



Sara Carolina Cortez Pedro

# PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS: UMA NOVA CLASSE DE ANTIBIÓTICOS?

Monografia realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sara Carolina Cortez Pedro

# Péptidos Antimicrobianos: Uma Nova Classe de Antibióticos?

Monografia realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sara Carolina Cortez Pedro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010699, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacêutico. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 3 de julho de 2014

---

(Sara Carolina Cortez Pedro)

# **Péptidos Antimicrobianos: Uma Nova Classe de Antibióticos?**

Julho 2014

**Professora orientadora**

---

(Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva)

**Aluna**

---

(Sara Carolina Cortez Pedro)

## **Agradecimentos**

*É com muito agrado que agradeço à Professora Gabriela Silva pela orientação na escolha e desenvolvimento do tema desta monografia e pela disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas. Agradeço a forma como lecionou a unidade curricular de bacteriologia, que me despertou o interesse pela área. Por toda o acompanhamento e ajuda, obrigada!*

*Um muito obrigado a todos os meus amigos, pelo apoio nos momentos mais difíceis e pelo percurso que traçámos juntos!*

*Por fim, um agradecimento muito especial à minha família, que com esforço me trouxe até aqui e porque sem eles este caminho não seria possível. Por tudo, muito obrigada!*

## Índice

Resumo/Abstract .....	3
1. Resistência bacteriana aos antibióticos: um problema de saúde pública .....	4
1.1. Identificação do problema e suas consequências.....	5
1.2. Causas e origem da resistência.....	7
1.3. Estratégias para combater a resistência bacteriana.....	9
2. Péptidos antimicrobianos.....	9
2.1. Estrutura e propriedades .....	10
2.2. Mecanismo de ação .....	11
2.3. Alvos intracelulares .....	14
2.4. Ação antibacteriana e potencial terapêutico .....	17
2.5. Ensaios clínicos e aplicações futuras .....	18
2.6. Desvantagens dos péptidos antimicrobianos e mecanismo de resistência bacteriana ...	22
3. Conclusão: péptidos antimicrobianos como uma nova classe terapêutica no combate a infecções bacterianas? .....	23
Bibliografia .....	24

## Lista de abreviaturas

- AMP – Péptido antimicrobiano  
ATP – Adenosina trifosfato  
Bac5 – Bactenecina 5  
Bac7 – Bactenecina 7  
CAMA – Cecropina (1-7)-melitina A (2-9) amido  
CDC – Center for Disease Control and Prevention  
ESBL –  $\beta$ -lactamases de espectro alargado  
FDA – Food and Drug Administration  
INF- $\gamma$  – Interferão  $\gamma$   
Lcn972 – Classe II das bacteriocinas  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MBC – Concentração mínima bactericida  
McC – Microcina C  
MDR-TB – Bacilo da tuberculose multi-resistente  
MIC – Concentração mínima inibitória  
MRSA – *Staphylococcus aureus* metilina resistente  
MX-226 - Omiganano penta-hidratado a 1% em gel  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PG – Polietilenoglicol  
ROS – Espécies reativas de oxigénio  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
VRE – *Enterococcus vancomicina* resistentes

## Resumo

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um problema de saúde pública. Assiste-se todos os dias ao aumento de bactérias resistentes e, para além disso, há espécies bacterianas que desenvolveram multi-resistência e não são suscetíveis a praticamente nenhum dos antibióticos disponíveis. Por este motivo, é premente a necessidade de novos compostos terapêuticos com atividade antibacteriana, para tratamento de infeções causadas por bactérias resistentes.

Os péptidos antimicrobianos (AMPs) são pequenos péptidos catiónicos naturais, produzidos por vários organismos e com atividade antimicrobiana. O seu mecanismo de ação consiste, genericamente, num aumento da permeabilidade da membrana celular, tendo como vantagem não precisarem de recetores à superfície da célula. Os AMPs têm ainda outros alvos celulares e, devido a esta multiplicidade de ações, é menos provável que as bactérias desenvolvam resistência a estas moléculas. Porém, vários mecanismos de resistência têm sido descritos. Não há dúvidas que os AMPs têm demonstrado alguma eficácia no combate a infeções bacterianas, no entanto, muita investigação ainda tem de ser feita para descobrir qual o melhor *design* para estes péptidos, de modo a que exerçam a sua atividade bactericida, sem causarem efeitos tóxicos no organismo.

## Abstract

Bacterial resistance to antibiotics is currently a public health problem. Every day, we can assist to the increase of resistant bacteria and moreover there are bacterial species that developed multidrug resistance and they aren't susceptible to any antibiotic that we are ready to use. For this reason, it is important and necessary new drugs with bacterial activity to treat infections caused by resistant bacteria.

The antimicrobial peptides (AMPs) are small, cationic and natural peptides produced by various organisms and they have antimicrobial activity. Its mechanism of action consists in an increase in cell membrane permeability and it doesn't need receptors in the surface cell to interact with bacteria, which is an advantage. The AMPs have other cellular targets and because of this multiplicity of actions, it is less likely that bacteria develop resistance to these molecules, but several mechanisms of resistance have been described. There is no doubt that AMPs have shown some effectiveness in fighting bacterial infections, however much research is necessary to find what are the best design for these peptides, in order to they have bactericidal activity without causing toxic effects in the human body.



## I. Resistência bacteriana aos antibióticos: um problema de saúde pública

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização em terapia anti-infecciosa constituiu um progresso inquestionável da medicina do século XX. No entanto, a sua eficácia foi rapidamente superada pela capacidade que as bactérias têm de se oporem à sua acção, isto é, de adquirirem resistência aos antibióticos. As bactérias adquirem resistência quer modificando o seu genoma por mutação, quer incorporando genes provenientes de outros microrganismos, por diferentes sistemas de transferência genética. [1]

Considera-se que uma bactéria é resistente a um antibiótico quando este perde a capacidade de controlar o crescimento bacteriano ou induzir a sua morte, continuando a bactéria a multiplicar-se na presença de níveis terapêuticos do agente antibacteriano. [1] Quando uma bactéria se torna resistente a pelo menos um antibiótico de três ou mais classes diferentes, é designada por multi-resistente. [2]

As bactérias podem exibir diferentes estratégias de resistência, como pode ser visto na figura I. Podem atuar: através da degradação enzimática do antibiótico; por alteração do local-alvo do antibiótico, o que impede a sua ligação; através de bombas de efluxo, um mecanismo de transporte que eflui o antibiótico novamente para fora da bactéria; por redução da permeabilidade da membrana externa, no caso de bactérias Gram-negativo; e por alteração da via metabólica. [3]

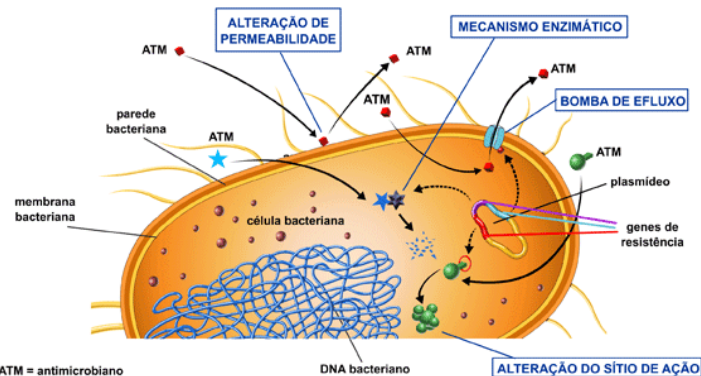


Figura I. Mecanismos de resistência bacteriana.

