



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas
(Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias / Genética
e Biotecnologia)



**Avaliação do potencial terapêutico e estudo da atividade
imunomodulatória e antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de
diferentes formas de clavaninas**

Osmar Nascimento Silva

Juiz de Fora, MG

2011

Osmar Nascimento Silva

**Avaliação do potencial terapêutico e estudo da atividade
imunomodulatória e antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de
diferentes formas de clavaininas**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Juiz de Fora para
obtenção do título de mestre em
Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética e
Biotecnologia

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientadores: Dr^a. Taia Maria Berto Rezende

Dr^a. Simoni Campos Dias

Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora, MG
2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde citada a fonte.

Silva, Osmar Nascimento.

Avaliação do potencial terapêutico e estudo da atividade imunomodulatória e antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de diferentes formas de clavaninas / Osmar Nascimento Silva. – 2012.
129 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia.)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Imunidade. I. Título.

CDU 57.083.3

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS), são uma das principais causas de mortalidade e aumento dos custos hospitalares em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nos casos em que um paciente adquire uma IrA e esta não é tratada adequadamente, a mesma pode evoluir para um quadro mais grave, podendo levar a sepse e conseqüentemente na maioria dos casos a morte. A sepse representa um importante problema de saúde pública, entretanto, um tratamento eficaz para esta síndrome ainda não foi encontrado. Peptídeos antimicrobianos foram relatados para modular a resposta à infecção bacteriana na sepse, independente dos mecanismos de resistência conhecidos para os antibióticos. Desta forma, procurou-se investigar a atividade imunomodulatória de duas formas de clavaninas sobre monócitos RAW 264.7, bem como a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade *in vitro*. Em ensaios *in vivo* a genotoxicidade, a ação das clavaninas sobre a migração de neutrófilos e a eficácia do tratamento com as clavaninas em um modelo de infecção de ferida operatória por *S. aureus* e sepse polimicrobiana grave também foram avaliadas. Os estudos *in vitro* demonstraram que as clavaninas inibiram completamente o crescimento de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*, preveniram a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12) e NO, e aumentaram a secreção de IL-10. Além disso, as clavaninas não apresentaram atividade citotóxica sobre as células RAW 264.7. Nos experimentos *in vivo*, as clavaninas não apresentaram genotoxicidade, além de apresentarem-se quimioatraentes para neutrófilos. As clavaninas, também, reduziram significativamente as unidades formadoras de colônias de *S. aureus* no modelo experimental de ferida operatória, e reduziram a mortalidade dos animais sépticos em mais de 50%, quando comparados com animais controle. Devido à sua ação direta sobre células do sistema imune e microorganismos, as clavaninas aparentam ser compostos potenciais para o tratamento de infecções bacterianas graves como a sepse, demonstrando alto valor biotecnológico.

Palavras-chave: infecções relacionadas à assistência à saúde, sepse, peptídeos antimicrobianos, clavaninas.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAIs) are a major cause of mortality, also increasing hospital costs in developed and developing countries. When a patient acquires HAIs and this is not properly handled, disease may clearly worsen, leading to sepsis and consequently in major to death. Despite of sepsis represents an important public health problem, any effective treatment for this syndrome was obtained until now. In this view, antimicrobial peptides have been reported as modulators of immune response to bacterial infection in sepsis, with independent activity of mechanisms that lead to antibiotic. Thus, the immunomodulatory activity of two different forms of clavanins over RAW 264.7 monocytes, as well the *in vitro* antimicrobial and cytotoxic activities were here investigated. Furthermore, *in vivo* genotoxicity assays, the evaluation of clavanins activity on neutrophil migration and also the efficacy of treatment with clavanins in a wound *S. aureus* infection model and severe polymicrobial sepsis were also evaluated. Moreover, *in vitro* studies demonstrated that clavanins are able of inhibit the growth of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*. Clavanins also prevented the secretion of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-12) and NO, and increased the IL-10 secretion. In addition, clavanins showed none cytotoxicity on RAW 264.7 cells. During *in vivo* experiments, the clavanins showed no genotoxicity, showing however, a clear chemotactic effect for neutrophils. Clavanins also significantly reduced the colony-forming units of *S. aureus* in an experimental model of surgical wound infection and reduced the mortality of septic animals in more than 50 %, when compared to control group. Due to their direct activities over immune cells and microorganisms, clavanins are potential compounds for the treatment of serious bacterial infections such as sepsis, showing an enormous and remarkable biotechnological value.

Keywords: Healthcare-associated infections, sepsis, antimicrobial peptides, clavanins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Microgramas

μM – Micromolar

ADP – Adenosina difosfato

ATCC – *The American type culture collection.*

BSA – Albumina do Soro Bovino.

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention.*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute.*

CO_2 – Dióxido de carbono.

COBEA – Conselho Brasileiro de Experimentação Animal.

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos celulares

DC – Dicroísmo circular

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular.

g – Grama

HCl – Ácido clorídrico

IFN- γ – Interferon gama.

IL – Interleucina

IrAS – Infecções relacionadas à assistência à saúde.

kDa – kilodaltons

LPS – Lipopolissacarídeo

mg – Miligrama

MIC – Concentração inibitória mínima

MIF – Fator inibidor da migração de macrófagos

mL – Mililitro

mM – milimolar

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NaCl – Cloreto de sódio

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards.*

NF- κ β – factor nuclear kappa beta.

NO – Óxido nítrico

°C – Graus Celsius

p38 – Proteína quinase ativada por mitógeno

PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

PARP – Poli (ADP-ribose) polimerase

PBS – Tampão fosfato salino

pg – Picograma

pH – Potencial hidrogeniônico

PI3K – Fosfoinosítídeo 3-quinase

PMN – células polimofonucleares

RAW – *Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*

rhAPC – Proteína C ativada recombinante humana

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SEM – Desvio padrão da média

SMH – Shai-Matsuzaki-Huang

SOAP – *Sepsis Occurrence In Acutely Ill Patients*

Th1 – Célula T help do tipo 1

Th2 – Célula T help do tipo 2

TLRs – Receptores *Toll-like*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFC – Unidade formadora de colônia

UV – Radiação ultravioleta

W3C – *World Wide Web Consortium*

nm – Nanometro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agentes mais comuns de infecções relacionadas à assistência à saúde.

Tabela 2. Sequência primária das clavaninas A-D.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima da clavanina A para diferentes estirpes bacterianas e fungos.

Tabela 4. Sequência de peptídeos utilizados no presente estudo.

Tabela 5. Efeito da clavanina A e MO sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positiva patogênicas humanas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de estruturas de peptídeos antimicrobianos.

Figura 2. Mecanismos de ação mais conhecidos dos peptídeos antibacterianos. A membrana bacteriana é representada como uma bicamada lipídica (a) e os peptídeos como bastões (b). Moléculas de peptídeoglicanas associadas à parede celular são representadas como cilindros (c). O mecanismo de permeabilização da membrana é indicado de A-E. Os PAMs se interagem com as cargas negativas da membrana exterior. “A” formação de um ‘tapete’ de peptídeos na superfície da membrana, “B” poro toroidal, “C” poros do tipo barril, “D” ação do tipo detergente, “E” permeabilização da membrana sem desestabilização. Vários PAMs atuam em processos intracelulares, tais como a inibição da síntese de mRNA (F), inibição da síntese protéica (G), inibição da atividade ATPase da DnaK, uma enzima envolvida no enovelamento de proteínas (H), além da inibição de enzimas envolvidas na modificação dos aminoglicosídeos (I). alguns PAMs inibiram a formação de componentes estruturais, como a parede celular (c; J), inibindo a transglicosilação de lipídios II, que é necessária para a síntese do peptídeoglicano.

Figura 3. Base física da atividade seletiva de interrupção do potencial de membrana dos peptídeos antimicrobianos catiônicos.

Figura 4. As clavaninas são produzidas pelo tunicado *Styela clava*. Observe na foto indivíduo solitário aderido a um recife de corais.

Figura 5. Visão geral do amplo espectro de ação dos peptídeos de defesa. Os peptídeos de defesa além de sua ação direta sobre os patógenos eles podem apresentar atividade antimicrobiana indireta, incluindo os efeitos imunomoduladores sobre a imunidade inata e adaptativa, embora apresentem

essas duas atividades, certos peptídeos têm uma ou outra atividade preferencialmente.

Figura 6. Espectro de atividade da catelicidina LL-37. A LL-37 induz alterações na expressão gênica global dos monócitos, através da sinalização por p38, ERK, PI3K, e as vias de NF- κ B, promovendo a expressão de quimiocinas e de outros genes envolvidos na comunicação celular. A LL-37 funciona como um quimioatraente direto para monócitos, neutrófilos, células T e mastócitos através do receptor FPRL1 e do receptor Gi-coupled. A LL-37 apresenta forte atividade anti-endotóxica, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias de monócitos em resposta ao LPS e, a maturação de células dendríticas derivadas de monócitos. Monócitos tratados com LL-37 modulam o processo de diferenciação de células dendríticas. Outras atividades da LL-37 incluem a promoção de funções antimicrobiana dos neutrófilos e mastócitos. A LL-37 suprime a apoptose das células epitelial e neutrófilo, através da ativação do FPRL1 ou P2X7. Nos queratinócitos, a LL-37 induz a expressão de IL8, a migração e cicatrização de feridas. Em células epiteliais das vias aéreas, LL-37 ativa p38 e ERK induzindo a secreção de quimiocinas, mediado por receptores: FPRL1 das metaloproteases da família ADAM e EGFR, através da internalização de peptídeos ativos. LL-37 também promove a angiogênese, mediada pelo receptor FPRL1.

Figura 7. Peptídeos antimicrobianos com atividade imunomodulatória.

Figura 8. Avaliação da atividade antibacteriana. *Escherichia coli* foi cultivada na presença de diferentes concentrações das clavanina A (círculo) e MO (quadrado). A cultura bacteriana em PBS representa um crescimento de 100%. Cloranfenicol foi utilizado como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm DP).

Figura 9. Avaliação da atividade antibacteriana. *Klebsiella pneumoniae* foi cultivada na presença de diferentes concentrações das clavanina A (círculo) e MO (quadrado). A cultura bacteriana em PBS representa um crescimento de

100%. Cloranfenicol foi utilizado como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm DP).

Figura 10. Avaliação da atividade antibacteriana. *Staphylococcus aureus* foi cultivada na presença de diferentes concentrações das clavanina A (círculo) e MO (quadrado). A cultura bacteriana em PBS representa um crescimento de 100%. Cloranfenicol (Sigma-Aldrich) foi utilizado como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm DP).

Figura 11. Avaliação dos efeitos hemolíticos da clavanina A (círculo), clavanina MO (quadrado) e LL-37 (asterísco) sobre eritrócitos humanos. 0,1 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) serviu como controle positivo (100% de hemólise). A liberação de hemoglobina foi medida a λ 550 nm e é expresso como % de hemólise. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm DP).

Figura 12. Efeito da LL-37 sobre a viabilidade de células RAW 264.7. Os peptídeos foram diluídos de 1,77 a 14,16 μ M. As células foram incubadas durante 24 horas (círculos), 48 horas (quadrado) e 72 horas (triângulo), a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. *, $p < 0,05$ como significativo em relação ao controle.

Figura 13. Efeito da Clavanina A sobre a viabilidade de células RAW 264.7. Os peptídeos foram diluídos de 3 a 191,96 μ M. As células foram incubadas durante 24 horas (círculos), 48 horas (quadrado) e 72 horas (triângulo), a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. *, $p < 0,05$ como significativo em relação ao controle.

Figura 14. Efeito da Clavanina MO sobre a viabilidade de células RAW 264.7. Os peptídeos foram diluídos de 2,41 a 157,5 μM . As células foram incubadas durante 24 horas (círculos), 48 horas (quadrado) e 72 horas (triângulo), a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. *, $p < 0,05$ como significativo em relação ao controle.

Figura 15. Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultura de células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 24 horas com clavanina A (3 e 6 μM), clavnina MO (2,4 e 5 μM) e LL-37 (1,7 e 3,4 μM), na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, com ou sem IFN- γ (10 ng.mL^{-1}). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, não significativo em relação ao controle.

Figura 16. Dosagem de IL-10 em sobrenadante de cultura células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 72 horas com clavanina A (3 e 6 μM), clavnina MO (2,4 e 5 μM) e LL-37 (1,7 e 3,4 μM), na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, com ou sem IFN- γ (10 ng.mL^{-1}). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, não significativo em relação ao controle.

Figura 17. Dosagem de IL-12 em sobrenadante de células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 24 horas com clavanina A (3 e 6 μM), clavnina MO (2,4 e 5 μM) e LL-37 (1,7 e 3,4 μM), na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, com ou sem IFN- γ (10 ng.mL^{-1}). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada

utilizando teste de Bonferroni, com $P < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, não significativo em relação ao controle.

Figura 18. Participação das clavaninas A e MO e da LL-37 na produção de NO por células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 72 horas com clavanina A (3 e 6 μM), clavnina MO (2,4 e 5 μM) e LL-37 (1,7 e 3,4 μM), na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, com ou sem IFN- γ (10 ng.mL^{-1}). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $P < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, não significativo em relação ao controle.

Figura 19. Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos tratados com as clavaninas A e MO. Foi avaliada a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 tratados com diferentes concentrações de clavanina A e MO (10, 30 e 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), após 6 horas de tratamento. Como controle positivo utilizamos Tioglicolato 4%. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. *, $p < 0,05$ como significativo em relação ao controle.

Figura 20. Avaliação do potencial de atividade indutora de neutrófilos murinos *in vivo* das clavaninas A e MO. Foi avaliada a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 tratados com diferentes concentrações de clavanina A e MO (10, 30 e 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), após 6 horas de tratamento. Como controle positivo utilizamos Tioglicolato 4%. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle.

Figura 21. Densidade média de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico de camundongos em diferentes tratamentos. Foi a formação de

micronúcleos em camundongos C57BL/6 tratados com diferentes concentrações de clavanina A e MO (10, 30 e 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Como controle positivo utilizamos colchicina 40 mg/kg. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle. **EPCMN**: Eritrócitos policromáticos com micronúcleos; **ENCMN**: Eritrócitos normocromáticos com micronúcleos.

Figura 22. Análise histológica de feridas tratadas com clavaninas A e MO.

As feridas foram inoculadas com 10^5 células/mL de *S. aureus* e tratadas com 1 mg.mL^{-1} de sulfato de neomicina bacitracina zincica (A), 37,5 μM de clavanina A (B), 37,5 μM de clavanina MO (C), PBS (D) e com gel de natrosol (E) durante 15 dias. As feridas não tratadas exibiram uma grave infiltração celular composta por células mononucleares (seta branca) e macrófagos (seta preta). Este infiltrado foi acompanhado por edema e necrose em fase inicial. Em contraste, as feridas tratadas com clavanina A e MO apresentaram menor infiltrado celular e uma resposta inflamatória atenuada. Vasos sanguíneos (ponta de seta). Imagens representativas de cinco camundongos examinados por grupo. Barra (30 μm , de A-E).

Figura 23. Recuperação da carga bacteriana (CFU por grama de tecido – ferida) após 15 dias de tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus*.

As feridas foram inoculadas com 10^5 células/mL de *S. aureus* e tratadas com 1 mg.mL^{-1} de sulfato de neomicina bacitracina zincica, 37,5 μM de clavanina A e MO (C), PBS e com gel de natrosol, durante 15 dias. Os dados são representativos de cinco camundongos examinados por grupo. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle. **SNBZ**: sulfato de neomicina bacitracina zincica; **CFU**: Unidade formadora de colônia.

Figura 24. Influência da clavaninas A e MO na sobrevivência de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana grave. Camundongos C57BL/6 foram inoculadas intraperitonealmente com 10^5 células/mL (*S. aureus* e *E. coli*). Os animais foram tratados com diferentes concentrações de clavanina A (**a**) e clavaninas MO (**b**) (10, 30 e 90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), durante 7 dias. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

LISTA DE BOXERS

Conclusão experimental 1: As clavaninas A e MO foram eficazes na inibição do crescimento *in vitro* de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

Conclusão experimental 2: As clavaninas não foram citotóxicas nas concentrações de 1 a 100 µg.mL⁻¹ (clavanina MO) e de 1 a 512 µg.mL⁻¹ (clavanina A).

Conclusão experimental 3: As clavaninas A e MO estimularam a viabilidade/proliferação de células RAW 264.7.

Conclusão experimental 4: As clavaninas A e MO estimularam a secreção de IL-10 e inibiram/não alteraram os níveis de NO, TNF-α e IL-12 pelas células RAW 264.7.

Conclusão experimental 5: As clavaninas A e MO estimularam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos após 6 horas de tratamento.

Conclusão experimental 6: As clavaninas A e MO não causaram qualquer efeito genotóxico em nível cromossômico.

Conclusão experimental 7: O tratamento tópico com as clavaninas A e MO, contribuíram para a melhora na cicatrização do ferimento e reduziu significativamente a carga bacteriana.

Conclusão experimental 8: As clavaninas A e MO aumentaram a sobrevivência de camundongos submetidos a sepse policróbica grave.

Conclui-se desta forma que: As clavaninas A e MO apresentam efeito antimicrobiano e imunomodulador importantes para potencial terapêutico de feridas cirúrgicas e quadros de sepsisemia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sepsis	3
1.2 Peptídeos antimicrobianos	9
1.2.1 Mecanismo de ação dos PAMs	11
1.3 Clavaninas	15
1.4 Peptídeos antimicrobianos com atividade imunomodulatória.....	20
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAIS & MÉTODOS.....	29
4.1 Considerações éticas	29
4.2 Obtenção da clavanina MO	29
4.3 Síntese de peptídeos.....	29
4.3.1 Quantificação dos Peptídeos	30
4.4 Ensaios <i>in vitro</i>	30
4.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana.....	31
4.4.2 Avaliação da atividade hemolítica.....	31
4.4.3 Avaliação do potencial imunomodulatório das clavaninas 'A' e 'MO'.....	32
4.4.4 Grupos experimentais.....	32
4.4.5 Concentrações utilizadas.....	32
4.4.6 Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT	33
4.4.7 Obtenção dos antígenos bacterianos.....	33
4.4.8 Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-12)	34
4.4.9 Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	34
4.5 Ensaios <i>in vivo</i>	35
4.5.1 Animais	35
4.5.1.1 Desenho experimental	35
4.5.2 Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal	37
4.5.2.1 Contagem total de leucócitos.....	37
4.5.2.2 Contagem diferencial de leucócitos	37
4.5.3 Avaliação da Genotoxicidade (teste de Micronúcleos).....	38
4.5.4 Preparo dos microorganismos	38

4.5.5 Modelo experimental de ferida operatória.....	39
4.5.5.1 Indução da lesão e infecção dos camundongos com <i>S. aureus</i>	39
4.5.5. Tratamento	39
4.5.5.3 Análise histopatológica	39
4.5.6 Modelo de sepse experimental	40
4.7 Análises estatísticas	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Verificação da pureza dos peptídeos.....	41
5.1.1 Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> das clavaninas A e MO	41
5.2 Avaliação da atividade hemolítica.....	45
5.3 Avaliação do potencial imunomodulatório das clavaninas 'A' e 'MO'	47
5.3.1 Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT	47
5.3.2 Dosagem de citocinas em linhagem de células RAW 264.7	60
5.3.3 Avaliação da produção de óxido nítrico por células RAW 264.7 tratadas com peptídeos antimicrobianos.....	58
5.4 Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal	61
5.5 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio de micronúcleo	63
5.6 Avaliação do potencial terapêutico das clavaninas A e MO em camundongos portadores de infecção da ferida cirúrgica por <i>S. aureus</i>	65
5.6.1 Recuperação da carga bacteriana.....	68
5.7 Avaliação do efeito protetor das clavaninas A e MO na sobrevivência de camundongos submetidos à sepse polimicrobiana grave	70
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÕES	87
8. REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS) ou infecções hospitalares (IHs), são uma das principais causas de mortalidade e aumento nos custos hospitalares em países desenvolvidos e em desenvolvimento, além de contribuírem para o aumento da resistência dos microorganismos aos antibióticos (Pittet *et al.*, 2008). Estima-se que a incidência das IrAS ocorre em torno de 5-10% nos países desenvolvidos e com uma frequência média de 27% nos países em desenvolvimento (Rezende *et al.*, 1998; Pittet *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos, segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), as IrAS representam cerca de 1,7 milhões de infecções, causando 99.000 mortes a cada ano, a um custo aproximado de US\$ 4,5 bilhões (McKibben *et al.*, 2005; Klevens *et al.*, 2007). Destas, 32% de todas as infecções associadas aos cuidados de saúde são as infecções do trato urinário; 22% são infecções de sítio cirúrgico; 15% são infecções pulmonares e 14% são infecções da corrente sanguínea (Klevens *et al.*, 2007).

No Brasil, segundo levantamentos feitos pelo Ministério da Saúde, estima-se que a taxa média de IrAS no país é de 15,5% (APECIH, 2005; Brasil, 2004). No entanto, as taxas de mortalidade por IrAS no Brasil não são precisas, uma vez que não existe um programa de controle de qualidade que ofereça condições satisfatórias para a coleta, processamento e gerenciamento das informações sobre as mesmas no Brasil. Os patógenos comumente envolvidos na etiologia das IrAS são bactérias, fungos e vírus, no entanto, merecem destaque as bactérias constituintes da microbiota humana normal, as quais podem causar infecção em indivíduos imunodeprimidos (Brasil, 2004). As bactérias mais comuns associadas a IrAS podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Agentes bacterianos mais comuns causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde.

Patógeno	Sítios comuns de isolamento do patógeno
Bactérias Gram-negativas	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Pseudomonas sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, queimaduras
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Proteus sp</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Serratia sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
Bactérias Gram-positivas	
<i>Streptococcus sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue

*Modificado de Brasil, 2004.

Um fator importante relacionado às IrAS é o aumento acentuado no aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos nas últimas décadas, bem como à disseminação das bactérias resistentes para a comunidade. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), por exemplo, que inicialmente foi encontrado em ambiente hospitalar, tem se tornado hoje, comum em ambientes comunitários durante as duas últimas décadas, isso, apesar de todos os esforços para conter sua propagação. Ao longo do tempo, a resistência de estafilococos a várias outras classes de antibióticos vem sendo observada (Taubes, 2008). Esta vasta disseminação da resistência aos antibióticos é em parte devido aos mecanismos sofisticados de ganhos de resistência das bactérias, incluindo a capacidade das bactérias para trocar material genético de uma cepa para a outra (Taubes, 2008). Esta troca de informação genética é muito mais provável de ocorrer com a exposição repetida a concentrações elevadas de antibióticos específicos. As terapias atuais, como a profilaxia com antibióticos de largo espectro, só aumentam este problema (Lynch & Robertson, 2008).

As IrAS são um grave problema de saúde pública, com uma tendência de agravamento ainda maior. Devido entre outros fatores, a aglomeração e tamanho da população que estão em aumento contínuo, além do uso indiscriminado de antibióticos, propiciando o surgimento cada vez maior de microorganismos resistentes às terapias disponíveis.

1.1 Sepses

As IrAS são infecções bastante comuns, mas quando tratadas rápida e adequadamente, não são perigosas para o paciente. No entanto, nos casos em que um paciente adquire uma infecção e esta não for tratada adequadamente, a mesma pode evoluir para um quadro mais grave, podendo levar a sepses, lesão grave, que pode levar a morte do hospedeiro (Perry, 2007).

A sepsis pode ser definida como uma resposta inflamatória sistêmica a microrganismos patogênicos em tecidos e fluídos normalmente estéreis (sangue, líquido cefalorraquidiano), onde ocorre uma produção exacerbada de uma série de mediadores inflamatórios, tais como citocinas e proteínas de fase aguda e ativação excessiva de células inflamatórias, podendo levar a disfunção ou falência de um ou vários órgãos (Ayres, 1985; Balk & Bone, 1989; Kilpatrick *et al.*, 1998).

Em um estudo observacional realizado em unidades de terapia intensiva européias, desenvolvido pelo SOAP (*Sepsis Occurrence In Acutely Ill Patients*), foram acompanhados 3.147 pacientes adultos, com idade média de 64 anos. Destes pacientes, 1.177 apresentaram sepsis, incluindo 777 pacientes que manifestaram sepsis na admissão, levando a 313 falecimentos, totalizando um índice de mortalidade alarmante de 45%. Nos pacientes com sepsis, o pulmão foi o local mais comum de infecção (68%), seguido pelo abdome (22%). Os microorganismos mais frequentes foram *Staphylococcus aureus* (30%, incluindo 14% resistente à meticilina), espécies de *Pseudomonas spp.* (14%) e *Escherichia coli* (13%) (Vincent, *et al.*, 2006).

Apesar do grande impacto sócio-econômico que a sepse causou e tem causado em todo o mundo e dos inúmeros estudos realizados até o presente, a patogênese da sepse ainda continua obscura. Sabe-se que um estímulo inflamatório microbiano é detectado pelos receptores de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), além disso, proteínas intracelulares ou mediadores que são liberados por células mortas, também são reconhecidos pelo sistema imune (Rittirsch *et al.*, 2008). Essas proteínas que são conhecidas como "alarminas", juntamente com os PAMPs, são conhecidas como padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs) (Bianchi, 2007). Os DAMPs são reconhecidos pelos receptores *Toll-like* (TLRs), que são receptores cruciais para a iniciação da resposta inflamatória (Rittirsch *et al.*, 2008).

Durante a sepse, a resposta imune adaptativa deixa de ter uma resposta inicial mediada por células Th₁ caracterizada pela produção de interferon gama (IFN γ) e de interleucina 12 (IL-12), e passa a ter uma resposta mediada por células T helper 2 (Th₂), caracterizada pela liberação de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, o que pode resultar em imunossupressão profunda (Rittirsch *et al.*, 2008). Além das células Th₁ e Th₂ outra população de Th foi recentemente descoberta, as células Th₁₇, um subconjunto de células Th que produz IL-17 (Harrington, 2005). Esta resposta é importante para o hospedeiro numa resposta a infecção por microorganismos que não são eliminados por Th₁ ou Th₂ (Rittirsch *et al.*, 2008).

Nos indivíduos acometidos pela sepse há uma completa ativação da resposta imune sistêmica devido à liberação de altos níveis de DAMPs de microorganismos invasores e / ou tecido do hospedeiro lesado, o que leva à super estimulação de células do sistema imune. Como resultado, a sepse é acompanhada por uma resposta acentuadamente desequilibrada de citocinas, com isso as respostas que normalmente são benéficas no combate a infecções, acabam levando a um intenso processo inflamatório, causando sérios danos ao hospedeiro (Rittirsch *et al.*, 2008).

Sabe-se agora que a resposta inflamatória na sepse envolve uma complexa interação de diferentes sistemas biológicos e tipos celulares,

resultando em grave desregulação da resposta inflamatória, tornando necessária a aplicação de abordagens interdisciplinares (Rittirsch *et al.*, 2008). Outro fator intrigante que tem chamado bastante à atenção dos pesquisadores, na última década, é um forte indício de que uma resposta inflamatória exacerbada na verdade não seja o principal responsável pelo óbito de pacientes portadores desta patologia. Tal observação se baseia no fato de que, embora alguns pacientes venham a óbito durante a fase inicial da resposta inflamatória exacerbada desencadeada durante a sepse, a maioria dos pacientes falece em momentos posteriores a este evento, o qual está associado a um extenso estado de imunossupressão (Rittirsch *et al.*, 2008). Notavelmente, os neutrófilos podem sofrer “paralisia imunológica” durante a sepse, que envolve um completo fechamento de importantes vias de sinalização intracelular e disfunção do sistema imune adaptativo, a qual é um fator importante que contribui para a imunossupressão que se observa nas fases posteriores da sepse (Rittirsch *et al.*, 2008).

