com valores de CIMs na faixa de 1 a 16 μ M. Verificou-se que o valor da CIM para mais de 50% (CIM50) ou 90% (CIM90) das bactérias testadas com esse peptídeo foram 4 μ M e 8 μ M, respectivamente. Em relação à colistina, os valores de CIM50 e CIM90 foram de 1 μ M e 2 μ M, respectivamente.

Outro ponto relevante foi verificar o efeito bactericida de LyeTx I-bPEG, uma vez que os valores da CBM se igualaram aos da CIM para diversos isolados, incluindo os valores da CBM50 e CBMC90, com 8 μ M e 32 μ M, respectivamente.

Tabela 13 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em μM de LyeTx I-b, LyeTx I-bPEG e colistina contra *A. baumannii*

	Microrganismos	Origem	LyeTx I-b		LyeTx I-bPEG		Colistina	
			CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CMB
CSAB	<i>A. baumannii</i> ATCC19606		8	8	16	16	0,5	4
	<i>A. baumannii</i> AC09	Secreção da pele	0,5	1	2	2	0,5	0,4
	<i>A. baumannii</i> AC36	Aspirado traqueal	4	8	4	4	0,2	0,5
CRAB	<i>A. baumannii</i> AC10	Secreção da pele	1	1	2	2	1	2
	<i>A. baumannii</i> AC37	Ponta de catéter	0,5	1	8	8	0,5	0,5
	<i>A. baumannii</i> AC30	Sangue (Hemocultura)	4	8	8	8	0,5	2
	<i>A. baumannii</i> AC31	Sangue (Hemocultura)	4	8	8	8	1	2
	<i>A. baumannii</i> AC35	Aspirado traqueal	1	2	2	2	0,02	0,02
	<i>A. baumannii</i> AC03	Líquor	0,5	2	2	2	0,5	0,5
	<i>A. baumannii</i> AC04	Aspirado traqueal	1	2	1	2	0,05	0,5
	<i>A. baumannii</i> AC25	Secreção da pele	0,5	8	2	4	2	16
	<i>A. baumannii</i> AC26	Aspirado traqueal	0,5	2	2	2	0,5	2
	<i>A. baumannii</i> AC52	Aspirado traqueal	2	8	8	8	1	1
	<i>A. baumannii</i> AC40	Aspirado Traqueal	1	8	4	32	1	1
	<i>A. baumannii</i> AC43	Escarro	1	4	4	8	1	1
	<i>A. baumannii</i> AC47	Urina	2	16	8	32	2	2
	<i>A. baumannii</i> AC45	Aspirado Traqueal	2	16	8	32	2	8
	<i>A. baumannii</i> AC39	Urina	1	1	4	8	1	4
	<i>A. baumannii</i> AC55	Secreção da pele	4	32	4	4	1	16
	<i>A. baumannii</i> AC23	Sangue (Hemocultura)	2	8	8	8	0,2	1
	<i>A. baumannii</i> AC24	Sangue (Hemocultura)	4	8	4	16	2	2
			CIM50	1		4		1
		CIM90	4		8		2	
		CBM50	8		8		2	
		CBM90	16		32		8	

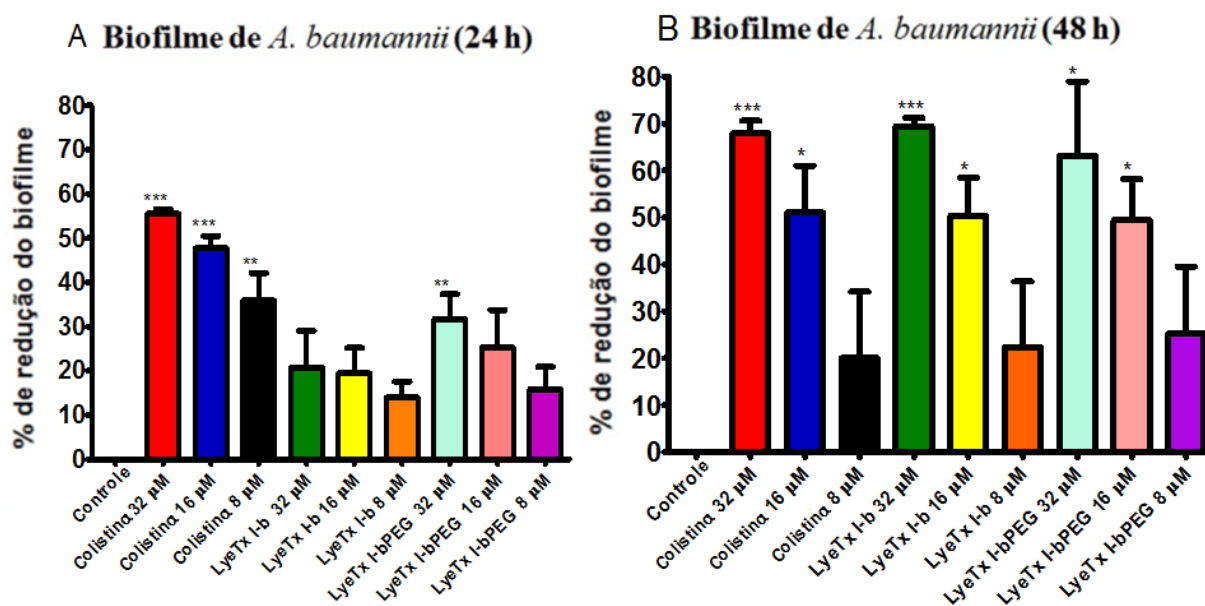
Obs.: CSAB – *A. baumannii* sensível a colistina. CRAB - *A. baumannii* resistência a colistina

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.2 Eficácia sobre biofilme maduro de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos

A PEGuilação do peptídeo LyeTx I-b gerou ganho na atividade antibiofilme, pois, na concentração de 32 μ M, o PEGuilado não apresentou diferença estatística com a colistina na concentração de 8 μ M, cujo valor de redução do biofilme, em 24h, foi próximo de 30% (Figura 29 – A). Em 48 horas, a redução do biofilme, tanto por LyeTx I-b, quanto por LyeTx I-bPEG, foi substancial, porém, na concentração de 16 μ M não houve diferença estatística entre os três compostos e com inibição de até 50% do biofilme (Figura 29 – B).

Figura 29 – Percentual de redução de biofilme *A. baumannii* por colistina, LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG



Obs.: Concentrações de 8, 16 e 32 μ M em 24 horas (A) e 48 horas (B). As linhas de desvios estão indicadas no topo das colunas e análise estatística com as significâncias nos asteriscos, com os intervalos de confiança, p de 0,05.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.3 Sinergismo

O comportamento dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG com outros antimicrobianos foi calculado através do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), conforme mostrado na Tabela 14. O ICIF com valor menor ou igual 0,5 aponta sinergismo entre os compostos. Se o seu valor estiver entre 0,6 e 1, o efeito é aditivo, entre 1,1 e 4, o efeito é indiferente, e o antagonismo é verificado com ICIF maior que 4.

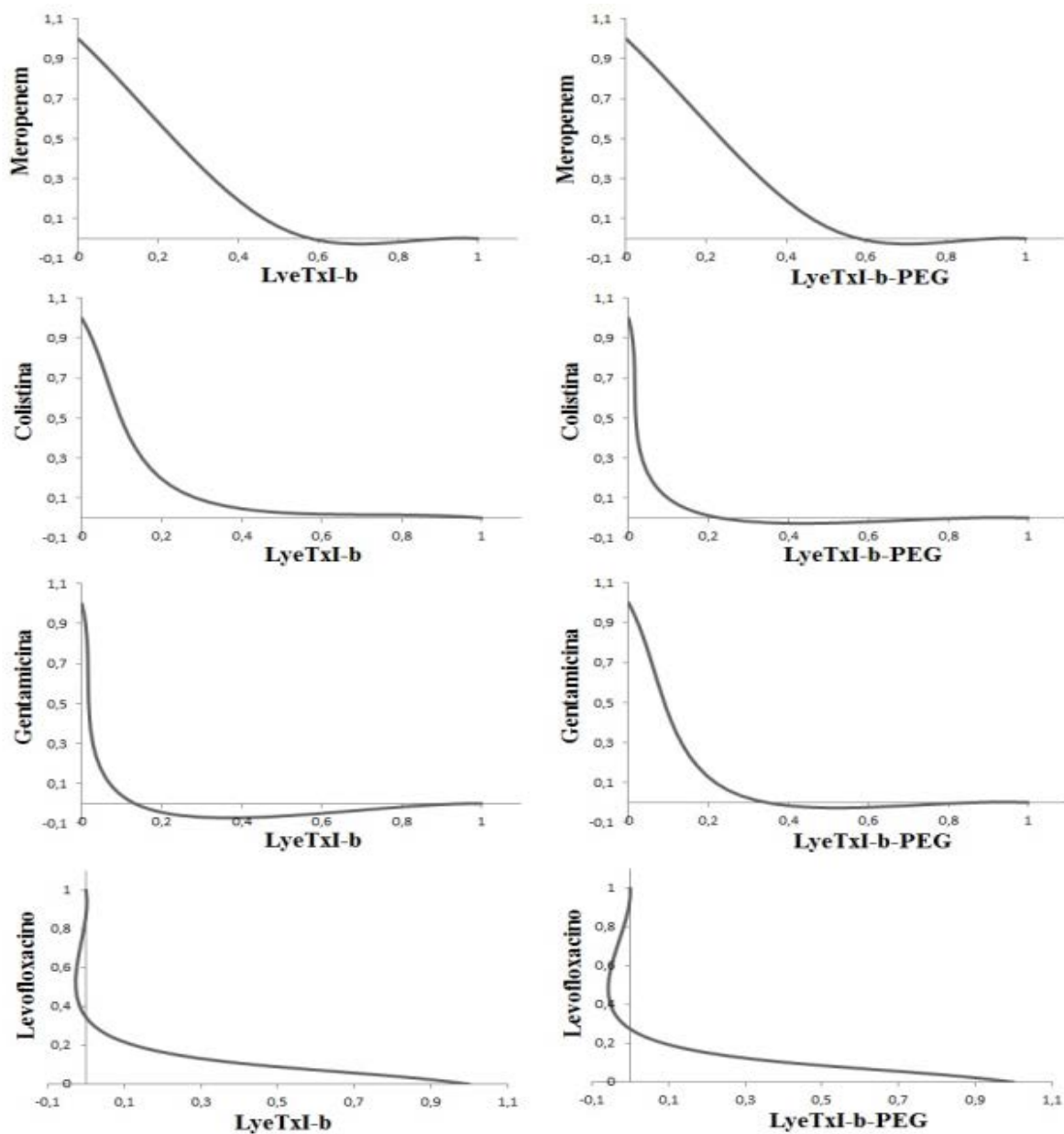
Tabela 14 – Concentração inibitória fracionária (CIF) e índice CIF (ICIF) da combinação do peptídeo LyeTx I-b ou LyeTx I-bPEG com diferentes antimicrobianos contra *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos

Classe	Antimicrobiano	LyeTx I-b				LyeTx I-bPEG			
		CIF Pept.	CIF Antib.	ICIF	Efeito	CIF Pept.	CIF Antim.	ICIF	Efeito
Carbapenêmicos	Meropenem	0,50	0,06	0,56	Aditivo	0,50	0,06	0,56	Aditivo
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0,13	0,002	0,13	Sinérgico	0,25	0,06	0,31	Sinérgico
Quinolonas	Levofloxacino	0,06	0,25	0,31	Sinérgico	0,02	0,25	0,27	Sinérgico
Polimixinas	Colistina	0,25	0,13	0,38	Sinérgico	0,13	0,06	0,19	Sinérgico

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos pela combinação dos peptídeos com os diferentes antimicrobianos foram plotados nos isobogramas apresentados na Figura 30. As curvas da gentamicina, levofloxacino e colistina apresentam tendência de função côncava, o que aponta efeito sinérgico. Ressalta-se que as curvas com a gentamicina associada à LyeTx I-b e a colistina associada à LyeTx I-bPEG apresentaram maior concavidade, e, portanto, maior efeito sinérgico. Ambos os peptídeos, quando combinados com meropenem não apresentaram inflexão, portanto, para essa combinação, houve somente o efeito aditivo.