Adaptado de Agência Nacional de Vigilância Sanitária [4]

Para a indústria farmacêutica a produção de antibióticos deixou de ser vantajosa e preferem focar-se na produção de fármacos *blockbuster*. É mais rentável para a indústria a produção de fármacos usados no tratamento de doenças crónicas, em detrimento do desenvolvimento de novos antibióticos, usados num curto espaço de tempo em doenças infecciosas agudas. [3]

### 1.1. Identificação do problema e suas consequências

A resistência aos antibióticos é hoje uma realidade em todo o mundo e constitui um problema sério no tratamento das doenças infecciosas. Infecções causadas por bactérias resistentes não respondem ao tratamento convencional, resultam em doença prolongada e grande risco de morte e aumentam os custos de saúde. [5]

Segundo o Center for Disease Control and Prevention (CDC) a resistência aos antibióticos causa anualmente mais de 2 milhões de doenças e 23.000 mortes só nos Estados Unidos da América. Assim, muitas infecções bacterianas correm o risco de se tornarem incuráveis e incontroláveis, levando-nos de novo para uma era “pré-antibiótica”. [6]

A resistência aos antibióticos é, então, um problema grave para a saúde humana, havendo atualmente várias estirpes de bactérias resistentes a determinados grupos de antibióticos. Por exemplo, o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é a produção de  $\beta$ -lactamases, adquiridas sobretudo por bactérias Gram-negativo. Vários estudos relacionam o desenvolvimento da resistência ao uso de antibióticos em infecções causadas por estas bactérias e, neste caso, a resistência ocorre sobretudo por transferência genética horizontal. [7] A família *Enterobacteriaceae* inativa esta classe de antibióticos pela quebra da ligação azoto-carbono no anel  $\beta$ -lactâmico (figura 2) e produz  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL), que as torna resistentes à maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. [8] A prevalência de ESBL produzidas por esta família de bactérias tem aumentado globalmente, sendo problemáticas as infecções causadas por *Escherishia coli* produtora de ESBL. [9] Inicialmente, os carbapenemos, tais como o imipenemo e o meropenemo, mostraram ter atividade contra os microrganismos produtores de ESBL, no entanto, rapidamente surgiram *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases, isto é, enzimas que hidrolisam praticamente todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenemos. [8]

O mesmo tem acontecido com *Streptococcus pneumoniae* que se tornou penicilina-resistente. [7]

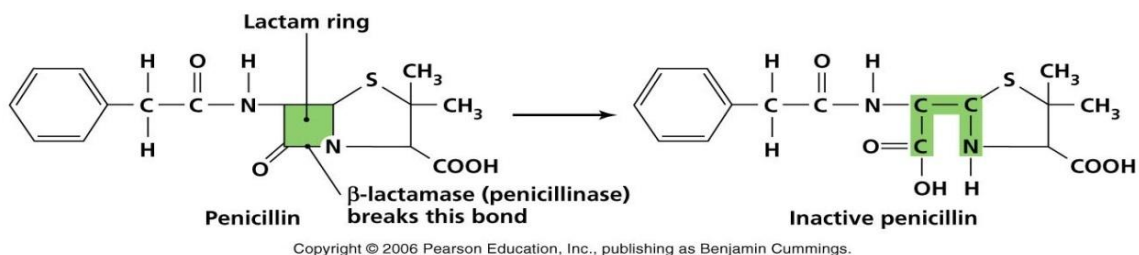


Figura 2. Mecanismo de inativação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pelas enzimas  $\beta$ -lactamases.

Adaptado de Pearson Education [13]

Há várias espécies de bactérias que são importantes em termos de multi-resistência em infeções nosocomiais, sendo consideradas problemáticas *E. coli* produtora de ESBL e *Enterococcus spp.* vancomicina resistente (VRE). [8] O aumento da ocorrência de infeções nosocomiais causadas por *Enterococcus spp.*, em especial *E. faecium* deve-se à variedade de resistências adquiridas e/ou intrínsecas à vancomicina e aos aminoglicosídeos. Estas bactérias têm uma grande capacidade de adquirir e transferir elementos que conferem resistência aos antibióticos e são também conhecidas resistências intrínsecas, pelo que as terapêuticas alternativas para infeções causadas por *Enterococcus* são muito limitadas. [8]

Uma elevada percentagem de infeções adquiridas a nível hospitalar são causadas por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), detetado pela primeira vez num hospital britânico em 1961. [5, 9] MRSA é resistente a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e frequentemente a outras classes de antibióticos. O perigo de infeções por MRSA resulta não só da emergência de multi-resistência, mas também da capacidade da bactéria produzir biofilmes e numerosos fatores de virulência, que lhe permitem infetar quase todos os tecidos e órgãos do corpo humano. [10]

Em 2011 estimaram-se cerca de 630 mil casos de tuberculose causada pelo bacilo da tuberculose multi-resistente (MDR-TB), cuja resistência ocorre por mutação espontânea. Em 2013 novos casos de resistência surgiram e a sua percentagem mundial pode ser observada na figura 3. Deste modo, o tratamento de primeira linha com isoniazida e rifampicina não tem efeito sobre o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e são requeridas, cada vez mais, terapêuticas com associação de vários antibióticos. [7]

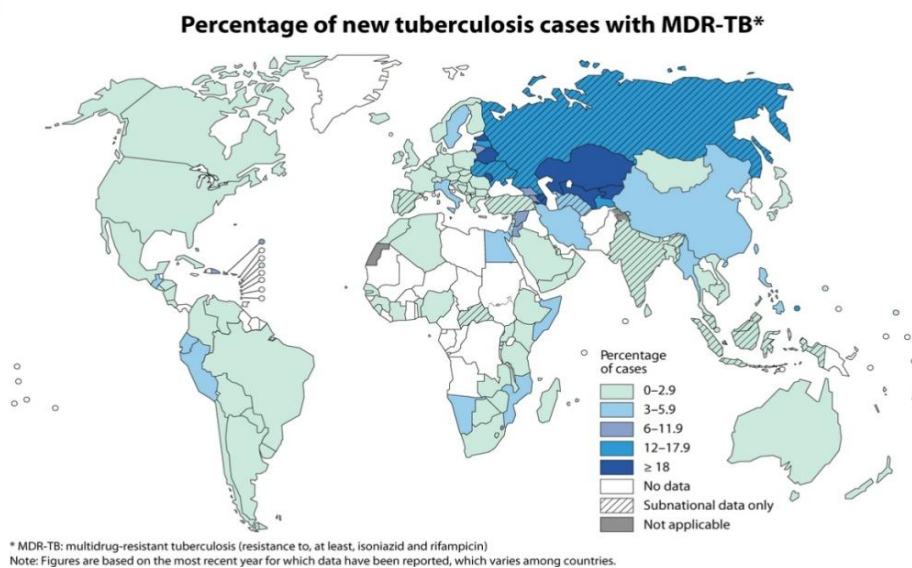


Figura 3. Percentagem de novos casos de tuberculose MDR em 2013.

Adaptado de OMS [5]

Assim, a resistência aos fármacos antibacterianos terá repercussões muito negativas na saúde humana, uma vez que, atualmente, se assiste a um aumento de bactérias resistentes e de antibióticos a que se tornam resistentes. Contrariamente, o desenvolvimento e produção de novas moléculas anti-infecciosas tem vindo a diminuir, o que fará com que haja, futuramente, falta de terapêuticas alternativas.

## **1.2. Causas e origem da resistência**

A principal razão da resistência aos antibióticos é o seu uso intensivo, muitas vezes excessivo e incorreto. O recurso à antibioterapia é um hábito muito comum, do qual temos de tomar consciência, uma vez que muitas vezes são cedidos sem prescrição médica e, frequentemente, os doentes tomam antibióticos desnecessariamente, nomeadamente para tratamento de doenças virais. Como sabemos, os antibióticos não destroem os vírus, por isso quando usados em gripes, amigdalites virais, e outras doenças causadas por estes microrganismos, não curam a doença e podem ainda aumentar a sua gravidade. O perigo da utilização excessiva dos antibióticos deve-se também à sua utilização na indústria alimentar, criação de gado, aquacultura e à deposição de resíduos no meio ambiente. [1]

As bactérias usam mecanismos diferentes para se adaptar a diversos meios, entre os quais mutações cromossómicas e transferência horizontal de genes. Deste modo, se uma bactéria adquire um gene com capacidade de conferir resistência a determinado antibiótico, pode transmiti-lo a novas gerações por transferência genética e, assim, disseminar os genes de resistência. [3]