A teoria de que a morte por sepse foi atribuída a uma hiper estimulação do sistema imune, não foi por acaso e é datada de um longo período de estudo. Contudo o “calcanhar de Aquiles” de tal teoria deve-se ao fato de que esta foi baseada em estudos realizados em modelos animais, os quais parecem não refletir o quadro clínico em humanos (Fink & Heard, 1990; Deitch, 1998; O’Reilly *et al.*, 1999). Esses estudos utilizaram grandes doses de endotoxina ou uma carga bacteriana muito alta, conseqüentemente, os níveis de citocinas circulantes, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), são exponencialmente maiores nos animais do que em pacientes com sepse (Deitch, 1998). Nestes estudos, os animais morreram pelo que chamamos de “tempestade de citocinas”, e o emprego de macromoléculas e outros compostos que bloqueiam a produção desses mediadores normalmente melhoraram a sobrevivência dos animais (Fink & Heard, 1990; Deitch, 1998; O’Reilly *et al.*, 1999).

Em certas formas de sepse, como por exemplo, na meningococemia, os níveis circulantes de TNF- α são elevados e correlacionados com a mortalidade (Girardin *et al.*, 1988; Hatherill *et al.*, 2000). Em um estudo realizado com 55

crianças com infecção causada por *Neisseria meningitidis*, 46 apresentavam níveis elevados de TNF- α circulante (Girardin *et al.*, 1988). No entanto, estudos têm demonstrado que a frequência de uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada é inferior ao que foi originalmente pensado (Debets *et al.*, 1989; Rogy *et al.*, 1994; Pruitt *et al.*, 1997; Oberholzer *et al.*, 2000). Debets e colaboradores (1989) observaram que, apenas 11 dos 43 pacientes com sepse (25%) apresentaram níveis detectáveis de TNF- α circulantes (limite de detecção, de 5 a 10 pg. mL⁻¹). Em outro estudo, com 87 pacientes com sepse, apenas sete apresentavam níveis mensuráveis de TNF- α ou IL-1 (Pruitt *et al.*, 1997; Oberholzer *et al.*, 2000). Estes estudos indicam que em humanos parece não haver uma produção exacerbada de citocinas como se pensava, ou como é observado em modelos animais.

Vários autores consideram as citocinas como grandes vilãs durante a sepse, todavia, as mesmas são de extrema importância no tratamento desta patologia (Hotchkiss & Karl, 2003). Estudos em um modelo animal de peritonite demonstraram que o bloqueio de TNF- α reduziu a sobrevivência dos animais em mais de 50% (Eskandari *et al.*, 1992; Echtenacher *et al.*, 2001). Em suma, o bloqueio total de receptores ou das respectivas citocinas tendem a comprometer ainda mais o estado clínico do paciente. Estudos datados da segunda metade do século XX (Meakins *et al.*, 1977), apresentavam indícios de como o organismo reagia após resistir à resposta inflamatória exacerbada que marca o início do agravamento da sepse. Nestes estudos, foi observado que pacientes com sepse apresentam características compatíveis com imunossupressão, incluindo uma perda de hipersensibilidade tardia, uma incapacidade de eliminar os agentes infecciosos e uma predisposição a IrAS (Meakins *et al.*, 1977; Lederer *et al.*, 1999; Oberholzer *et al.*, 2000). Inicialmente, a sepse é caracterizada pelo aumento de mediadores inflamatórios, mas à medida que a síndrome persiste, há uma mudança em direção a um estado de imunossupressão (Lederer *et al.*, 1999; Oberholzer *et al.*, 2000). Há fortes evidências de que a imunossupressão está presente num estado tardio da doença. Foi observado que quantidades pequenas de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 estavam presentes no sangue total

de pacientes estimulados com LPS (Ertel *et al.*, 1995). Além disso, em pacientes que apresentavam imunossupressão durante a sepse, tal quadro foi revertido após a administração de TNF- α . Desta forma, o TNF- α aparentemente estimulou a proliferação de macrófagos melhorando a sobrevida destes pacientes (Docke *et al.*, 1997).

Nas duas últimas décadas, os estudos sobre a patogênese da sepse tem se intensificado, juntamente com a busca por um tratamento eficaz. Nesta busca, diversos novos agentes têm demonstrado eficácia em modelos animais clinicamente relevantes, oferecendo esperança no tratamento da sepse (Hotchkiss & Karl, 2003). O'Suilleabhain e colaboradores (1996) demonstraram que a IL-12, é um potente estimulante imunológico e indutor de Th1, reduzindo a mortalidade por sepse, quando administrada após ferimento ou queimadura. A administração de anticorpos contra a ativação do sistema complemento e consequente liberação do fator C5a, reduziu a frequência de bacteremia, evitou a apoptose de células Th e acabou melhorando a sobrevida dos animais (Czermak *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2000; Huber-Lang *et al.*, 2001). Calandra e colaboradores (2000) relataram que altas concentrações do contra fator inibidor da migração de macrófagos estavam (MIF) presentes em pacientes com sepse e que a administração de anticorpos que inibem MIF em camundongos aumenta a sobrevida dos animais em um modelo de peritonite aguda. Estudos que utilizam fatores que inibem a apoptose de linfócitos e células epiteliais gastrointestinais têm melhorado a sobrevida em modelos experimentais de sepse (Chung *et al.*, 1998; Hotchkiss *et al.*, 1999; Hotchkiss *et al.*, 2000; Oberholzer *et al.*, 2001a; Oberholzer *et al.*, 2001b; Coopersmith *et al.*, 2002). Camundongos com sepse deficientes em poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) apresentaram uma melhora na sobrevida e a administração de um inibidor de PARP, aumentou a sobrevida de porcos portadores de um modelo experimental de sepse (Goldfarb *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2002). Além dos fatores descritos anteriormente, o sistema nervoso central é um importante modulador da inflamação, a estimulação elétrica do nervo vago protege contra choque endotóxico (Borovikova *et al.*, 2000).

A proteína C ativada recombinante humana (rhAPC), um anticoagulante, é o primeiro agente anti-inflamatório, que apresentou atividade no tratamento da sepse (Bernard *et al.*, 2001; Matthay *et al.*, 2001). Em pacientes com sepse, a administração da rhAPC resultou em uma redução de 19,4% no risco de morte (Bernard *et al.*, 2001). A rhAPC ativada inativa os fatores Va e VIIIa, evitando, assim, a geração de trombina (Matthay *et al.*, 2001). A eficácia de um agente anticoagulante em pacientes com sepse tem sido atribuída à reação entre o sistema de coagulação e da cascata inflamatória (Hotchkiss & Karl, 2003). A inibição da geração de trombina pela rhAPC ativada diminui a inflamação pela ativação plaquetária, recrutamento de neutrófilos, degranulação dos mastócitos (Hotchkiss & Karl, 2003). A rhAPC ativada apresenta propriedades antiinflamatória direta, incluindo o bloqueio da produção de citocinas por monócitos e bloqueio da adesão celular (Hotchkiss & Karl, 2003).

Como exposto anteriormente, uma variedade de agentes prometem novas terapias eficazes no tratamento da sepse. Todavia, os dados aqui apresentados são de experimentos laboratoriais (exceto, o uso da rhAPC) e como bem sabemos o caminho do laboratório até as prateleiras das farmácias é dispendioso. O que se faz hoje na prática é a utilização de antibióticos convencionais como ampicilina, estreptomicina, vancomicina dentre outros, sozinhos ou em combinação. No entanto, um dos fatores limitantes de tal terapia é a ineficácia, na maioria dos casos, destes compostos. A sepse em sua quase totalidade é polimicrobiana, e outro agravante, que coíbe a eficácia de tal terapia está relacionado com a identificação dos patógenos envolvidos na síndrome. A identificação do patógeno é importante para o tratamento e, como se sabe, o método mais difundido para identificação dos patógenos envolvidos na sepse é a hemocultura, técnica relativamente demorada. Este processo atrasa o relatório médico em vários dias, o que na maioria dos casos compromete o tratamento, sendo um dos fatores que contribuem de forma significativa, para o elevado número de óbitos na sepse.

Diante do exposto, observamos que a sepse não pode ser mais atribuída exclusivamente a uma ação desordenada do sistema imunitário, podendo

indicar um sistema imunológico que está gravemente comprometido e incapaz de erradicar patógenos. Os mecanismos que levam a falência de órgãos e o óbito de pacientes com sepse, ainda permanecem desconhecidos, sendo que, os estudos de autópsias não revelam necrose generalizada. Os avanços clínicos no tratamento da sepse incluem: a terapia com rhAPC, o controle da glicose no sangue e terapia alvo-dirigida. Terapias futuras podem ser direcionadas para aumentar ou inibir a resposta imunológica do paciente, dependendo de polimorfismos genéticos, a duração da doença e as características do patógeno particular (Hotchkiss & Karl, 2003).

1.2 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas evolutivamente antigas constituintes do sistema imune inato (Nijnik & Hancock, 2009). São relativamente pequenas, apresentando entre 6 a 100 resíduos de aminoácidos, tendo sido isolados de microorganismos unicelulares, insetos e outros invertebrados, plantas, anfíbios, aves, peixes e mamíferos, incluindo seres humanos (Martin *et al.*, 1995; Wang Wang *et al.*, 2004). Os PAMs são um importante mecanismo de defesa para diversos organismos, por isso eles também são conhecidos como antibióticos naturais. Nos invertebrados marinhos, por exemplo, os quais dependem exclusivamente dos mecanismos de defesa da imunidade inata, que incluem tanto uma resposta humoral, quanto uma celular (Wright, 1981). Estando a imunidade humoral nestes animais caracterizada pela presença de compostos antimicrobianos, presentes nas células do sangue e plasma (Wright, 1981). Há evidências de que os PAMs são amplamente distribuídas em invertebrados (Charlet *et al.*, 1996), sendo encontrados especialmente em tecidos como o intestino e órgãos respiratórios.

Apesar da grande diversidade em suas sequências e estruturas, a maioria dos PAMs apresenta carga positiva, alto teor de resíduos hidrofóbicos e resíduos de aminoácidos organizados em uma estrutura onde os resíduos hidrofóbicos e catiônicos estão espacialmente localizados em pontos distintos da molécula (anfipáticos). Em decorrência de tal característica os mesmos são

solúveis em água e capazes de interagir fortemente com membranas biológicas (Powers & Hancock, 2003; revisado em Brogden, 2005). Os PAMs apresentam um amplo espectro de atividade antibacteriana, antifúngica, em alguns casos antiviral, antiparasitária e antitumoral (Martin *et al.*, 1995; Bulet *et al.*, 2004; Wang Wang *et al.*, 2004).

Apesar das inúmeras características compartilhadas pelos PAMs, vale destacar aqui que os PAMs isolados de invertebrados marinhos são dotados em sua maioria de modificações pós-traducionais. A plicatamida e outros peptídeos isolados de acídias (Tincu *et al.*, 2006; Azumi *et al.*, 1990), como as halociaminas, são caracterizados por um resíduo aromático descarboxilado na região C-terminal. Esta modificação pós-traducional pode representar uma alternativa de resistência proteolítica de amidação C-terminal (Otero-González *et al.*, 2010). Outro exemplo é a stielina D, a qual apresenta dois novos aminoácidos aminados a di-hidroxi-arginina e di-hidroxi-lisina, e dois aminoácidos anormais, o 6 bromo-triptofano e 3,4- di-hidroxi-fenilalanina, bem como uma amidação C-terminal. Além disso, a stielina D apresenta micro-heterogeneidade devido à hidroxilação diferencial de seus resíduos de lisina. A stielina D apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas em 200 mM de NaCl. O papel das extensas modificações pós-translacionais, acredita-se estar relacionado com a preservação da atividade em pH baixo ou em condições de elevadas concentrações de sal (Taylor *et al.*, 2000).

Os PAMs são classificados em vários grupos por compartilharem algumas características físico-químicas em comum, tais como composição de resíduos de aminoácidos (os resíduos mais abundantes são catiônicos e hidrofóbicos), carga líquida (a maioria dos PAMs são carregados positivamente em pH fisiológico e alguns subgrupos são peptídeos aniônicos), anfipaticidade (conferida pela sua composição de aminoácidos e arranjo) e estrutura tridimensional (incluindo α -hélices, folhas- β , e estruturas não-convencionais). As estruturas mais estudadas dos PAMs são: α -hélices, folhas- β , uma mistura de estruturas em α -hélices/folhas- β , macrocíclica e estruturas irregulares

(Figura 1) (Boman, 1995; Hancock, 1997; Gennaro & Zanetti, 2000; Vizioli & Salzet, 2002).

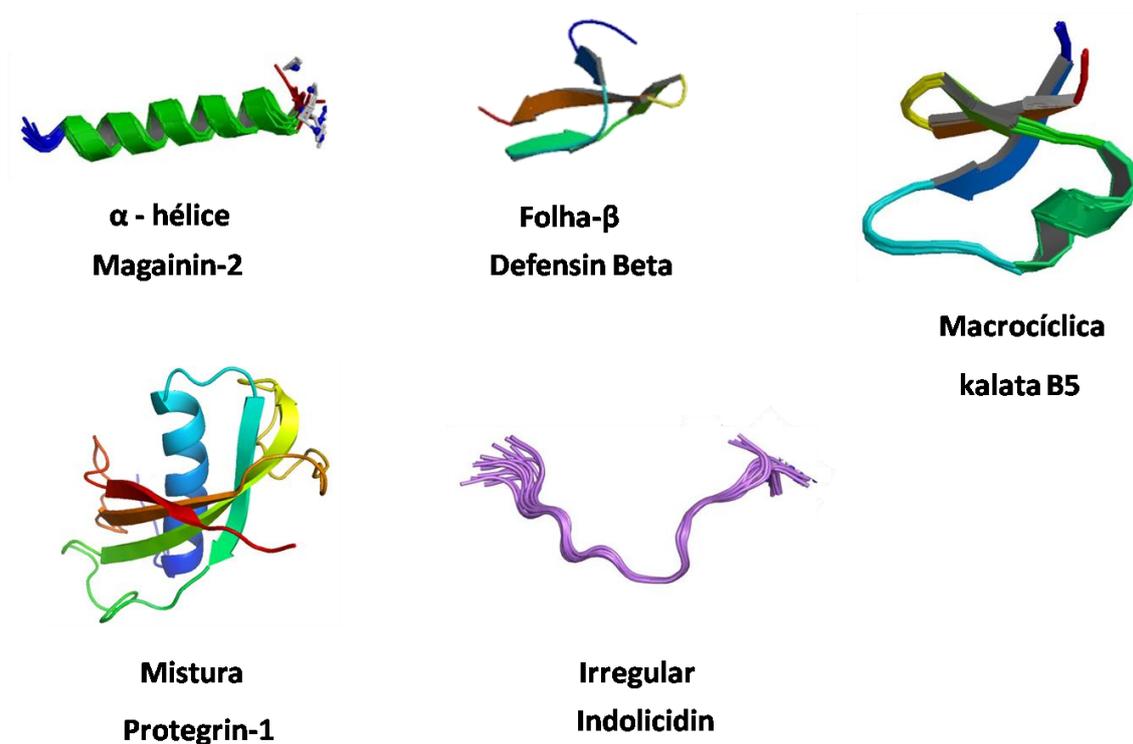


Figura 1. Exemplos de estruturas de peptídeos antimicrobianos.

1.2.1 Mecanismo de ação dos PAMs

Os PAMs apresentam uma grande variedade de mecanismos de ação, sendo aqueles apresentados pelos peptídeos antibacterianos, os mais estudados até o momento. Os mecanismos de ação apresentados pelos PAMs incluem a inibição da formação da parede celular, formação de poros na membrana celular resultando na interrupção do potencial de membrana com eventual lise da célula e inibição da síntese de ácidos nucleicos, de proteínas, de atividade enzimática e da parede celular (Hancock & Rozek, 2002; Zasloff, 2002; Brogden, 2005).

Um dos modelos mais bem aceitos para explicar a atividade dos PAMs é o modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) (Figura 2) (Matsuzaki, 1999; Shai,

1999; Yang, 2000). Este modelo propõe a interação do peptídeo com a membrana, seguido pelo deslocamento de lipídios, alteração na estrutura da membrana e em certos casos, a entrada do peptídeo no interior da célula-alvo.

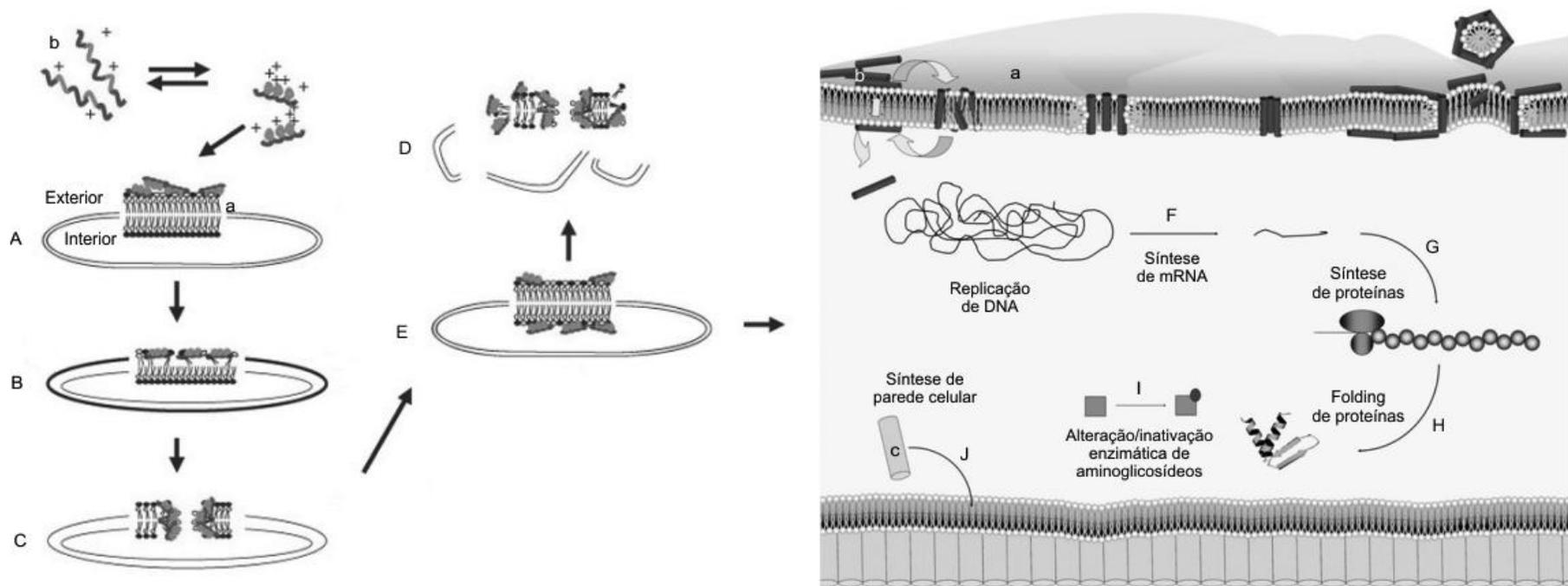


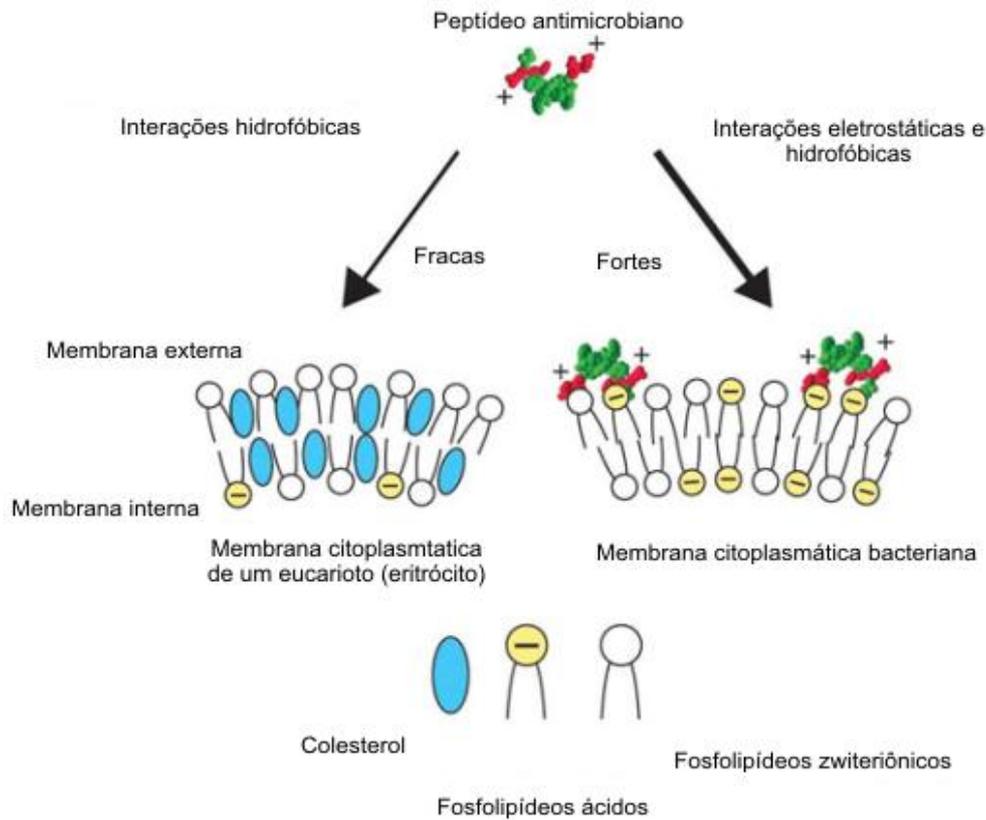
Figura 2. Mecanismos de ação mais conhecidos dos peptídeos antibacterianos. A membrana bacteriana é representada como uma bicamada lipídica (a) e os peptídeos como bastões (b). Moléculas de peptídeoglicanas associadas à parede celular são representadas como cilindros (c). O mecanismo de permeabilização da membrana é indicado de A-E. Os PAMs se interagem com as cargas negativas da membrana exterior. “A” formação de um ‘tapete’ de peptídeos na superfície da membrana, “B” poro toroidal, “C” poros do tipo barril, “D” ação do tipo detergente, “E” permeabilização da membrana sem desestabilização. Vários PAMs atuam em processos intracelulares, tais como a inibição da síntese de mRNA (F), inibição da síntese protéica (G), inibição da atividade ATPase da DnaK, uma enzima envolvida no enovelamento de proteínas (H), além da inibição de enzimas envolvidas na modificação dos aminoglicosídeos (I). Alguns PAMs inibiram a formação de componentes estruturais, como a parede celular (c; J), inibindo a transglicosilação de lipídios II, que é necessária para a síntese do peptídeoglicano.

*Adaptado de Zasloff 2002; Nicolas 2009.

Durante muitos anos tem-se discutido sobre o mecanismo de ação dos PAMs, em um momento inicial. Acreditava-se que a ação desses peptídeos era única e exclusivamente sobre a membrana celular. Todavia, hoje há uma aceitação de que os PAMs, além de suas propriedades de permeabilização e ruptura da membrana (Figura 2), também operem por meio de interações com alvos intracelulares ou interrupção dos principais processos celulares (Figura 2) (Nicolas, 2009).

Independentemente do mecanismo de ação, a atividade dos peptídeos antibacterianos são, em sua maioria, dependentes da interação entre o peptídeo e a membrana celular (Hancock & Rozek, 2002). Sendo que o mecanismo de ação dos PAMs pode variar de acordo com a célula com a qual interage, o que depende da composição e característica das membranas celulares. As membranas bacterianas, por exemplo, são organizadas de tal forma que a membrana externa da bicamada é densamente rica em lipídios com as “cabeças” dos fosfolipídios carregados negativamente. Em contrapartida, a membrana externa da bicamada em plantas e animais é composta principalmente por lipídeos com nenhuma carga líquida, a maioria dos lipídios com cabeças carregadas negativamente estão presentes na membrana interna da bicamada (Figura 3) (revisado por Zasloff, 2002; Matsuzaki, 1999).

Uma das características que torna os PAMs moléculas bastante atraentes quando se pensa em seu uso terapêutico é a seletividade tóxica apresentada por muitos PAMs. Muitos deles são completamente inativos a células eucarióticas, a base para essa seletividade parece estar relacionada com a composição lipídica da membrana-alvo (fluidez, densidade de carga negativa, e a ausência / presença de colesterol) (Nicolas, 2009). A presença de colesterol na membrana, geralmente reduz a atividade dos PAMs, uma vez que o colesterol auxilia na estabilização da bicamada lipídica, podendo haver ainda interações entre o colesterol e os PAMs (Figura 3) (Matsuzaki, 1999).



*Adaptado de Zasloff, 2002.

Figura 3. Base física da atividade seletiva de interrupção do potencial de membrana dos peptídeos antimicrobianos catiônicos.

1.3 Clavaninas

As clavaninas compõem uma família de peptídeos com atividade antimicrobiana isolada dos hemócitos do tunicado marinho *Styela clava* (Figura 4) (Lee *et al.*, 1997). De acordo com Menzel e colaboradores (2002), as clavaninas estão presentes nos grânulos citoplasmáticos e/ou citoplasma de cinco diferentes tipos de granulócitos e também ocorrem em todo o citoplasma de macrófagos. Essa família é composta por quatro isoformas “A”, “B”, “C” e “D” (Tabela 2), esses peptídeos possuem 23 resíduos de aminoácido, estrutura em α -hélice (resolvido por DC), são ricas em histidina, glicina e fenilalanina, possuem o C-terminal amidado, além da presença de oito dos vinte e três aminoácidos em posições idênticas para cada um dos peptídeos descritos.

Estes peptídeos apresentam características catiônicas e anfipáticas muito comuns a peptídeos antimicrobianos (Lee *et al.*, 1997).



Figura 4. As clavaninas são produzidas pelo tunicado *Styela clava*. Observe na foto indivíduo solitário aderido a um recife de corais (wdfw.wa.gov/.../species_images/styela_clava.jpg).

Uma característica marcante das clavaninas é o C-terminal na forma carboxamida no lugar do ácido carboxílico. A amidação é uma das modificações pós-traducionais mais comuns que ocorrem nos PAMs, a qual envolve a descarboxilação do carbono de um resíduo terminal de glicina num processo enzimático de duas etapas. A presença da carboxamida na porção C-terminal impede a clivagem do peptídeo por carboxipeptidases e permite a formação de uma ligação de hidrogênio adicional na formação de estruturas em α -hélice (Bradbury & Smyth, 1987; revisado por Andrew & Rivas, 1998). Todavia, não existe ainda uma correlação direta entre a amidação do C-terminal e a atividade biológica, não havendo diferenças significativas entre as formas modificadas e as formas originais. No entanto, em alguns experimentos utilizando peptídeos sintéticos com o grupo carboxamida presente, houve um aumento significativo na atividade antimicrobiana comparativamente aos análogos não modificados (Mor & Nicolas, 1994; revisado por Andrew & Rivas, 1998).