Figura 30 – Isoblograma da associação entre o LyeTx I-b e LyeTx I-b-PEG com meropenem, colistina, gentamicina e levofloxacino



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.4 Ressensibilização do *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos a antimicrobianos convencionais pelos peptídeos

O tratamento de *A. baumannii* por uma hora com metade da CIM de LyeTx I-b foi capaz de reduzir a CIM de meropenem em duas vezes, de gentamicina em oito vezes e de levofloxacino em duas vezes em comparação às células não expostas. Com o peptídeo PEGuilado, houve apenas a redução da CIM do meropenem em duas vezes em comparação às células não expostas (Tabela 15).

Tabela 15 – Ensaio de ressensibilização do *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos para o meropenem, gentamicina e levofloxacino

Antimicrobiano	Vezes de ressensibilização	
	LyeTx I-b	LyeTx I-bPEG
Meropenem	2	2
Gentamicina	8	Sem efeito sensibilizante
Levofloxacino	2	Sem efeito sensibilizante

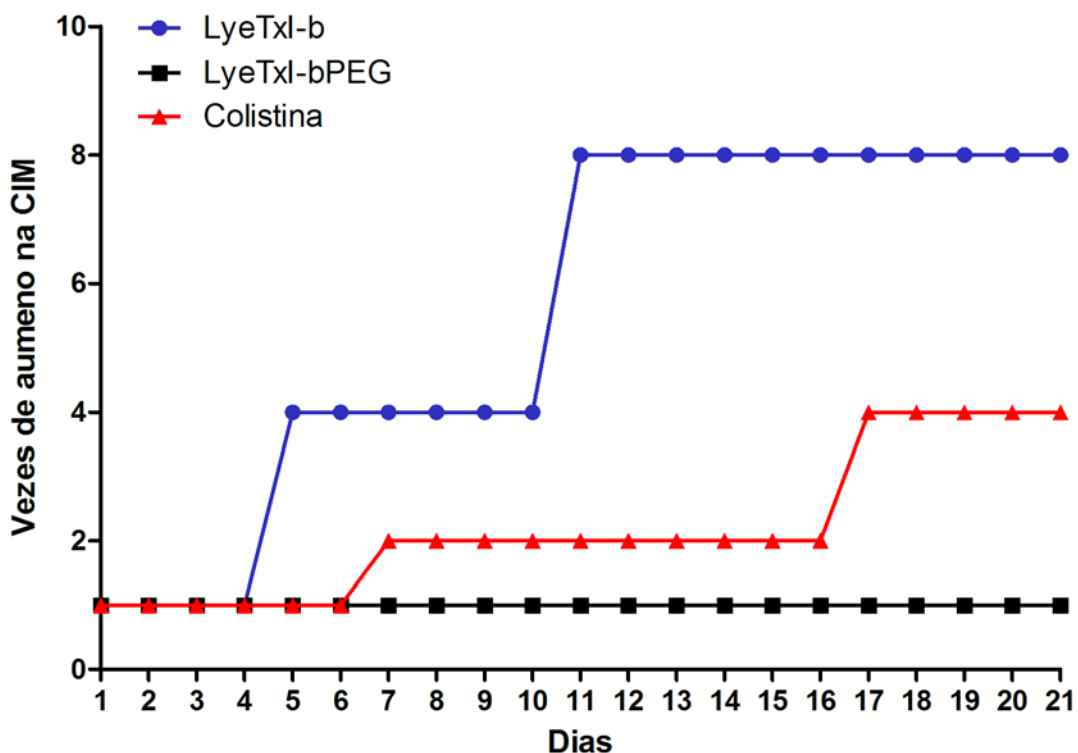
Obs.: Incubação com concentrações sub-inibitórias (1/2 x CIM) dos peptídeos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.5 Indução de resistência

Nas 21 passagens, a CIM do LyeTx I-b aumentou em oito vezes, a da colistina em quatro vezes e a do LyeTx I-bPEG permaneceu constante durante todo o período avaliado. Já para o peptídeo sem o PEG, o isolado apresentou indução de resistência no quarto dia e a colistina a partir do sexto dia, conforme a Figura 31.

Figura 31 – Potencial de indução de resistência pelo ensaio de múltiplas passagens



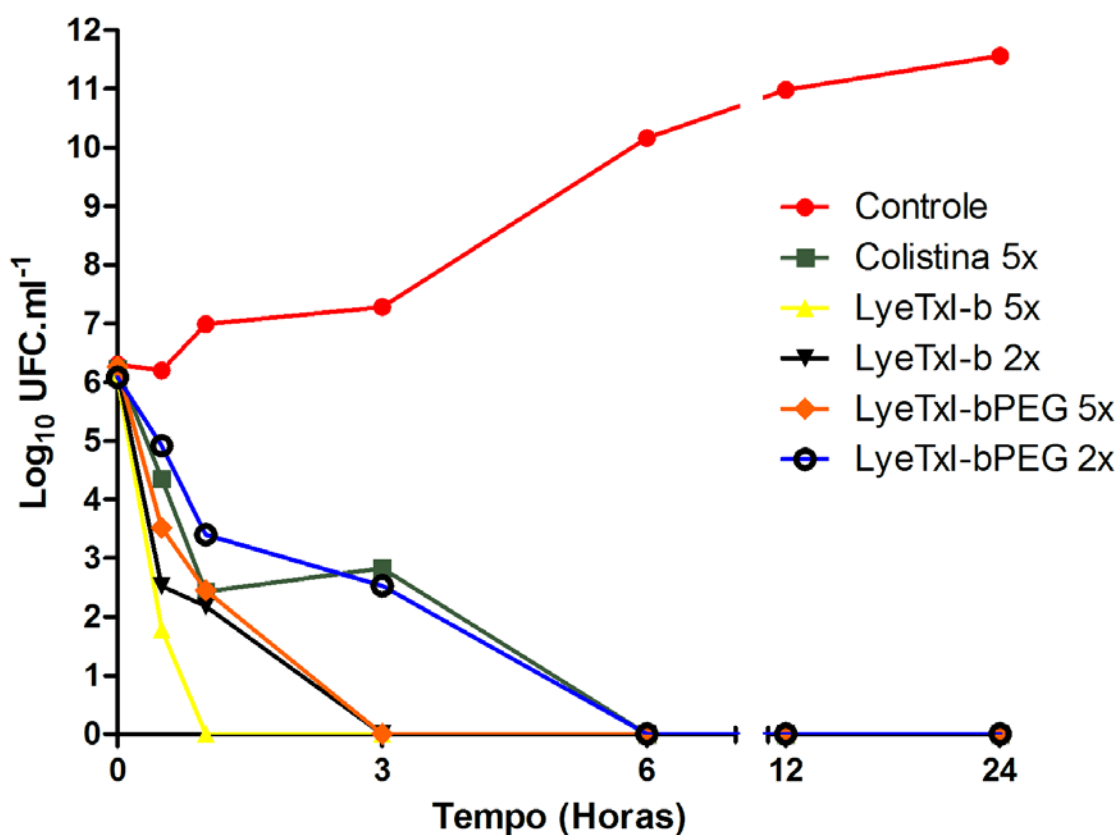
Obs.: Compostos LyeTx I-b, LyeTx I-bPEG e colistina, em isolado de CRAB.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.6 Curva de morte

O peptídeo PEGuilado (LyeTx I-bPEG) apresentou rápido efeito bactericida contra células em crescimento logarítmico e foi capaz de eliminar completamente alta carga microbiana (1×10^6 UFC / mL) de isolados de *A. baumannii* dentro de três horas na concentração de cinco vezes, e seis horas na concentração de três vezes a CIM (Figura 32). O LyeTx I-b eliminou as células de *A. baumannii* em menor tempo: em uma hora na concentração de cinco vezes, e três horas na concentração de três vezes a CIM (Figura 32). O valor da cinética de morte para *A. baumannii* para a colistina foi o menor dos três produtos testados, pois esse antibiótico levou seis horas para eliminar completamente *A. baumannii* (Figura 32).

Figura 32 – Curva de morte de *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos após a exposição à colistina em diferentes intervalos de tempo



Obs.: Concentração de colistina a cinco vezes o CIM e dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG de duas e cinco vezes o CIM.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.7 Ensaio de estabilidade em diferentes meios

O peptídeo LyeTx I-bPEG mostrou redução em sua atividade antibacteriana quando incubado na presença de soro fetal bovino, sais e albumina, porém, foi relativamente estável na presença de plasma humano. Já a atividade de LyeTx I-b foi reduzida trinta e duas vezes em plasma humano. Os resultados foram comparados com aqueles mostrados pela colistina, que teve variação máxima de quatro vezes na presença de soro fetal bovino, albumina e plasma humano (Tabela 16).

Tabela 16 – Concentração inibitória mínima em μM de LyeTx I-b, LyeTx I-bPEG e colistina, na presença de sais, soro fetal bovino, albumina bovina sérica e plasma humano, contra *Acinetobacter baumannii* AC37 resistente aos carbapenêmicos