Uma mutação é um erro na síntese de DNA durante a replicação e/ou na reparação do DNA e podem ser espontâneas ou induzidas. Um exemplo de uma resistência atual causada por mutações sucessivas é o bacilo da tuberculose. As mutações espontâneas ocorrem na sequência de DNA, são herdadas pelas células filhas e, normalmente, ocorrem substituições de bases, a mais comum, ou remoção ou adição de nucleóticos. As primeiras resultam de erros de incorporação das bases de DNA, resultando numa proteína diferente. A remoção ou adição de nucleótidos altera a leitura da cadeia de mRNA, resultando, normalmente, em proteínas não funcionais, pois a seguir ao nucleótido adicionado ou removido, todos os aminoácidos seguintes são afetados. [11] As mutações podem ser transferidas de uma bactéria para outra através de divisão binária. É desta forma que a bactéria desenvolve resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, às quinolonas e aos macrólidos. A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos por  $\beta$ -lactamases ocorre por mutações aleatórias dos genes que codificam estas enzimas; aos macrólidos pode ocorrer pela modificação do RNA da bactéria

ou das proteínas da subunidade 50S do ribossoma; e quanto às fluoroquinolonas, são necessárias duas mutações para que ocorra resistência, tendo-se verificado ultimamente um aumento da prevalência de mutações nos genes da proteína girase. [7]

Em estudos epidemiológicos sobre a resistência aos antibióticos, há normalmente um maior foco nos organismos resistentes do que nos genes de resistência, no entanto, a bactéria tem capacidade de transferir esses genes. [8]

A disseminação dos genes de resistência pode ocorrer por mecanismos de transferência horizontal de genes: conjugação, transdução ou transformação (Figura 4). Para além disso, a bactéria pode adquirir resistência através de elementos genéticos móveis, plasmídeos, integrões e transposões. A transmissão mediada por plasmídeos, conjugação, é o mecanismo mais comum de transferência genética horizontal, associado à resistência aos antibióticos. [7, 8]

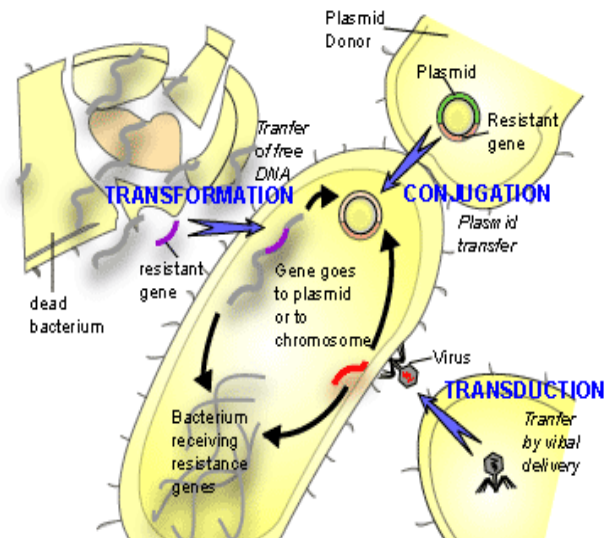


Figura 4. Mecanismo de transferência horizontal de genes.

Adaptado de Todar's Online Textbook of Bacteriology. [12]

Um plasmídeo é um segmento extracromossomal de DNA com mecanismos de autoreplicação e com capacidade de transportar genes com vantagens de sobrevivência à bactéria, tais como os genes de resistência. A conjugação requer o contacto íntimo entre duas bactérias, para que o plasmídeo, depois de se autoreplicar, seja transferido para a bactéria recetora. [11]

Assim, a origem da resistência é genética, mas as causas da sua disseminação são, sem dúvida, de origem antropogénica. A toma desnecessária de antibióticos em infeções que nem são de origem bacteriana, tem levado a uma disseminação muito rápida de bactérias resistentes. Além disso, o seu despejo indevido na natureza seleciona reservatórios de genes de resistência, potencialmente prejudiciais à saúde. Também o uso de antibióticos em animais que se destinam ao consumo humano, quer em terapia e profilaxia, quer como promotores do crescimento animal, tem aumentado o número e diversidade de bactérias resistentes que se transmitem através da cadeia alimentar. [8]

### 1.3. Estratégias para combater a resistência bacteriana

O número limitado de classes de antibióticos e a ocorrência de resistência cruzada entre as classes, tem reforçado a urgente necessidade da promoção do uso racional de antibióticos e da descoberta de novos compostos com o mesmo efeito terapêutico.

A produção de novos antibióticos é, nos dias de hoje, muito cara para as indústrias farmacêuticas, desde a sua descoberta e ensaios pré-clínicos até à sua inserção no mercado. Por isso, a investigação tem sido mais no sentido de entender o mecanismo de resistência da bactéria e alterar a estrutura da molécula para aumentar o seu espectro antibacteriano, do que no sentido de produzir novos compostos. [3]

No entanto, considerando a rápida evolução de bactérias patogénicas, é necessário o desenvolvimento de novos agentes que controlem as bactérias multi-resistentes, caso contrário, estas bactérias provocarão infeções que podem mesmo levar à morte. Idealmente, deverá ser um novo composto com um amplo espectro de ação e de baixo custo. Os péptidos antimicrobianos (AMPs) têm sido apontados como uma importante alternativa para os antibióticos. [17]

Os AMPs são moléculas produzidas por uma série de organismos que têm mostrado alguma eficácia contra bactérias multi-resistentes e baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana, talvez devido ao seu mecanismo de ação ser diferente dos mecanismos habituais dos antibióticos. [3] Deste modo, apresentam-se como moléculas promissoras e que podem constituir futuramente uma boa alternativa aos antibióticos que se mostrarem insuficientes.

## 2. Péptidos antimicrobianos

Os AMPs são pequenas moléculas peptídicas compostas por 10-50 resíduos de aminoácidos, com atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antivírica. [14] São um importante componente do sistema imunitário, desempenhando um papel fundamental na resposta imune inata não específica, o que confere resistência contra infeções sem exposição primária ao patógeno. [15]

Quanto à sua origem, os AMPs podem ser isolados de praticamente todos os organismos vivos, incluindo bactérias, insetos, plantas e animais vertebrados. São, normalmente, classificados em quatro grupos de acordo com a sua origem: a partir de insetos, a partir de outros animais, obtidos através de síntese e a partir de microrganismos geneticamente modificados. Os AMPs produzidos por insetos são sintetizados no *fat body* e depois secretados na hemolinfa, enquanto noutros animais, como anfíbios e mamíferos, os



genes que codificam os AMPs são expressos em diferentes tipos de tecidos e células. Nos animais vertebrados estes péptidos parecem ser sintetizados por neutrófilos circulantes ou mastócitos. [18]

Devido às suas propriedades antimicrobianas naturais, rapidez de ação e baixa propensão para o desenvolvimento de resistência, são candidatos ideais ao desenvolvimento clínico de novas alternativas aos antibióticos. [15] O seu potencial antibacteriano deve-se também ao efeito sinérgico com os antibióticos convencionais e ao facto de serem ativos em modelos animais. [16]

Os AMPs têm algumas desvantagens que os tornam questionáveis quanto à sua utilização no ser humano, por exemplo a sua degradação por ação das proteases e a sua ação tóxica no organismo, sobretudo ao nível dos eritrócitos. Contudo, vários estudos têm sido feitos no sentido de melhorar a sua estabilidade às proteases e o seu perfil farmacocinético e terapêutico, melhorando, assim, as propriedades *fármaco-like* dos AMPs. [17]

Existem, atualmente, 2410 AMPs reportados na base de dados “*The Antimicrobial Peptide Database*” (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). [16]

## 2.1. Estrutura e propriedades

Os AMPs têm geralmente menos de 50 aminoácidos, carga positiva, conferida pelos aminoácidos lisina e arginina e contém 50% de aminoácidos hidrofóbicos. [15] Consoante a sua composição em aminoácidos, tamanho e conformação são classificados em diferentes grupos, sendo que o maior corresponde aos péptidos catiónicos. [14]

Este grupo é dividido em três classes de acordo com a estrutura secundária dos péptidos:  $\alpha$ -*helical* e  $\beta$ -*sheet*.