Tabela 2. Sequência primária das clavaninas A-D.

Peptídeo	Sequência
Clavanin A	VFQFL GKIIH HVGNF VHGFS HVF-NH2
Clavanin B	VFQFL GRIIH HVGNF VHGFS HVF-NH2
Clavanin C	VFHLL GKIIH HVGNF VYGFS HVF-NH2
Clavanin D	AFKLL GRIIH HVGNF VYGFS HVF-NH2

As clavaninas são amplamente eficazes contra bactérias gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, bem como bactérias gram-negativas e fungos. Estes peptídeos são ativos em altas concentrações de sal e mais ativos em pH ácido do que em pH neutro (Lee *et al.*, 1997).

A clavanina “A” apresenta uma sequência rica em resíduos de histidina, fenilalanina e glicina. Esse PAM atua em nível de membrana através de um mecanismo dependente do pH. Em pH neutro, quando o peptídeo apresenta uma carga ligeiramente positiva, ele atua de forma inespecífica, desestabilizando a bicamada lipídica (van Kan *et al.*, 2001; van Kan *et al.*, 2002; van Kan *et al.*, 2003). Estudos utilizando microscopia de força atômica (AFM) mostraram que a clavanina A desestabilizou a bicamada lipídica, sugerindo que o mecanismo de ação é semelhante ao descrito para o modelo “*carpet-like*”, dado esse que foi confirmado pela liberação de carboxifluoresceína, calceína e FITC- dextran, compostos esses com mais de 9 kDa (van Kan *et al.*, 2003).

Em condições ácidas (pH 5,5), quando os resíduos de histidina estão protonados, a Clavanina A apresenta atividade antimicrobiana superior (~10x) que aquela apresentada em pH neutro. Este aumento da atividade é acompanhado por um aumento da capacidade de colapso do potencial de membrana. Apesar da alta afinidade pelos lipídios de membrana em pH 5,5, a clavanina A se mostrou incapaz de liberar íons pequenos e calceína das vesículas lipídicas em condições ácidas. Em tais condições, o peptídeo não mata as bactérias pela permeabilização da membrana, de acordo com alguns autores, neste pH há fortes indícios de que o peptídeo utilize outro mecanismo

de ação, sendo o mais provável à interação com proteínas envolvidas na translocação de prótons (van Kan *et al.*, 2002). Esses resultados sugerem que a clavanina A atue sobre proteínas de membrana envolvidas no gradiente de prótons transmembrana ou gradientes de íons, tais como ATP sintases ou bombas de prótons, alvos mais prováveis da clavanina A. Todavia, o mecanismo exato das interações entre a clavanina A com componentes específicos das membranas biológicas ainda não foram descritos (van Kan *et al.*, 2002). Independentemente dos mecanismos apresentados pela clavanina A, os resíduos de glicina facilitam/promovem a flexibilidade 'conformacional' do peptídeo. As clavaninas são produzidas nos grânulos citoplasmáticos e/ou citoplasma de cinco diferentes tipos de granulócitos e em todo o citoplasma de macrófagos deste organismo e são armazenadas em grânulos citoplasmáticos e compartimentos celulares em que, acredita-se, o pH interno seja em torno de 5 (Menzel *et al.*, 2002; van Kan *et al.*, 2002). A clavanina A apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana, atuando sobre fungos e bactérias Gram-positivas e negativas (Tabela 3) (van Kan *et al.*, 2002).

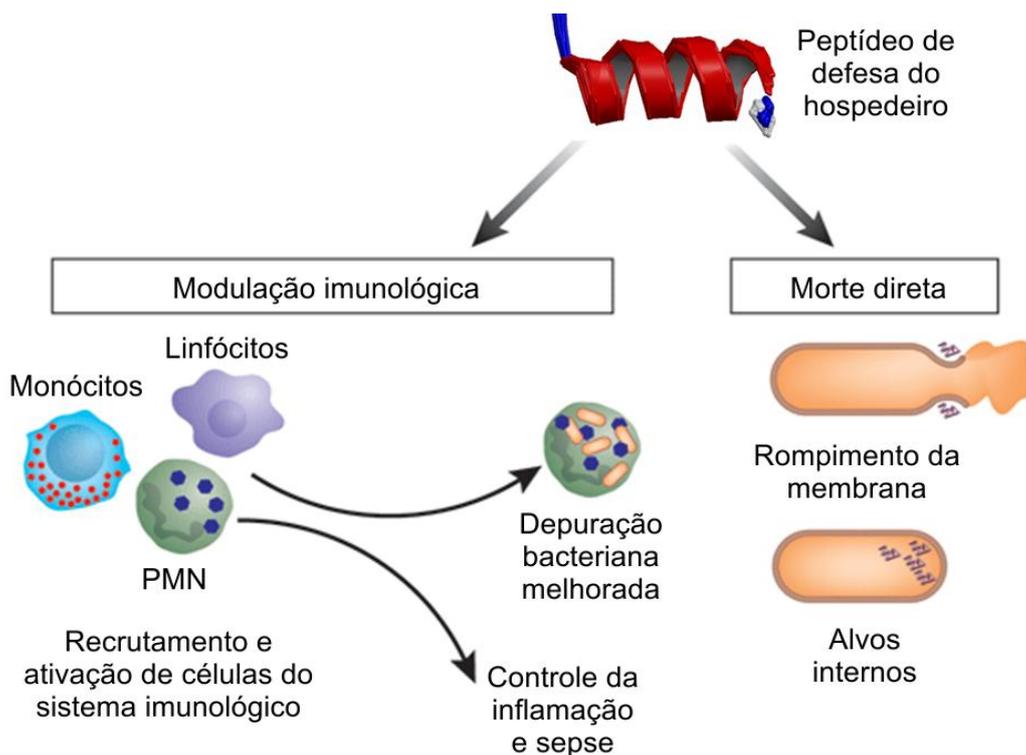
Tabela 3. Concentração inibitória mínima da clavânica A para diferentes estirpes bacterianas e fungos.

Patógeno	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	pH		
	5,5	6,5	7,0/7,4
Bactérias Gram negativas			
<i>Escherichia coli</i> ML-35p	-	2,3	-
<i>E. coli</i> mcr 106	-	1,7	-
<i>E. coli</i> BAS 849	-	0,4	-
<i>Salmonella typhimurium</i> 14028S	-	2,1	-
<i>S. typhimurium</i> 7953S	-	0,6	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2270	-	4,2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SBI-N	-	0,4	-
<i>P. aeruginosa</i> MR2123	-	0,4	-
<i>P. aeruginosa</i> MR3007	-	0,8	-
Bactérias Gram positivas			
<i>S. aureus</i> 930918-3	-	1,4	-
<i>S. aureus</i> 30371 (MRSA)	-	3,8	-
<i>S. aureus</i> 28841 (MRSA)	-	1,4	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CDC 21	-	1,1	-
<i>Enterococcus faecium</i> 94-132	-	0,2	-
<i>E. faecium</i>	-	0,4	-
<i>L. monocytogenes</i> EGD	-	0,2	-
<i>Micrococcus flavus</i>	-		13,07
<i>Lactobacillus sake</i>	1,6	17,6	-
Fungos			
<i>Candida albicans</i>	5,0		20,0

Com dois notáveis e distintos mecanismos de ação, a clavanina A distingue-se de muitos outros PAMs de ocorrência natural. No entanto, cabe ainda a realização de estudos complementares e mais detalhados sobre a ação *in vivo* deste peptídeo, além de estudos estruturais.

1.4 Peptídeos antimicrobianos com atividade imunomodulatória

Além de sua ação frente a microorganismos, os PAMs apresentam atividades relacionadas à imunidade inata e adaptativa (ação imunomodulatória) como, por exemplo, a indução ou a modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, quimiotaxia, apoptose, transcrição de genes, inibição da resposta inflamatória, recrutamento e estímulo da proliferação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T (Finlay & Hancock 2004; Bowdish *et al.*, 2005; Nijnik & Hancock, 2009), ativação e diferenciação de células dendríticas (Figura 5) (Biragyn *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2004).



*Adaptado de Hancock & Sahl, 2006.

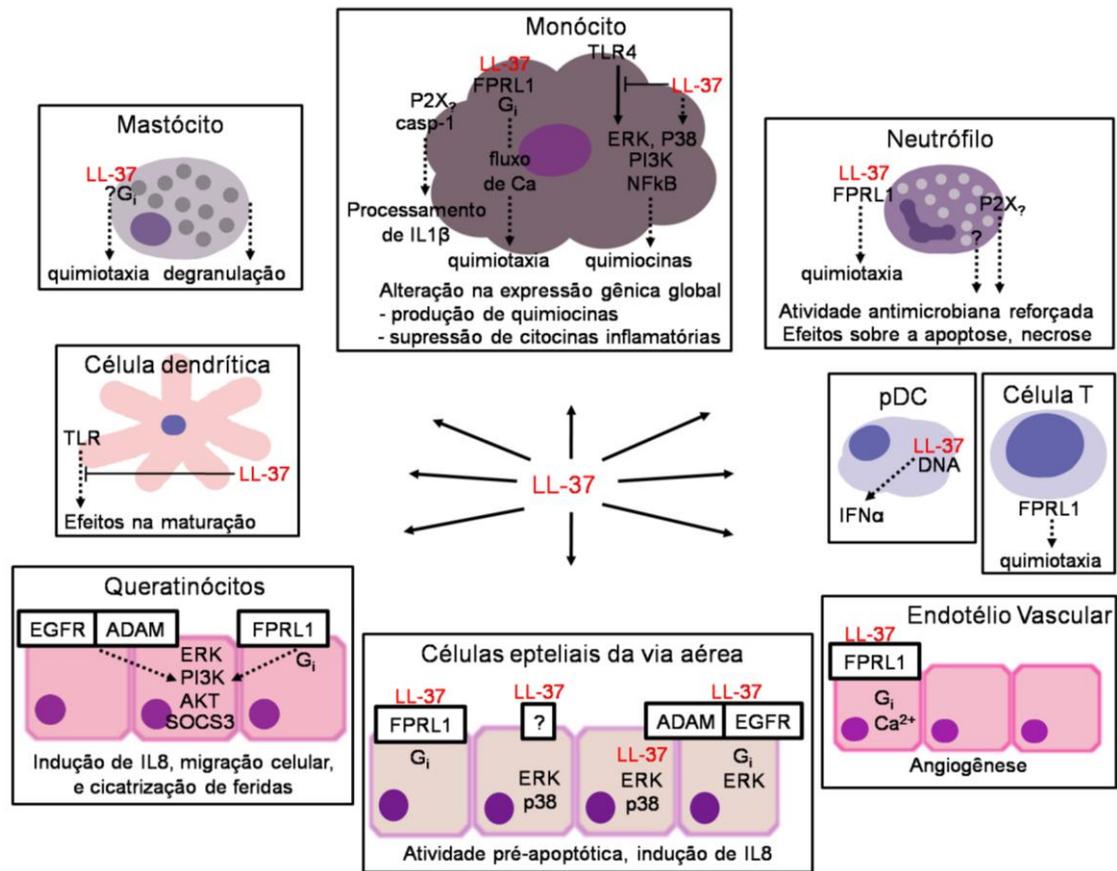
Figura 5. Visão geral do amplo espectro de ação dos peptídeos de defesa. Os peptídeos de defesa além de sua ação direta sobre os patógenos eles podem apresentar atividade antimicrobiana indireta, incluindo os efeitos imunomoduladores sobre a imunidade inata e adaptativa, embora apresentem essas duas atividades, certos peptídeos têm uma ou outra atividade preferencialmente.

Vários PAMs são encontrados no mesmo sitio de infecção, havendo assim um forte indício de que estes peptídeos agem em conjunto no combate a infecção (Auvynet & Rosenstein, 2009), e em alguns casos sua atividade parece sobrepor. Em experimentos com camundongos *knockout* para o gene que codifica a β -defensina-1 (mBD-1), esses animais apresentam capacidade reduzida para eliminar *Haemophilus influenzae* dos pulmões (Moser *et al.*, 2002) e em outro experimento com camundongos deficientes no gene que codifica LL-37, foi observado que esses animais são susceptíveis a infecção por *Streptococcus* do grupo A (Nizet *et al.*, 2001).

A catelicidina LL-37 (hCAP18), a qual é um peptídeo catiônico encontrado em humanos no epitélio bucal e na saliva, são derivados dos neutrófilos e das glândulas salivares (Murakami *et al.*, 2002). Além da atividade microbicida, a LL-37 apresenta importantes funções adicionais na defesa do hospedeiro,

incluindo propriedades quimiotáticas e modulação da resposta inflamatória, atraindo neutrófilos, monócitos, células T e mastócitos (Figura 6) (Zanetti, 2004; Bowdish *et al.*, 2005). Além da LL-37 outros peptídeos apresentam importante atividade sobre o sistema imune, onde estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos e monócitos, como é o caso das α -defensinas, HNP1-3 e β -defensinas hBD3 e hBD4, já os mastócitos são atraídos para o local da infecção pela LL-37, HNP1-3 e hBD2 (Davidson *et al.*, 2004). Além disso, hBD1 e hBD3 são quimiotáticos para células dendríticas imaturas e células T de memória, enquanto que α -defensinas humanas induzem seletivamente a migração de células humanas CD4⁺ CD45⁺ e CD8⁺ *naive* (Lai & Gallo, 2009).

Além de suas propriedades intrínsecas quimioatraentes, que promovam diretamente a locomoção e a chegada de diferentes grupos celulares até o local da lesão, os PAMs podem indiretamente favorecer a quimiotaxia induzindo ou aumentando a secreção de quimiocinas. A LL-37, por exemplo, induz a liberação de IL-8 por linhagens de células epiteliais pulmonares (Scott *et al.*, 2002; Tjabringa *et al.*, 2003), as defensinas humanas HNP1-3 também favorecem o recrutamento de neutrófilos através da indução da ativação e degranulação de mastócitos, aumentando o influxo de neutrófilos e estimulando a transcrição e produção de IL-8 por células epiteliais brônquicas (Echtenacher *et al.*, 1996; Malaviya *et al.*, 1996; Befus *et al.*, 1999; Niyonsaba *et al.*, 2001).



*Adaptado de Nijnik & Hancock, 2009.

Figura 6. Espectro de atividade da catelicidina LL-37. A LL-37 induz alterações na expressão gênica global dos monócitos, através da sinalização por p38, ERK, PI3K, e as vias de NF-κB, promovendo a expressão de quimiocinas e de outros genes envolvidos na comunicação celular. A LL-37 funciona como um quimioatraente direto para monócitos, neutrófilos, células T e mastócitos através do receptor FPRL1 e do receptor Gi-coupled. A LL-37 apresenta forte atividade anti-endotóxica, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias de monócitos em resposta ao LPS e, a maturação de células dendríticas derivadas de monócitos. Monócitos tratados com LL-37 modulam o processo de diferenciação de células dendríticas. Outras atividades da LL-37 incluem a promoção de funções antimicrobiana dos neutrófilos e mastócitos. A LL-37 suprime a apoptose das células epitelial e neutrófilo, através da ativação do FPRL1 ou P2X7. Nos queratinócitos, a LL-37 induz a expressão de IL-8, a migração e cicatrização de feridas. Em células epiteliais das vias aéreas, LL-37 ativa p38 e ERK induzindo a secreção de quimiocinas, mediado por receptores: FPRL1 das metaloproteases da família ADAM e EGFR, através da internalização de peptídeos ativos. LL-37 também promove a angiogênese, mediada pelo receptor FPRL1.

Outra característica interessante dos PAMs com atividade imunomodulatória é a capacidade de protegerem o hospedeiro contra

patógenos potencialmente nocivos através de sua atividade antimicrobiana e ação sobre a imunidade inata, ao mesmo tempo, que protegem o organismo contra os efeitos prejudiciais de uma resposta inflamatória excessiva (Auvynet & Rosenstein, 2009). As α -defensinas e β -defensinas induzem a liberação de histamina e prostaglandinas D₂ (Niyonsaba *et al.*, 2001). A HPN1-3 se liga a proteína C1q e ativa o sistema complemento através da via clássica (Prohaszka *et al.*, 1997), aumentando a produção de TNF- α e IL-1 β e diminuição da produção de IL-10 dos monócitos (Befus *et al.*, 1999; Chaly *et al.*, 2000; Niyonsaba *et al.*, 2001). Além disso, β -defensina-2 funciona como um ligante endógeno para o receptor *Toll-like* 4 (TLR-4), ativando células dendríticas imaturas, provocando uma forte resposta de células Th1 (Biragyn *et al.*, 2002). A LL-37 induz a liberação de IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-6 e do fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) pelos queratinócitos, e a liberação de TNF- α e IL-6 por células dendríticas imaturas (Davidson *et al.*, 2004; Braff *et al.*, 2005).

A LL-37 funciona como molécula antiinflamatória, protegendo camundongos e ratos após administração de uma dose letal de LPS (Scott *et al.*, 2002; Cirioni *et al.*, 2006). Além disso, a LL-37 inibe a expressão de moléculas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e a translocação nuclear de NF κ B p50/p65 induzida pelo TLR-2 e TLR-4 em resposta ao ácido lipóico e LPS, respectivamente (Mookherjee *et al.*, 2006). O fator antipolisacarídeo *Limulus* (LALF) é um peptídeo isolado do caranguejo-ferradura, apresenta atividade bactericida para bactérias Gram-negativas, sendo sua principal característica a capacidade de neutralizar o LPS (Vallespi *et al.*, 2000). Em estudos, *in vivo*, o LALF aumentou a sobrevivência de camundongos após administração de uma dose letal de *Pseudomonas aeruginosa*, que foi correlacionada com a diminuição da síntese de TNF- α e elevação sistêmica mRNA de IL-2, IL-12 e IL-13, no baço e no fígado (Vallespi *et al.*, 2000; Vallespi *et al.*, 2003).

Outros peptídeos com atividade imunomodulatória são as hepcidinas de tilápia 2 e 3 (TH2-3). As hepcidinas são peptídeos antimicrobianos ricos em cisteína, expresso predominantemente no fígado humano, no entanto, esses

peptídeos foram identificados em outros animais como camundongos e peixes (Park *et al.*, 2001). As hepcidinas 1-5 foram isoladas de tilápia (*Oreochromis mossambicus*), estes peptídeos apresentam forte atividade antimicrobiana (Huang *et al.*, 2007). Em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, as TH2-3, reduziram a secreção de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (Rajanbabu *et al.*, 2010). Os TH2-3 inibem a secreção de TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias através da regulação dos genes COX-2 e PDE4D, por mecanismos dependentes de pERK1/2.

Na figura 7 podem ser encontrados alguns PAMs com atividade imunomodulatória.

Nome	Organismo	Estrutura	Sequência
Mastoporan-X	<i>Vespa lewisii</i>		INWKGIAAMAKLLX
Magainina-2	<i>Xenopus laevis</i>		GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNSX
Foulicidina	<i>Gallus domesticus</i>		KRFWPLVPVAINTVAAGINLYKAIRRK
LL-37	Mamíferos		LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES

Figura 7. Peptídeos antimicrobianos com atividade imunomodulatória.

Os PAMs são moléculas de grande relevância para a indústria farmacológica, biotecnológica e alimentícia. Uma vez que há uma grande demanda por novos antibióticos no mercado mundial, como insumo para a biopreservação de alimentos. Um interesse maior tem sido a utilização dos PAMs para produção de novos fármacos que venham a substituir os antibióticos convencionais, uma vez que os mesmos se mostram ineficazes devido ao surgimento de cepas multi-resistentes, além disso, inúmeros trabalhos têm demonstrado que a utilização de PAMs em combinação com antibióticos convencionais para obtenção de um efeito sinérgico aumentou a atividade antibacteriana e dificultou o desenvolvimento da resistência aos

mesmos (Darveau *et al.*, 1991; Giacometti *et al.*, 2000; Fehri *et al.*, 2007). Além disso, muitos PAMs mostram especificidade para procariontes com baixa toxicidade para as células eucarióticas (Fehri *et al.*, 2007). Esta é uma característica que tem favorecido a sua investigação e exploração como potenciais novos antibióticos.

2 JUSTIFICATIVA

A busca por novos antibióticos tem se tornado mais intensa nas últimas décadas, como resposta aos relatos cada vez mais frequentes de patógenos multi-resistentes, ou pelos efeitos colaterais apresentados pelos antibióticos hoje disponíveis no mercado. Apesar do notável aumento nos esforços para se buscar novas drogas, o número de antibióticos descobertos nos últimos anos é baixo, tornando-se necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas para o tratamento de infecções bacterianas. A pesquisa por novas substâncias com atividade antimicrobiana à partir de fontes naturais é de grande importância. Dentre essas moléculas, os peptídeos se destacam, por apresentarem naturalmente atividade antimicrobiana. Outra característica que tem chamado à atenção para estas moléculas é a atividade imunomodulatória apresentada por alguns desses peptídeos. Tal atividade é de grande importância, uma vez que a descoberta de novos compostos com atividade imunomodulatória abre a possibilidade de aplicações terapêuticas numa variedade de distúrbios, tais como neoplasias, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes e imunodeficiências. Visando o desenvolvimento de terapias alternativas no combate a IrAS e sepse, uma vez que essas patologias são a principal causa de morte em UTI's, no presente trabalho avaliamos a atividade de dois peptídeos antimicrobianos em um modelo experimental de ferida operatória infectada por *S. aureus* e em um outro experimento avaliamos a ação destes peptídeos em um modelo de sepse polimicrobiana experimental. Os peptídeos antimicrobianos vêm se mostrando bons candidatos para o tratamento das IrAS, e os dados aqui obtidos indicam que estes peptídeos com dupla atividade, são candidatos potenciais para o desenvolvimento de novas terapias eficazes no tratamento das IrAS e da sepse.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho apresentou como objetivo avaliar o potencial antibacteriano de duas formas de clavanina *in vitro* e a atividade imunomodulatória *in vitro* utilizando a linhagem de monócitos RAW 264.7. Bem como *in vivo*, em um modelo experimental de ferida operatória e em um modelo experimental de sepse polimicrobiana.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* das diferentes formas de clavaninas.
2. Avaliar o efeito hemolítico das diferentes formas de clavaninas.
3. Avaliar o potencial imunomodulatório *in vitro* através da avaliação da produção de TNF, IL-12, IL-10 e NO em linhagem de células RAW 264.7 tratadas com as diferentes formas de clavaninas.
4. Avaliar o efeito das diferentes formas de clavaninas sobre a migração de leucócitos para a cavidade intraperitoneal.
5. Avaliar o possível efeito genotóxico das diferentes formas de clavaninas pelo ensaio de micronúcleo.
6. Avaliar o potencial terapêutico das diferentes formas de clavaninas em camundongos portadores de infecção da ferida operatória por *S. aureus*.
7. Avaliar o efeito das diferentes formas de clavaninas com potencial ação antimicrobiana na sobrevida de camundongos submetidos à sepse polimicrobiana grave.

4 MATERIAL & METÓDOS

4.1 Considerações éticas

Os ensaios *in vivo* foram realizados junto ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da UnB, e do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco, sendo desenvolvidos após aprovação dos protocolos experimentais pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB nº 0177-07 (ANEXO 1). Foram adotados os Princípios Éticos em Experimentação Animal, recomendados pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), instituição filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*, e respeitados os preceitos apresentados pela Legislação Brasileira de Animais de Experimentação, Lei nº 11.794, de 09 de outubro de 2008.

4.2 Obtenção da clavanina MO

No presente trabalho, utilizamos a clavanina A e uma modificação deste peptídeo denominado clavanina MO. A clavanina MO é uma modificação da clavanina A, através da adição de cinco resíduos de aminoácidos apolares na região C-terminal do peptídeo (FLPII VFQFL GKIIH HVGNF VHGFS HVF-NH₂). Esta pequena sequência foi obtida após comparação com peptídeos descritos na literatura com atividade imunomodulatória.

4.3 Síntese de peptídeos

A sequência dos peptídeos utilizados no presente estudo encontra-se na tabela 4. Os peptídeos foram sintetizados pela Shanghai Hanhong Chemical Co., LTD., República Popular da China, segundo o método de síntese em fase sólida através da estratégia F-moc (Hirata et al., 1994). Os peptídeos foram

purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RT-HPLC). A massa molecular e a pureza dos peptídeos sintetizados foram confirmadas por espectrometria de massas MALDI-TOF. Em seguida os peptídeos foram liofilizados, acondicionados em tubos cônicos e enviados para o Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília. Todos os peptídeos sintetizados apresentaram pureza superior a 97% para serem empregados em ensaios biológicos. Os peptídeos foram diluídos em H₂O (5 mM solução estoque), e armazenados a -20 °C, até o uso.

Tabela 4. Sequência de peptídeos utilizados no presente estudo.

Peptídeos	Sequência	Massa molecular (Da)
Clavanina A	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHF	2667.10
Clavanina MO	FLPIIFQLGKIIHHVGNFVHGFSHF	3250.90
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	4493.33

4.3.1 Quantificação dos Peptídeos

Os peptídeos foram quantificados pela absorção UV a 215 e 220 nm, utilizando a seguinte fórmula de concentração mg.mL⁻¹ = (A 215-A 225) × 0,144 (Waddell, 1956).

4.4 Ensaios *in vitro*

4.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos antimicrobianos foi avaliada pelo ensaio modificado de inibição do crescimento por microdiluição em caldo, de acordo com o NCCLS (*National Committee for*

Clinical Laboratory Standards) (NCCLS, 2003). Foi determinado o MIC para as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* ATCC8739 *Klebsiella pneumoniae* e da gram-positiva *S. aureus* ATCC 25923. Cinquenta microlitros de meio Mueller-Hinton (Himedia – Índia) contendo 10^5 células/mL na metade da fase logarítmica de crescimento foram adicionados aos poços de uma placa contendo 50 µL de diluições seriadas de clavanina A e clavanina MO (600 a 4,68 µM), ampicilina (344,65 a 43,08 µM). Após 24 horas de incubação, a 37 °C, em um leitor de microplaca com incubação (Bio-Tek PowerWave HT - USA), o crescimento bacteriano foi avaliado pela determinação da absorbância a 595 nm. A menor concentração que inibiu 100% do crescimento bacteriano foi considerada a concentração inibitória mínima (MIC).

4.4.2 Avaliação da atividade hemolítica

O ensaio para determinar a atividade hemolítica foi realizado de acordo com o Bignami (1993). As células foram separadas do plasma por sedimentação e preparada a 1% (v/v) da suspensão de eritrócitos de sangue humano (lavado três vezes com NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4). As frações foram ressuspensas em 50 µL do tampão salino e adicionados a tubos de polietileno com 50 µL da solução de hemácias. Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 minutos. Uma porção de 100 µL de cada sobrenadante será transferida para uma placa multi-poços e realizada a leitura em 550 nm em um leitor de ELISA (Bio-Tek PowerWave HT - USA). As amostras de referência serão empregadas utilizando 1% (v/v) da suspensão de eritrócitos incubada com 0,1 % (v/v) de Triton X-100 como controle negativo e 1% (v/v) da suspensão de eritrócito com solução salina como controle positivo.