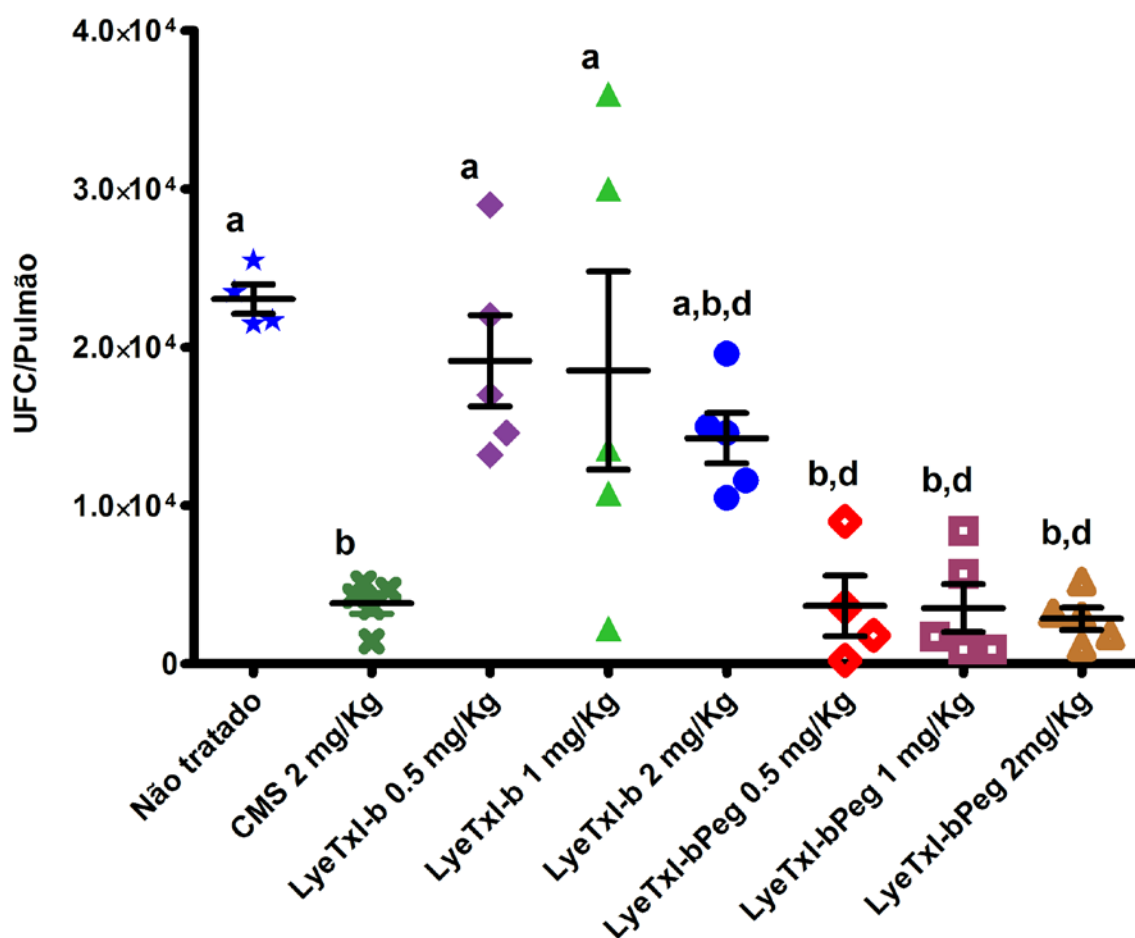
	LyeTx I-b	LyeTx I-bPEG	Colistina
Controle	0,5	8	0,4
Cloreto de Sódio 100mM	2	32	0,4
Cloreto de Cálcio 8 μM	0,5	16	0,4
Cloreto de Potássio 1mM	1	32	0,4
Soro Fetal Bovino 2%	1	8	0,8
Soro Fetal Bovino 5%	2	16	0,8
Soro Fetal Bovino 10%	8	32	1,6
Albumina Bovina Séria 30mg.mL ⁻¹	0,5	32	1,6
Albumina Bovina Séria 10mg.mL ⁻¹	0,5	32	1,6
Plasma Humano 2%	4	8	0,4
Plasma Humano 5%	16	8	1,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.8 Tratamento de pneumonia causada por *Acinetobacter baumannii*, em modelo *in vivo*.

No modelo de infecção pulmonar em camundongos com o tratamento pela via endovenosa, observamos que o peptídeo PEGuilado, nas três concentrações testadas, bem como a colistina, reduziram a UFC/pulmão em mais de duas vezes em relação ao grupo controle. Também não houve diferença estatística entre os valores de UFC/pulmão na presença do peptídeo PEGuilado e da colistina (Figura 33).

Figura 33 – Atividade antibacteriana *in vivo* de LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG, em infecção pulmonar causada por *A. baumannii* em camundongos



Obs.: O gráfico representa UFC/pulmão (eixo y) em animais doentes e não tratados (estrela azul), ou com os seguintes tratamentos: colistina (X, em verde), LyeTx I-b $0,5\text{mg.kg}^{-1}$ (losango roxo), LyeTx I-b 1mg.kg^{-1} (triângulo verde), LyeTx I-b 2mg.kg^{-1} (círculo azul), LyeTx I-bPEG $0,5\text{mg.kg}^{-1}$ (losango vermelho), LyeTx I-bPEG 1mg.kg^{-1} (quadrado vinho) e LyeTx I-bPEG 2mg.kg^{-1} (triângulo marrom). Todos os animais foram administrados com *Acinetobacter baumannii* multirresistente, pela via intranasal. As linhas horizontais dos grupos representam a média e as verticais os intervalos de confiança, p de 0,05.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os grupos tratados com LyeTx I-b nas concentrações de $0,5$ e 1mg.kg^{-1} não mostraram diferenças significativas com o grupo controle não tratado em relação aos valores de UFC/pulmão. Já o grupo LyeTx I-b na concentração de 2mg.kg^{-1} não apresentou diferença estatística com o grupo controle, nem com o grupo PEGuilado (Figura 33).

6.3 DISCUSSÃO

Neste trabalho, a atividade antimicrobiana de LyeTx I-bPEG foi explorada e caracterizada por diversos estudos *in vitro*, tendo sua CIM determinada em 20 isolados e também em linhagem ATCC. Na avaliação da CIM, o peptídeo LyeTx I-bPEG apresentou atividade menor que o LyeTx I-b e a colistina, tendo mostrado a perda média de duas vezes em relação ao peptídeo não PEGuilado.

A perda da atividade *in vitro* é corroborada pelos resultados de outros autores, que também observaram perdas de atividade antimicrobiana *in vitro* de alguns peptídeos e proteínas após PEGuilação (KODERA *et al.* 1998; VERONESE, 2009). Porém, o LyeTx I-bPEG, de modo geral, apresentou valores de CIM semelhantes às de CBM, o que não foi observado para o peptídeo sem o mPEG-MAL. Isso mostra que o produto PEGuilado apresentou maior atividade bactericida que o não PEGuilado e pode-se inferir que a PEGuilação contribuiu para a ação bactericida de LyeTx I-b.

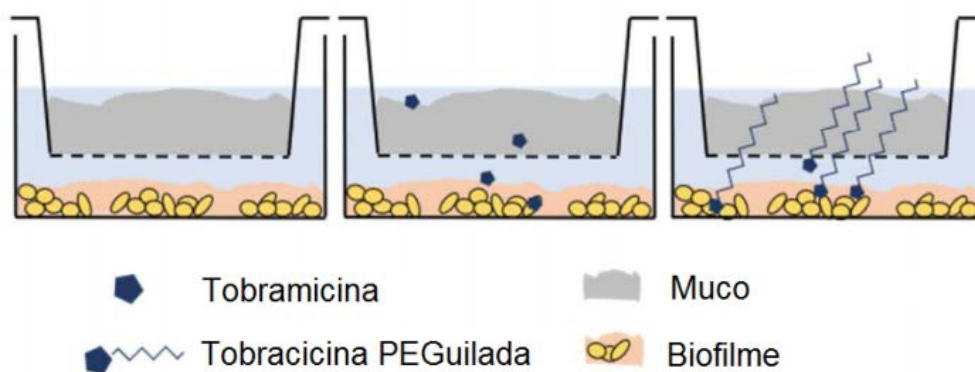
A. baumannii tem alto potencial para formar biofilme em superfícies, podendo se instalar em órgãos como o pulmão e levar a um processo inflamatório de difícil tratamento (ESPINAL, *et al.*, 2012). Essa bactéria é muito prevalente em infecções pulmonares, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Nesse sentido, para avaliar o potencial do LyeTx I-bPEG contra pneumonia que não responde eficientemente aos medicamentos convencionais, e cuja gravidade possa estar ligada ao aparecimento de biofilmes maduros, avaliamos a capacidade do peptídeo LyeTx I-b e de seu derivado PEGuilado de atuar em biofilmes pré-formados de *A. baumannii*.

Como mostrado na Figura 29, o LyeTx I-bPEG reduziu o biofilme em mais de 30% na concentração de 32 μ M em 24 horas de incubação e não houve diferença estatística nessa concentração quando comparada à colistina. Isso demonstra que mesmo o peptídeo PEGuilado tendo apresentado redução de valores de CIM, a atividade antibiofilme foi superior.

Uma vez que muitos antimicrobianos convencionais apresentam uma redução na atividade antibiofilme após 24 horas, foi avaliada a atividade dos peptídeos em biofilme maduro após 48 horas de incubação. Essa redução ocorre porque as células que permanecem no biofilme após o tratamento proliferam novamente e estabelecem uma nova matriz de exopolímero (WOLCOTT *et al.*, 2010).

O efeito antibiofilme em 48 horas das três substâncias testadas aumentou em relação ao tratamento de 24 horas, principalmente do LyeTx I-b e do LyeTx I-bPEG, tendo esse último, apresentado aumentos expressivos com valores acima de 40% de redução de biofilme em todas as concentrações testadas. O aumento da atividade antibiofilme com a PEGuilação de antimicrobianos já foi demonstrada com a tobramicina PEGuilada e está ilustrada na Figura 34 (BAHAMONDEZ-CANAS *et al.*, 2018; DU *et al.*, 2015). Esse aumento de atividade antibiofilme em até 24 horas para o LyeTx I-bPEG se dá pelas propriedades hidrofílicas e não carregadas do polietileno glicol, que podem impedir sua interação com a rede mucosa presente em biofilmes, e assim proteger o fármaco conjugado (LAI, WANG, HANES, 2009; DU *et al.*, 2015).

Figura 34 – Representação do modelo de biofilme com barreira de muco para tobramicina e para a tobramicina PEGuilada



Fonte: Bahamondez-Canas *et al.*, (2018).

No tratamento de infecções, é comum a combinação de fármacos (PULIDO-CEJUDO *et al.*, 2017), uma vez que as terapias combinadas apresentam diversas vantagens sobre a monoterapia, como: efeitos sinérgicos e efeitos aditivos que favorecem a redução do tempo de internação e tratamento, aumento do espectro de

microrganismos afetados, redução da concentração dos antimicrobianos utilizados e redução do risco de seleção de resistência (PLETZ, HAGEL, FORSTNER, 2017). Essa combinação de compostos de ação sinérgica já é utilizada na terapêutica, como o sulfametoxazol e trimetoprima. Assim, foram avaliados os potenciais sinérgicos dos peptídeos em combinação com antimicrobianos comumente empregados na prática clínica.

Na Tabela 14, foi analisado o possível sinergismo do LyeTx I-b e de seu derivado PEGuilado com três antimicrobianos utilizados na clínica (aminoglicosídeos, quinolonas e polimixinas). Quando se compara o valor ICIF entre os peptídeos, observa-se aumento desses valores para a combinação do peptídeo PEGuilado com o aminoglicosídeo. Já para as classes das quinolonas e polimixinas, observam-se reduções de valor ICIF. Com isso, podemos presumir que a PEGuilação reduziu o efeito sinérgico do LyeTx I-b com a gentamicina. Porém, contribui para o efeito sinérgico das duas outras classes de antimicrobianos (quinolonas e polimixinas), mesmo que para o levofloxacino a redução do valor ICIF tenha sido muito pequena. Esse sinergismo está ilustrado na Figura 30, pelos isobogramas, onde a concavidade das combinações está diretamente relacionada ao efeito sinérgico, o que é visto na combinação do PEGuilado com a colistina. As polimixinas atuam ligando-se em compostos lipoproteicos da membrana bacteriana, interferindo em sua permeabilidade seletiva (SOUZA, 2006), e os PAMs também. É provável que a PEGuilação possa ter favorecido o acúmulo do peptídeo na membrana bacteriana, o que pode ter colaborado com a ação da colistina de forma sinérgica.