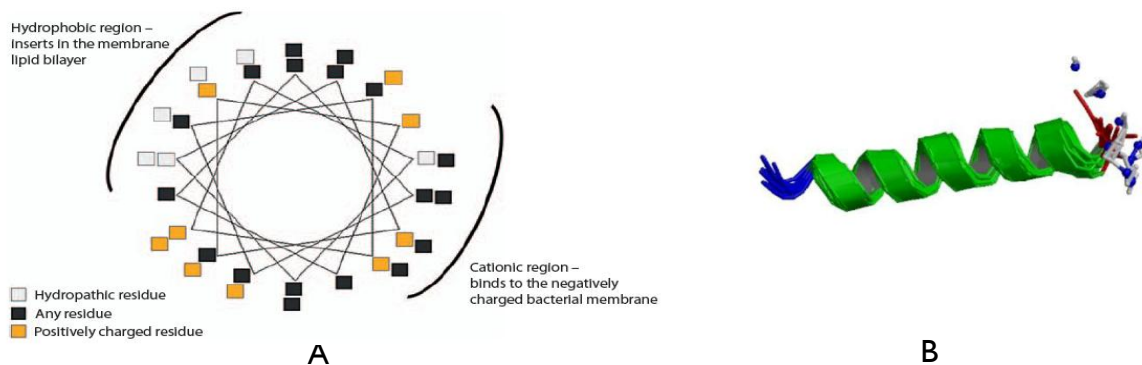


Figura 5 – A: Esquema de um AMP catiónico em  $\alpha$ -*helical*.

Adaptado de *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2011 [15]

B: Estrutura secundária de AMP em  $\alpha$ -*helical*.

Adaptado de *PLOS Pathogens* [19]

A primeira é composta por péptidos catiónicos lineares  $\alpha$ -*helical*, tais como o magainina (AMP produzido por anfíbios) e o grupo dos péptidos cecropinas (produzidos por insetos), que são lineares antes da interação com a membrana celular das bactérias e depois de com ela interagirem, adotam uma estrutura secundária anfipática  $\alpha$ -*helical*, observada na figura 5. A segunda classe compreende os péptidos catiónicos enriquecidos com aminoácidos específicos: prolina e arginina. Estes péptidos são lineares, embora alguns possam exibir estruturas em espiral. Por último, dentro dos péptidos catiónicos ainda encontramos os que contêm resíduos de cisteína e formam pontes dissulfureto e  $\beta$ -*sheets* estáveis (figura 6). Por exemplo as defensinas têm seis resíduos de cisteína, que são divididos de acordo com o alinhamento das suas pontes dissulfureto. [14]

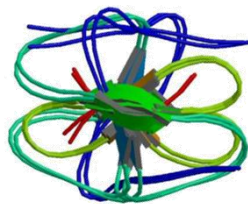


Figura 6. Estrutura secundária de AMP em  $\beta$ -*sheet*.  
Adaptado de PLOS Pathogens [19]

Apesar da sua estrutura secundária ser diferente, todos têm em comum a estrutura tri-dimensional, que enrola em moléculas anfílicas com carga e regiões hidrofóbicas segregadas a partir dos aminoácidos hidrofílicos. Esta organização permite uma interação forte entre a carga positiva dos péptidos e a carga negativa da membrana bacteriana, enquanto os grupos hidrofóbicos facilitam a penetração do péptido na camada lipídica. [15]

Existem também outros grupos de péptidos não-catiónicos, entre os quais, péptidos aniónicos e péptidos aromáticos, os quais revelam fraca atividade antibacteriana, apesar de poderem potenciar a atividade dos AMPs catiónicos. [14]

Para além da carga do AMP, diversos estudos mostraram que outras características, como o tamanho, sequência primária, conformação, estrutura, hidrofobicidade e anfipaticidade podem ser cruciais para a atividade antimicrobiana e mecanismo de ação. [14]

Os AMPs têm propriedades multifuncionais que os tornam potenciais agentes terapêuticos. Exibem rápida acção bactericida, dentro de minutos *in vitro*, e têm um amplo espetro de ação tanto em bactérias Gram-negativo como bactérias Gram-positivo, para além de parasitas, fungos e vírus envelopados. [18]

## 2.2. Mecanismo de ação

A principal vantagem dos AMPs reside no mecanismo global da sua ação, que é notavelmente diferente dos antibióticos convencionais. [18]



O mecanismo clássico dos AMPs envolve a sua capacidade de causar danos na membrana celular, podendo destruí-la e resultando em lise celular, ou então interagir com a membrana, formando poros transitórios que transportam os péptidos para o interior da célula. [18] Assim, os AMPs interagem com a membrana externa dos microrganismos Gram-negativos e com a parede celular das bactérias Gram-positivo por interação eletrostática, entre a carga positiva dos seus aminoácidos e a carga negativa exposta à superfície da célula bacteriana. A membrana celular das bactérias é essencialmente composta por lípidos de carga negativa, tais como o fosfatidilglicerol (PG), a cardiolipina e a fosfatidiletanolamina. [14] Para além destes constituintes, as bactérias Gram-negativo contém lipopolissacarídeos (LPS) na sua membrana externa e a parede celular das bactérias Gram-positivo é enriquecida em ácidos lipoteicóicos. Apesar das bactérias terem uma parede celular distinta, como se vê na figura 7, ambas têm moléculas que lhes conferem carga negativa à superfície, sendo o alvo dos AMPs catiónicos. [14]

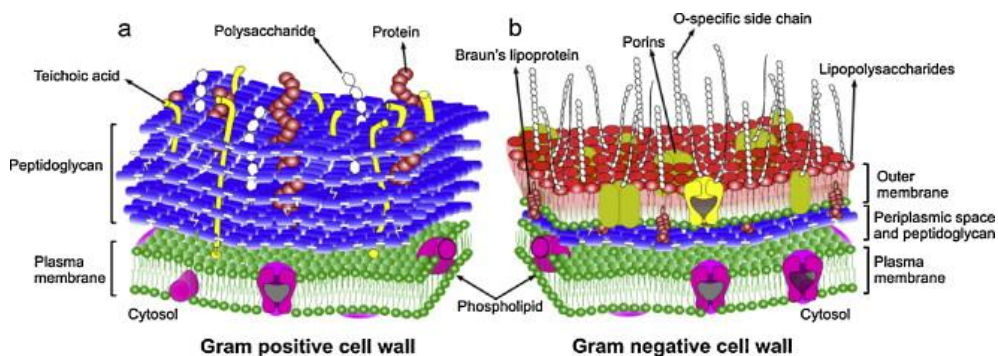


Figura 7. Diferenças da parede celular de bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. Adaptado de MicrobeWiki [20]

A interação e ação dos AMPs com os seus alvos celulares dependem da superfície da célula e da composição em aminoácidos de cada péptido. Além disso, a estrutura secundária adotada pelo péptido é essencial para a ligação com os compostos de carga negativa da membrana. Consoante a afinidade entre péptido e lípidos, os AMPs podem penetrar a bicamada lipídica perpendicularmente, levando à formação de poros transmembranares. Porém este mecanismo não é comum a todos os AMPs. [14]

Normalmente, após a ligação à membrana do patógeno, ocorre permeabilização e consequente disfunção da membrana celular, o que pode, eventualmente, causar morte celular. Em contraste com os antibióticos convencionais, os AMPs interagem com a membrana celular sem serem necessários recetores específicos, o que é uma vantagem por contornar o problema da resistência resultante de mutações bacterianas. [16]

Vários modelos têm sido propostos para explicar a disfunção membranar causada pelos AMPs, entre os quais o “barrel-stave model”, “toroidal model”, “carpet model” e “aggregate channel model”, sendo cada um exemplificado na figura 8. [14]