4.4.3 Avaliação do potencial imunomodulatório das clavaninas 'A' e 'MO'

Para avaliação do potencial imunomodulatório dos peptídeos (clavanina A e MO) foi utilizada uma linhagem celular de monócitos RAW 264.7, derivadas de tumores induzidos em camundongos machos BALB/c infectados com o vírus da leucemia murina de Abelson. As células RAW 264.7 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (CR108). As mesmas foram mantidas em meio de cultura DMEM (Gibco – EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL) em estufa contendo CO₂, a 37°C, em atmosfera úmida. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e as passagens foram realizadas sempre que as culturas atingiram 80% de confluência.

4.4.4 Grupos experimentais

A viabilidade celular e as propriedades imunomodulatórias foram avaliadas, após a exposição das células aos seguintes tratamentos:

Grupo I: ausência de tratamento

Grupo II: clavanina A

Grupo III: clavanina MO

Grupo IV: LL-37 (controle)

4.4.5 Concentrações utilizadas

Para avaliação do potencial imunomodulatório das clavaninas 'A' e 'MO', os grupos 2, 3 e 4 foram avaliados em um estudo piloto prévio nas seguintes concentrações:

Grupo II: 95,98; 47,99; 24; 12; 6; 3; 1,5 e 0,75 µM.

Grupo III: 78,75; 39,4; 19,7; 9,8; 4,9; 2,45; 1,22 e 0,61 μM .

Grupo IV: 57,0; 28,5; 14,2; 7,1; 3,55; 1,77; 0,88 e 0,44 μM .

4.4.6 Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT

Para avaliar a viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 de monócitos, nos tempos 24, 48 e 72 horas dos diferentes grupos, utilizamos o ensaio colorimétrico MTT (Sigma - USA). As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL em meio DMEM-s (volume final de 200 μL por poço), as mesmas foram incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas. Após cada período, 155 μL do sobrenadante foi removido, e acrescentado 10 μL de MTT ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)/poço. As placas foram incubadas por 3 horas. Após esse período, a reação foi bloqueada com 60 μL /poço de solução isopropanol-HCl 0,04M, homogeneizadas para completa solubilização do conteúdo celular e a absorbância determinada em leitor de ELISA a 575 nm (Bio-Tek PowerWave HT - USA). A viabilidade celular nos grupos experimentais foi expressa em porcentagem após subtração da absorbância do meio de cultura e comparada ao grupo controle negativo, representado pela cultura celular em solução de lise (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA e 0.1% triton X-100) (Kurien & Scofield, 2006).

4.4.7 Obtenção dos antígenos bacterianos

No ensaio para avaliação da produção de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-12) e de NO, utilizamos a linhagem de células RAW 264.7 na presença de IFN- γ e antígenos bacterianos de *E. coli* e *S. aureus*. Os antígenos foram obtidos como descrito a seguir. As culturas bacterianas foram obtidas conforme descrito no item 4.4.1. O número de bactérias foi obtido pelo grau de absorbância de luz (1 D.O. = 8×10^8 células/mL). Após a quantificação, as bactérias foram centrifugadas a 1500 x g, a 4 °C, por 10 minutos e ressuspendidas em PBS pH 7,4. Essas foram levadas a autoclave até que a temperatura atingisse 100 °C;

ali permaneceram por 10 minutos (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002). Após a morte dos microorganismos, os frascos foram mantidos sob refrigeração a 4°C, até o uso. Os antígenos bacterianos foram utilizados na concentração de 5×10^5 UFC/mL, nos experimentos de mensuração da produção para a TNF- α , IL-12, IL-10, e NO.

4.4.8 Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-12)

A produção de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-12), do sobrenadante das culturas de células RAW 264.7, após incubação com antígenos de *S. aureus* e *E. coli* (5×10^5 UFC/mL), com e sem IFN- γ (10 ng.mL^{-1}) (Peprtech - EUA) recombinante, além dos peptídeos em estudo. Em seguida, as placas foram incubadas por 24h (TNF- α , IL-12) e 72h para (IL-10) em estufa a 37° C, com 5% de CO₂. As concentrações de TNF- α , IL-10 e IL-12 no sobrenadante das culturas foram determinadas pelo método de ELISA, de acordo com as especificações do fabricante (Peprtech - EUA). Os níveis de citocinas foram expressos em picogramas por mililitro (pg.mL^{-1}).

4.4.9 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico foi verificada no sobrenadante da cultura, segundo as mesmas condições experimentais estabelecidas para verificação da dosagem de IL-10. Após o período de incubação das placas contendo as culturas celulares, o sobrenadante da cultura foi recolhido e avaliado para a presença de NO. A produção de nitritos nos sobrenadantes das culturas foi avaliada pelo método de Green *et al.* (1982), com algumas adaptações. Resumidamente, 100 μL dos sobrenadantes de cultura foram colocados em placas de 96 poços (TPP – EUA), acrescidos de 100 μL de DMEM (Gibco – EUA), nos poços em branco e nos poços da curva padrão. Em seguida, adicionou-se 100 μL de uma mistura de sulfanilamida a 1 %, em ácido fosfórico 2,5%, e naftiletilenodiamina 1%, em ácido fosfórico 2,5 %, na proporção de 1:1.

Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, procedeu-se a leitura em leitor de ELISA (Bio-Tek PowerWave HT - USA) a 540 nm. A quantidade de nitrito foi calculada, usando-se uma curva padrão de nitrito de sódio (200 µM a 1,5625 µM).

4.5 Ensaios *in vivo*

4.5.1 Animais

Para realização dos ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL/6, com 6 a 8 semanas e peso médio de 30 g. Os animais utilizados nos experimentos de infecção de ferida operatória foram adquiridos do biotério da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto – USP/RP e mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB. Os animais utilizados nos experimentos para avaliar a migração de neutrófilos para a cavidade intraperitoneal e avaliação dos peptídeos na sobrevida de camundongos submetidos à sepse polimicrobiana grave, foram provenientes do biotério da Universidade Católica Dom Bosco. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, controlada entre 22-24 °C, *timer* programado para 12h de iluminação diária, alimentação e água *ad libitum*, com troca diária de maravalha.

4.5.1.1 Desenho experimental

A. Para a avaliação da migração de leucócitos e genotoxicidade, os animais foram separados randomicamente em grupos de 6 animais cada de acordo como o tratamento a ser recebido:

Grupo I. Tratado com 10 µg.mL⁻¹ de clavanina A.

Grupo II. Tratado com 30 µg.mL⁻¹ de clavanina A.

Grupo III. Tratado com 90 µg.mL⁻¹ de clavanina A.

Grupo IV. Tratado com excipiente (xarope simples – Lab. Caiçara, Brasil).

Grupo V. Tratado com PBS.

B. Para os experimentos de ferida operatória os animais foram separados randomicamente em grupos de 6 animais cada, de acordo como o tratamento a ser recebido:

Grupo I. Infectado e tratado com clavanina A.

Grupo II. Infectado e tratado com clavanina MO.

Grupo III. Infectado e tratado com sulfato de neomicina bacitracina zincica (Multilab, Brasil).

Grupo IV. Infectado e tratado com excipiente (gel natrosol – Manipulatum, Brasil).

Grupo V. Infectado e tratado com PBS.

C. Para a avaliação do modelo experimental de sepse polimicrobiana grave os animais foram separados randomicamente em grupos de 5 animais cada de acordo como o tratamento a ser recebido:

Grupo I. Infectado e tratado com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clavanina A.

Grupo II. Infectado e tratado com $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clavanina A.

Grupo III. Infectado e tratado com $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clavanina A.

Grupo IV. Infectado e tratado com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clavanina MO.

Grupo V. Infectado e tratado com $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clavanina MO.

Grupo VI. Infectado e tratado com $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clavanina MO.

Grupo VII. Infectado e tratado com excipiente (xarope simples – Lab. Caiçara, Brasil).

Grupo VIII. Infectado e tratado com PBS.

4.5.2 Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal

Os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de cetamina 10% (80mg/Kg) (Agener União – Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) (Agener União – Brasil) administrado via intraperitoneal. Posteriormente, os animais foram tratados conforme o item 4.5.1.1 A.

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada 6 horas após o tratamento. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, posteriormente a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS/ EDTA K3 (5%). À partir do exudato, foram feitas a contagem total e diferencial das células presentes.

4.5.2.1 Contagem total de leucócitos

A contagem total de células foi realizada em contador automático de células (Coulter) e expressa como nº de células x 10⁶/ mL.

4.5.2.2 Contagem diferencial de leucócitos

Após os animais serem tratados com os peptídeos, fez-se a contagem diferencial a partir dos exudatos obtidos 6 horas e preparados em centrífuga (Cytospin 4; Shandon) e corados em corante panótico rápido (Diff Quik). As células foram examinadas em microscópio óptico, sendo contadas 200 células por lâmina, diferenciando-se três tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares. A quantidade de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi calculada pela percentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtidas na contagem total. Os resultados foram expressos como nº de cada tipo celular x 10⁶/ mL.

4.5.3 Avaliação da genotoxicidade (teste de micronúcleos)

O teste de micronúcleos foi realizado a partir de esfregaços de sangue periférico e aspirado de medula óssea de camundongos submetidos a teste experimentais (4.5.2). O sangue colhido (24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento) foi gotejado sobre uma lâmina para ser realizado o esfregaço, com secagem do material por 12 horas e coloração com Giemsa. Para a avaliação do potencial genotóxico, a frequência de micronúcleos em eritrócitos foi avaliada pela contagem 2000 células por animal, conforme HEDLLE (1991). A confecção das lâminas e a contagem forão realizadas pelo procedimento duplo-cego, as lâminas forão examinadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E-200), em objetiva de imersão (1000x).

4.5.4 Preparo dos microorganismos

Uma colônia de *S. aureus* ATCC 25923 (microorganismo utilizada no modelo experimental de ferida operatória) e colônias de *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 25122 (microorganismos utilizadas no modelo experimental de sepse polimicrobiana), provenientes de cultura previamente inoculada em camundongos, foram incubadas em 10 mL meio de infusão de coração e cérebro (Himedia – Índia), por 24 horas, a 37 °C, sob agitação, a 220 rpm. Após esse período, todo o conteúdo foi centrifugado a 1000 x g, por 5 minutos. O sedimento foi coletado e levado três vezes em PBS (pH 7,2). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspendido em 5 mL de PBS e o número de células por mL dessa solução foi determinado por O.D., e mantidas no gelo até o uso.

4.5.5 Modelo experimental de ferida operatória

4.5.5.1 Indução da lesão e infecção dos camundongos com *S. aureus*

Os camundongos foram previamente anestesiados como descrito no item 4.5.2. Procedeu-se a assepsia e anti-sepsia do local cirúrgico, uma lesão

subcutânea com 1 cm de extensão foi realizada no dorso do animal. Uma suspensão bacteriana de 10^5 células/mL de *S. aureus* (item 4.5.2) foi aplicada sobre a área da lesão. Os animais foram, então, mantidos individualmente em gaiolas, a fim de proteger as lesões contra mordidas/lambidas de outros animais.

4.5.5.2 Tratamento

Os camundongos portadores de infecção da ferida operatória por *S. aureus*, foram tratados com clavanina A e MO (37,5 μ M**) e sulfato de neomicina bacitracina zincica (5 mg/g). Os peptídeos foram previamente incorporados ao veículo (gel natrosol). O tratamento dos grupos teve início um dia após os animais terem sido inoculados com *S. aureus* e foram realizados durante 15 dias, sendo os tratamentos administrados a cada 24 horas.

**A concentração utilizada teve como base o MIC para *S. aureus*.

4.5.5.3 Análise histopatológica

Ao fim do tratamento todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e a pele dorsal foi removida assepticamente e fixada em solução de formol 10% tamponado e preparados de acordo com as técnicas de rotina para embebição em parafina. Cortes histológicos foram realizados e os mesmos corados por hematoxilina e eosina, seguido pela observação em microscopia de luz.

4.5.6 Modelo de sepse experimental

No presente trabalho utilizamos o modelo de sepse polimicrobiana letal, com a inoculação intraperitoneal de bactérias Gram positivas e Gram

negativas. Os camundongos foram anestesiados conforme o item 4.5.2, sendo em seguida inoculadas intraperitonealmente, 10 μL ($1,15 \times 10^{12}$ UFC/mL). Os animais foram observados quanto à sobrevivência até o sétimo dia. Após o sétimo dia, os animais sobreviventes foram eutanasiados.

4.7 Análises estatísticas

Os resultados foram representados pela média \pm desvio padrão. Foram utilizados, *two-way* ANOVA para avaliar a significância dos resultados obtidos no modelo murino de ferida cirúrgica, e *one-way* ANOVA para dosagem de citocinas, ambos seguidos pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Para a comparação do tempo de sobrevivência dos animais foi utilizado a curva de sobrevivência de KAPLAN-MEIER. Os resultados obtidos para viabilidade celular foram analisados utilizando o teste *t* de *Student*. As análises foram realizadas utilizando o software Bioestat versão 5.0 e o GraphPad PRISMA® versão 5.0. Os resultados foram considerados significativos, quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Estudos *in vitro*

5.1 Verificação da pureza dos peptídeos

Com o objetivo de confirmar a pureza dos peptídeos, e assim assegurar a eficácia dos ensaios biológicos. A pureza dos peptídeos sintéticos foi confirmada por espectrometria de massa. Os espectros obtidos (Anexo 1) indicaram um excelente grau de pureza (>97%) para todos os peptídeos, demonstrando massas moleculares de 2667.1 Da (clavanina A), 3250.9 Da (clavanina MO) e 4493.3 Da (LL-37), bem como menores contaminantes, não sendo, portanto, necessária a purificação dos mesmos.

5.1.1 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* das clavaninas A e MO

A fim de confirmar a atividade da clavanina A sintética, e investigarmos se o peptídeo modificado (Clavanina MO) possui atividade antibacteriana, ambos os peptídeos foram avaliados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados demonstraram que não houve crescimento de *E. coli* quando tratada com 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de clavanina A (95,98 μM) e MO (78,75 μM). O controle positivo utilizado neste experimento (cloranfenicol), quando administrado 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (99,07 μM), inibiu em 100 % o crescimento bacteriano (Figura 8).

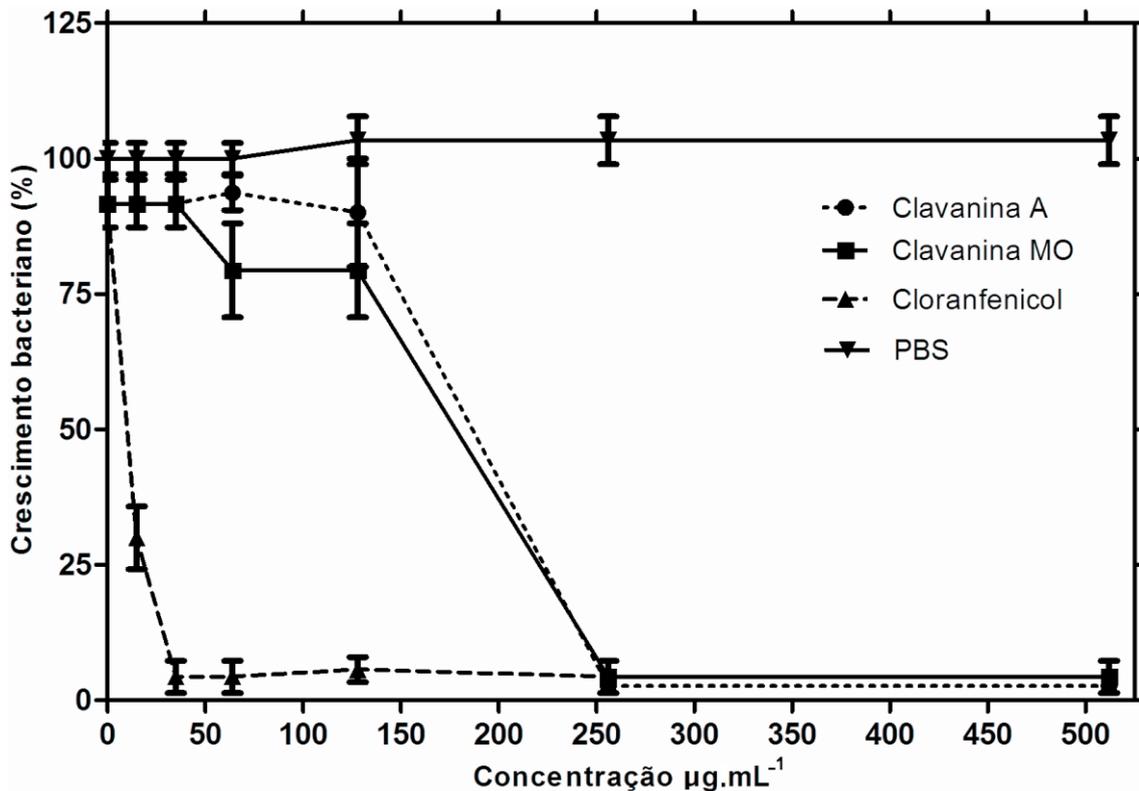


Figura 8. Avaliação da atividade antibacteriana. *Escherichia coli* foi cultivada na presença de diferentes concentrações das clavanina A (círculo) e MO (quadrado). A cultura bacteriana em PBS representa um crescimento de 100%. Cloranfenicol foi utilizado como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm DP).

Avaliou-se também a atividade antibacteriana das clavaninas A e MO sobre o crescimento de *K. pneumoniae* (Figura 9). Como pode ser visto não houve crescimento deste microorganismo quando tratado com 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (95,98 μM) de clavanina A e com 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (39,4 μM) de clavanina MO. Semelhante ao que ocorreu no ensaio anterior frente a *E. coli*, cloranfenicol inibiu em 100% o crescimento bacteriano quando administrado a uma concentração de 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (99,07 μM).

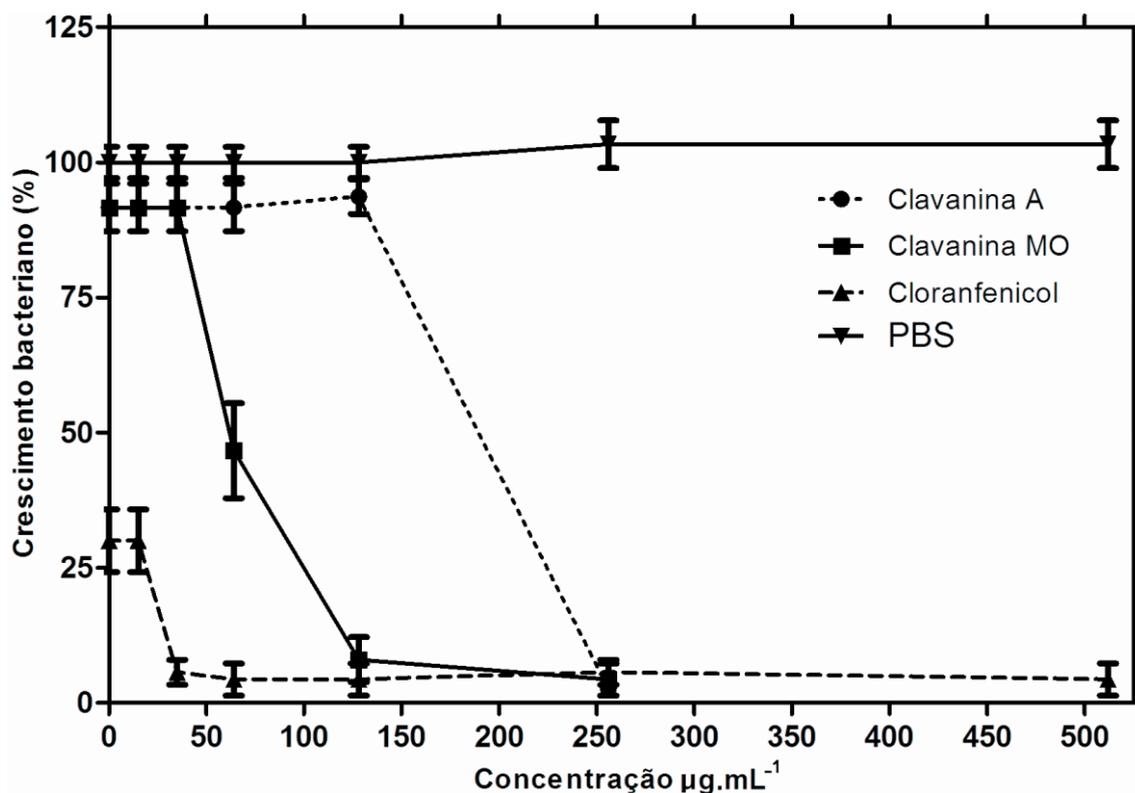


Figura 9. Avaliação da atividade antibacteriana. *Klebsiella pneumoniae* foi cultivada na presença de diferentes concentrações das clavanina A (círculo) e MO (quadrado). A cultura bacteriana em PBS representa um crescimento de 100%. Cloranfenicol foi utilizado como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média ± DP).

Na figura 10, estão apresentados os dados da avaliação da atividade antibacteriana das clavaninas A e MO sobre *S. aureus*. Como pode ser observado, não houve crescimento deste microorganismo quando desafiado com 512 µg.mL⁻¹ (192,0 µM) de clavanina A e 256 µg.mL⁻¹ (78,75 µM) de clavanina MO. A cultura bacteriana tratada com cloranfenicol foi inibida em 100% quando administrada a 64 µg.mL⁻¹ (198,14 µM).

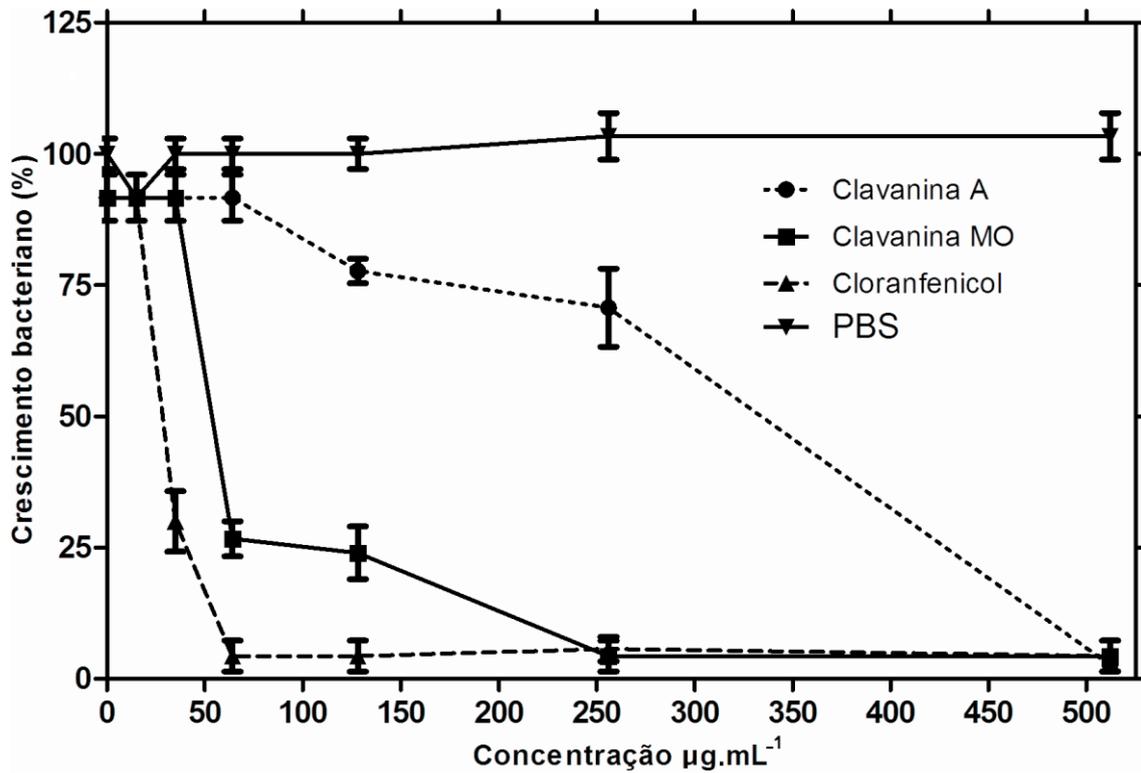


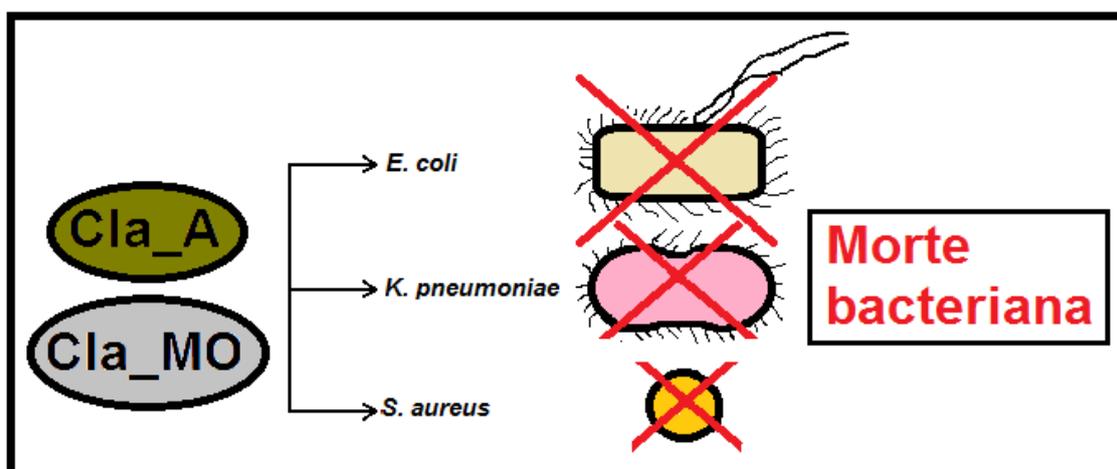
Figura 10. Avaliação da atividade antibacteriana. *Staphylococcus aureus* foi cultivada na presença de diferentes concentrações das clavanina A (círculo) e MO (quadrado). A cultura bacteriana em PBS representa um crescimento de 100%. Cloranfenicol (Sigma-Aldrich) foi utilizado como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm DP).

Adicionalmente as curvas de inibição, as MICs dos peptídeos estudados contra todas as bactérias avaliadas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Efeito da clavanina A e MO sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positiva patogênicas humanas.

Microorganismos	Composto (μM)		
	Clavanina A	Clavanina MO	Cloranfenicol
<i>Escherichia coli</i>	95,98	78,75	99,07
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	95,98	39,40	99,07
<i>Staphylococcus aureus</i>	192,00	78,75	198,14

Conclusão experimental 1: As clavaninas A e MO foram eficazes na inibição do crescimento *in vitro* de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*.



5.2 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica de peptídeos foi analisada contra hemácias humanas. Neste experimentos e nos subseqüentes, utilizamos com controle positivo a catelecidina humana LL-37, um peptideo multifuncional de defesa do hospedeiro, sendo essencial para a resposta imune à lesão e infecção dos tecidos. A LL-37 é um potente peptídeo com atuação sobre diferentes microrganismos, com a capacidade de prevenir os efeitos imunoestimuladores

de moléculas da parede bacteriana, como lipopolissacarídeos, além de proteger contra a endotoxemia letal. Além da função quimiotática, inibição da apoptose de neutrófilos, estimulação da angiogênese, regeneração de tecidos e liberação de citocinas (Bucki *et al.*, 2010).

Como pode ser observado na figura 11, a clavanina A e LL-37 não apresentaram atividade hemolítica, mesmo em uma concentração de 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (191,96 e 113,97 μM respectivamente), enquanto 45% de hemólise foi observado para a clavanina MO em uma concentração de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (39,4 μM), sendo que esta porcentagem foi mantida até as concentrações subsequentes.