A gentamicina é um aminoglicosídeo que atua inibindo a síntese das proteínas na unidade 30S do ribossomo bacteriano. Essa se liga à unidade 30S de forma específica e irreversível, impactando na tradução do mRNA e assim, levando à incorporação incorreta de aminoácidos na cadeia polipeptídica durante a síntese proteica - “*non sense*” (SOUZA, 2006). O sinergismo a esse fármaco pode ser devido aos peptídeos formarem poros, e, assim, aumentarem a permeabilidade da membrana bacteriana, favorecendo a entrada dessa substância no citoplasma bacteriano.

Para as demais classes testadas, o efeito sinérgico do PEGuilado, medido pelo ICIF, não apresentou ganho substancial, tampouco perda do sinergismo, se comparado ao LyeTx I-b.

Além de algumas combinações possuírem efeitos sinérgicos, também podem levar à ressensibilização de bactérias resistentes a determinado fármaco do qual eram resistentes. A ressensibilização é uma alternativa interessante no combate de microrganismos resistentes, pois possibilita a utilização de medicamentos comuns na clínica e em menores doses. Assim, o LyeTx I-b e o LyeTx I-bPEG foram avaliados quanto às suas possíveis propriedades de ressensibilização.

Nos resultados dos tratamentos apresentados na Tabela 15, observa-se que o LyeTx I-b apresentou melhor desempenho, pois levou à ressensibilização as três classes de antimicrobianos testados. Quanto ao desempenho dos peptídeos em CRAB, o peptídeo PEGuilado reduziu a CIM do meropenem duas vezes, ou seja, aumentou a sua susceptibilidade aos carbapenêmicos. Porém, a PEGuilção prejudicou a ressensibilização da gentamicina e do levofloxacino pelo peptídeo LyeTx I-b.

Outros peptídeos antimicrobianos já mostraram essa atividade de ressensibilização, uma vez que a resistência intrínseca a antimicrobianos em bactérias Gram-negativas, como *A. baumannii*, se dá devido à presença de uma membrana externa (OM), que atua como uma barreira de permeabilidade, e à expressão de várias bombas de efluxo de drogas (ARZANLOU *et al.*, 2017; ZGURSKAYA, LOPEZ, GNANAKARAN, 2015).

Assim, este estudo mostrou pela primeira vez que o peptídeo LyeTx I-b pode ser utilizado, em baixa dose, como quimiossensibilizador em combinação com antimicrobianos no tratamento de infecções por *A. baumannii*, como já testado com outros peptídeos antimicrobianos e antibiofilme (PLETZER *et al.*, 2018). Porém, mesmo levando à ressensibilização, os peptídeos utilizados por longo tempo e em subdoses também podem levar a indução de resistência.

A resistência a antimicrobianos é um problema mundial de Saúde Pública (TAUBES, 2008; WHO, 2017) e para avaliar se o LyeTx I-b e o LyeTx I-bPEG

induzem resistência em *A. baumannii*, foi realizado o estudo de indução de resistência em vários dias de incubação. Durante todo o tempo de teste de 21 dias, os valores da CIM do LyeTx I-bPEG permaneceram constantes. Porém, o mesmo comportamento não foi observado para o LyeTx I-b, nem para a colistina (Figura 31). Portanto, os resultados do estudo de resistência em várias etapas indicaram que *A. baumannii* não foi capaz de desenvolver resistência rápida contra o LyeTx I-bPEG no período testado, o que não foi observado para o peptídeo sem o mPEG-MAL.

De forma geral, os peptídeos antimicrobianos são conhecidos por suas baixas propensões ao desenvolvimento de resistência aos microrganismos. Isso tem sido associado à capacidade desses peptídeos em produzir rápida morte celular devido aos danos que esses causam à membrana bacteriana (REIS *et al.*, 2018; SHRESTHA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2010). Porém, neste trabalho, a PEGuilação confrontou essa questão. Mesmo apresentando uma redução da atividade *in vitro* demonstrada nos ensaios de avaliação da CIM, ressensibilização e curva de morte, o peptídeo PEGuilado mostrou resultados promissores em outros testes também *in vitro*, como o sinergismo e a indução de resistência. O PEG, além de proteger o peptídeo de proteases presentes no plasma, também atua como uma barreira para proteases e enzimas bacterianas. Falciani *et al.* (2014) demonstrou que a PEGuilação sitio-dirigida protegeu o peptídeo antimicrobiano M33 da ação da enzima elastase de *P. aeruginosa*. Esta enzima é responsável pela virulência dessa bactéria, pois lisa os peptídeos antimicrobianos envolvidos na imunidade inata.

As velocidades de ação bactericidas *in vitro* do LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG foram avaliadas, comparando-se à da colistina, pelas curvas de morte em *A. baumannii*. Para a concentração de cinco vezes a CIM do LyeTx I-b, do LyeTx I-bPEG e da colistina, apresentaram rápido efeito bactericida contra células em crescimento logarítmico, sendo capazes de eliminar completamente uma alta carga microbiana (1×10^6 UFC.mL⁻¹) de *A. baumannii* em 1, 3 e 6 horas, respectivamente (Figura 32).

A cinética de morte bacteriana com menor tempo e com mais baixa concentração é a ideal para o antimicrobiano, pois é importante para a eliminação mais rápida e eficaz de patógenos, minimizando assim o risco de sua propagação, reduzindo a probabilidade de indução de resistência e diminuindo a progressão da

infecção com redução do tempo de tratamento (ALDER, EISENSTEIN, 2004). Nesse sentido, mesmo a PEGuilação tendo aumentado o tempo de morte bacteriana comparado ao LyeTx I-b, o seu produto PEGuilado apresentou melhor cinética de morte se comparado a colistina.

O peptídeo antimicrobiano pode ter sua atividade e estabilidade comprometidas dependendo do meio no qual esteja, pois fatores como presença de proteases, sais e pH podem interferir na preservação de sua estrutura ou conformação, modificando sua capacidade de ligação ao seu sítio de ação ou degradando-o.

Os peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG apresentaram redução significativa de atividade, principalmente o peptídeo PEGuilado, na presença de sais (Tabela 16). Isso era esperado, pois soluções contendo cátions como Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} desempenham papel fundamental na modificação das interações entre membranas bacterianas e compostos PEGuilados. Nos sistemas que contêm sais, a distância entre o composto PEGuilado e a membrana lipídica é maior em comparação aos sistemas com ausência de sais. Isso acontece devido às interações repulsivas entre os compostos PEGuilados e a bicamada lipídica nos sistemas contendo sais, pois essas repulsões eletrostáticas envolvem grupos lipídicos com os íons como o Na^+ ligados ao polietileno glicol, composto muito sodiado, como visto na Figura 20 (RISSANEN *et al.*, 2014).

Satisfatoriamente, na presença de plasma humano, o produto PEGuilado não apresentou perda de sua atividade, diferentemente do LyeTx I-b. Nesse contexto, a preservação da atividade do LyeTx I no plasma foi um resultado importante, pois a via de administração planejada para esse produto é a parenteral. Medicamentos à base de peptídeos apresentam instabilidade pela via oral, sendo, por isso, administrados, preferencialmente, pela via parenteral.

Foi mostrada a atividade antimicrobiana *in vivo* do peptídeo LyeTx I-b no tratamento de artrite séptica (REIS, *et al.*, 2018), porém pela via intra-articular, que mesmo sendo utilizada na clínica, não é a usual.

É provável também que o peptídeo administrado *in situ* tenha pouca influência do meio. Assim, as eficácias dos peptídeos LyeTx I-b e LyeTx I-bPEG

foram avaliadas em modelo de pneumonia bacteriana por *A. baumannii* em camundongos pela via endovenosa (Figura 33). Após o tratamento, observou-se redução significativa da carga bacteriana nos pulmões dos animais tratados com peptídeo PEGuilado nas três concentrações testadas (0,5; 1 e 2mg.kg⁻¹).

Já para os animais tratados com o peptídeo sem o mPEG-MAL, os valores ficaram semelhantes ao do controle sem tratamento. Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de UFC para os tratamentos com LyeTx I-bPEG e colistina. Considerando-se que o peptídeo não PEGuilado não tenha apresentado atividade *in vivo* nas concentrações de 0,5 e 1mg.kg⁻¹, sugere-se que este tenha sido degradado no plasma devido à presença de enzimas, incluindo proteases e esterases, resultado corroborado pelos ensaios *in vitro* de estabilidade em plasma.

Outro ponto importante, mesmo que o LyeTx I-bPEG tenha mostrado atividade *in vivo* na concentração de 2mg.kg⁻¹, esse valor está muito próximo de sua toxicidade aguda verificada no capítulo II: 5mg.kg⁻¹. O PEGuilado apresentou atividade na menor concentração testada, 0,5mg.kg⁻¹ com toxicidade aguda de 20mg.kg⁻¹, ou seja, a dose terapêutica foi 40 vezes abaixo da tóxica.

6.4 CONCLUSÃO

O peptídeo LyeTx I-bPEG, mesmo apresentando CIM menor que o LyeTx I-b, apresentou melhor desempenho em testes *in vitro* como atividade antibiofilme e indução de resistência nas condições estudadas. Porém, no modelo *in vivo*, os resultados foram bem distintos, mostrando que o peptídeo sem o mPEG-MAL não apresentou atividade significativa em modelo de pneumonia, sendo possivelmente degradado na circulação.

A PEGuilação mostrou-se eficiente para a manutenção da atividade do peptídeo pela via endovenosa e mostrou ganho substancial na segurança terapêutica. Assim, a PEGuilação de LyeTx I-b_{cys} foi fundamental para sua atividade

antimicrobiana *in vivo*, em modelo de pneumonia causada por *A. baumannii* em camundongos.

Como visto no capítulo II, a conjugação com mPEG-MAL, além de favorecer a segurança e a estabilidade do peptídeo, garantiu sua atividade *in vivo* pela via endovenosa. Portanto, o LyeTx I-bPEG se mostrou como potencial candidato a biofármaco antimicrobiano para tratamento de infecções pulmonares causadas por *Acinetobacter baumannii* resistente.