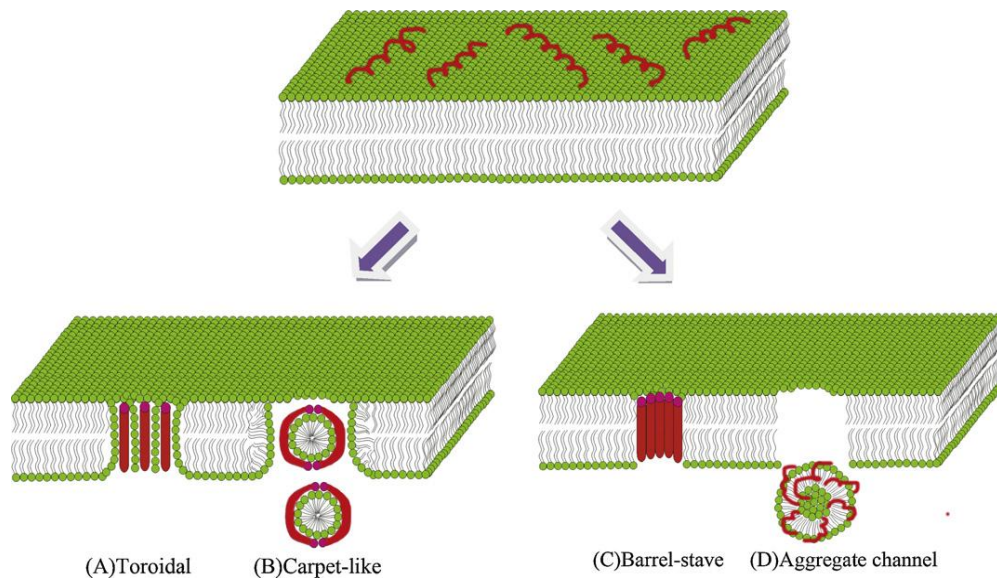


Figura 8. Modelos de mecanismo de ação dos AMPs  
Adaptado de Li, Yanmei *et. al*, (2012) [18]

No *toroidal model* os AMPs são reorientados na bicamada da membrana e inseridos perpendicularmente formando um poro; as regiões hidrofílicas do poro mantêm a sua associação com as cabeças dos fosfolípidos e as regiões hidrofóbicas associam-se com o núcleo hidrofóbico da membrana lipídica. Por fim, os péptidos enrolam para o interior, formando um estado “multiporo” que causa danos irreversíveis por rompimento da membrana. [16] Exemplos de AMPs que utilizam este modelo como mecanismo de ação são as megaininas e aureinas (produzidos ambos por anfíbios) e melitina (extraída do veneno da abelha). [14]

De acordo com o *carpet model*, os AMPs associam-se à membrana da bactéria e alinham-se paralelamente à bicamada lipídica, cobrindo toda a superfície da membrana e atuando como detergente. [16] Esta interação é inicialmente eletrostática e, quando se atinge o limiar de concentração de AMPs, a membrana desintegra-se e há formação de micelas, levando a lise celular e, por isso, morte celular. [14] Este modelo é o mecanismo de ação mais comum dos AMPs para destruírem as bactérias Gram-negativo e os parasitas. Inicialmente, resulta num enfraquecimento da membrana, seguidamente, esta alteração promove a formação de poros e ocorre transporte de lípidos do exterior da célula para o seu interior, provocando o colapso da membrana dentro de pequenas vesículas revestidas por AMPs. [18]

O *barrel-stave model* sugere que os AMPs formam poros transmembranares através da sua inserção direta nos lípidos da membrana; conjuntos de hélices anfipáticas ligam-se à membrana como um monómero, seguindo-se a sua oligomerização e formação do poro com os resíduos hidrofílicos a formar o seu lúmen. [14] Esta organização leva à formação de um canal aquoso, seguindo-se perda de polarização, esvaziamento do conteúdo citoplasmático e disfunção membranar, por redistribuição lipídica ou ativação das hidrolases que destroem a parede celular. [18] O recrutamento de mais monómeros pode aumentar o tamanho do poro e aumentar a rapidez de ação dos AMPs. [14]

No *aggregate channel model*, depois de se ligarem às cabeças dos fosfolípidos, os AMPs inserem-se na membrana e formam um aglomerado destruturado que a abrange por completo. [16] Os agregados de péptidos formam canais que permitem a saída de iões através da membrana, envolvendo o deslocamento competitivo de catiões divalentes,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ . Este deslocamento causa, por sua vez, uma destabilização da membrana e os AMPs ganham acesso ao interior da bactéria. O AMP maculatina, derivado de anfíbios australianos, atua por este mecanismo. [18]

Recentemente, tem sido proposto que os AMPs causam a morte dos microrganismos por outros mecanismos diferentes da destruição da membrana: os AMPs podem interagir com alvos intracelulares que induzem danos celulares, podem ligar-se, por exemplo ao DNA, RNA e proteínas. Um péptido pode atuar em vários alvos celulares, envolvendo vários mecanismos de ação. [14]

### 2.3. Alvos intracelulares

Os AMPs têm desenvolvido mecanismos únicos de translocação até ao citoplasma. Uma vez em contacto com o microrganismo, eles podem alterar a formação da membrana citoplasmática, inibir a síntese da parede bacteriana, inibir os ácidos nucleicos e a síntese proteica ou induzir a morte celular. [18]

#### 2.3.1. Inibição da síntese da parede celular

A parede celular é essencial à bactéria, na medida em que previne a lise celular quando há elevada pressão osmótica no citoplasma e serve de âncora aos componentes da membrana e proteínas extracelulares. Nas bactérias Gram-positivo o maior componente da parede celular é o peptidoglicano, enquanto as bactérias Gram-negativo, como contém uma membrana externa, possuem LPS a envolver uma fina camada de peptidoglicano (figura 7). [14] Uma vez que não se encontra nas células eucarióticas, os compostos que inibem a

síntese de peptidoglicano são interessantes para a terapêutica antibacteriana, sobretudo os que inibem o lípido II, um importante precursor deste composto. O lípido II tem, assim, mostrado ser um atrativo alvo para os compostos antibacterianos, como por exemplo os lantibióticos, também denominados classe I das bacteriocinas. [23] Os lantibióticos são uma família de AMPs sintetizados nos ribossomas bacterianos, com capacidade de inibir a síntese da parede celular por formação de poros transmembranares, que permitem o efluxo de moléculas e/ou iões – ATP, K<sup>+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. [23]

Estudos recentes de Yount e Yeaman, (2013)<sup>[23]</sup> demonstram que a nisina, um AMP utilizado na indústria alimentar, se liga primeiro ao lípido II e de seguida atua na membrana por formação de poros, levando conseqüentemente à perda de aminoácidos, K<sup>+</sup> e ATP pela célula. Sabe-se também que a nisina se liga aos lípidos III e IV, interferindo com a biossíntese dos ácidos teicóico e lipoteicoico, constituintes da parede celular. Tem sido ainda demonstrado em *Staphylococcus simulans* que a nisina estimula a atividade da autolisina N-acetilmuramoyl-L-alanina amidase, o que resulta em danos na parede celular, lise e, então, morte celular. [14]

A mersacidina, outro AMP pertencente à família dos lantibióticos, é efetivo contra MRSA. Este AMP liga-se ao lípido II, apesar do local de ligação ser diferente da nisina; enquanto a nisina se liga ao grupo fosfato, a mersacidina liga-se, provavelmente, aos resíduos de açúcar. Independentemente do local de ligação, ambos inibem a formação do peptidoglicano. [24]

Outro grupo de lantibióticos capaz de inibir a síntese da parede celular é a família dos “two-peptides”, composta por dois péptidos independentes que atuam sinergicamente, de modo a terem uma atividade antimicrobiana ótima. Foi proposto que um dos péptidos se liga ao lípido II enquanto o outro forma poros transmembranares. [23]

Resumindo, uma vez que a parede celular tem um papel fundamental na manutenção da integridade da célula e como não está presente nas células eucarióticas, esta estrutura celular é um excelente alvo para a pesquisa de novos antibióticos. Para além disso, a combinação de mecanismos de ação, na parede celular e na membrana celular, observada em alguns AMPs, pode minimizar o desenvolvimento de bactérias resistentes. [14]

### **2.3.2. Inibição dos ácidos nucleicos e da síntese proteica**

Alguns AMPs conseguem, espontaneamente, atravessar a parede celular e as membranas externa e interna, atuando ao nível de moléculas intracelulares, como os ácidos nucleicos e as proteínas. [25]

A buforina II (produzido por uma espécie de sapos asiáticos) é um AMP catiónico e linear com 21 aminoácidos, capaz de atravessar a membrana sem alterar a sua permeabilidade, acumulando-se no citoplasma. Este péptido é constituído por resíduos de prolina, que têm um papel crítico na penetração do AMP na célula. Uma vez dentro da célula, a buforina II liga-se ao DNA e RNA, como tem sido demonstrado em *E. coli*, exibindo capacidade de neutralizar os efeitos tóxicos das endotoxinas e prevenido, assim, um choque séptico. [25] Esta capacidade de neutralização tem sido também descrita para outros AMPs: temporinas (originárias de anfíbios) e catelicidinas (produzidas sobretudo por neutrófilos de diversos mamíferos). [14]