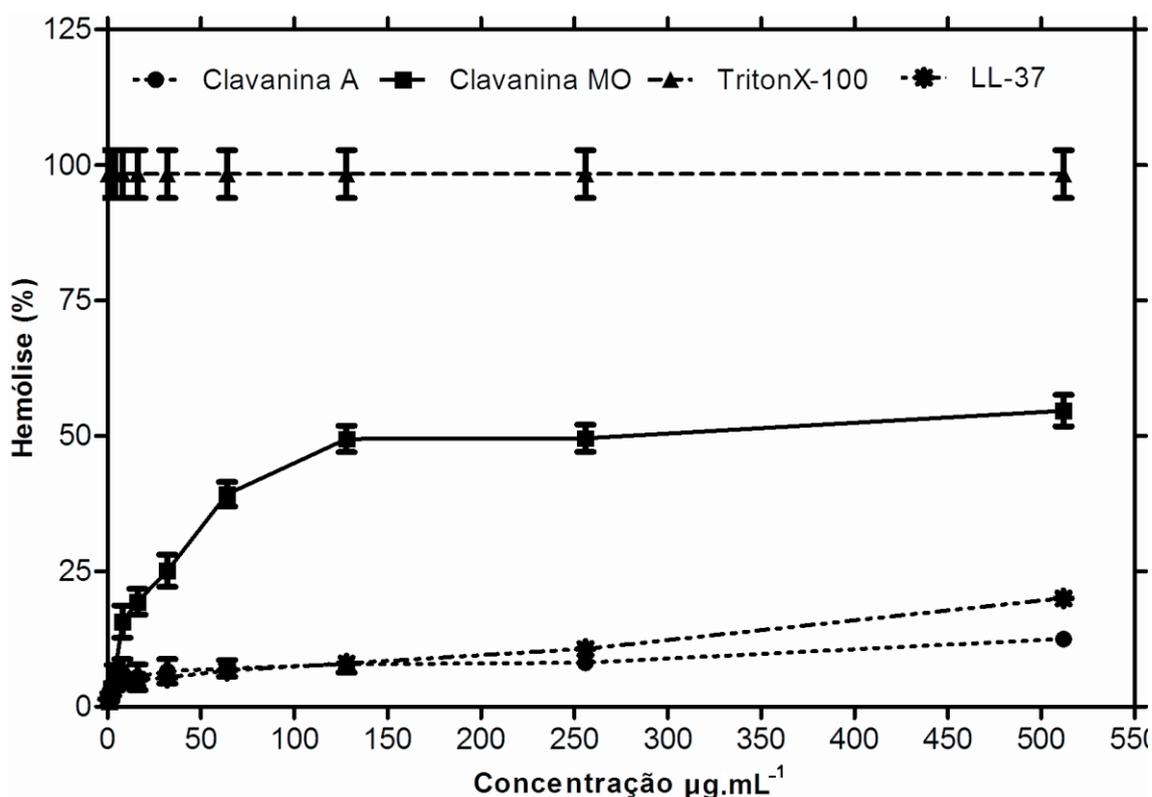
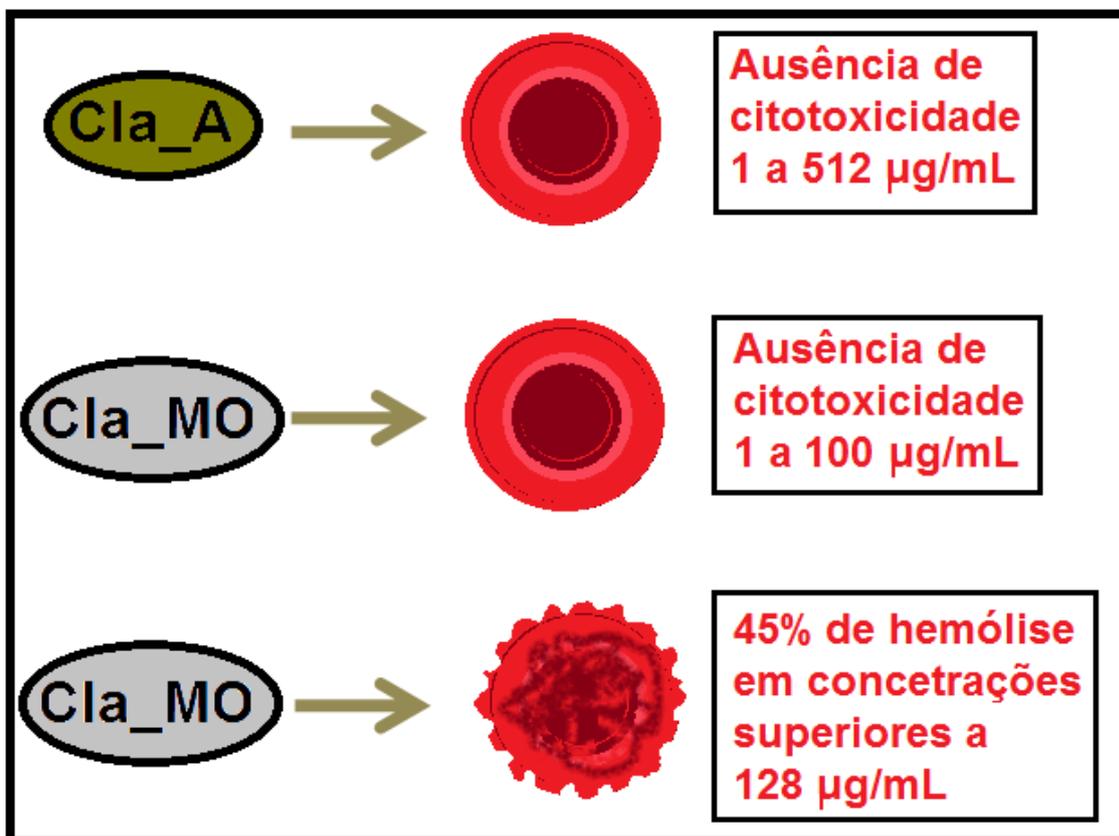


Figura 11. Avaliação dos efeitos hemolíticos da clavanina A (círculo), clavanina MO (quadrado) e LL-37 (asterisco) sobre eritrócitos humanos. 0,1 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) serviu como controle positivo (100% de hemólise). A liberação de hemoglobina foi medida a λ 550 nm e expressa como % de hemólise. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm DP).

Conclusão experimental 2: As clavaininas não foram citotóxicas nas concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (clavainina MO) e de 1 a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (clavainina A).



5.3 Avaliação do potencial imunomodulatório das clavaininas 'A' e 'MO'

5.3.1 Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT

Para avaliarmos a possível atividade imunomodulatória das clavaininas A e MO, foram utilizadas células RAW 264.7, monócitos murinos derivados de tumores induzidos em camundongos machos BALB/c infectados com o vírus da leucemia murina de Abelson (Abelson & Rabstein, 1970). Estas células possuem receptores para imunoglobulinas, respondem de forma similar aos macrófagos obtidos de camundongos, além de serem alvos de ativação por polissacarídeos (Ramamoorthy & Tizard, 1998). Para avaliar possíveis efeitos citotóxicos das clavaininas A e MO sobre células RAW 264.7, a redução do

brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio (MTT) foi avaliada após incubação com os peptídeos por 24, 48 e 72 horas. Como controle para detecção da citotoxicidade, uma solução de lise celular (10 mM Tris, pH 7.4; 1 mM EDTA e 0,1% Triton X-100) e a catelecidina LL-37 (8-64 μ M) como controle negativo foram utilizados. As figuras representam a percentagem da viabilidade/proliferação celular em relação ao controle (células com meio suplementado), cuja absorbância foi considerada 100% de viabilidade/proliferação celular.

A LL-37 (Figura 12) e as clavaninas A (Figura 13) e MO (Figura 14) não apresentaram efeito citotóxico para as células, mesmo nas concentrações mais elevadas. É possível observar um decréscimo significativo na viabilidade/proliferação celular após 24 horas, em todos os tratamentos e em todas as concentrações utilizadas, contudo variações maiores são encontradas nas células tratadas com a clavanina MO, nas maiores concentrações. Quando a clavanina MO nas concentrações de 39,38; 78,75 e 157,5 μ M foram utilizadas após 72 horas, uma redução na viabilidade/proliferação celular para 20%, o que em primeira análise indicaria um efeito tóxico desse peptídeo, contudo ao analisarmos os tempos anteriores vemos que nas concentrações de 39,38 e 78,75 μ M a cultura apresenta 180% de viabilidade/proliferação celular (Figura 14), 1,8 vezes mais que o controle (células com meio suplementado). Além disso, uma viabilidade/proliferação celular de 130% foi observada quando as células foram tratadas com 157,5 μ M da clavanina MO (Figura 14), 1,4 vezes mais que o controle (células com meio suplementado).

As células tratadas com a LL-37 e clavanina A também apresentaram resultados semelhantes aos observados para a clavanina MO. Contudo, seus níveis de viabilidade/proliferação celular não foram tão altos, conseqüentemente este efeito não chegou em níveis abaixo dos 40% como observados para a clavanina MO. Contudo observa-se certa semelhança entre a cultura tratada com a LL-37 e com a clavanina A (Figuras 12 e 13, respectivamente), mesmo em baixas concentrações (1,77 μ M da LL-37 e 3 μ M da clavanina A): as células tratadas com esses peptídeos apresentam viabilidade/proliferação celular superior a 110%. Quando comparado o grupo

tratado com clavanina MO e com os grupos tratados com clavanina A e LL-37, em 48 e 72 horas, observou-se uma diferença significativa entre esses grupos ($p < 0,05$). Os dados aqui obtidos sugerem que as clavaninas A e MO não apresentam citotoxicidade para as células RAW 264.7.

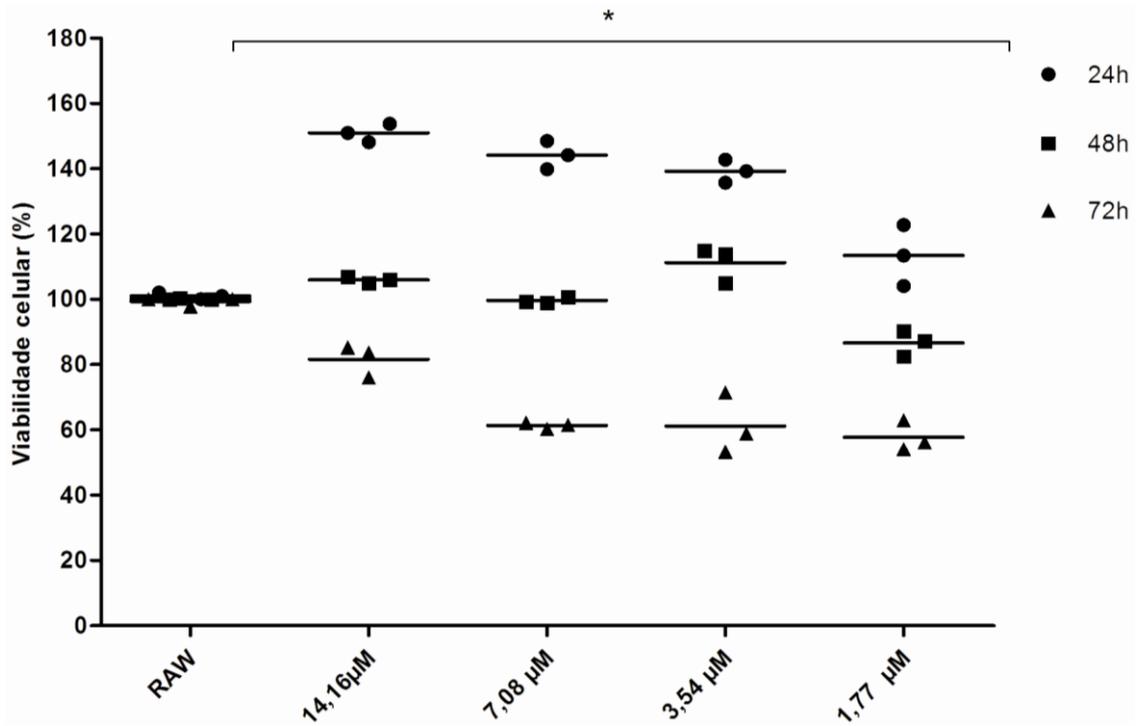


Figura 12. Efeito da LL-37 sobre a viabilidade de células RAW 264.7. Os peptídeos foram diluídos de 1,77 a 14,16 µM. As células foram incubadas durante 24 horas (círculos), 48 horas (quadrado) e 72 horas (triângulo), a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. *, $p < 0,05$ como significativo em relação ao controle.

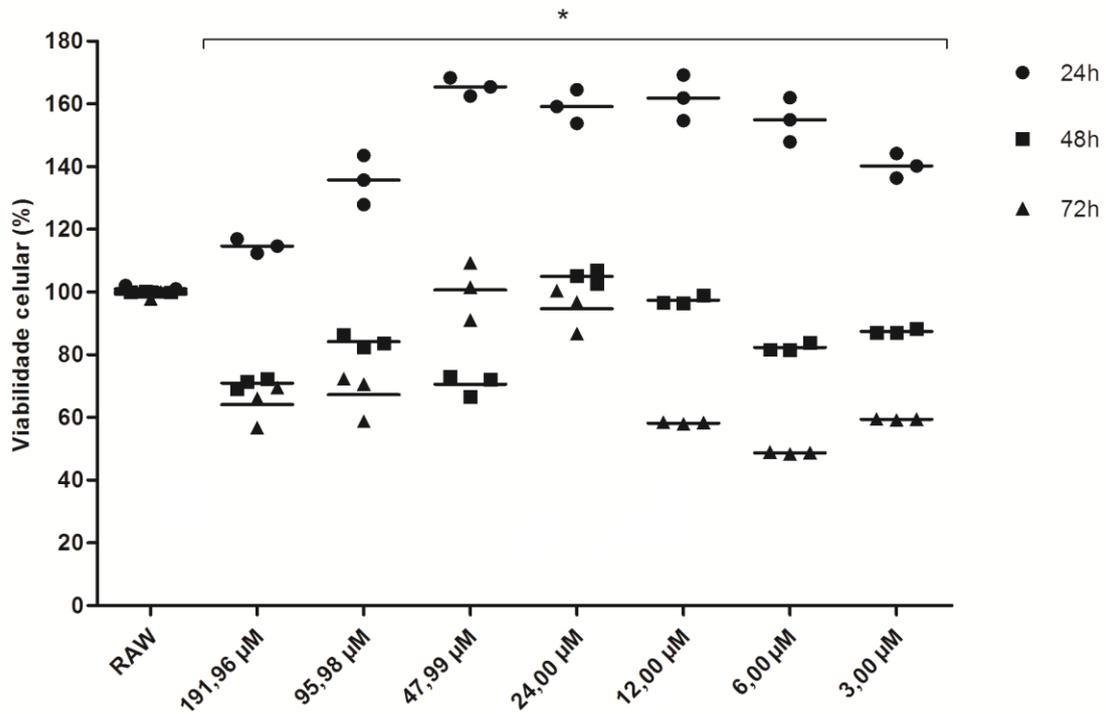


Figura 13. Efeito da Clavanina A sobre a viabilidade de células RAW 264.7. Os peptídeos foram diluídos de 3 a 191,96 µM. As células foram incubadas durante 24 horas (círculos), 48 horas (quadrado) e 72 horas (triângulo), a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. *, p<0,05 como significativo em relação ao controle.

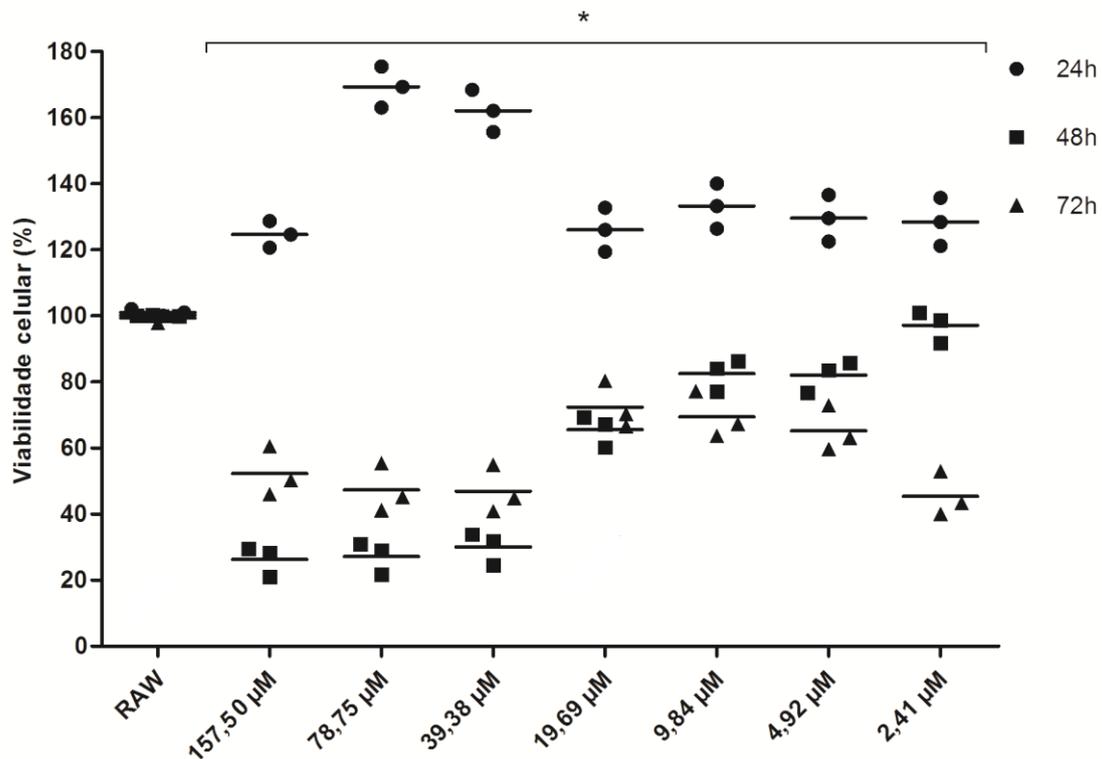
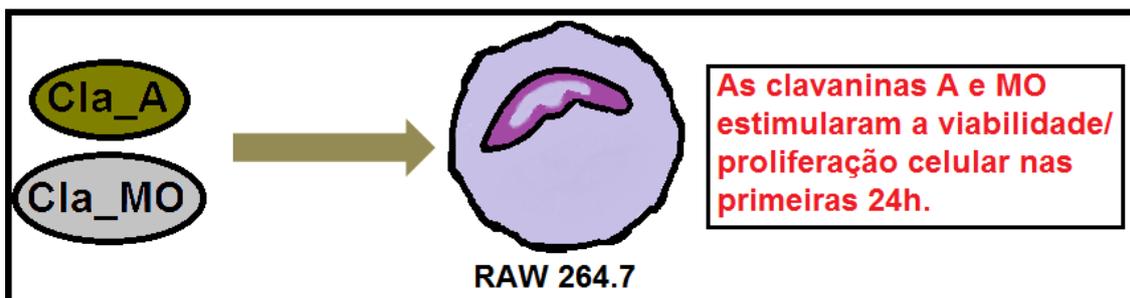


Figura 14. Efeito da Clavanina MO sobre a viabilidade de células RAW 264.7. Os peptídeos foram diluídos de 2,41 a 157,5 µM. As células foram incubadas durante 24 horas (círculos), 48 horas (quadrado) e 72 horas (triângulo), a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. *, p<0,05 como significativo em relação ao controle.

Conclusão experimental 3: As clavaninas A e MO estimularam a viabilidade/proliferação de células RAW 264.7.



5.3.2 Dosagem de citocinas em linhagem de células RAW 264.7

No presente trabalho, também foram avaliados os efeitos das clavaninas A e MO sobre a secreção de TNF- α , IL-10 e IL-12 por células RAW 264.7, estimulados ou não por antígenos bacterianos (*E. coli* e *S. aureus*) e IFN- γ . Como controle, utilizamos a LL-37, um peptídeo de conhecida ação sobre diferentes tipos de células do sistema imune, modulando a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios por diferentes tipos celulares.

O tratamento com os peptídeos modificou o padrão de secreção de TNF- α pelas células RAW 264.7. A Figura 15, demonstra que houve aumento significativo na secreção desta citocina pelas células RAW 264.7 não estimuladas e tratadas com clavanina A, clavanina MO (5 μ M) e LL-37 (\pm 2.480 pg.mL^{-1}). Por outro lado, as células tratadas com 2,4 μ M de clavanina MO não produziram TNF- α (Figura 15).

Os grupos celulares estimuladas com antígeno de *E. coli* tratados com clavanina A e MO (2,4 μ M) e LL-37 produziram concentrações de TNF- α , próximas aquelas produzidas pelo controle (\pm 2.500 pg.mL^{-1}) (Figura 15). Os grupos tratados com 5 μ M de clavanina MO, as concentrações de TNF- α foram indetectáveis (Figura 15). As células estimuladas com antígeno de *E. coli* e IFN- γ e tratadas com clavaninas A e MO (5 μ M) e LL-37 não tiveram os níveis de TNF- α detectáveis (Figura 15). Um padrão de secreção de citocinas similar ao observado anteriormente, foi visto no sobrenadante das células estimuladas com antígeno de *S. aureus*, onde não foi possível a quantificação de TNF- α no sobrenadante.

Quando estimuladas com antígeno de *S. aureus* e IFN- γ e tratadas com clavanina A e LL-37, apresentaram secreção de TNF- α , significativamente superior ao grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 15). Enquanto o grupo controle e as células tratadas com clavanina MO não secretaram TNF- α para o meio (Figura 15).

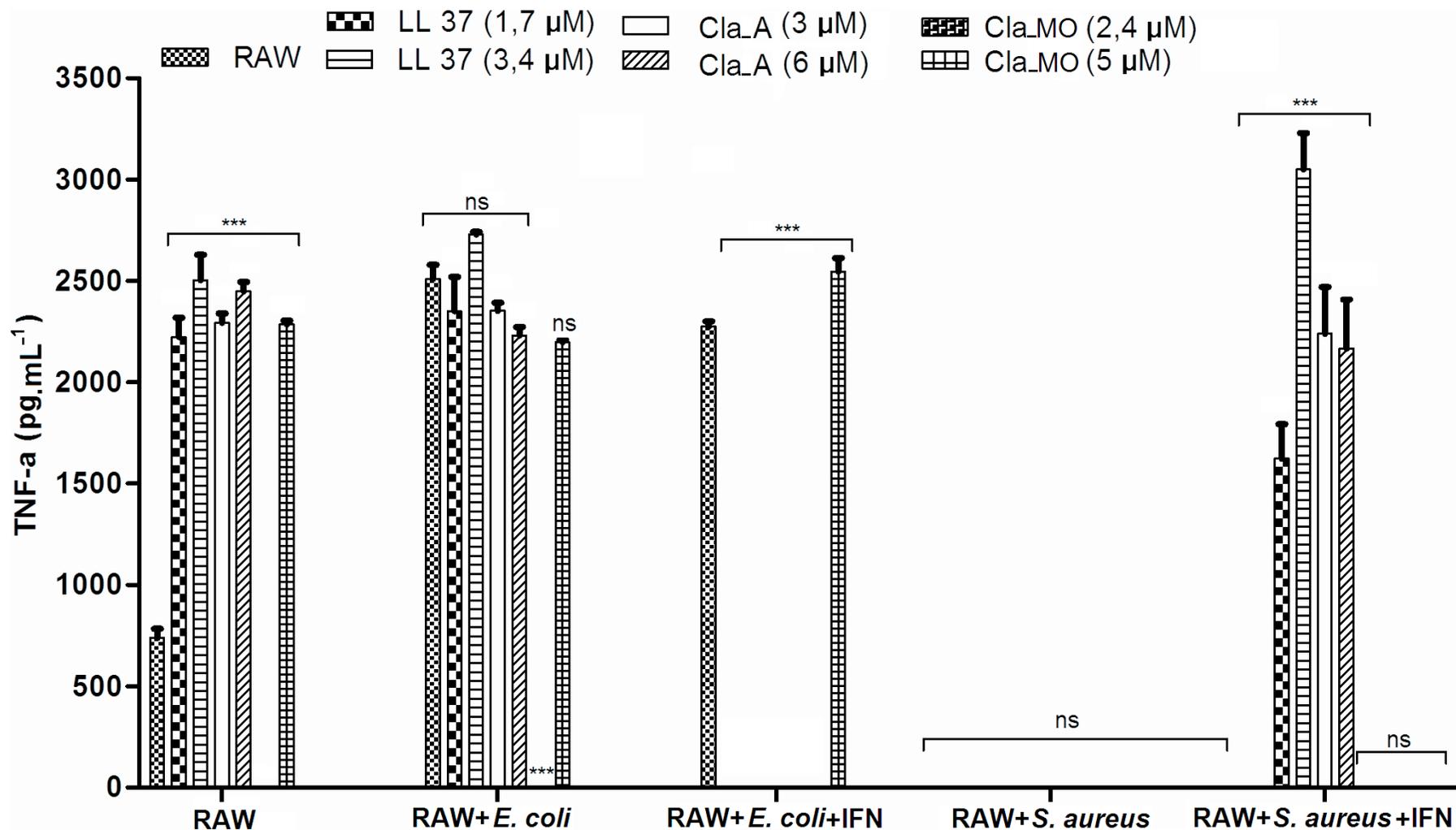


Figura 15. Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultura de células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 24 horas com clavina A (3 e 6 μ M), clavina MO (2,4 e 5 μ M) e LL-37 (1,7 e 3,4 μ M), na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, com ou sem IFN- γ (10 ng.mL^{-1}). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, não significativo em relação ao controle.

O tratamento com os peptídeos modificou o padrão de secreção de IL-10 pelas células RAW 264.7. A Figura 16, demonstra que houve aumento significativo na secreção desta citocina pelas células RAW 264.7 não estimuladas e tratadas com clavanina A, clavanina MO e LL-37 (3,4 μM) (± 250 ; 360 e 200 pg.mL^{-1} respectivamente). Enquanto que as células tratadas com 1,7 μM de LL-37 não secretaram concentrações detectáveis de IL-10 α (Figura 16). Um padrão de secreção de citocinas similar ao observado anteriormente, foi visto no sobrenadante das células estimuladas com antígeno de *S. aureus* e IFN- γ , onde todos os grupos secretaram concentrações superiores de IL-10 (± 600 pg/mL) que aquelas secretadas pelo grupo controle (± 56 pg.mL^{-1}), ou seja, onze vezes maior (Figura 16). Ainda neste mesmo grupo a clavanina MO (2,4 μM) estimulou as células RAW 264.7 a secretarem ± 1.350 pg/mL de IL-10, vinte e quatro vezes mais que o grupo controle e duas vezes mais que os demais grupos.

As células estimuladas com antígeno de *E. coli* e tratadas com clavaninas A (6 μM) e MO e LL-37 reduziram a secreção de IL-10 (Figura 16). O grupo tratado com 3 μM de clavanina estimulou a secreção desta citocina (357 pg.mL^{-1}), quando comparado ao grupo controle (282 pg.mL^{-1}) (Figura 16). O grupo de células estimuladas com antígeno de *E. coli* e IFN- γ e tratadas com clavaninas A (6 μM) e MO e LL-37 (1,7 μM) produziram concentrações de IL-10 secretadas para o meio, superiores aquelas produzidas pelo controle (± 100 pg/mL) (Figura 16), sendo que o grupo tratado com clavanina MO (2,4 μM) produziu ± 1320 pg.mL^{-1} . O grupo tratado com LL-37 (3,4 μM) reduziu a secreção de IL-10 para o meio (Figura 16).