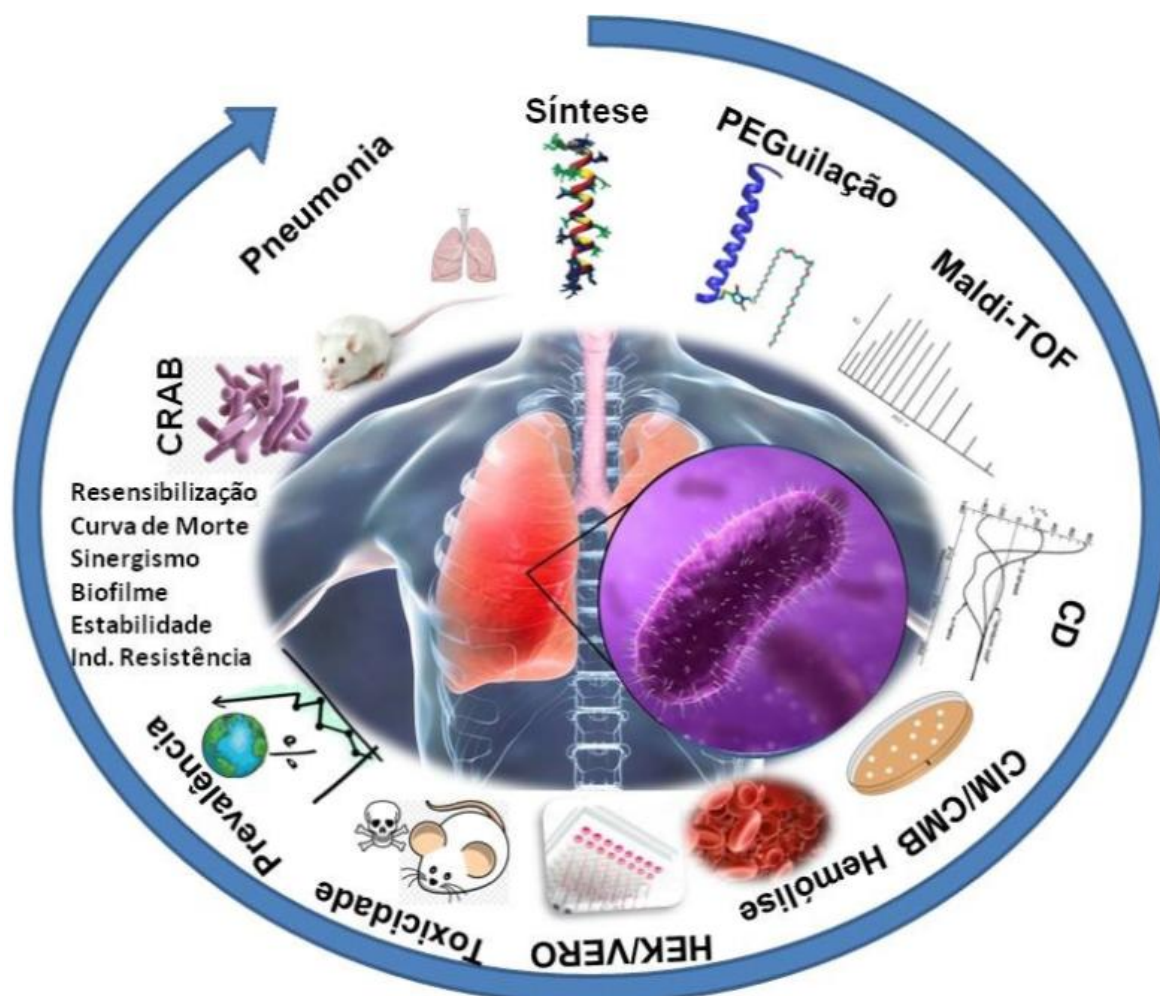
CONCLUSÃO DA TESE E RESUMO GRÁFICO

7 CONCLUSÃO DA TESE E RESUMO GRÁFICO

São frequentes os casos de pneumonias bacterianas ocasionadas por microrganismos multirresistentes, reduzindo o arsenal terapêutico disponível. E, para alguns isolados como PRABs, não há outros medicamentos disponíveis. Como mostrado neste trabalho, esses microrganismos estão presentes em IRAS e em taxas alarmantes por todo o mundo, principalmente na América do Sul.

Nas pneumonias bacterianas ocasionadas por patógenos multirresistentes, um dos organismos frequentes no ambiente hospitalar é *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos. Nesse sentido, o peptídeo PEGuilado (LyeTx I-bPEG) estudado neste trabalho, mesmo apresentando redução da atividade *in vitro* para *A. baumannii*, quando comparado ao não PEGuilado (LyeTx I-b), teve essa perda compensada quando avaliada em modelo de pneumonia *in vivo*. A perda parcial de atividade em detrimento dos benefícios é fato comum dentre vários fármacos PEGuilados conhecidos. Conclui-se que a PEGuilação de LyeTx I-b o tornou um potencial biofármaco como alternativa, além das polimixinas, para o tratamento da pneumonia causada por CRAB.

Figura 35 – Resumo gráfico



Fonte: <https://www.cleanpng.com/> com modificações pelo autor.

PERSPECTIVAS

8 PERSPECTIVAS

➤ **Realizar ensaios de biodistribuição e farmacocinética**

No processo de desenvolvimento de fármacos, é imprescindível conhecer sua biodistribuição e farmacocinética, pois estas fornecem informações quanto à concentração, distribuição e tempo para que o fármaco alcance seu local de ação, bem como para que seja eliminado/metabolizado.

➤ **Avaliar a atividade dos peptídeos LyeTx I-b e de LyeTx I-bPEG em *A. baumannii* resistentes às polimixinas (PRABs)**

Devido ao desenho do estudo desta tese, bem como considerando as condições de segurança necessárias para se trabalhar com isolados de PRABs, neste trabalho os modelos de estudo foram bactérias *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Entretanto, é desejável verificar se o produto PEGuilado seria ativo nas PRABs, seguindo as normas de segurança exigidas.

➤ **Avaliar a ação do peptídeo PEGuilado em outros modelos de infecção pulmonar, por outras bactérias resistentes, como *S. aureus*, dentre outras**

A pneumonia pode também ser determinada por outras bactérias, por exemplo: *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae* e *M. pneumoniae*, dentre outras. Assim, o LyeTX I-bPEG pode ser avaliado para outras bactérias, podendo ter espectro mais amplo de ação. Também é preciso avaliar o processo de inflamação, quantificando citocinas.

➤ **Avaliar a atividade do peptídeo LyeTx I-bPEG em modelo de sepse**

Como foi mostrado nesta tese, o LyeTx I-bPEG apresentou atividade quando administrado pela via endovenosa. Esta via pode ser de grande interesse para se avaliar a atividade do LyeTx I-bPEG no modelo de sepse.

➤ **Avaliar a atividade do LyeTx I-bPEG em modelo de pneumonia pela via inalatória**

A via inalatória é importante e muito utilizada na clínica para a administração de fármacos no tratamento de doenças respiratórias. Portanto, o LyeTx I-BPEG poderia também ser avaliado na forma nebulizada para o tratamento de pneumonia.

➤ **Transferência de tecnologia**

Buscar, com o apoio das instituições detentoras da patente (em fase de depósito), empresas interessadas em levar avante os testes com o peptídeo PEGuilado para o possível desenvolvimento de novo antibiótico.

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, M. A. *et al.* The synthetic peptide LyeTx I-b derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom is cytotoxic to U-87 MG glioblastoma cells. **Amino acids**, v. 3, ed. 51, p. 433-449, 2018.
- ABDULZAHRA, A. T.; KHALIL, M. A. F.; ELKHATIB, W. F. First report of colistin resistance among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from hospitalized patients in Egypt. **New microbes new Infect.**, v. 26, p. 53–58. 2018.
- ABUCHOWSKI, A. *et al.* Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos, v. 252, n. 11, p. 3578-3581, 1977.
- ACHILLADELIS, B.; ANTONAKIS, N. The dynamics of technological innovation: the case of the pharmaceutical industry. **Research Policy**, Holanda, v. 30, n. 4, p. 535-588, 2001.
- AFONSO, A. S. **Purificação e análise da atividade antimicrobiana do peptídeo des-his16-LyeTx I proveniente da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*.** Orientador: Maria Elena de Lima Perez Garcia. 2015. 40 f. Monografia de Especialização (Especialização em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade federal de Minas Gerais, Brasil, 2015.
- AGODI, A. *et al.* Spread of a carbapenem – and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. **J. Hosp. Infect.**, v. 86, p. 260–266. 2014.
- AKLN, F.; YAZAR, A.; DOĞAN, M. Determining the Infectious Pathogens and Their Resistance to Antibiotics in a Pediatric Intensive Care Unit. **J Pediatr Infect Dis.**, v. 13, p. 42–45. 2018.
- ALAEI, N.; AZIEMZADEH, M.; BAHADOR, A. Antimicrobial resistance profiles and genetic elements involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates from a referral hospital in Southern Iran. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 5: p. 75–79. 2016.
- ALDER, J.; EISENSTEIN, B. The advantage of bactericidal drugs in the treatment of infection, **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 6, p. 251–253, 2004.
- ANDRADE, J.T. *et al.* Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationship studies of chalcone derivatives as potential anti-Candida agents. **J. Antibiot.**, v. 71, p. 702–712, 2018.
- ANVISA. Antimicrobianos – Bases Teóricas e Uso Clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_w eb/modulo1/lactamicos2.htm. Acesso em: 16 jul. 2020.

APD. Nebrasca: Antimicrobial Peptide Database. Dep. de Patologia e Microbiologia, Universidade de Nebrasca, 2020. Disponível em: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. Acesso em: 12 jul. 2020.

ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays Biochem.**, v. 61, p. 49–59, 2017.

AVELAR JÚNIOR, J. T. *et al.* Synergistic effect between the peptide LyeTx I-b and cisplatin to kill triple negative breast cancer cells, MDA-MB-231. **Toxicon**. Suppl 1:S54, 2020. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.12.119.

BAADANI A. M.; THAWADI, S. I.; EL-KHIZZI, N. A. Omrani AS. Prevalence of colistin and tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from 2 hospitals in Riyadh Region over a 2-year period. **Saudi Medical Journal.**, p. 248–353. 2013.

BAGIYAN, G. A. *et al.* Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions. **Russian Chemical Bulletin**, n.52, p. 1135-1141, 2003.

BAHADOR, A. *et al.* Emergence of rifampicin, tigecycline, and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* in Iran; spreading of MDR strains of novel International Clone variants. **Microb. Drug Resist.**, v. 19, p. 397–406. 2013.

BAHAMONDEZ-CANAS, T. F. *et al.* PEGylation of Tobramycin Improves Mucus Penetration and Antimicrobial Activity against *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms in vitro. **Mol. Pharm.**, v.15, n. 4, p. 1643-1652, 2018.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, [s.n.], p. 1543-1575, 2013

BALKHAIR, A. *et al.* Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: Description of a decade-long trend. **Int J Infect. Dis.**, v. 85: p. 10–15. 2019.

BENINCASA, M. *et al.* PEGylation of the peptide Bac7 (1-35) reduces renal clearance while retaining antibacterial activity and bacterial cell penetration capacity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, ed. 5, p. 2010-2019, 2015.

BOBONE, S. **Peptide and protein interaction with membrane system: Applications to antimicrobial therapy and protein drug delivery.** Orientador: Lorenzo Stella. 2012. Tese (Doutorado em Química) – Department of Chemical Sciences and Technologies, University of Rome Tor Vergata, Italia, 2012. p. 147.

BOGDANOVICH T, EDNIE LM, SHAPIRO S, APPELBAUM PC. Antistaphylococcal activity of ceftobiprole, a new broad-spectrum cephalosporin. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, ed. 4210-4219, 2005.

BRASIL. Lei n. 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 15/05/1996, p. 8353.

BRKIĆ, D. V. *et al.* *Acinetobacter baumannii* microbiological and phenotypic characteristics of isolates from intensive care unit of the department of internal medicine at the University Hospital Centre in Zagreb over a four-year period. **Signa Vitae**, v.10, p. 13–15. 2015.

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

BRUNETTI, J. *et al.* In vitro and in vivo efficacy, toxicity, bio-distribution and resistance selection of a novel antibacterial drug candidate. **Scientific Reports**, Reino Unido, v. 6, 2016.

BUDNIK, B. A. *et al.* De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. **Journal of Mass Spectrometry**, Estados Unidos, v. 39, n. 2, 2004.

BURG, J.; REICHERT, K.; SCHROTH, A.; SCHURIG, H.; WESSNER, A. inventor. **Purification of PEGylated polypeptides**. Depositante: F. Hoffmann-La Roche AG. Titular: F. Hoffmann-La Roche AG. EP n. 2178900B1. 2012 Fev 05. Depósito: 07 mai. 2009. Concessão: 20 mar. 2012.