Outros AMPs atuam por inibição da síntese dos ácidos nucleicos. A indolicidina (extraída dos neutrófilos de bovinos), um péptido catiónico com uma sequência de aminoácidos muito curta, promove a despolarização da membrana bacteriana e inibe a síntese de DNA. A puroindolina (AMP produzido por plantas), rica em resíduos de triptofano, inibe o processo de transcrição. As catelicidinas, entre as quais a PR-39, atravessam rapidamente a célula, sem causar danos na membrana bacteriana e bloqueiam o DNA e a síntese proteica na bactéria. As batenecinas, Bac5 e Bac7 presentes nos neutrófilos de bovinos, atuam por aumento da permeabilidade da membrana e inibição proteica e síntese de RNA em *E.coli* e *Klebsiella pneumoniae*. [14]

Existe ainda a família das microcinas, produzidas por algumas enterobactérias, onde se destacam a microcina C (McC), que inibe a enzima aminoacil-tRNA sintetase, a microcidina B17, que atua na DNA girase com consequente inibição da replicação do DNA e a microcidina J25, que penetra a membrana com o auxílio de proteínas membranares e se liga à RNA polimerase, inibindo o processo de transcrição. [26]

### **2.3.3. Indução da morte celular**

Vários AMPs têm mostrado atividade antitumoral, por exemplo a magainina, péptido catiónico que induz apoptose por aumento dos níveis de ROS e da atividade da caspase-3 em células tumorais obtidas partir de linhas celulares de leucemia promielocítica aguda. [14]

Esta ação terapêutica tem maior interesse para células tumorais e como antifúngico, uma vez que alguns AMPs podem provocar apoptose e necrose em fungos, tais como *Candida albicans*. [27]

## 2.4. Ação antibacteriana e potencial terapêutico

Apesar da potência dos AMPs contra a maioria dos patogêneos ser menor que a dos antibióticos convencionais, quando comparados, os AMPs apresentam outras vantagens. Uma das suas grandes vantagens é a capacidade de causar morte de bactérias multi-resistentes. Para além disso, a rapidez de ação é maior, o mecanismo envolve vários alvos celulares e a probabilidade de desenvolvimento de resistência é menor, como pode ser visto na tabela I. [21]

A comparison of conventional antibiotics with cationic antimicrobial peptides.		
Property	Conventional antibiotics	Cationic antimicrobial peptides
Spectrum of activity	Bacterial infections (often selective)	Bacterial, fungal and viral infections; septicaemia; and/or inflammation
Uptake	Specific mechanisms	Relatively non-specific: based on charge. Self-promoted uptake
Targets	Usually one dominating target or class of targets (e.g. penicillin-binding proteins, topoisomerases, ribosomes)	Relatively less specific (possibly multiple targets in any given cell)
Resistance rate and mechanism	Resistance development at frequencies of $10^{-7}$ to $10^{-10}$ , or after a few passages at sub-MIC. Resistance caused by mechanisms such as reduced uptake or increased efflux, chemical modification or degradation of antibiotic, or altered target	Resistance generally cannot be directly selected. Needs multiple passages on sub-MIC concentrations to induce resistance. Resistance caused by mechanisms such as an impermeable outer membrane or specific proteases (can be overcome by incorporating D-amino acids or backbone alterations)
Additional activities	No	Include anti-endotoxic and/or boosting of innate immunity
Pharmacokinetics	Varies but once per week antimicrobials under development	Short systemic half-life owing to proteolytic degradation
Toxicology	Antibiotics tend to be one of the safest groups of pharmaceuticals	No known topical toxicities; systemic toxicity issues remain undefined
Manufacturing costs	Can be inexpensive (e.g. \$0.8 per gram for aminoglycosides)	Expensive (\$50–400 per gram)

Tabela I. Comparação entre antibióticos convencionais e AMPs catiónicos.

Adaptado de Marr *et. al* - Antibacterial peptides for therapeutic use, 2006 [21]

A maior motivação para a utilização terapêutica dos AMPs é o facto de terem diversas aplicações: podem ser usados como antimicrobianos em monoterapia ou em associação com outros antibióticos, de modo a potenciar o seu efeito, ou ainda como imunomoduladores e/ou como compostos neutralizantes de endotoxinas. [21] Uma vez que a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima bactericida (MBC) são muito próximas, conclui-se que os AMPs têm uma ação bactericida, o que os torna, ainda mais, ótimos candidatos a antibióticos, mostrando *in vitro* excelente atividade antimicrobiana. [21]

Os AMPs catiónicos têm demonstrado boa atividade contra quase todas as bactérias e excelente atividade contra MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente e *Stenotrophomonas maltophilia*. [22]



## 2.5. Ensaios clínicos e aplicações futuras

Apenas um pequeno número de AMPs tem sido estudado e devem ser ainda intensamente investigados em termos da sua estrutura e propriedades biofísicas, pois, hoje em dia, é possível sintetizar péptidos através de métodos de síntese laboratoriais, o que leva a uma redução nos custos de produção deste novo alvo terapêutico. [16]

O ponto de partida para o desenvolvimento deste novo grupo de fármacos é identificar os AMPs naturais, seguindo-se a sua modificação e otimização. Deste modo, um dos AMPs de “primeira geração” foi o pexiganano (MSI-78), um derivado sintético do AMP magainina 2, originária dos anfíbios. Ensaios clínicos de fase III provaram que o pexiganano era eficiente no tratamento de feridas, com baixos valores de toxicidade, no entanto, a Food and Drug Administration (FDA) rejeitou este produto por achar que não oferecia grandes vantagens quando comparado com os tratamentos disponíveis no mercado. [21]

Outro AMP que mostrou eficácia para uso tópico em ensaios clínicos de fase III foi o MX-226 (omiganano penta-hidratado a 1% em gel), um péptido derivado de bovinos, desenvolvido para prevenir a contaminação de catéteres venosos centrais. Num estudo concluído de fase III, MX-226 demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa de 49% de infeções no local do catéter, bem como uma diminuição de 21% da colonização do catéter. [21]

Existem já AMPs aprovados pela FDA como agentes terapêuticos, a polimixina B (ou colistina) e a gramicidina S (ou neomicina), sendo ambos “ingredientes” de cremes e soluções tópicas; a sua utilização encontra-se confinada a uso tópico, pois ambas são tóxicas por via sistémica. [15] Aplicações tópicas de colistina e neomicina no tratamento de infeções causadas por *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são clinicamente seguras e efetivas. Estes AMPs ligam-se a estas bactérias e neutralizam endotoxinas, com baixo desenvolvimento de resistência. Combinações tópicas com neomicina têm sido usadas na prática clínica em cremes adjuvantes da cicatrização, colírios oculares e gotas auriculares. Na tentativa de diminuir a sua toxicidade, desenvolveu-se um pró-fármaco, a colomicina, usado por via sistémica na terapia intravenosa de infeções pulmonares em doentes com fibrose cística. [21]

Em 2003 foi aprovado pela FDA o uso de daptomicina em tratamentos complicados de infeções cutâneas e em estruturas da pele, causadas por *S. aureus* (incluindo MRSA), *S. pyogenes* e *E. faecalis* (apenas suscetível à vancomicina). A daptomicina é um lipopéptido cíclico que também apresenta elevada atividade no tratamento de meningite pneumocócica. [21]

Devido ao potencial interesse dos AMPs como antibacterianos, outros ainda têm sido investigados e alguns encontram-se já na fase III de ensaios clínicos sobretudo para uso tópico, como mostra a tabela 2.