Os dados apresentados na Figura 16 demonstram que as células estimuladas com antígeno de *S. aureus* e tratadas com LL-37 e clavanina A estimularam a secreção de IL-10 (Figura 16). Enquanto o grupo de células tratadas com clavanina MO secretou concentrações de IL-10 próximos ao secretado pelo grupo controle (± 70 pg.mL^{-1}) (Figura 16).

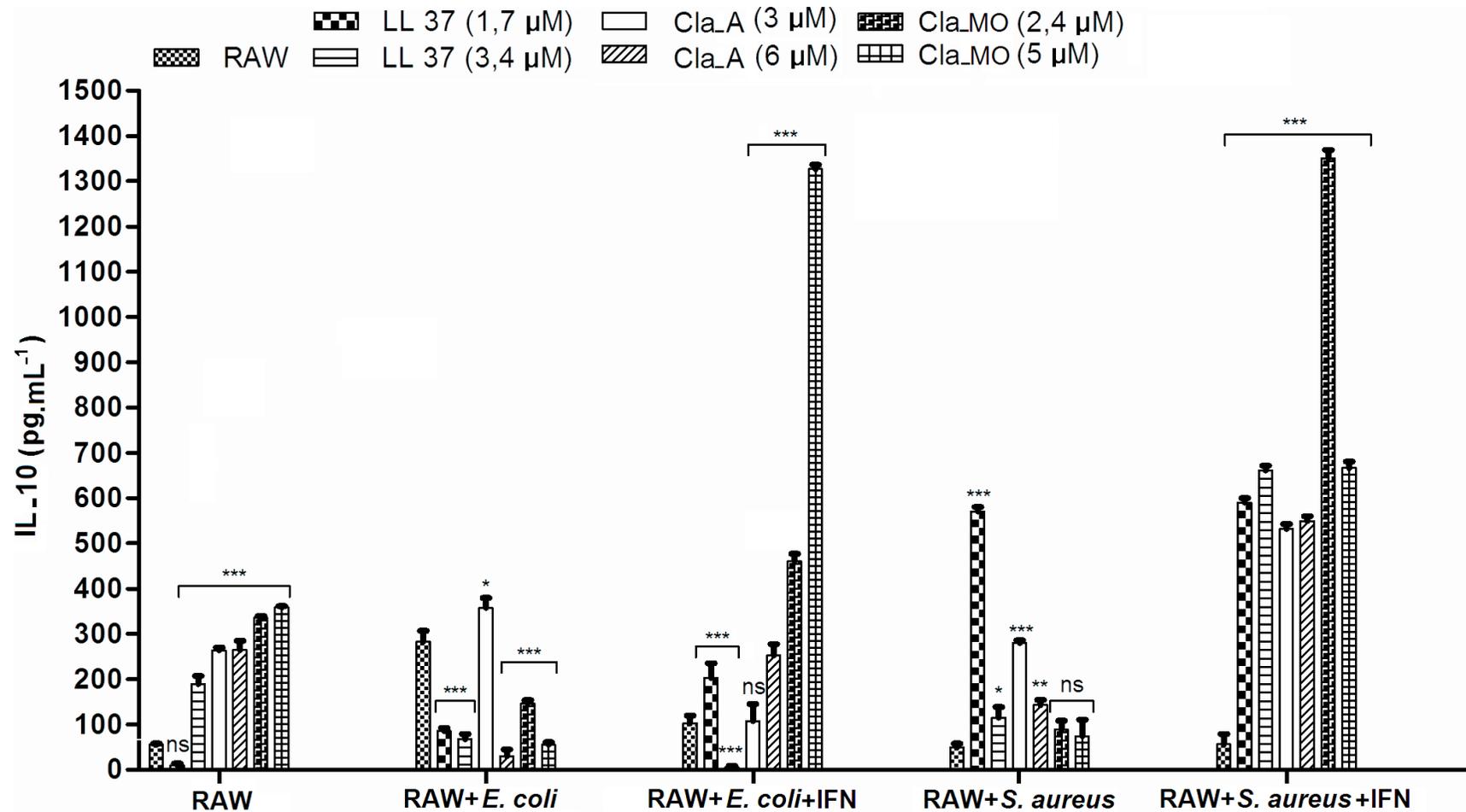


Figura 16. Dosagem de IL-10 em sobrenadante de cultura células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 72 horas com clavanina A (3 e 6 μM), clavnina MO (2,4 e 5 μM) e LL-37 (1,7 e 3,4 μM), na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, com ou sem IFN- γ (10 ng.mL^{-1}). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, não significativo em relação ao controle.

Como podem ser observadas na Figura 17, as clavaninas A e MO alteraram a produção de IL-12 pelas células RAW 264.7. Nas células não estimuladas e tratadas com 3 μM de clavanina A, apenas pequenas quantidades de IL-12 foram quantificadas, apresentando valores equivalentes ao controle ($\pm 20 \text{ pg.mL}^{-1}$) (células apenas com meio suplementado). Enquanto que as células tratadas com 6 μM de clavanina A produziram duas vezes mais IL-12 que o controle ($\pm 40 \text{ pg.mL}^{-1}$). As células tratadas com clavanina MO por sua vez estimularam a secreção de quantidades significativas de IL-12 ($\pm 80 \text{ pg.mL}^{-1}$ – 2,4 μM e $\pm 130 \text{ pg.mL}^{-1}$ – 5 μM), dose dependente, produzindo concentrações superiores aquelas produzidas pelas células tratadas com LL-37 ($\pm 80 \text{ pg/mL}$ – 1,7 μM e $\pm 110 \text{ pg.mL}^{-1}$ – 3,4 μM).

As células estimuladas com antígeno de *E. coli* tratadas com LL-37 (3,4 μM), clavanina A (3 μM) e clavanina MO (2,4 μM) reduziram as concentrações de IL-12 secretadas para o meio, quando comparado com o controle (células com meio suplementado) (Figura 17). Nas demais concentrações, os peptídeos não afetaram as concentrações de IL-12.

Os dados apresentados na Figura 17 mostram que quando as células foram estimuladas com antígeno de *E. coli* e IFN- γ e tratadas com os peptídeos, a secreção de IL-12, foi inferior aquelas concentrações produzidas pelo grupo controle (células com meio suplementado), havendo uma menor produção nos grupos tratados com as menores concentrações de clavanina A e MO (3,0 e 2,4 μM respectivamente) ($\pm 45 \text{ pg.mL}^{-1}$), valores esses quatro vezes inferiores ao grupo controle ($\pm 175 \text{ pg.mL}^{-1}$). Por outro lado, as células estimuladas com antígeno de *S. aureus* tratadas com clavanina A e MO e LL-37 (3,4 μM) produziram concentrações de IL-12, próximas aquelas produzidas pelo controle ($\pm 70 \text{ pg.mL}^{-1}$) (Figura 17). Mas quando tratada com 1,7 μM de LL-37, as células produziram $\pm 120 \text{ pg.mL}^{-1}$ de IL-12 (Figura 17). As células estimuladas com antígeno de *S. aureus* e IFN- γ tratadas com clavanina A e MO (2,4 μM) produziram concentrações de IL-12, inferiores ($\pm 50 \text{ pg.mL}^{-1}$) a aquelas produzidas pelo controle ($\pm 100 \text{ pg.mL}^{-1}$) (Figura 17). No entanto, quando as células foram tratadas com LL-37, estas produziram $\pm 140 \text{ pg.mL}^{-1}$ de IL-12 (Figura 17).

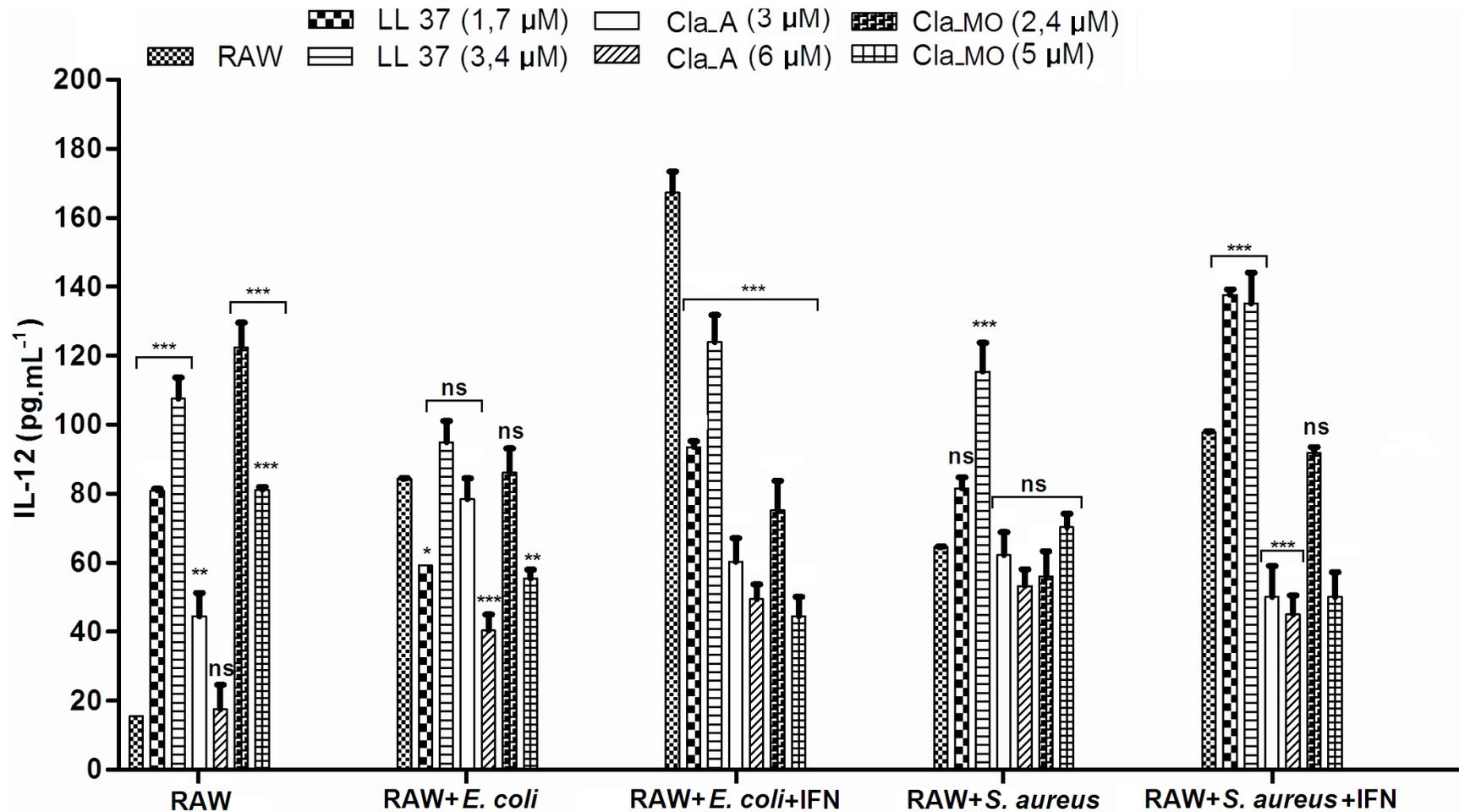


Figura 17. Dosagem de IL-12 em sobrenadante de células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 24 horas com clavanina A (3 e 6 μM), clavnina MO (2,4 e 5 μM) e LL-37 (1,7 e 3,4 μM), na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, com ou sem IFN- γ (10 ng.mL^{-1}). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $P < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, não significativo em relação ao controle.

5.3.3 Avaliação da produção de óxido nítrico por células RAW 264.7 tratadas com peptídeos antimicrobianos

Foi também avaliado o impacto das clavaninas A e MO e da LL-37 sobre a capacidade de células RAW 264.7 tratadas somente com estes peptídeos ou com antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, na presença ou não de TNF- α , na produção de óxido nítrico. Como pode ser observado na Figura 18, após 72 horas, as células tratadas com os peptídeos, secretaram baixas concentrações de NO para o meio, em todas as concentrações e tratamentos ($p < 0,001$).

Como esperado, as estimuladas pelos antígenos bacterianos de *E. coli* e *S. aureus* produziram quantidades maiores de NO que as não-estimuladas, sendo que a adição de IFN- γ fez com que esta células secretassem concentrações ainda maiores de NO para o meio (Figura 18).

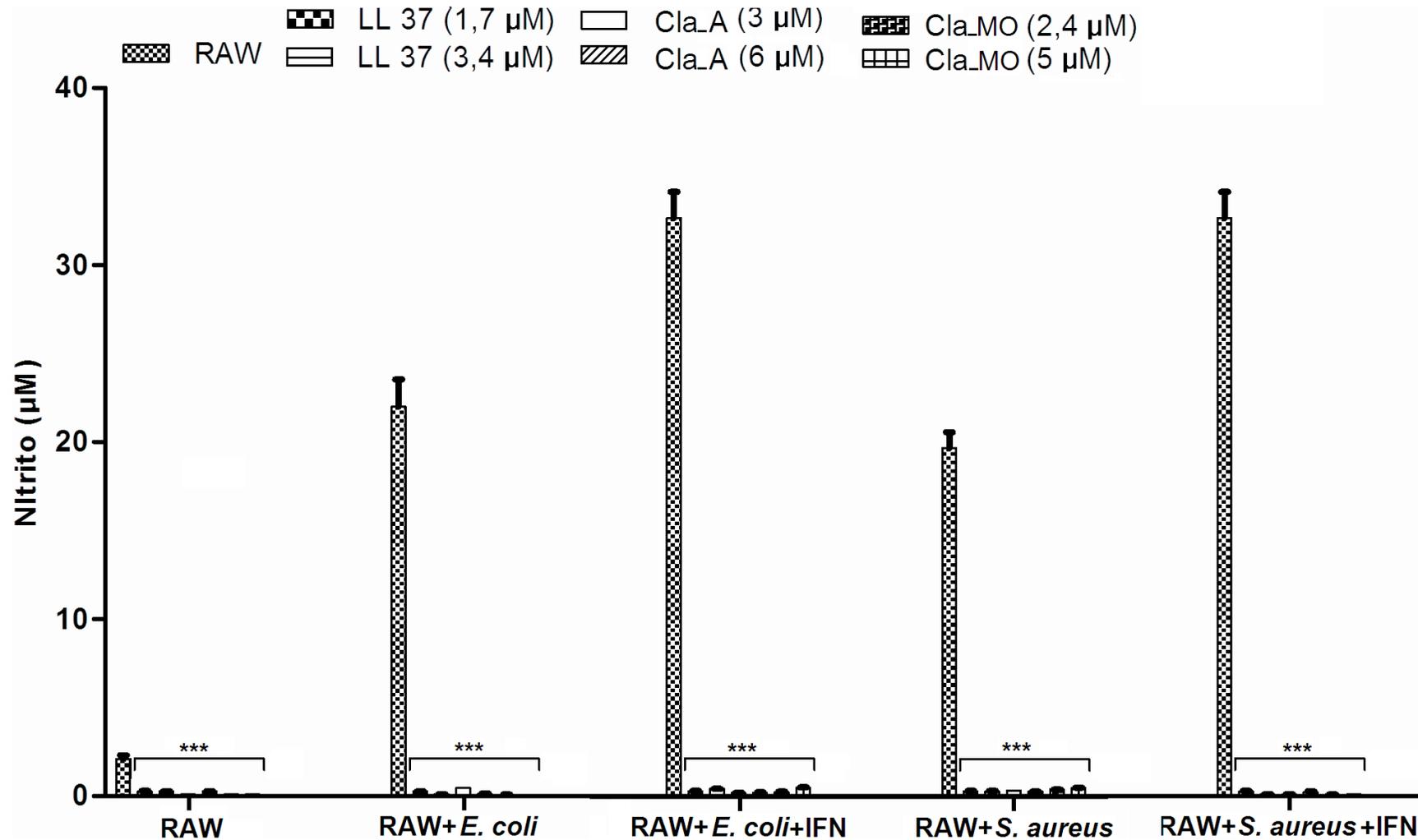
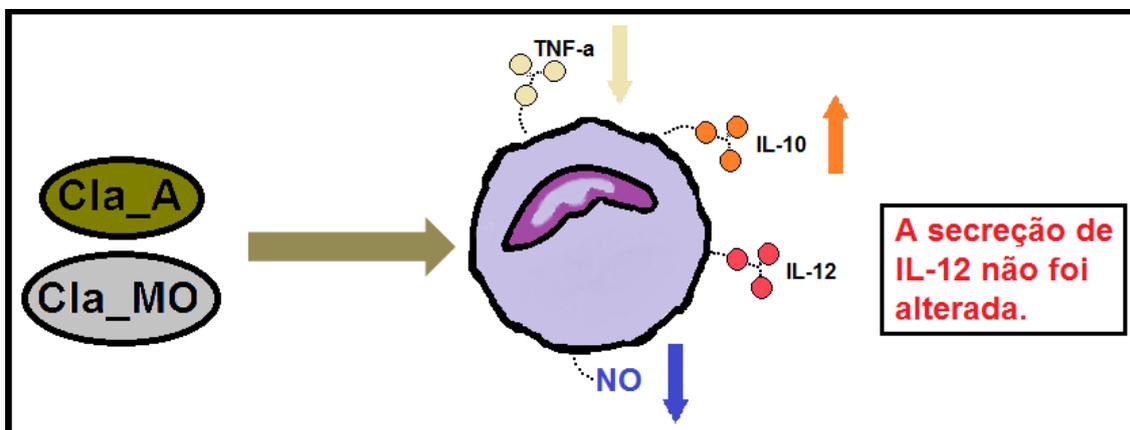


Figura 18. Participação das clavanas A e MO e da LL-37 na produção de NO por células RAW 264.7. As células foram estimuladas por 72 horas com clavantina A (3 e 6 µM), clavantina MO (2,4 e 5 µM) e LL-37 (1,7 e 3,4 µM), na presença ou ausência de antígeno bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*, com ou sem IFN- γ (10 ng.mL⁻¹). Os dados representam a média de três experimentos realizados em triplicata, sendo expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $P < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, não significativo em relação ao controle.

Conclusão experimental 4: As clavaninas A e MO estimularam a secreção de IL-10 e inibiram/não alteraram os níveis de NO, TNF- α e IL-12 pelas células RAW 264.7.



Estudos *in vivo*

5.4 Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal

Neste experimento avaliamos o potencial das clavaninas A e MO de induzir a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6. Os animais tratados com as clavaninas A e MO (10 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) induziram um aumento significativo na migração de leucócitos ($p < 0,05$) para a cavidade peritoneal destes animais (Figura 19). A clavanina MO na concentração de 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não apresentou diferença significativa na migração de leucócitos (Figura 19). Note que não houve diferença estatística entre os grupos tratados com clavanina A e clavanina MO.

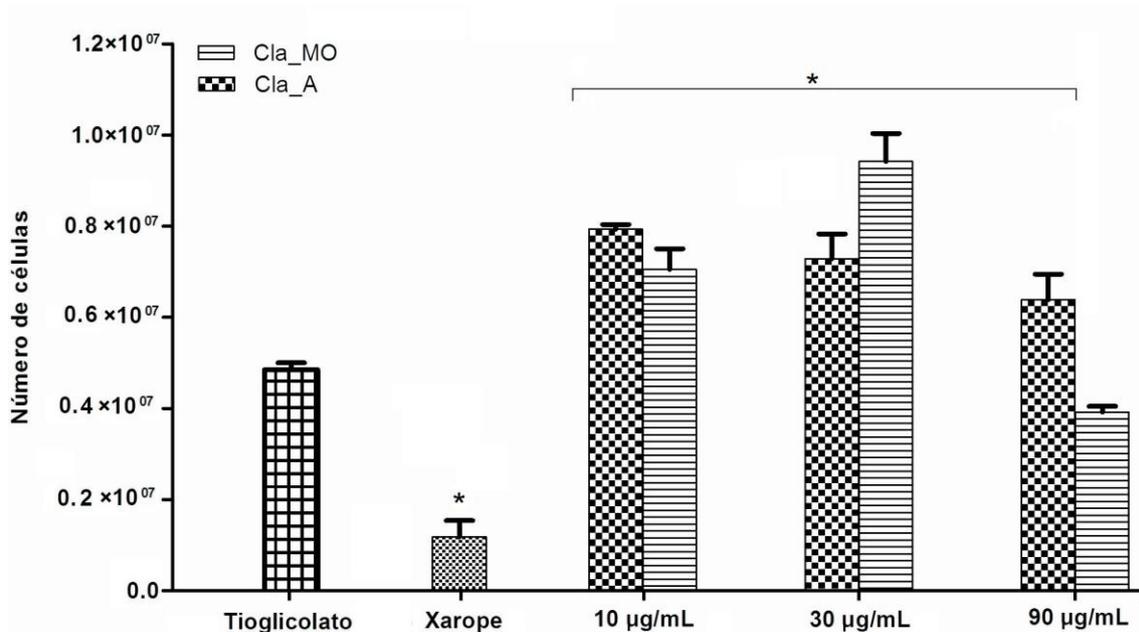


Figura 19. Avaliação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos tratados com as clavaninas A e MO. Foi avaliada a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 tratados com diferentes concentrações de clavanina A e MO (10, 30 e 90 µg.mL⁻¹), após 6 horas de tratamento. Como controle positivo utilizamos tioglicolato 4%. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. *, p<0,05 como significativo em relação ao controle.

As populações celulares que migraram para a cavidade peritoneal dos camundongos após 6 horas de tratamento, estão demonstradas na Figura 20. Todos os estímulos utilizados induziram, de maneira geral, uma migração preferencial de neutrófilos, com uma baixa migração de basófilos e monócitos (Figura 20). As clavaninas A e MO exibiram um perfil semelhante entre si, havendo uma diferença significativa (p<0,05) entre os grupos tratados com os peptídeos e o grupo que recebeu tioglicolato. Note que não houve uma diferença significativa entre número de basófilos e monócitos, quando comparamos os grupos tratados com as clavaninas A e MO, em relação ao grupo controle.

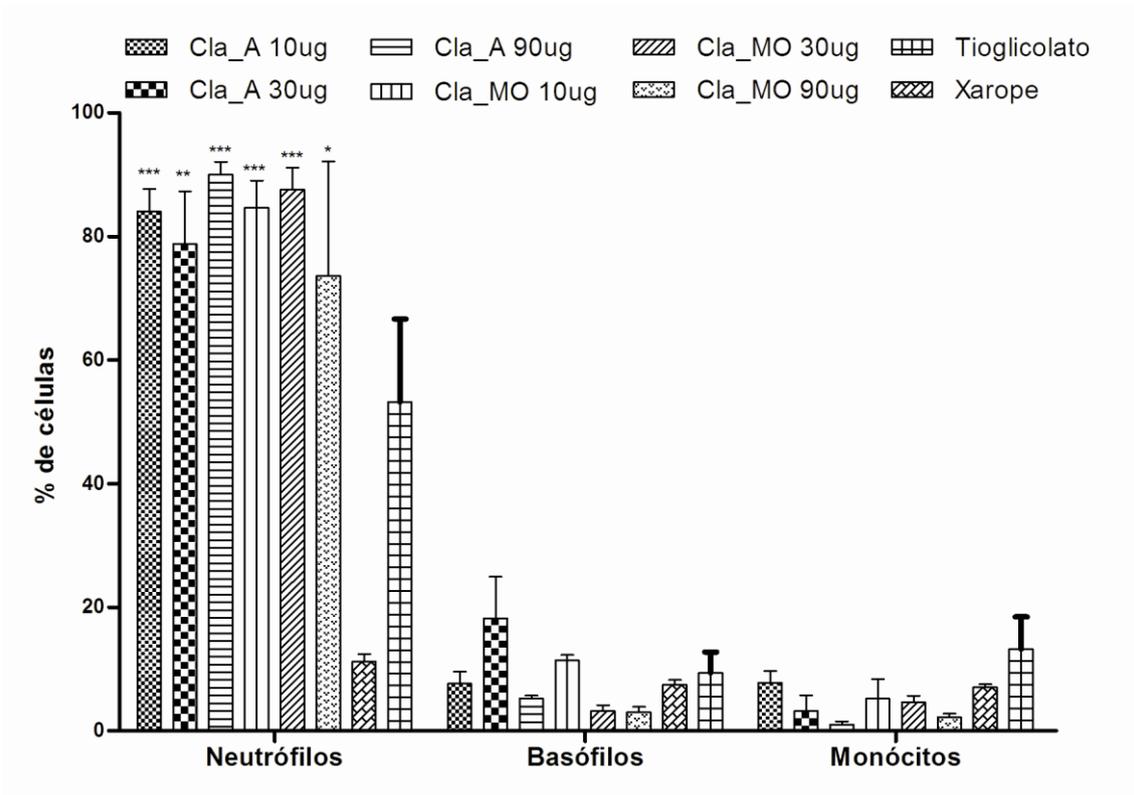
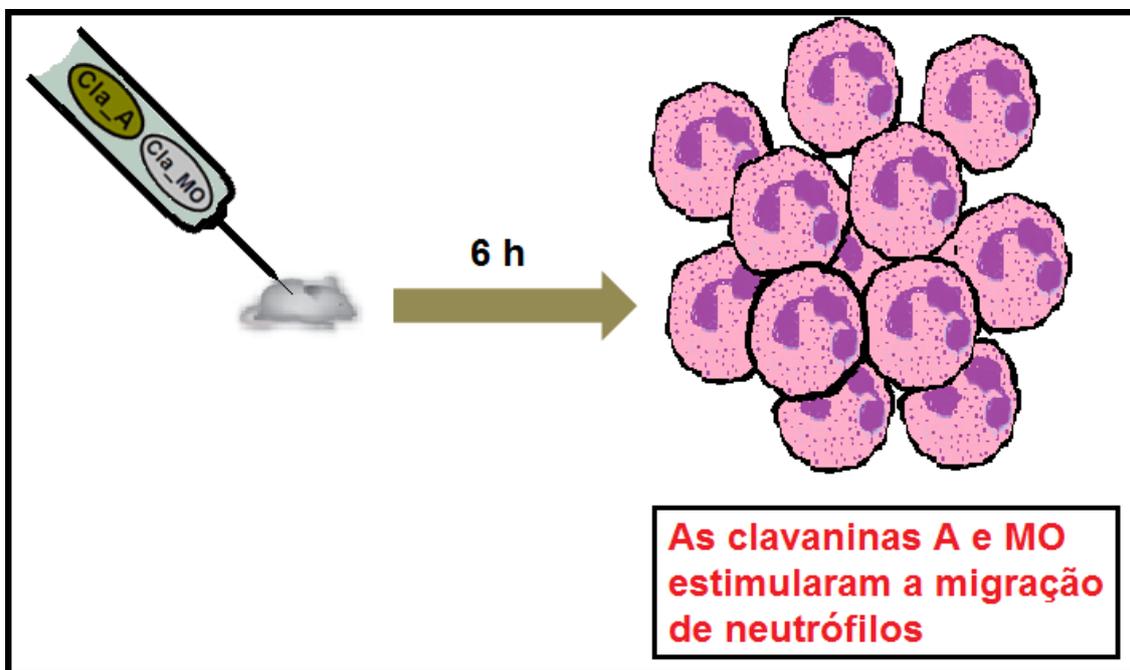


Figura 20. Avaliação do potencial de atividade indutora de neutrófilos murinos *in vivo* das clavaninas A e MO. Foi avaliada a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 tratados com diferentes concentrações de clavanina A e MO (10, 30 e 90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), após 6 horas de tratamento. Como controle positivo utilizamos tioglicolato 4%. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle.