CAKIRLAR, F. K.; CIFTCI, I. H.; GONULLU, N. OXA-type Carbapenemases and Susceptibility of Colistin and Tigecycline Among Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from Patients with Bacteremia in Turkey. **Clin Lab.**, v. 61, p.741–7. 2015.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis**. A Practical Approach. Oxford University Press. 2000.

CHANG K-C. *et al.* Clonal spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in eastern Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 45, p. 37–42. 2012.

CHEN, C. H.; LU, T. K. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. **Antibiotics**, v. 9, n. 24, 1-20, 2020.

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute. **Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – tenth edition**. CLSI document M07-A10, Estados Unidos, v. 35, n. 2, 2018.

CONSUEGRA, J. *et al.* Peptides: β -cyclodextrin inclusion compounds as highly effective antimicrobial and anti-epithelial proliferation agents. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 12, p. 1858-1868. 2013.

COOPER, L. Z.; MADOFF, M. A.; WEINSTEIN, L. Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alpha-toxin I. Kinetics of the lytic reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 87, n. 1, p. 127-135, 1964.

COTTIER, T. The Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights. *In*: MACRORY, P. F. J.; APPLETON, A. E.; PLUMMER M. G. **The World Trade Organization: Legal, Economic and Political Analysis**, Boston, MA: Springer, 2005. cap. 22, p. 1041-1120.

CORDEIRO, L. P. *et al.* Funcionalização do Polímero mPEG-OH Via Reação de Bromoacetilação: Ativação, Caracterização por MALDI-TOF e Mecanismo de Reação. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 49, n. 3, 2020. No prelo.

DAFOPOULOU, K. *et al.* Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 4625–4630. 2015.

DAFOPOULOU, K. *et al.* An update on polymyxin susceptibility testing methods for *Acinetobacter baumannii*. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 9, p. 699–713, 2019.

DAVIS, S. S.; ILLUM, L.; TOMLINSON, E. **Delivery systems for peptide drugs**. Nato series A: Life Sciences. v. 125. Springer Science & Business Media, 1986. 370p.

DE FREITAS, S. S.; *et al.* Endotoxin removal from solutions of F(ab')₂ fragments of equine antibodies against snake venom using macroporous chitosan membrane. **Journal of membrane science**, v. 234, p. 67-73. 2004.

DE LIMA, M. E.; AMARAL, F. A.; PIMENTA, A. M. C.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N.; DOS SANTOS, D. M.; FARIAS, L. M.; FAGUNDES, E. M. S.; RESENDE, J. M.; JÚNIOR, J. T. A.; FUSCALDI, L. L.; MAGALHÃES, P. P. **Peptídeos antimicrobianos, composições farmacêuticas e usos**. Depositante: Universidade Federal de Minas Gerais. Titular: Universidade Federal de Minas Gerais, Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de Minas Gerais. BR n. PI 10 2017 028133-7A. Depósito: 26 dez. 2017.

DE LIMA, M. E.; DOS SANTOS, D. M.; BONILHA, J. C.; SEGURA, M. E. C.; MILÁN, R. D. S. **Composições farmacêuticas compreendendo peptídeos catiônicos incluídos e/ou associados à ciclodextrinas e usos**. Depositante: Universidade Federal de Minas Gerais. Titular: Universidade Federal de Minas Gerais. BR n. PI 017234-8A. Depósito: 12 jul. 2012.

DE LIMA, M. E.; DOS REIS, P. V. M.; BOFF, D.; SANTOS, D. M.; PIMENTA, A. M. C.; PERDIGÃO, G. M. C.; FAGUNDES, E. M. S.; RESENDE, J. M.; AMARAL, F. A. **Composições farmacêuticas para o tratamento de artrite séptica e usos**. Depositante: Universidade Federal de Minas Gerais. Titular: Universidade Federal de Minas Gerais. BR n. PI070945-2A. Depósito: 10 out. 2018.

DE LIMA, M. E. *et al.*, inventores; **Composição farmacêuticas para aplicação intravítrea e seu uso no tratamento de doenças da retina**. Universidade Federal

de Minas Gerais, Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de Minas Gerais, Depositantes. BR n. PI102018016318-3A. 09 ago. 2018.

DE SOUZA, H. R. T.; DE OLIVEIRA, S. B. L.; VILELA, L.; ZUCULIN, M. J.; XAVIER, M. S. S. P.; GUIA, M. L. M. **Processo aperfeiçoamento para produção em larga escala de cristais de insulina purificada**. Depositante: Biobrás - Bioquímica do Brasil S/A. Titular: Biobrás - Bioquímica do Brasil S/A. BR n. PI8803346-5A. Depósito: 30 jun. 1988.

DERIS, Z. Z *et al.* Probing the Penetration of Antimicrobial Polymyxin Lipopeptides into Gram-Negative Bacteria. **Bioconjugate Chem**, v. 25, n. 4, p. 750-760. 2014.

DRIDER, D.; REBUFFAT, S. **Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications**. Springer. Estados Unidos: Springer science & business media, 2011. 451p.

DU, J. *et al.* Improved Biofilm Antimicrobial Activity of Polyethylene Glycol Conjugated Tobramycin Compared to Tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Mol. Pharm.**, v. 12, n.5, p. 1544-1553. 2015.

DURDU, B. *et al.* Temporal trends and patterns in antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria implicated in intensive care unit-acquired infections: A cohort-based surveillance study in Istanbul, Turkey. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, 14: 190–196. 2016.

EARS-Net. **Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network** Suécia: ECDC, 211 p. 2014.

ECDC – EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013**.

ERIKSEN, M. B.; FRANDBEN, T. F. The impact of patient, intervention, comparison, outcome (PICO) as a search strategy tool on literature search quality: a systematic review. **Journal of the Medical Library Association**, Estados Unidos. v. 106, ed. 4, p. 420–431, 2018.

ESPINAL, P.; MARTÍ, S.; VILA, J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, p. 56-60. 2012.

EUCAST. **Recommendations for Colistin (Polymyxin E) MIC Testing-Joint EUCAST and CLSI Recommendation**. 2016 [cited 17 Nov 2019]. Disponível em: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.

EVANS, B. C. *et al.* Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of visualized experiments**, v. 9, n. 73, 50166. 2013.

EZADI, F.; ARDEBILI, A.; MIRNEJAD, R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. **J. Clin. Microbiol.**, v. 57, n. 4, 2018.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K.; SARAVOLATZ, L. D. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases.**, v. 40, p. 1333–1341. 2005.

FALCIANI, C.; *et al.* Site-specific pegylation of an antimicrobial peptide increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* elastase. **Amino acids**, v. 46, ed. 5, p. 1403-1407, 2014.

FEE, C. J.; VAN ALSTINE, J. M. PEG-proteins: reaction engineering and separation issues. **Chemical engineering science**, v. 61, n. 3, p. 924-939. 2006.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug discovery today**, v. 20, n. 1. p. 122-128, 2015.

FUSCALDI, L. L. *et al.* Synthesis and antimicrobial evaluation of two peptide LyeTx I derivatives modified with the chelating agent HYNIC for radiolabeling with technetium-99m. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 22, ed. 16, 2016.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 2070-2074, 2011.

GANDHI, J. A. *et al.* Alcohol Enhances *Acinetobacter baumannii*-Associated Pneumonia and Systemic Dissemination by Impairing Neutrophil Antimicrobial Activity in a Murine Model of Infection. **Plos One.** v. 9(4). 2014.

GENTELUCI, G. L. Emergence of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitals in Rio de Janeiro. **J. Bras. Patol. e Med. Lab**, v. 52, p. 91–95. 2016.

GIAMARELLOU, H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 614–621, 2016.

GIULIANI, A.; RINALDI, A. C. **Antimicrobial peptides: methods and protocols.** Berlim: Humana press, Ed Springer; v. 618, 2010.

GODIN, B. Innovation: **A Conceptual History of an Anonymous Concept. National de la recherche scientifique.** Montreal, Quebec, Canadá; 2015.

GOMES, D. B. C. *et al.* *Acinetobacter baumannii* multirresistentes: emergência de resistência à polimixina no Rio de Janeiro Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: the occurrence of polymyxin resistance in Rio de Janeiro. Acesso em 15 mar. 2020. Disponível em: https://periodicos.fiocruz.br/index.php?q=pt-br/fc_print/publicacao/1089266

GOPALAKRISHNAKONE, P. CORZO G, DE LIMA ME, DIEGO-GARCIA E. **Spider venoms**, Ed. Springer; 2016.

GUPTA, M. *et al.* Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia in a tertiary care hospital: an evolving threat. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, ed. 1. p. 72–73. 2016.

GUVENSEN, N. C.; KESKIN, D.; SANKUR, F. Antibiotic resistance ratio of *acinetobacter baumannii* against to ten antibiotics and multidrug resistance index. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 25, p. 8316-8320. 2016.

HAEBERLI, S. *et al.* Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). **Toxicon**, v. 38, n. 3, p. 373-380, 2000.

HALL, W.; MCDONNELL, A.; O'NEILL, J. Superbugs: An Arms Race Against Bacteria. **The Lancet**, v. 6, 2018.

HAMEED, F. *et al.* Plasmid-mediated mcr-1 gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Pharmacokinetic consequences of pegylation. **Drug delivery**, v. 13, n. 6, p. 399-409, 2006.

HASAN, R.; ACHARJEE, M.; NOOR, R. Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections. **Tzu Chi medical journal**, v. 28, n. 2, p. 49-53, 2016.

HENNINOT, A.; COLLINS, J. C.; NUSS, J. M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 1382-1414, 2018.

HIEMSTRA, P. S.; ZAAT, S. A. **Antimicrobial peptides and innate immunity**. Berlin: Springer science & Business media; 2013.

HINDLER, J. A.; HUMPHRIES R. M. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51. p. 1678–1684. 2013.

HOWARD, A. *et al.* *Acinetobacter baumannii*. An emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, Estados Unidos, v. 3, n. 3, p. 243–250, 2012.

JEVSEVAR, S.; KUNSTELJ, M.; POREKAR, V. G. PEGylation of therapeutic proteins. **Biotechnology Journal**, Holanda, v. 5, n. 1, p. 113-128, 2010.

JUNG, J.; PARK, W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2533–2548, 2015.

KANG, S. J. *et al.* Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. **Archiv. Pharmac. Res.**, v. 35, n. 3, p. 409-413, 2012.

KAKKAR, M. *et al.* Antimicrobial resistance in South East Asia: time to ask the right questions. **Glob. Health Action**, v. 11, 1483637, 2018.

KAYE KS, *et al.* Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. **Infect. Dis. Clin. North Am.** v. 30: p. 391–414, 2016.

KIM, U. J. *et al.* Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. **Chonnam. Med. J.**, v. 50, p. 37–44, 2014.

KO, K. S. *et al.* High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, 1163–7, 2007.

KO, K. S.; CHOI, Y.; LEE, J-Y. Old drug, new findings: colistin resistance and dependence of *Acinetobacter baumannii*. **Precis. Futur. Med.**, v. 1, p. 159–167, 2017.

KODERA, Y. *et al.* Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 7, p. 1233-1271, 1998.

KUHN-NENTWIG, L. *et al.* N-terminal aromatic residues closely impact the cytolytic activity of cupiennin 1a, a major spider venom peptide. **Toxicon**, v. 1, n. 75, p. 177-186, 2013.