AMP	Estrutura	Origem	Forma farmacêutica	Indicações – Fase do ensaio clínico
<b>Iseganano (IB-367)</b>	Péptido com pontes dissulfureto	Leucócitos de suínos	Solução oral	Tratamento de tumores induzido por mucosite oral – Ensaio clínico em fase III
			Aerossol	Infeções pulmonares em doentes com fibrose cística – Ensaio clínico em fase I
<b>Péptidos MBI (MBI-226)</b>	$\alpha$ -helical	(não declarado)	Creme	Infeções sanguíneas associadas a catéteres – Ensaio clínico em fase III
<b>Variantes de histatina</b>	$\alpha$ -helical	Humanos	Solução oral	Gengivites e infeções da mucosa oral – Ensaio clínico em fase II
				Infeções pulmonares por <i>P. aeruginosa</i> – Ensaio clínico de fase I
<b>Variantes da heliomocina</b>	Péptido com pontes dissulfureto	Insetos: <i>Heliothis virescens</i>	Uso parenteral	Infeções fúngicas em indivíduos imunodeprimidos – Ensaios pré-clínicos
<b>Variantes de defensinas</b>	$\beta$ -sheet	Insetos	(não declarado)	Infeções causadas por bactérias Gram-positivo multi-resistentes – Ensaios pré-clínicos

Tabela 2. Desenvolvimento clínico dos AMPs.

Adaptado de Internacional Journal of Antimicrobial Agents [28]

Uma outra aplicação que deve ser investigada é a utilização dos AMPs em associação com antibióticos, mostrando *in vitro* efeitos sinérgicos ou aditivos contra MRSA e *P. aeruginosa*. Pensa-se que esta combinação tem maior ação terapêutica pois os AMPs aumentam a permeabilidade da membrana, permitindo que os antibióticos entrem na bactéria mais facilmente e porque os AMPs têm demonstrado capacidade de inibir as bombas de efluxo, prevenindo a expulsão do antibiótico do citoplasma. [15]

Os AMPs têm ganho atenção como alternativas antimicrobianas ao uso de conservantes químicos alimentares, no entanto, é a indústria farmacêutica quem os tem mais investigado para serem substitutos de antibióticos. [18] Devido ao seu elevado potencial terapêutico, devem ser melhor estudados para que possam colmatar a drástica situação de resistência bacteriana. Para isso, vários ensaios clínicos têm já sido feitos em situações clínicas mais específicas, apresentando de seguida dois estudos publicados.



**Estudo I. “*In vitro* pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms” [10]**

Um biofilme é uma comunidade microbiana que consiste em células ligadas a superfícies abióticas e que produzem polissacáridos extracelulares; com o crescimento do biofilme as bactérias acumulam-se em aglomerados e são cercadas por uma matriz de polissacáridos. Assim, uma bactéria num biofilme torna-se muito mais resistente aos antibióticos e é uma das causas da persistência das infeções. Não é novidade que os antibióticos não são efetivos na erradicação de biofilmes em concentrações habituais e tal acontece por diversas razões: diminuição da difusão dos antibióticos na matriz extracelular, aumento da atividade das bombas de efluxo, tolerância ao antimicrobiano, entre outros.

Neste ensaio clínico foram investigadas, *in vitro*, as atividades de três AMPs, indolicidina, CAMA e nisina, em monoterapia e em combinação com antibióticos – ciprofloxacina, teicoplanina, daptomicina e azitromicina – em dois biofilmes de MRSA. Foram de seguida determinadas as MIC tanto para os antibióticos como para os AMPs e as concentrações mínimas para erradicar os biofilmes também para os dois grupos em estudo. Quanto à MIC ela foi muito menor para os antibióticos que para os AMPs, ou seja, os antibióticos precisam de uma concentração menor para inibir o desenvolvimento da bactéria; quanto à concentração mínima para erradicar os biofilmes, obtiveram-se valores de 640 mg/L para os AMPs e entre 512 e 5120 mg/L para os antibióticos, o que revela que os AMPs eliminam os biofilmes com maior eficácia quando comparados com alguns antibióticos.

Para contornar o problema de resistência associada a biofilmes, foram testadas combinações de antibióticos com AMPs, uma vez que podem ter efeitos sinérgicos. Este efeito é observado frequentemente em todas as combinações de AMPs com antibióticos, com exceção da azitromicina, em culturas de MRSA. Porém, esta interação sinérgica ocorre mais frequentemente com as seguintes combinações: nisina + daptomicina/ciprofloxacina, indolicidina + teicoplanina e CAMA + ciprofloxacina.

Deste modo, os AMPs são bons candidatos ao tratamento de biofilmes de MRSA, pelas suas propriedades “anti-biofilme” e por ajudarem a prevenir ou atrasar a emergência de resistência quando usados em combinação com os antibióticos.

Os AMPs têm sido apontados como potenciais agentes terapêuticos para prevenir a aderência e formação de biofilmes de microrganismos em doentes imunodeprimidos. [18]

**Estudo 2: “Peptides with antimicrobial and anti-inflammatory activities that have therapeutic potential for treatment of *acne vulgaris*” [29]**

A acne é uma doença dos folículos pilosebáceos, com componentes inflamatórios e bacterianos, associada a *Propionibacterium acnes*. Esta bactéria Gram-positivo é encontrada normalmente na flora cutânea, sobretudo em áreas ricas em glândulas sebáceas, e a colonização bacteriana é precedida por hiperproliferação de queratinócitos e fatores que aumentem a secreção do sebo. *P. acnes* liberta enzimas proteolíticas e lipases que destroem o epitélio folicular e produzem uma resposta inflamatória, com formação de pápulas, pústulas e abscessos subcutâneos.

O uso intensivo de antibióticos no tratamento da acne tem levado à emergência da resistência de *P. acnes* em grande escala, sendo clara a necessidade de novos antimicrobianos e anti-inflamatórios a que a bactéria ainda não tenha sido exposta. Assim, os AMPs catiónicos com conformação anfipática  $\alpha$ -*helical* provenientes da pele de anfíbios têm sido apontados como interessantes e potenciais agentes terapêuticos. O maior obstáculo para o seu uso terapêutico é o facto de, quando administrado sistemicamente, serem citotóxicos, sobretudo a nível dos eritrócitos. No entanto, têm sido desenvolvidos AMPs sintéticos análogos aos que são extraídos da pele dos anfíbios, com igual potência contra microrganismos patogénicos, mas com menor atividade hemolítica. No caso da acne, o mecanismo de ação destes AMPs parece ser, para além de inibição da proliferação bacteriana, inibição da libertação de citocinas pró-inflamatórias e estimulação da libertação de citocinas anti-inflamatórias. Os análogos peptídicos utilizados neste estudo foram [D4k]ascaphin-8, [G4K]XT-7 e [T5k]temporin-DRa.

Todos os péptidos demonstraram ter atividade bactericida, e não bacteriostática, e todos revelaram um enorme potencial para o desenvolvimento de agentes tópicos no tratamento de *acne vulgaris*. [D4k]ascaphin-8 foi o péptido com maior capacidade de inibir o crescimento dos isolados de *P. acnes* e foi também o mais efetivo a inibir a libertação de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Tal como todos os fármacos baseados em péptidos, a terapêutica com AMPs está limitada ao seu curto tempo de vida na circulação, no entanto, quando aplicados em lesões cutâneas na forma de *spray*, os péptidos têm a capacidade de penetrar no estrato córneo e destruir os microrganismos. Assim, as suas aplicações terapêuticas futuras estão mais direcionadas para o seu uso tópico, em vez de sistémico, como é o caso do omiganano, cuja investigação em ensaios clínicos tem evoluído também no sentido de ser usado em terapia tópica para a acne facial.