Conclusão experimental 5: As clavaninas A e MO estimularam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos após 6 horas de tratamento.



5.5 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio de micronúcleo

Na Figura 21, estão representados os resultados da avaliação da genotoxicidade em eritrócitos do sangue periférico de camundongos C57BL/6 tratados com clavaninas A e MO (10, 30 e 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), xarope (controle negativo) e colchicina (controle positivo), por 24, 48, 72 e 96 horas. O número de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN) e eritrócitos normocromáticos com micronúcleos (ENCMN) são significativos entre os grupos experimentais ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo tratado com ciclofosfamida (Figura 21). Tais dados estão compatíveis com o esperado, uma vez que os animais tratados com a colchicina apresentam um número superior de eritrócitos micronucleados, uma vez que esta substância é conhecida por causar dano ao material genético.

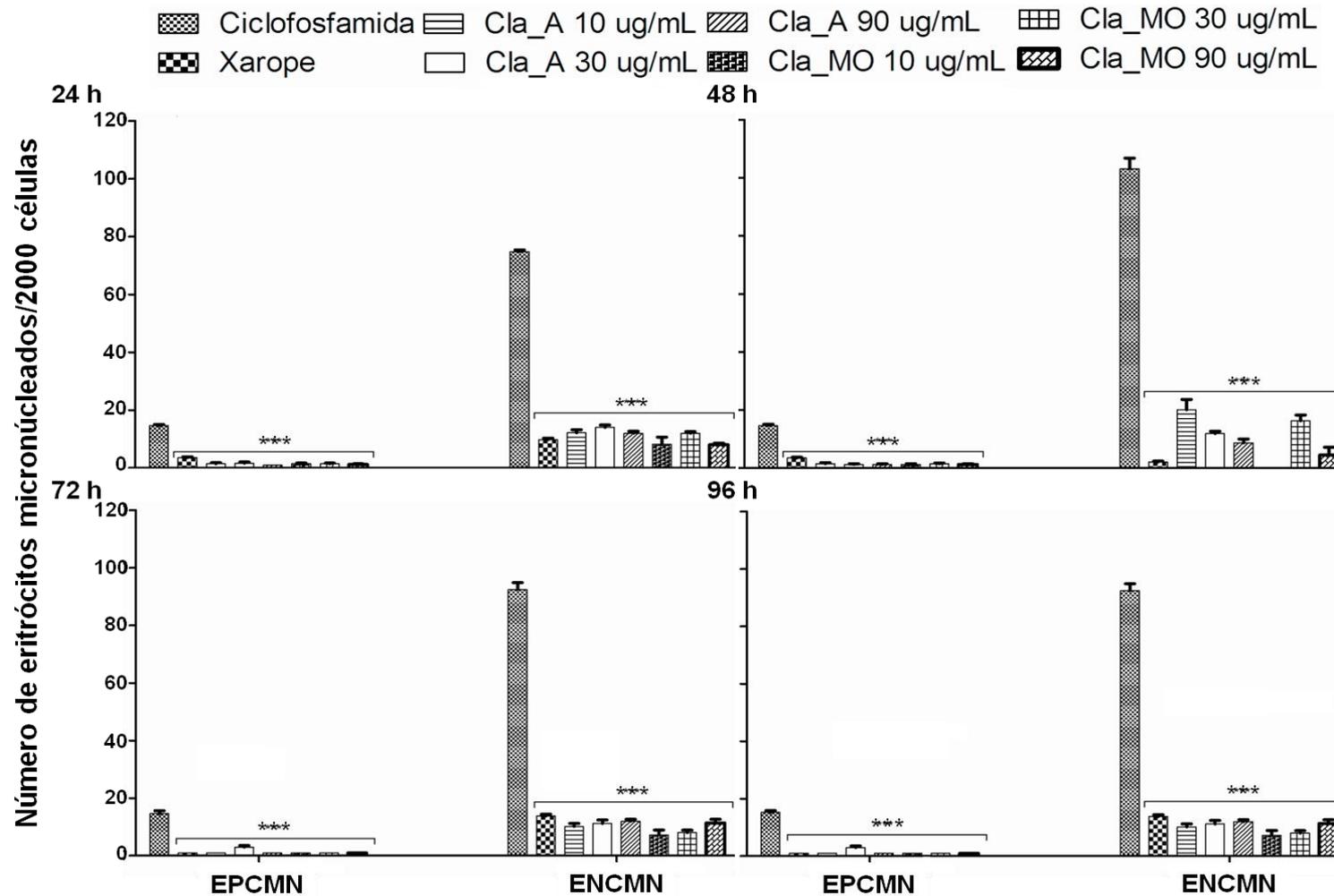
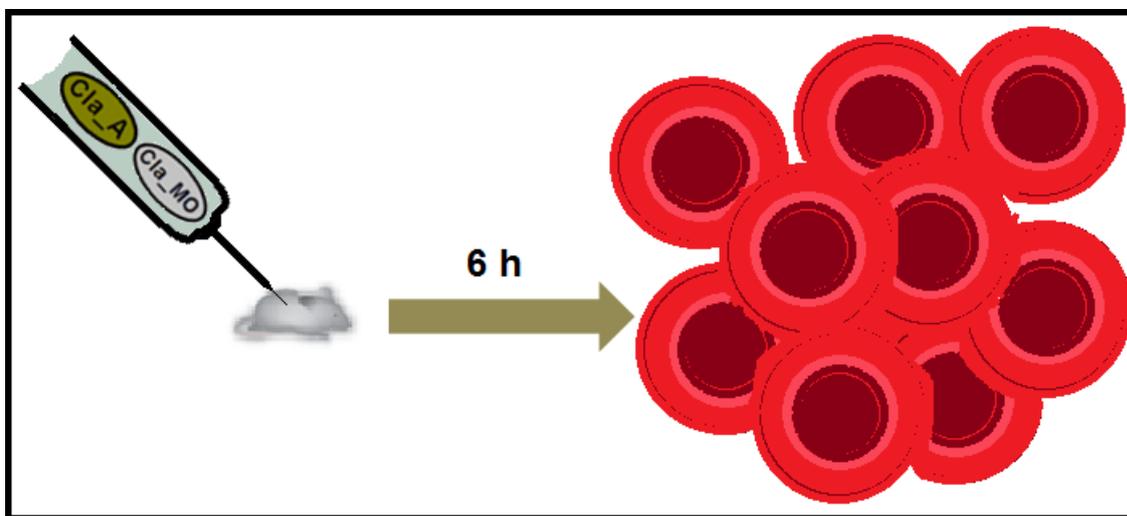


Figura 21. Densidade média de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico de camundongos em diferentes tratamentos. Foi a formação de micronucleos em camundongos C57BL/6 tratados com diferentes concentrações de clavulina A e MO (10, 30 e 90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Como controle positivo, utilizamos colchicina 40 mg/kg. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle. **EPCMN**: Eritrócitos policromáticos com micronúcleos; **ENCMN**: Eritrócitos normocromáticos com micronúcleos.

Conclusão experimental 6: As clavaninas A e MO não causaram qualquer efeito genotóxico em nível cromossômico.



5.6 Avaliação do potencial terapêutico das clavaninas A e MO em camundongos portadores de infecção da ferida cirúrgica por *S. aureus*

Após a confirmação do potente efeito antibacteriano das clavaninas A e MO e confirmação da toxicidade moderada destes peptídeos para eritrócitos humanos (Figura 11), além da baixa toxicidade em monócitos murinos RAW 264.7 (Figuras 13 e 14), estes peptídeos parecem apresentar seletividade para células procarióticas. Estes dados nos encorajaram a avaliar o potencial terapêutico dos mesmos.

Com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico das clavaninas A e MO, utilizamos um modelo de ferida cirúrgica infectada com *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* é um importante patógeno envolvido em uma variedade de infecções tais como infecções oculares, infecção de feridas cirúrgicas e sepse (Woodford & Livermore, 2009). No presente estudo foi possível observar que após 24 horas pós-inoculação, a infecção havia sido estabelecida em todas as feridas. Nestas, foram observados hiperemia, edema circunscrito a área da ferida e início de secreção (dados não mostrados) - momento da instituição do

tratamento. Os animais foram tratados diariamente com 37,5 μM de clavanina A e MO e com sulfato de neomicina bacitracina zincica ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), durante 15 dias. As feridas não-infectadas não apresentaram sinais de contaminação cruzada de bactérias. As análises histológicas demonstram não haver uma diferença no padrão de infiltrado inflamatório, após 15 dias de tratamento entre os grupos controle (Figura 22 A) e tratados com clavaninas A (Figuras 22 B), apresentando uma predominância de células mononucleares no local da incisão. No grupo tratado com sulfato de neomicina bacitracina zincica, observou-se um tecido de granulação mais denso, com maior quantidade de vasos e células inflamatórias (Figura 22 A). O grupo tratado com clavanina MO (Figura 22 C) apresentou maior epitelização e menor quantidade de células inflamatórias quando comparado ao grupo tratado com PBS/tratado com natrosol (Figuras 22 E e F). O grupo tratado com clavanina A (Figura 22 B) apresentou maior quantidade de células mononucleares e macrófagos que o grupo tratado com clavanina MO.

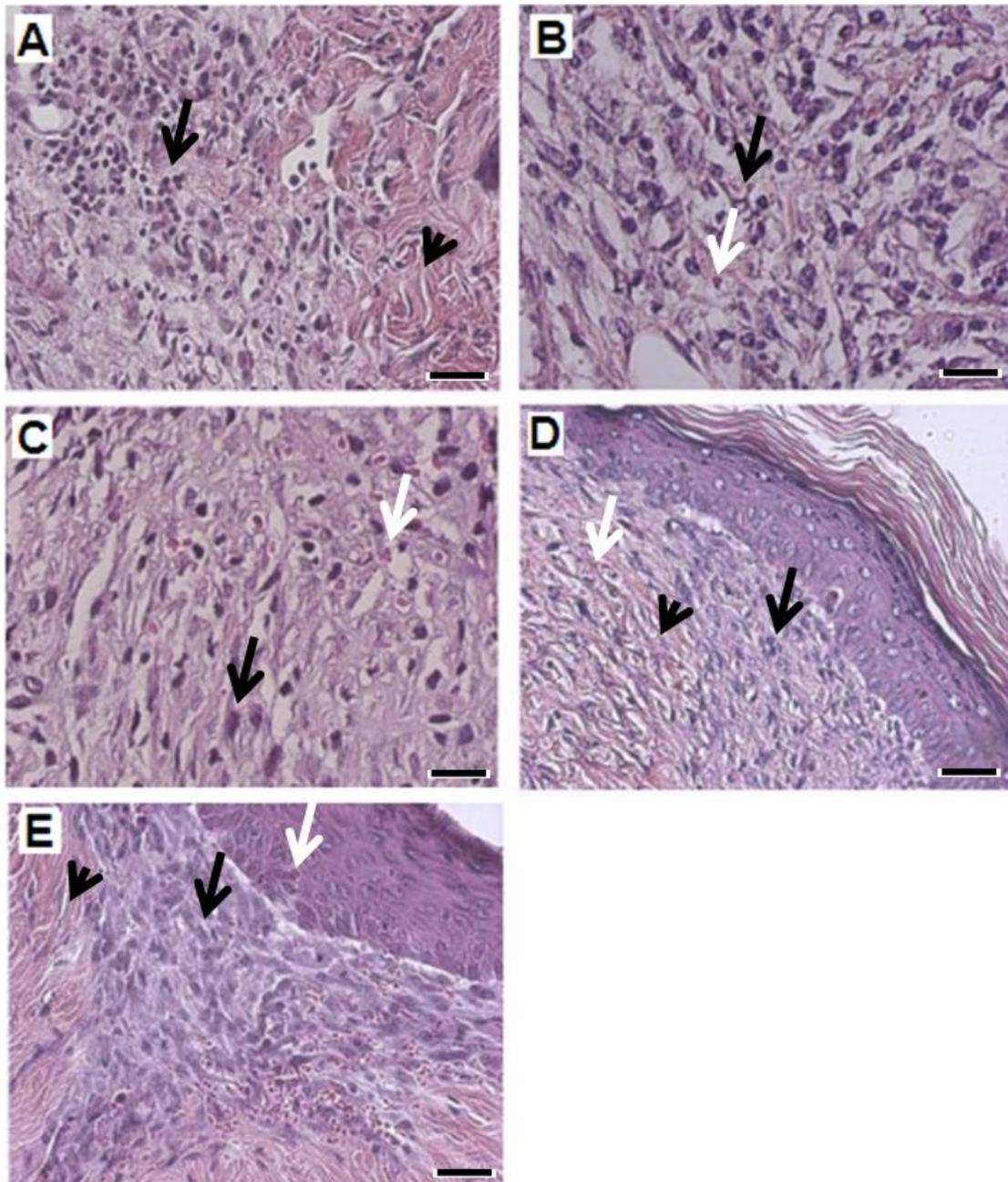


Figura 22. Análise histológica de feridas tratadas com clavulanicas A e MO. As feridas foram inoculadas com 10^5 células/mL de *S. aureus* e tratadas com 1 mg.mL^{-1} de sulfato de neomicina bacitracina zincica (A), $37,5 \text{ }\mu\text{M}$ de clavulanicina A (B), $37,5 \text{ }\mu\text{M}$ de clavulanicina MO (C), PBS (D) e com gel de natrosol (E) durante 15 dias. As feridas não tratadas exibiram uma grave infiltração celular composta por células mononucleares (**seta branca**) e macrófagos (**seta preta**). Este infiltrado foi acompanhado por edema e necrose em fase inicial. Em contraste, as feridas tratadas com clavulanicina A e MO apresentaram menor infiltrado celular e uma resposta inflamatória atenuada. Vasos sanguíneos (**ponta de seta**). Imagens representativas de cinco camundongos examinados por grupo. Barra ($30 \text{ }\mu\text{m}$, de A-E).

5.6.1 Recuperação da carga bacteriana

Após 15 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e ferida removida e macerada para avaliação da eficácia do tratamento com as clavaninas A e MO, administrado a cada 24 horas por 15 dias no tratamento da ferida cirúrgica infectada por *S. aureus*, através da avaliação da recuperação da carga bacteriana. A administração dos peptídeos resultou em uma diminuição significativa na contagem de bactérias presentes na ferida ($p < 0,001$), quando comparado ao tratamento com PBS e natrosol (Figura 23).

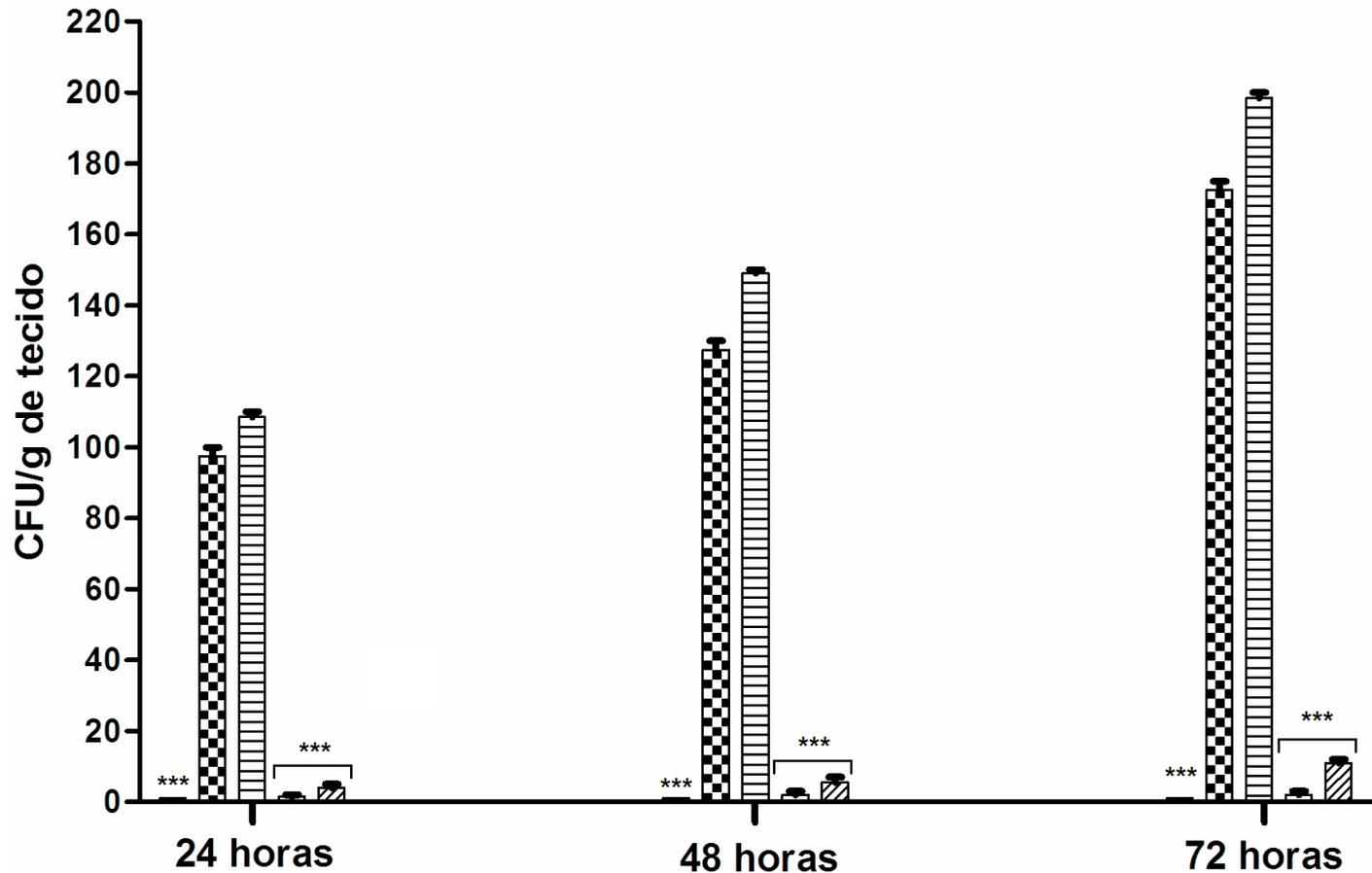
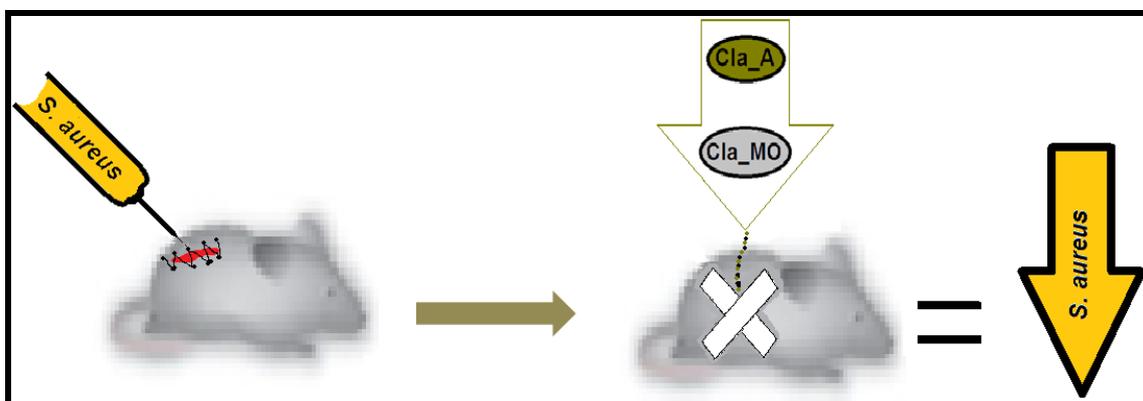


Figura 23. Recuperação da carga bacteriana (CFU por grama de tecido – ferida) após 15 dias de tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com *S. aureus*. As feridas foram inoculadas com 10^5 células/mL de *S. aureus* e tratadas com 1 mg.mL^{-1} de sulfato de neomicina bacitracina zincica, $37,5 \mu\text{M}$ de clavanina A e MO (C), PBS e com gel de natrosol, durante 15 dias. Os dados são representativos de cinco camundongos examinados por grupo. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como significativo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ em relação ao controle. **SNBZ**: sulfato de neomicina bacitracina zincica; **CFU**: Unidade formadora de colônia.

Conclusão experimental 7: O tratamento tópico com as clavaninas A e MO, contribuíram para a melhora na cicatrização do ferimento e reduziu significativamente a carga bacteriana.



5.7 Avaliação do efeito protetor das clavaninas A e MO na sobrevivência de camundongos submetidos à sepse polimicrobiana grave

As clavaninas A e MO apresentaram um efeito benéfico na sobrevivência de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana grave. Os camundongos infectados foram tratados com doses diferentes de clavanina A e MO, 24 horas após a infecção e a sobrevivência foi analisada, durante 7 dias. A Figura 24a demonstra que 100% dos camundongos infectados tratados com PBS morreram durante as primeiras 12 horas. No grupo de animais tratados com clavanina A $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 40% dos animais estavam vivos após 12 horas, e esse índice se manteve até o final do tratamento, que foi o mesmo observado para o grupo de animais tratado com $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Oitenta por cento dos animais tratados com $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ deste peptídeo, estavam vivos após 12 horas e ao final do tratamento, 60% dos animais estavam vivos. Comparando a taxa de mortalidade global dos grupos tratados com PBS e clavanina A, os animais tratados clavanina A apresentaram uma tendência para a sobrevivência prolongada.

A clavanina MO apresentou um efeito dose-dependente na sobrevivência de camundongos infectados (Figura 24b). Todos os camundongos do grupo

controle morreram dentro de 12 horas após a infecção, os animais tratados com 10, 30 ou 90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de clavanina MO/rato/dia, demonstraram sobrevida prolongada, sendo que, 80, 60 e 80% dos animais, respectivamente, estavam vivos após 7 dias de tratamento.

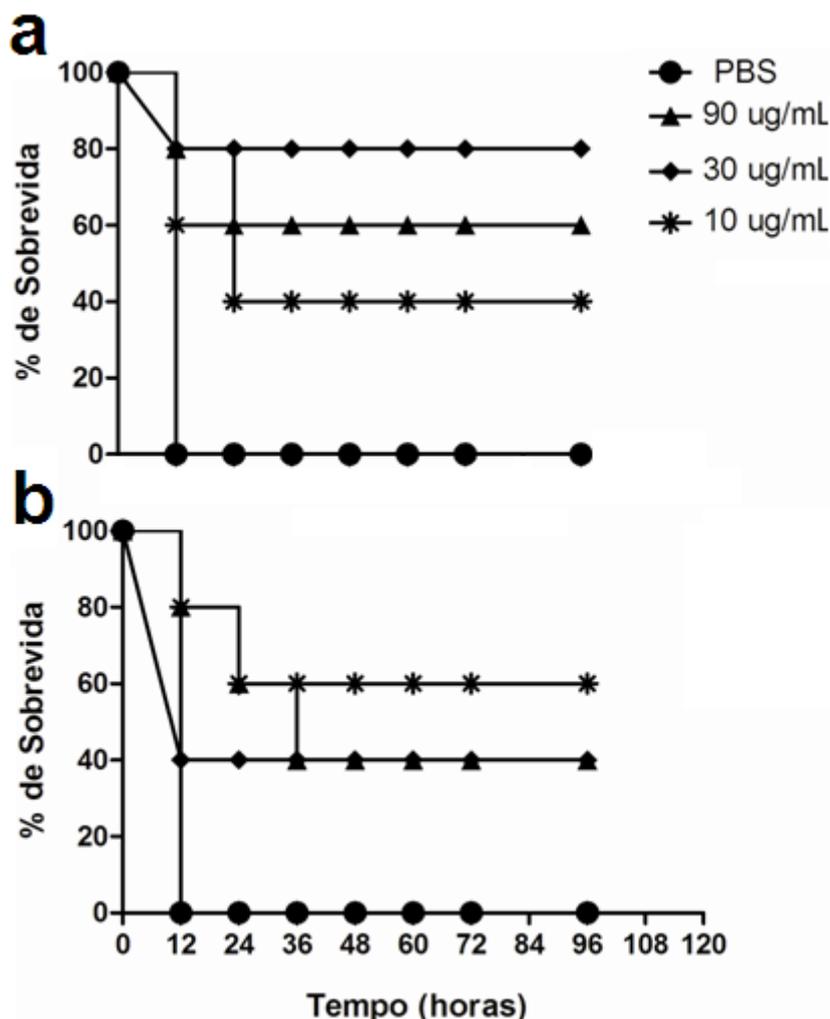
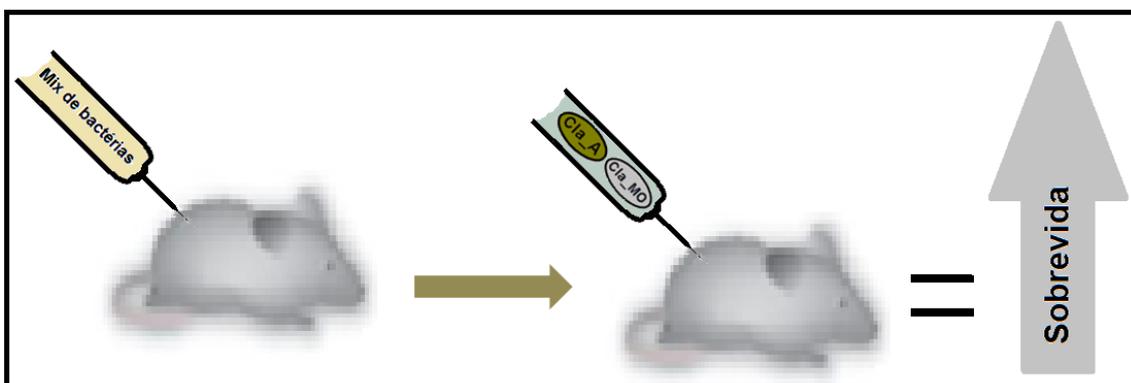


Figura 24. Influência da clavaninas A e MO na sobrevida de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana grave. Camundongos C57BL/6 foram inoculadas intraperitonealmente com 10^5 células/mL (*S. aureus* e *E. coli*). Os animais foram tratados com diferentes concentrações de clavanina A (**a**) e clavaninas MO (**b**) (10, 30 e 90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), durante 7 dias. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Conclusão experimental 8: As clavaninas A e MO aumentaram a sobrevivência de camundongos submetidos a sepse policróbica grave.



6. Discussão

O peptídeo antimicrobiano clavanina A foi previamente caracterizado por Lee e colaboradores (1997). Neste estudo, foi observado que este peptídeo apresenta uma forte atividade antibacteriana, não apresentando atividade hemolítica. Tendo em vista, a possibilidade de potencialização da atividade da clavanina A, buscamos em bancos de dados, peptídeos que apresentavam atividade imunomodulatória, a fim de localizarmos uma região conservada com um indicativo de tal atividade. Como resultado desta busca, encontramos uma região localizada no C-terminal, composta por cinco resíduos de aminoácidos apolares (FLPII) (Salmon *et al.*, 2001).