KUMAR, G. T. *et al.* Biotechnology based drug delivery by PEGylation method. **IJRAP**, v. 1, p. 95-102, 2011.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

LAI, S. K.; WANG, Y.-Y.; HANES, J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 2, p. 158-171, 2009.

LAROCCA R. A. *et al.* Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474-478, 2016.

LAWRENCE, P. B.; PRICE, J. L. How PEGylation influences protein conformational stability. **Current opinion in chemical biology**, v. 34, p. 88-94, 2016.

LAZAREV, V. N.; GOVORUN, V. M. Antimicrobial peptides and their use in medicine. **App. Bioch. Microb.**, v. 46, n. 9, p. 803-814, 2010.

LEAN, S-S. *et al.* Prevalence and Genetic Characterization of Carbapenem- and Polymyxin-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from a Tertiary Hospital in Terengganu, Malaysia. **ISRN Microbiol.**, v. 2014. 2014.

LEE, S. Y. *et al.* Identification, genotypic relation, and clinical features of colistin-resistant isolates of *Acinetobacter* genomic species 13BJ/14TU from bloodstreams of patients in a university hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52: p. 931–939. 2014.

LEITE, J. F. *et al.* Removal of sodium and potassium adducts using a matrix additive during matrix-associated laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of peptides. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 18, n. 23, p. 2953–2959, 2004.

LESHO, E. *et al.* Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. **J. Infect. Dis.**, v. 208, p. 1142–1151. 2013.

LETTL, C.; HERSTATT, C.; GEMUENDEN, H. G. Users' contributions to radical innovation: evidence from four cases in the field of medical equipment technology. **R&D management.**, v. 36, n. 3. P. 251-272, 2006.

LEUNG, L. M. *et al.* A Prospective Study of *Acinetobacter baumannii* Complex Isolates and Colistin Susceptibility Monitoring by Mass Spectrometry of Microbial Membrane Glycolipids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 57. 2019

LI, H. *et al.* The evaluation of four in vitro susceptibility testing methods for colistin on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Jundishapur J. Microbiol.**, v. 10. 2017.

LI, Z. *et al.* Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? **Open Forum Infect Dis.**, v. 6, n. 10, 2019.

LIBERATI, A. *et al.* The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. **BMJ.**, v. 339, b2700, 2009.

LIMA, W. G. *et al.* Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 37, n. 6, p.1009–1019, 2018.

LIMA, W. G. *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with burn injury: A systematic review and meta-analysis. **Burns**, v. 45, n. 7, p. 1495-1508, 2019a.

LIMA, W. G. *et al.*, Synthesis and antimicrobial activity of some benzoxazinoids derivatives of 2-nitrophenol and 3-hydroxy-2-nitropyridine, *Synth. Commun.* v. 49, n. 2, 2019b.

LING, L. L. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature.** v. 517, p. 455-459. 2015.

LOUREIRO, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev. Port. Saúde Pública**, v. 34, p. 77–84. 2016.

LOWE, M. *et al.* *Acinetobacter baumannii*: Epidemiological and Beta-Lactamase Data From Two Tertiary Academic Hospitals in Tshwane, South Africa. **Front. Microbiol.**, v. 9. 2018.

LYU, Y. *et al.* Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP-36-derived peptides against bacteria and *Candida*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.

MAHMOUDI, S. *et al.* Antimicrobial resistance patterns of Gram-negative bacteria isolated from bloodstream infections in an Iranian referral paediatric hospital: A 5.5-year study. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 11, p. 17–22, 2017.

MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides. **Upsala J. Med. Sci.**, v. 119, [s.n.], p. 199-204, 2014.

MANOHAR, P. *et al.* The distribution of carbapenem- and colistin-resistance in Gram-negative bacteria from the Tamil Nadu region in India. **J. Med. Microbiol.**, v. 66. p. 874–883. 2017.

MAYERHOFF, Z. D. V. L, *et al.* **Estudo comparativo dos critérios de patenteabilidade para invenções biotecnológicas em diferentes países.** Rio de Janeiro: GTEB/INPI. 2007.

MAVROIDI, A. *et al.* Molecular identification of tigecycline- and colistin-resistant carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* from a Greek hospital from 2011 to 2013. **J. Med. Microbiol.**, v. 64: 993–997. 2015.

MEIBOHM, B.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biotech drugs. In: Meyers, R. A. (Org.). **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**, v. 10, ed. 2, 2005. p. 211-239.

MELETIS, G. *et al.* Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. **New Microbiol.**, v. 38, 417–421. 2015.

MELO-BRAGA, G. *et al.* Antimicrobial Peptides From Lycosidae (Sundevall, 1833) Spiders. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 21,n5, 527–541. 2020.

MENDES OLIVEIRA V. R.; PAIVA, M. C.; LIMA, W. G. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. **Travel. Med. Infect. Dis.**, v. 31, 2019. DOI: 10.1016/j.tmaid.2019.07.015

MRSNY, R. J.; DAUGHERTY, A. Proteins and peptides: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and Metabolic outcomes. **CRC Press**, v. 202, 2009.

MOHAMED, M. F; ABDELKHALEK, A; SELEEM, M. N. Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. **Sci Rep.** v. 6, p. 1-14. 2016.

MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? **CMAJ**, v. 180, n. 4, p.408-15, 2009.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

NEKTAR. **Nektar Advanced PEGylation: Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation**. Catálogo-2005-2006. Disponível em: <http://www.sejinbio.co.kr/Catalogue/Nektar>.

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L. Variations in colistin susceptibility among different species of the genus *Acinetobacter*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65: 367–369. 2010.

NOWAK, J. *et al.* High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 72: p. 3277–3282. 2017.

ODDO, A.; HANSEN, P. R. **Hemolytic Activity of Antimicrobial Peptides**. In: Hansen, P.R. (eds) *Antimicrobial Peptides*. Methods in Molecular Biology, v. 1548, 2017. Humana Press, New York.

OECD/OCDE 423: **Guideline for testing of chemicals acute oral toxicity** – Acute toxic class method. Rio de Janeiro: OECD/OCDE, 2001.

OFFMAN, E.; EDGINTON, A. N. A PBPK workflow for first-in-human dose selection of a subcutaneously administered pegylated peptide. **Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics**, v. 42, n. 2, p. 135-150, 2015.

OFFMAN, E.; EDGINTON, A. N. Pharmacokinetic time course scaling of a subcutaneously administered pegylated peptide conjugate for a first-in-human investigation. **Eur. Jour. of Drug Metab. and Pharmac.**, v. 42, n. 1, p. 69-78, 2017.

OIKONOMOU, O. *et al.* Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. **BMC Infect Dis.**, v. 15, p. 559. 2015

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front, Microbiol.**, v. 5: n. 643, 2014.

O'TOOLE, G. A. Microtiter dish Biofilm formation assay. **J. Vis. Exp.**, 47, 2437, 2010.

OROOJALIAN F. *et al.* Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on foodborne pathogens. **Food Chem.**, v. 120, n. 3, p. 765-770, 2010.

OROOJALIAN, F.; ORAFEE, H.; AZIZI, M. Synergistic antibacterial activity of medicinal plants essential oils with biogenic silver nanoparticles. **Nanomed. J.**, v. 4, n. 4, p. 237-244, 2017.

ORHAN, R. *et al.* Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 140-143, 2005.

OTVOS, L. Peptide-based drug design: here and now. **Methods Mol. Biol.**, v. 494, p. 1-8, 2008.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 13, p. 1177-1188, 2009.

PEREIRA, P. G.; GALVÃO, T. F. Heterogeneity and publication bias in systematic reviews. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 23, n. 4, p. 775-778, 2014.

PHOENIX, D. A.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. **Antimicrobial peptides**, Nova Jersey: John Wiley & Sons. 2012. DOI:10.1002/9783527652853.

PLETZER, D.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. W. Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. **PLoS Pathog.**, v. 14, n. 6, e1007084, 2018.

PLETZ, M. W.; HAGEL, S.; FORSTNER, C. Who benefits from antimicrobial combination therapy?, **Lancet Infect. Dis.**, v. 17, p. 677–678, 2017.

PULIDO-CEJUDO, A. *et al.* Management of acute bacterial skin and skin structure infections with a focus on patients at high risk of treatment failure, **Ther. Adv. Infect. Dis.**, v. 4, p. 143–161, 2017.

QUEENAN, A. M. *et al.* Multidrug resistance among *Acinetobacter* spp. in the USA and activity profile of key agents: Results from CAPITAL Surveillance 2010. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 73, p. 267–270. 2012.

RARO, O. H. F. *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 2, p. 167-172, 2017.

RAMESH, N. *et al.* Colistin susceptibility of gram-negative clinical isolates from Tamil Nadu, India. **Asian biomedicine**. v. 10: p. 1-12. 2017.

R CORE TEAM. R: **A Language and environment for statistical computing** [Internet], 2017. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

REDDY, T. *et al.* Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates from a metropolitan Detroit health system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 2235–2238, 2010. DOI:10.1128/AAC.01665-09

REIS, P. V. *et al.* LyeTx I-b, a synthetic peptide derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom, shows potent antibiotic activity *in vitro* and *in vivo*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. 667, 2018.

- REZAEI, A. *et al.* Prevalence of metallo-beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit in tertiary care hospitals. **Ann Ig.**, v. 30, p. 330–336. 2018.
- RISSANEN, S. *et al.* Effect of PEGylation on Drug Entry into Lipid Bilayer. **J. Phys. Chem. B.**, v. 118, n. 1, 144-151, 2014.
- RISS, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, *et al.*, editors. **Assay Guidance Manual [Internet]**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- ROBERTS, M.; BENTLEY, M.; HARRIS, J. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 4, p. 459-76, 2002.
- RODRÍGUEZ-VERDUGO, A. *et al.* Compounding effects of climate warming and antibiotic resistance. **Science**, v. 23, n. 4, p. 101-115, 2020.
- RODRIGUEZ, C. H. *et al.* Discrepancies in susceptibility testing to colistin in *Acinetobacter baumannii*: The influence of slow growth and heteroresistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 54, p. 587–591. 2019.
- ROSMAN, K. J. R.; TAYLOR, P. D. P. Isotopic Compositions of the Elements. **J. Phys. Chem. Ref. Data**, v. 27, n. 6, p. 1275-1287, 1997.
- RUIZ, J.; CALDERON, J.; RONDÓN-VILLARREAL, P.; TORRES, R. Analysis of structure and hemolytic activity relationships of antimicrobial peptides (AMPs). In: CASTILLO, L. F.; CRISTANCHO, M.; ISAZA, G.; PINZÓN, A.; RODRÍGUEZ, J. M. C.; editores. **Advances in computational biology**, Holanda: Springer. 2014, 232 vol. p. 253-258.
- SAMONIS, G. *et al.* In vitro susceptibility to various antibiotics of colistin-resistant gram-negative bacterial isolates in a general tertiary hospital in Crete, Greece. **Clin. Infect Dis.**, v. 50: p. 1689–1691. 2010.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada a experimentação animal**, 4. ed.: 4, 2015.
- SANTOS, D. M. *et al.* LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino acids**, v. 39, n. 1, p. 135-44, 2010
- SANTOS, D. M.; BONILLA, J. C.; LIMA, M. E.; SEGURA, M. E.C.; MILÁN, R. D. S. inventores; **Composições farmacêuticas compreendendo peptídeos catiônicos incluídos e/ou associados à ciclodextrinas e usos**. Universidade Federal de Minas Gerais, Depositante. BR n. PI102012017234-8A. Depósito: 12 jul. 2012.
- SCHMID, F. X. **Biological macromolecules: UV-visible Spectrophotometry**, Enciclopedia of life sciences. 2001.
- SCHUMPETER, J. A. **Capitalism, Socialism and Democracy**, 1. ed. Brasil: Taylor and Francis, 2003. 460 p. ISBN 0-415-10762-8.