## 2.6. Desvantagens dos péptidos antimicrobianos e mecanismo de resistência bacteriana

Uma das principais desvantagens dos AMPs é serem citotóxicos por via sistêmica, exercendo efeitos negativos sobretudo nos eritrócitos. [16]

Outro inconveniente é a sua incompleta atividade *in vivo*, devido à fraca estabilidade às proteases. Por esse motivo, vários desenvolvimentos têm sido feitos com o intuito de melhorar a estabilidade dos AMPs, por exemplo melhorar a sua formulação associando-os a lipossomas, usá-los como pró-fármacos ou desenvolver péptidos cíclicos com ligações peptídicas mais fortes e mais resistentes às proteases. [22]

O custo de produção dos AMPs sintéticos é muito elevado quando comparado com os antibióticos convencionais. Além disso, o seu pequeno tamanho é um entrave à tentativa de redução dos custos de fabrico, constituindo uma desvantagem destes péptidos. [16]

Assiste-se atualmente a um aumento do número de mecanismos de ação alternativos dos AMPs, mostrando serem muito mais versáteis do que se pensava e aumentaram também os casos descritos de AMPs ativos contra múltiplas estirpes de organismos patogénicos. No entanto, muitos estudos demonstram que as bactérias têm desenvolvido diversas estratégias de resistência a estes péptidos. [14] As bactérias respondem aos AMPs reduzindo a carga negativa da membrana, o que causa modificações e/ou inibição do seu mecanismo de ação. Além disso, as bactérias têm a capacidade de se adaptarem e resistirem à ação destes péptidos, através da produção de peptidases e proteases, ou pela produção de compostos que inibam a sua ação. [30] O mecanismo de resistência mais comum envolve uma alteração da superfície celular e o bloqueio de acesso dos AMPs aos seus alvos celulares, uma vez que são impedidos de se ligar à membrana e penetrarem para dentro da célula. [14] Por exemplo, *Helicobacter pylori*, uma bactéria Gram-negativo que coloniza o mucosa do estômago e pode causar úlcera péptica, resiste aos AMPs por desfosforilar o lípido A do LPS, seguindo-se a adição de um grupo fosfoetilenamina, levando a uma diminuição da carga negativa da membrana. [14] O mesmo acontece com *S. aureus*, que modifica os fosfolípidos aniónicos da membrana citoplasmática com L-lisina, resultando também na redução da carga negativa da membrana e, assim, repulsão dos AMPs e posterior resistência. [15] Outra modificação da membrana pode estar relacionada com a produção de uma cápsula: a bactéria forma uma cápsula polissacarídica que evita a interação entre os AMPs catiónicos e a membrana bacteriana; é o que acontece com *Klebsiella pneumoniae* que se tem mostrado resistente à colistina, AMP utilizado apenas quando mais nenhum antibiótico exerceu efeito antibacteriano. [14]

### 3. Conclusão: péptidos antimicrobianos como uma nova classe terapêutica no combate a infeções bacterianas?

O aumento da emergência de resistência bacteriana tem levado à pesquisa de novas alternativas para resolver este alarmante problema, entre as quais os AMPs. [18] Nas últimas décadas têm ganho atenção por parte dos investigadores como uma terapêutica alternativa de infeções por microrganismos patogénicos, dado o seu amplo espetro de ação contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. [14]

Os AMPs, naturalmente produzidos por múltiplos organismos, têm a capacidade de destruir rapidamente as bactérias por um mecanismo de ação diferente dos antibióticos convencionais, daí serem os candidatos ideais para desenvolvimento e uso terapêutico. [15]

Vários estudos têm sido feitos no sentido de comparar a atividade antibacteriana dos AMPs com os antibióticos, sobretudo ao nível das infeções cutâneas. Os AMPs têm sido incorporados em cremes e soluções de uso tópico e atualmente estão a ser desenvolvidos ensaios clínicos sobre a sua utilização terapêutica, por exemplo, na *acne vulgaris*. [29]

O facto de terem vários alvos celulares, torna-os menos suscetíveis ao desenvolvimento de resistência por parte das bactérias, no entanto, a resistência bacteriana aos AMPs tem ocorrido. Ao mesmo tempo que se assiste ao desenvolvimento de uma nova classe de fármacos com promissora atividade antimicrobiana, assiste-se também ao desenvolvimento de resistência bacteriana a esses mesmos agentes. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência é fundamental, para que o *design* dos AMPs seja otimizado e se tornem fármacos eficazes. [14] Para além disso, existem outras limitações, tais como a sua fraca estabilidade, toxicidade e elevado custo de produção. [15]

O grande desafio para o futuro é, então, contornar estas limitações e desenvolver péptidos que possam ser aplicados na terapêutica de doenças infecciosas, com o máximo de atividade antibiótica possível. [16] Existem já empresas farmacêuticas a trabalhar na melhoria tecnológica dos AMPs, sendo a sua incorporação em lipossomas e a sua modificação estrutural duas alterações que promovem o seu desenvolvimento como agentes terapêuticos. [15]

O objetivo atual é tornar os AMPs uma nova classe de antibióticos, mas ainda muita investigação e ensaios clínicos terão de ser realizados!

## Bibliografia

- [1] Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. [Acedido a 28 de abril de 2014]. Disponível na internet: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/portallInicio.aspx>
- [2] MAGIORAKOS, A., *et. al.* - Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (2011) 268-281
- [3] TAVARES, L.S., SILVA, C., SOUZA, V.C., SILVA, V.L., DINIZ, C.G. - Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiol*, Volume 4, Article 412 (2013)
- [4] Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Acedido a 15 de maio de 2014]. Disponível na internet: <http://www.anvisa.gov.br/>
- [5] Organização Mundial de Saúde. [Acedido a 28 de abril de 2014]. Disponível na internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en>
- [6] Centers for Disease Control and Prevention. [Acedido a 28 de abril de 2014]. Disponível na internet: <http://www.cdc.gov/drugresistance/>
- [7] DAVIES, J., DAVIES, D. - Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2010) 417-433
- [8] RADHOUANI, H., SILVA, N., POETA, P., TORRES, C., CORREIA, S., IGREJAS, G. - Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Frontiers in Microbiology*, Volume 5, Article 23 (2014)
- [9] CHOUDHURY, R., PANDA, S., SINGH, D.V. - Emergence and dissemination of antibiotic resistance: A global problem. *Indian Journal of Medical Microbiology* (2012) 384-390
- [10] DOSLER, S., MATARACI, E. - In vitro pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Peptides* (2013) 53-58
- [11] WILLEY, J., SHERWOOD, L., WOOLVERTON, C. – Prescott's Microbiology. 5ª Ed. Mcgraw-hill Companies (2008)
- [12] Todar's Online Textbook of Bacteriology [Acedido a 15 de maio de 2014]. Disponível na internet: <http://www.textbookofbacteriology.net/>
- [13] Pearson Education [Acedido a 15 de maio de 2014]. Disponível na internet: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Beta-Lactamas&lang=3](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Beta-Lactamas&lang=3)
- [14] GUILHELMELLI, F. *et. al.* - Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, Volume 4, Article 353 (2013)
- [15] BALTZER, S.A., BROWN, M.H. - Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (2011) 228-235.

- [16] KANG, S., KIM, D., MISHIG-OCHIR, T., LEE, B. - Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. *Archives of Pharmaceutical Research* (2012) 409-413.
- [17] DIEHNELT, C.W. - Peptide array based discovery of synthetic antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology* (2013)
- [18] LI, Y., XIANG, Q., ZHANG, Q., HUANG, Y., SU, Z. - Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* (2012) 207-215.
- [19] PLOS Pathogens [Acedido a 17 de maio de 2014]. Disponível na internet: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1001067>
- [20] MicroWiki [Acedido a 17 de maio de 2014]. Disponível na internet: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/MicrobeWiki>
- [21] MARR, A.K., GOODERHAM, W.J., HANCOCK, R.E. - Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology* (2006) 468-472.
- [22] HANCOCK, R.E.W - Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* (2001) 156-164.
- [23] YOUNT, N.Y., YEAMAN, M.R. – Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of Sciences Volume 1277, Antimicrobial Therapeutics Reviews* (2013) 127–138
- [24] ISMAL, M.R. *et. al* – Antimicrobial mechanism of lantibiotics. *Biochemical Society Transactions* 40 (2012)
- [25] CHO, J.H., SUNG, B.H., KIM, S.C. – Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim, Biophys* (2009) 1564-1569
- [26] REBUFFAT, S. – Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions* 40 (2012) 1456 – 1462
- [27] VAN DER WEERDEN *et. al* – Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (2013)
- [28] *Internacional Journal of Antimicrobial Agents* 25 (2005) 448-452
- [29] POPOVIC, S., URBÁN, E., LUKIC, M., CONLON, J.M. - Peptides with antimicrobial and anti-inflammatory activities that have therapeutic potential for treatment of acne vulgaris. *Peptides* (2012) 275-282.
- [30] FACCONI, D. *et. al* - Antimicrobial activity of de novo designed cationic peptides against multi-resistant clinical isolates. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2014) 31-35.