SELASI, G. N. *et al.* Genetic basis of antimicrobial resistance and clonal dynamics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type 191 in a Korean hospital. **Infect. Genet. Evol.**, v.36: p. 1–7. 2015.

SHAFER, W. **Antimicrobial peptides and human disease**. Berlim: Springer science & Business Media; 2006.

SHECK, E. A. *et al.* Epidemiology and genetic diversity of colistin nonsusceptible nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains from Russia for 2013-2014. **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.**, v. 2017. 2017.

SHIMONISHI, Y. **Peptide Science—Present and Future: Proceedings of the 1st International Peptide Symposium**. Berlim: Springer science & business media; 2007.

SHRESTHA, P. *et al.* Enumerating the economic cost of antimicrobial resistance per antibiotic consumed to inform the evaluation of interventions affecting their use. **Antimicrobial Resistance and infection control**, v.7, n. 98, 2018.

SIMAR, S. *et al.* Colistin and polymyxin B minimal inhibitory concentrations determined by etest found unreliable for gram-negative bacilli. **Ochsner J.**, v. 17, p. 239–242. 2017.

SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2006.

SOUSA, C. *et al.* MALDI-TOF MS and chemometric based identification of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex species. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, p. 669–677, 2014. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.04.014.

SPITZNAGEL, J. K. Origins and development of peptide antibiotic research. **Molecular Biotechnology**, v. 10, n. 3, 1998. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Circular dichroism of peptides and proteins. In. **Circular Dichroism: Principles and applications**, (BEROVA, N., NAKANISHI, K., e WOODY, R. W. eds) ed. 2, p. 601-620, 2000. Willey-VCH, Nova York.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Structural composition of β_I - and β_{II} -proteins. **Protein. Sci.**, v. 12, p. 384–388, 2003.

STOLF, W. O. **Uso do adesivo tecidual de fibrina derivado de veneno de serpente e avaliação da técnica de autoenxertia utilizando a pele do sulco nasogeniano**. 1998. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo.

STRATEVA, T. *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014–2016). **J. Glob. Antimicrob., Resist.** v. 16, p. 266–273, 2019.

STROHALM, M. *et al.* mMass Data Miner: An Open Source Alternative for Mass Spectrometric Data Analysis. **Rapid Commun., Mass Spectrom.** v. 22, n. 6, p. 905-908. 2008.

TAUBES, G. The bacteria fight back. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 356-361, 2008.

THORPE, K. E.; JOSKI, P.; JOHNSTON, J. Antibiotic-resistant Infection Treatment Costs Have Doubled Since, 2002, Now Exceeding \$2 Billion Annually. **Health Affairs**, v. 37, n. 4, p. 662–669, 2018.

TURECEK, P. L. *et al.* PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 460-475, 2016.

TYURYAEVA, I. I. *et al.* Origin of anti-tumor activity of the cysteine-containing GO peptides and further optimization of their cytotoxic properties. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 40217, 2017.

URBAN, C. *et al.* Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype anitratus. **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 2, p. 448–451, 1993.

UZUN, B. *et al.* Changes in resistance percentage to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from blood cultures of intensive care unit patients. **Turk Hij ve Deneysel Biyol Derg**, v. 71, p. 1–8. 2014.

VAEZ, H.; SAHEBKAR, A.; KHADEMI, F. Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* in Iran: a Systematic Review and Meta-Analysis. **J. Chemother.**, v. 31, n. 1, p. 1–8, 2019.

VALENZUELA M. T, DE QUADROS C. Antibiotic resistance in Latin America: A cause for alarm. **Vaccine**, v. 27, 2009; p. C25–C28, 2009.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proc. of the Natl. Acad. of. Sci. of the USA**, v. 112, n.18, p. 5649–5654, 2015.

VASSILEVSKI, A.; KOZLOV, S.; GRISHIN, E. Molecular diversity of spider venom. **Biochemistry**, v. 74, n. 13, p. 1505-1534. 2009.

ROSMAN, K. J. R.; E TAYLOR P. D. P. Inorganic Chemistry Division, Commission on Atomic Weights and Isotopic Abundances, Subcommittee for Isotopic Abundance Measurements. Isotopic Compositions of the Elements 1997. **Pure Appl. Chem.**, v. 70, p. 217–235, 1998.

VAKILI, B. *et al.* Detection of colistin sensitivity in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Iran. **J. Res. Med. Sci.**, v. 19: S67-70. 2014.

VELKOV, T. *et al.* Pharmacology of Polymyxins: New Insights Into an 'Old' Class of Antibiotics. **Future Microbiol.**, v. 8, n. 6, p. 711-724, 2013.

VERONESE, F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. **Biomaterials**, v. 22, n. 5, p. 405-417, 2001.

VERONESE F. M. editor. **PEGylated protein drugs: basic science and clinical applications**. Holanda: Springer. 2009.

VIEIRA, V. M. M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado da arte no Brasil e políticas de P&D. Innovation for pharmaceuticals and drugs: state of the art in Brazil and R&D policies. **Revista Economia & Gestão**, v. 6, n. 13, p. 60-82, 2008. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2006 mar. 26.

VINE, K. L. *et al.* Improved pharmacokinetic and biodistribution properties of the selective urokinase inhibitor PAI-2 (SerpinB2) by site-specific PEGylation: implications for drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 32, n. 3, p. 1045-1054, 2015.

VOGLER, K.; STUDER, R. O. The chemistry of the polymyxin antibiotics. **Experientia**, v. XXII, fasc. 6, p. 345–354, 1966.

VOURLI, S. *et al.* Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 72, p. 2528–2530. 2017.

WIELAND, T.; BODANSZKY, M. Introduction. Amino Acids and a Few Early Paradigmatic Peptides. **The World of Peptides: a Brief History of Peptide Chemistry**, Berlin: Springer-Verlag, 1991, p. 5-14.

WILSON, K.; WALKER, J. Mass Spectrometric Techniques. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, New York: Cambridge University Press, 2010, 7ed. p. 352.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature news**, v. 543, n. 15, 2017.

WONG, M. H. Y.; CHAN, E. W. C.; CHEN, S. Evolution and Dissemination of OqxAB-Like Efflux Pumps, an Emerging Quinolone Resistance Determinant among Members of Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3290–3297, 2015.

WIRTZ, V. J.; DRESER, A.; GONZALES, R. Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 27, n. 3, 2010. p. 219–25.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva, 2017. (Global PPL).

WOLCOTT, R. D. *et al.* Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time dependent therapeutic window. **J. Wound Care**, v. 19, n. 8 p. 320–328, 2010.

YUN, Y. *et al.* Intravenous polymyxins: Revival with puzzle. **Biosci. Trends**, v. 11, n. 4: p. 370–382, 2017.

ZGURSKAYA, H. I.; LOPEZ, C. A., GNANAKARAN S. Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. **ACS Infect. Dis.**, v. 1, n. 11, p.

ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial Peptides. **Cur. Biol.**, v. 26, p. R14-R19, 2016.

ZILBERBERG, M. D. *et al.* Secular trends in *Acinetobacter baumannii* resistance in respiratory and blood stream specimens in the United States, 2003 to 2012: A survey study. **J. Hosp. Med.**, v. 11, n. 1, p. 21–26, 2016.

10 ANEXOS

10.1 CEUA – TOXICIDADE AGUDA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade de peptídeos antimicrobianos no tratamento de infecções pulmonares", protocolo do CEUA: 116/2019 sob a responsabilidade de Flavio Almeida Amaral que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 10/06/2019.

Vigência da Autorização	10/06/2019 a 09/06/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	42
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	25
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	70
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	25
Peso/Idade	22g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG

Considerações posteriores:

10/06/2019	Aprovado na reunião do dia 10/06/2019. Validade: 10/06/2019 à 09/06/2024
------------	--------------------------------------------------------------------------

Belo Horizonte, 19/06/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

10.2 CEUA – MODELO PNEUMONIA *Acinetobacter baumannii*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 367/2019**Título do projeto:** Biodistribuição e avaliação da atividade de peptídeos contra pneumonia induzida por *Acinetobacter baumannii***Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Simone Odilia Antunes Fernandes**Unidade:** Faculdade de Farmácia**Departamento:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 16/03/2020. Validade: 16/03/2020 à 15/03/2025.

Belo Horizonte, 16/03/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpg.ufmg.br

10.3 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO – SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A8A5768

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A8A5768
 Usuário: Universidade Federal de Minas Gerais
 CPF/CNPJ: 17.217.985/0001-04
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
 Finalidade do Acesso: Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Lycosa erythrognatha

Título da Atividade: LyeTxI-b, um peptídeo sintético derivado do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*, mostra atividade antibiótica potente in vitro e in vivo

Equipe

Maria Elena de Lima Perez Garcia	Universidade Federal de Minas Gerais
Pablo Victor Mendes dos Reis	Universidade Federal de Minas Gerais
Daiane Boff	Universidade Federal de Minas Gerais
Jarbas Magalhães Resende	Universidade Federal de Minas Gerais
Adriano Monteiro de Castro Pimenta	Universidade Federal de Minas Gerais
Flávio Almeida Amaral	Universidade Federal de Minas Gerais
Daniel Moreira dos Santos	Fundação Ezequiel Dias
Maria Esperanza Cortes Segura	Universidade Federal de Minas Gerais



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AD9C926

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AD9C926**
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Lycosa erythrognatha

Título da Atividade: **COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA COM ATIVIDADE CONTRA PNEUMONIA BACTERIANA E USO**

Equipe

Simone Odília Antunes Fernandes	Universidade Federal de Minas Gerais
Júlio César Moreira de Brito	Fundação Ezequiel Dias
Maria Elena de Lima Perez Garcia	Santa Casa-Belo Horizonte: Instituto de Ensino e Pesqui:
William Gustavo Lima	Universidade Federal de Minas Gerais
Flavio Almeida Amaral	Universidade Federal de Minas Gerais
Adriano Monteiro de Castro Pimenta	Universidade Federal de Minas Gerais
Joaquim Teixeira de Avelar Júnior	Universidade Federal de Minas Gerais
Valbert Nascimento Cardoso	Universidade Federal de Minas Gerais
Elaine Maria de Souza Fagundes	Universidade Federal de Minas Gerais
Daiane Boff	Universidade Federal de Minas Gerais
Natália Rocha Guimarães	Universidade Federal de Minas Gerais
Paula Prazeres Magalhães	Universidade Federal de Minas Gerais
Luiz de Macêdo Farias	Universidade Federal de Minas Gerais

Parceiras Nacionais

17.209.891/0001-93 / Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte
17.503.475/0001-01 / Fundação Ezequiel Dias

Data do Cadastro: **29/07/2020 14:47:57**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:48** de **29/07/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - SISGEN

APÊNDICE

PATENTE – RESULTANTE DA TESE DE DOUTORADO



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 016848 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 19/08/2020 às 00:17, Petição 870200103868