Os experimentos para confirmação da atividade antibacteriana da clavanina A e avaliação da clavanina A modificada, agora denominada clavanina MO sobre *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*, demonstraram um aumento na atividade antimicrobiana após a adição dos cinco resíduos apolares, frente aos microorganismos avaliados neste estudo. Estes resultados sugerem que este aumento na atividade antibacteriana possivelmente está relacionado ao efeito lítico que os cinco resíduos de aminoácidos inseridos na porção C-terminal causa nas membranas celulares (Yeaman & Yount, 2003). A adição destes resíduos deixou a clavanina MO com um caráter hidrofóbico superior ao da clavanina A. Como dito anteriormente, o aumento na atividade antibacteriana da clavanina MO veio acompanhado de um aumento na atividade hemolítica, enquanto a clavanina A e LL-37 não apresentaram tal atividade. Atribui-se esta atividade, a presença dos resíduos de aminoácidos apolares (FLPII) no C-terminal da clavanina MO, ausentes na clavanina A. Embora o mecanismo de ação da clavanina MO ainda não tenha sido determinado, a alta hidrofobicidade da face apolar pode aumentar a especificidade para membranas eucarióticas através de interações entre o peptídeo e lipídeos não carregados encontrados apenas nas células eucarióticas, tais como o colesterol (Prenner *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2003; Yeaman & Yount, 2003). Vale ressaltar ainda, que em todas as situações as clavaninas A e MO apresentaram melhor atividade que o cloranfenicol (~2

vezes mais). A clavanina MO se mostrou mais eficiente que a clavanina A, indicando que a adição da cauda apolar, contribui de forma significativa, no ensaio contra *K. pneumoniae*. A clavanina MO apresentou 2,4 vezes melhor atividade que a clavanina A e 2,5 vezes, que o cloranfenicol, frente a este microorganismo. Esses mesmos valores também são observados no ensaio contra *S. aureus*.

No presente estudo, avaliamos também o potencial imunomodulatório *in vitro*, das clavaninas A e MO através da avaliação da produção de TNF, IL-12, IL-10 e NO em linhagem de células RAW 264.7. Inicialmente os experimentos visaram identificar a ausência de interferências dos peptídeos sobre a viabilidade/proliferação celular, empregando o ensaio de viabilidade celular utilizando MTT em tempo de incubação máximo de 72 horas. Como observado, os peptídeos não influenciaram na viabilidade/proliferação celular (Figuras 12-14). Entretanto, foi observado que após 48 horas, há uma redução drástica na viabilidade/proliferação celular, em especial naquelas culturas tratadas com clavanina MO (30% nas concentrações mais altas - 40-160 µM). Deste modo, podemos inferir que o decréscimo na viabilidade/proliferação celular após 48 horas de tratamento, deve-se a um aumento significativo na população celular nas primeiras 24 horas de tratamento, deixando o meio deficiente de nutrientes em relação a super população celular e não, devido a um efeito tóxico dos peptídeos (Abbas & Lichtman, 2005).

Vários estudos têm demonstrado que a LL-37 estimula a proliferação de várias linhagens celulares, dentre elas monócitos (Bowdish *et al.*, 2004), células epiteliais (Shaykhiev *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2009) e linfócitos (Nell *et al.*, 2006). A proliferação celular de monócitos e linfócitos induzida pela LL-37 é mediada pela ativação do receptor de peptídeo *formil-like 1* (FPRL1) (De Yang *et al.*, 2000; Koczulla *et al.*, 2003). Enquanto que a proliferação das células epiteliais (queratinócitos) envolve a ativação do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e subsequente ativação de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs1 e 3) (Braff *et al.*, 2005; Niyonsaba *et al.*, 2005). Os resultados aqui obtidos corroboram com os dados, obtidos para a LL-37, entretanto, o mecanismo de ação não foi estudado. Além da LL-37,

outros peptídeos antimicrobianos apresentaram atividade sobre a proliferação celular reportada, como é o caso das defensinas humanas hBD-2, -3 e -4 que estimula a proliferação de queratinócitos através da ativação de EGFR e subsequente ativação de STAT1 e STAT3 (Niyonsaba *et al.*, 2007).

Os dados encontrados no ensaio de viabilidade/proliferação de células RAW 264.7, reforçam a necessidade de estudos futuros a cerca do mecanismo pelo qual as clavaninas A e MO atuam sobre essa linhagem celular. A realização deste estudo de citotoxicidade demonstrou que todas as concentrações empregadas neste estudo apresentavam um padrão de atividade muito semelhante, ou seja, uma alta viabilidade/proliferação celular nas primeiras 24 horas e uma redução após este período, sendo que a principal hipótese foi discutida anteriormente. Estes dados foram determinantes para a escolha das menores concentrações de peptídeos a serem utilizadas nos ensaios subsequentes para avaliação do potencial imunomodulatório *in vitro*, das clavaninas A e MO. Estudos anteriores utilizando a LL-37 e defensinas humanas, demonstraram que concentrações baixas destes peptídeos (~2 µM) (Braff *et al.*, 2005; Niyonsaba *et al.*, 2005; Niyonsaba *et al.*, 2007), foram suficientes para a modulação da atividade de células do sistema imune do hospedeiro. Este feito é semelhantemente ao efeito provocado pelas interleucinas, onde concentrações micromolares destes polipeptídios são suficientes para desencadear inúmeras respostas biológicas (Bowdish *et al.*, 2004). Partindo deste princípio, iniciamos nossos estudos utilizando baixas concentrações de clavanina A (3 e 6 µM) e MO (2,41 e 4,92 µM).

Os experimentos para avaliação do possível potencial imunomodulatório *in vitro*, das clavaninas A e MO, através da avaliação da produção de TNF- α , IL-12, IL-10 e NO, foi realizado seguindo as mesmas condições experimentais utilizadas no experimento para avaliação da viabilidade celular. Inicialmente, verificamos se os peptídeos, por si só, estimulavam a produção de TNF- α , IL-12, IL-10 e NO. Posteriormente, à suspensão celular, foram adicionados antígenos bacterianos de *E. coli* e *S. aureus*, uma vez que esses são os principais agentes causadores de IrAS (Brasil, 2004). Também foi utilizado IFN- γ , em associação com estes antígenos, o qual atua estimulando a

apresentação de antígenos e a produção de citocinas por monócitos (Stark *et al.*, 1998). Como observado em nosso estudo, a clavanina MO em sua menor concentração inibiu em todas as condições experimentais a produção de TNF- α . No entanto, em sua maior concentração, a clavanina MO, estimulou a liberação de TNF- α apenas quando as células não foram estimuladas. A clavanina A, por sua vez, estimulou a produção de TNF- α quando as células não foram estimuladas e quando tratadas com antígenos de *S. aureus* em combinação com IFN- γ , comportamento semelhante ao apresentado pela LL-37, aqui reportado. O peptídeo antimicrobiano P18, um peptídeo derivado da cecropina A, inibiu a produção de TNF- α por células RAW 264.7 estimuladas com LPS (Nan *et al.*, 2008). Em outro estudo, células RAW 264.7 estimuladas com polissacarídeo capsular (CPS) de *Neisseria meningitidis*, inibiram a produção de TNF- α , após a adição da LL-37 (Zughaier *et al.*, 2010). Estes dados observados para LL-37 corroboram com os dados obtidos neste estudo. Em outro estudo, células RAW 264.7 expostas ao LPS de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e a incubação com LL-37, diminuiu significativamente a liberação de TNF- α e aumentou a atividade antimicrobiana dos neutrófilos (Alalwani *et al.*, 2010). Outro exemplo a ser citado proveniente da literatura, demonstra que a hepcidina 3 (TH3) suprimiu a expressão de TNF- α por células RAW 264.7 estimuladas com LPS (Rajanbabu *et al.*, 2010). O principal mecanismo pelo qual todos os peptídeos citados anteriormente, inibem a produção de TNF- α em infecções por bactérias gram-negativas, aparentemente está relacionado a neutralização do LPS. Como mencionado anteriormente, os peptídeos relatados na literatura que apresentam atividade antimicrobiana e imunomodulatória apresentam um padrão semelhante de atuação, onde suprimem a expressão de TNF- α por células RAW 264.7 (Nan *et al.*, 2008; Alalwani *et al.*, 2010; Zughaier *et al.*, 2010).

Em experimento *in vivo*, peptídeos que aumentaram a sobrevivência de camundongos tratados com altas doses de LPS apresentaram níveis de TNF- α reduzidos. Como exemplo, podemos citar, os camundongos que receberam altas doses de LPS (150 μ g) de *E. coli* e tratados com S-tanatina (3, 6 e 12 mg/kg) que apresentaram seus níveis de TNF- α reduzidos, acompanhado de

aumento na sobrevivência dos animais tratados com este peptídeo (Wu *et al.*, 2011). Em outro experimento, animais infectados com *P. aeruginosa* e tratados com uma única dose de taquiplesina III (1 mg/kg), apresentaram níveis de TNF- α reduzidos e a sobrevida aumentada (Cirioni *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que a inibição da produção de TNF- α parece ser um importante mecanismo que aumenta a sobrevida de animais infectados. Como pode ser observado no presente estudo, quando as células não foram estimuladas com antígenos bacterianos não houve supressão de TNF- α , exceto em uma das concentrações de clavanina MO. Demonstrando que as clavaninas A e MO podem atuar na proteção contra condições patológicas durante o processo inflamatório.

Todavia, vale ressaltar que dentre as várias citocinas que participam da defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, merecem destaque as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Essa citocina é produzida nas fases iniciais da infecção e é responsável, por meio de sua ação no hipotálamo, pelo aparecimento da febre, a qual inibe a multiplicação bacteriana. Esta citocina em sua forma solúvel, aumenta a expressão das moléculas de adesão (seletina Pe ICAM) nas células endoteliais, facilitando a passagem de células dos vasos para o sítio da infecção, além de estimulam e ativar os neutrófilos e macrófagos a produzirem NO (Machado *et al.*, 2004). Por outro lado, a preocupação nos ensaios clínicos, que bloqueiam o TNF- α tem sido o potencial aumento da susceptibilidade às infecções, em função do papel central do TNF- α , na resposta inflamatória. Apesar dessas considerações, não houve aumento significativo nas infecções graves, nos estudos realizados para avaliar a eficácia de agentes anti-TNF- α (Maini & Taylor, 2000). No entanto, vale ressaltar que, nos estudos aqui descritos onde há inibição da produção de TNF- α devido ao tratamento com PAMs, há uma exposição do organismo a um grande número de microorganismos e quando a infecção chega a esse nível, a uma produção exacerbada desta citocina ocorre, causando sérios danos para o hospedeiro. Neste caso, agentes que suprimam a produção desta citocina tem uma tendência a aumentar a sobrevida do hospedeiro.

Os monócitos diferenciados podem ser polarizados para se diferenciarem em macrófagos que irão produzir citocinas regulatórias, como IL-10 ou pró-inflamatórias como IL-12. Deste modo, com o objetivo de avaliar se as clavaninas A e MO induziriam alteração na ativação das células RAW 264.7, os níveis destas citocinas em culturas, após tratamento com os peptídeos nas diferentes condições experimentais, foram determinados. Ao avaliarmos a expressão da IL-10, observamos que as clavaninas A e MO não estimularam a secreção de IL-10, quando as células foram estimuladas com antígeno de *E. coli* e de *S. aureus* em associação com IFN- γ . A redução na expressão desta citocina quando tratada com as clavaninas A e MO foi observado apenas no grupo estimulado com antígeno de *E. coli*. As células tratadas com LL-37 apresentaram baixa secreção de IL-10 quando estimuladas com antígeno de *E. coli*. No entanto, nas demais condições experimentais, a secreção desta citocina foi aumentada quando as células foram tratadas com LL-37.

A IL-10 é uma citocina regulatória produzida por macrófagos, mastócitos e queratinócitos, sendo um inibidor de macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK) estando envolvida no controle das reações da imunidade e da imunidade mediada por células (Moore *et al.*, 2001; Couper *et al.*, 2008). Quando secretada, a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6, além de interferir na apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, através da diminuição na expressão da molécula de histocompatibilidade II (MHC II). Em função desta atuação, a IL-10 inibe a ativação de células T finalizando assim as reações da imunidade mediada por células (Moore *et al.*, 2001). Sendo assim, a IL-10 age nos macrófagos ativados fazendo com que esses retornem ao estado de repouso à medida que a infecção microbiana é erradicada (Abbas & Lichtman, 2005). O peptídeo antimicrobiano hLF1-11 derivado da lactoferrina humana, aumentou a produção de IL-10 por macrófagos humanos, após estímulo destes com LPS (van der Does *et al.*, 2010). Além disso, o hLF1-11 aumentou a produção de IL-10 por monócitos humanos, 60 minutos após o estímulo destes com LPS. A presença de hLF1-11, durante 60 minutos, foi suficiente para aumentar a fagocitose de *C. albicans* por estas células, durante a diferenciação celular.

Estes dados indicam que uma breve exposição dos monócitos ao hLF1-11 foi suficiente para direcionar a diferenciação dos monócitos em macrófagos (van der Does *et al.*, 2010). A LL-37 também estimulou a produção de IL-10 por monócitos humanos (Zhang & Shively, 2010), dados estes que estão de acordo com os obtidos no presente estudo.

Vale ressaltar que, nenhuma conclusão definitiva pode ser feita com relação ao adicional da produção de IL-10 ser benéfico para o controle de infecção ou não (Couper *et al.*, 2008). Neste contexto, Scott e colaboradores (2007) sugeriram que o aumento nos níveis da IL-10 (induzida pelo peptídeo-1 IDR) poderia ajudar a controlar a inflamação, enquanto que as respostas imunes seriam reforçadas. Os resultados aqui encontrados mostram mais uma vez que as clavaninas A e MO podem atuar na proteção contra condições patológicas decorrentes do processo inflamatório.

O tratamento com os peptídeos demonstrou que, as clavaninas MO estimularam o aumento na secreção de IL-12 apenas quando as células RAW 264.7 foram incubadas com os peptídeos. Uma redução na secreção de IL-12 foi observada quando as células foram estimuladas com antígeno de *E. coli* em conjunto com IFN- γ . Nas outras condições experimentais, a secreção de IL-12 manteve-se inalterado. A IL-12 é o principal mediador da resposta imune inata inicial aos microorganismos intracelulares. São secretadas principalmente por monócitos mononucleares ativados e células dendríticas, sendo estas últimas as únicas células descritas até o momento a produzirem o componente p40, que é a forma biologicamente ativa (Abbas & Lichtman, 2005). A IL-12 estimula as células NK e células T a produzirem IFN- γ . Nos casos de infecção bacteriana grave provocada por bactérias Gram-negativas, grandes quantidades de IL-12 são produzidas, o que leva a alta produção de IFN- γ e, este por sua vez atua em conjunto com o LPS estimulando os macrófagos a produzirem TNF, principal mediador do choque séptico (Abbas & Lichtman, 2005).

Macrófagos humanos tratados com hLF1-11 após estímulo destes com LPS, não apresentaram expressão de IL-12 alterada quando comparados com

o controle (van der Does *et al.*, 2010). Papareddy e colaboradores (2010) observaram que quando macrófagos murinos, estimulados com antígenos de *E. coli* e tratados com peptídeos derivados da proteólise da trombina humana, tiveram redução nos níveis de produção de IL-12. Nijnik e colaboradores (2009) demonstraram que a LL-37 não alterou o padrão de secreção de IL-12 por células RAW 264.7, quando estas foram estimuladas com LPS ou IFN- γ ou uma combinação de ambos. Ao compararmos os resultados do presente estudo com os resultados anteriormente obtidos com outros peptídeos, é possível observar que as clavaninas A e MO apresentam um comportamento semelhante a estes peptídeos, apresentando atividade antimicrobiana direta sobre os microorganismos, além de modular a resposta imune do hospedeiro a infecções bacterianas.

Também foi avaliada neste estudo a produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7, após contato com as clavaninas A e MO e LL-37 nos diferentes tratamentos aqui utilizados. Foi observado que todos os peptídeos inibiram a produção de NO em todas as condições experimentais. Resultados semelhantes foram obtidos por Papareddy e colaboradores (2010) quando estes avaliaram o efeito da LL-37 e do GKY25 um peptídeo derivado da proteólise da trombina humana, após estímulo das células RAW 264.7 com antígenos de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Em outro estudo, Zughailer e colaboradores (2010) observaram que a LL-37 inibia a secreção de NO por células RAW 264.7 e macrófagos humanos quando estimulados com CPS de *Neisseria meningitidis*. A inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos após tratamento com a LL-37 e outros peptídeos antimicrobianos foi descrito na literatura como sendo uma consequência da neutralização das endotoxinas bacterianas (Zughailer *et al.*, 2005), ou por bloqueio da ligação das endotoxinas a proteína de ligação ao LPS (Hancock & Scott, 2000; Nagaoka *et al.*, 2001).

A secreção de TNF- α , IL-12, IL-10 e NO pelas células RAW 264.7 indicam que as clavaninas A e MO parecem induzir a transcrição de fatores que direcionam para uma resposta celular do tipo Th2, uma vez que uma baixa produção de IL-12 pode propiciar uma resposta Th2, enquanto, uma alta produção de IL-12, a uma resposta do tipo Th1 (Rissoan *et al.*, 1999). Esta

resposta está relacionada a estímulos celulares com antígenos bacterianos, na presença ou ausência de IFN- γ . Dados da literatura pertinente, também indicam que a resposta celular mediada por células Th1 é crucial quando o hospedeiro é infectado por microorganismos extracelulares, enquanto uma resposta mediada por Th2 é bastante eficaz quando o hospedeiro é infectado por microorganismos extracelulares (Abbas & Lichtman, 2005). Nossos resultados corroboram com os relatados na literatura, uma vez que os antígenos bacterianos utilizados foram de bactérias extracelulares e as clavaninas A e MO parecem propiciar uma resposta com padrão Th2.

No presente estudo foia avaliada a capacidade quimiotática das clavaninas A e MO, *in vivo*, para neutrófilos murinos. Como observado, ambos os peptídeos estimularam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. A migração celular é controlada por processos que envolvem várias etapas que incluem quimiotaxia, adesão celular e, em alguns casos, a transmigração através de camadas do tecido (Butcher *et al.*, 1999). Tem sido relatado que dois peptídeos humanos, a α -defensina humana e o peptídeo neutrofílico humano HNP-1 e 2, apresentam a capacidade de recrutar neutrófilos humanos e murinos (Chertov *et al.*, 1996; Territo *et al.*, 1989). A LL-37, também apresenta atividade quimiotática para neutrófilos (Ciornei *et al.*, 2005), assim como, a catelecidina suína e o PR-39 (Huang *et al.*, 1997).

A função quimiotática de neutrófilos apresenta-se diminuída em pacientes sépticos, contudo as implicações fisiopatológicas deste processo ainda não foram elucidados (Tavares-Murta *et al.*, 2002). No entanto, parece que a diminuição na migração de células do sistema imune para o foco infeccioso, prejudica o apuramento da infecção subjacente (Ciornei *et al.*, 2005). Deste modo, parece razoavel dizer que o tratamento com as clavaninas A e MO durante um processo infeccioso tenderiam a auxiliar na eliminação dos patógenos.

A fim de averiguar se ocorria algum dano em nível gênico quando os animais foram tratados com estes peptídeos, avaliamos o efeito genotóxico das clavaninas A e MO através do ensaio de micronúcleo. Os micronúcleos são

estruturas presentes no citoplasma de células em divisão (Evans, 1997). São formados tanto por fragmentos acêntricos como por cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase do ciclo celular (Evans, 1997). Os animais tratados com as clavaninas A e MO, nas diferentes concentrações, não apresentaram qualquer efeito genotóxico em nível cromossômico, uma vez que, o aumento no número de micronúcleos indica lesão em nível cromossômico (Evans, 1997). Em estudos com o peptídeo filosseptina-1 (PS-1) utilizando um peptídeo isolado de *Phyllomedusa hypochondrialis*, foi possível observar que este peptídeo não causou efeito sobre o número de micronúcleos de eritrócitos indicando uma possível ausência de genotoxicidade (Kuckelhaus *et al.*, 2007). Os resultados obtidos para a PS-1 são semelhantes ao encontrado neste estudo para as clavaninas A e MO. Estes resultados são de grande importância, uma vez que genotoxicidade desempenha um papel importante na avaliação da segurança de medicamentos (Hayashi, 2007). O ensaio de micronúcleo de células hematopoiéticas de roedores é um importante teste para avaliar as características estruturais e de aberrações cromossômicas (Hayashi, 2007).

O contexto atual da problemática em questão é representado por um número cada vez mais frequente de pacientes infectados em ambiente hospitalar, especialmente após procedimento cirúrgico e uma resistência crescente a utilização de antibióticos. Deste modo, alternativas aos antibióticos e anti-sépticos são extremamente necessárias. Vários agentes antimicrobianos estão disponíveis para a prevenção ou tratamento de feridas infectadas. Tais como antimicrobianos de uso tópico e anti-sépticos têm sido comumente utilizados no tratamento de feridas, para prevenir ou tratar a infecção (Malmsten *et al.*, 2011). Vários destes agentes antimicrobianos são utilizados para o tratamento de infecções da pele e feridas, existindo várias preocupações, sobre o possível efeito destes agentes sobre as células humanas (Malmsten *et al.*, 2011).

Após verificarmos que as clavaninas A e MO não apresentam efeito genotóxico e uma suposta atividade imunomodulatória, avaliamos seu potencial

terapêutico em duas situações: um modelo murino de ferida cirúrgica infectada com *S. aureus* e um modelo murino de sepse.

No modelo murino de ferida cirúrgica infectada, foi observado que ambos os peptídeos apresentaram uma potente atividade sobre a redução deste microorganismo no sítio cirúrgico. Resultados semelhantes foram encontrados por Malmsten e colaboradores (2011) que comprovaram a eficácia de um peptídeo derivado de uma sequência rica em arginina, leucina e prolina, em um modelo *ex vivo* de ferida cirúrgica em pele de suínos infectada com *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A administração tópica do peptídeo antimicrobiano derivado da halocidina HG1 exerceu forte atividade antimicrobiana, em um modelo de ferida cirúrgica infectada com *S. aureus* resistente a metilicina, em camundongos (Lee *et al.*, 2011). O peptídeo antimicrobiano D2A21 inibiu fortemente o crescimento de *P. aeruginosa* em um modelo de ferida cirúrgica em ratos (Chalekson *et al.*, 2003).

Como mencionado acima, vários PAMs podem constituir novas alternativas terapêuticas para uso tópico. E no presente estudo, as clavaninas A e MO, apresentam características atrativas, que incluem uma atividade de amplo espectro contra bactérias multi-resistentes e eficácia em modelos de feridas cirúrgicas *in vivo*, uma alta seletividade e baixa toxicidade. Os resultados encontrados na literatura em conjunto com os efeitos anti-séptico e imunomodulador apresentados pelas clavaninas A e MO *in vitro* e *in vivo*, nos permitiram inferir que estes peptídeos apresentam interessantes possibilidades terapêuticas no tratamento de infecções locais e possivelmente também em infecções sistêmicas. Desta forma, resolvemos testar seu efeito terapêutico em modelo murino de sepse polimicrobiana grave, por injeção intraperitoneal de bactérias. As clavaninas A e MO foram bastante eficazes na melhora da sobrevivência de camundongos portadores de sepse grave (80% de sobrevivência em relação ao controle – ausência de tratamento). Estes dados, em conjunto com o fato das clavaninas A e MO ativarem a migração de neutrófilos, indicam um grande potencial do uso destes peptídeos na sepse grave, uma vez que, a função quimiotática de neutrófilos está diminuída nestes pacientes (Tavares-Murta *et al.*, 2002). Vale ressaltar que, a atividade antibacteriana apresentada

por estes peptídeos no modelo experimental de ferida cirurgica e sepse polimicrobiana, são resultados peculiares, uma vez que, como discutido anteriormente estes peptídeos modularam as células RAW 264.7 a apresentarem um padrão de expressão envolvendo a secreção de citocinas regulatórias, e não citocinas pró-inflamatórias, como na grande parte dos agentes que apresentam atividade antimicrobiana. Outro achado bastante significativo, consistiu na análise de sobrevivência expressiva para animais infectados com dois importantes patógenos humanos (*E. coli* e *S. aureus*), englobando 80% dos animais tratados com clavanina MO e 60 % dos animais tratados com clavanina A. Ao compararmos esse achado com os dados da literatura, observamos expressividade dos mesmos, uma vez que, animais que receberam uma dose letal de *E. coli* e foram tratados com 200 µg.mL⁻¹ de LL-37 apresentaram apenas 28 % de sobrevivência (Cirioni *et al.*, 2006). Esses mesmos autores observaram que animais sépticos por ligação do ceco que receberam 1 mg.kg⁻¹ de LL-37 apresentaram 34% de sobrevivência. Em outro estudo, Giacometti e colaboradores (2006), observaram que animais que receberam uma dose letal de *E. coli* e foram tratados com 200 µg.mL⁻¹ de temporina L apresentaram uma sobrevivência de 80 %. Como pode ser observado, existem relatos na literatura de peptídeos com potencial significativo de aumento na sobrevivência dos animais sépticos, contudo é importante notar que as concentrações utilizadas foram superiores (1 a 2 vezes maior) aos observados para a clavanina A. Além deste fato, a maioria dos estudos utiliza apenas um tipo de bactéria em seus experimentos e neste caso a sepse foi polimicrobiana (Cirioni *et al.*, 2006;Giacometti *et al.*, 2006).

Deste modo, os dados obtidos neste estudo indicam que estes peptídeos apresentam um mecanismo de ação diferenciado, sendo considerados novos candidatos ao emprego no tratamento de sepse bacteriana grave. Fato este, relacionado a não estimulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que a resposta imune exacerbada desencadeada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, tende a ser um dos responsáveis pelo óbito de pacientes sépticos na fase inicial da doença. Todavia, sabe-se que aqueles pacientes que sobrevivem a esta fase, também podem vir a óbito não pela

resposta imune exacerbada, mas sim por imunossupressão, desencadeada pela secreção excessiva de citocinas pró-inflamatórias. Deste modo, as clavaninas A e MO, são moléculas com um comportamento atípico, uma vez que, apresentam uma forte atividade antibacteriana, não desencadeiam a secreção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, não sendo bloqueadores das mesmas, uma vez que, as citocinas pró-inflamatórias analisadas neste estudo foram secretas, em níveis basais. Este fato é de fundamental importância, uma vez que estas citocinas apesar de nocivas quando produzidas de forma exacerbada, são cruciais para a eliminação dos patógenos. Além disso, o fato destes peptídeos apresentarem atividade quimiotática *in vivo* para neutrófilos, é um outro achado bastante peculiar, uma vez que, apesar destes peptídeos não estimularem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, é provável que no decorrer da sepse, essas citocinas sejam produzidas em grandes quantidades, em função da produção de endotoxinas pelos microorganismos presentes. Outro fato relevante, diz respeito a ação direta destes peptídeos sobre os microorganismos e desta forma, a medida que estes são mortos, eles estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Como dito anteriormente, os pacientes que sobrevivem a fase inicial da sepse, a qual é caracterizada pela ativação exacerbada do sistema imune, podem vir a óbito devido a supressão do sistema imune. Deste modo, analisando a cinética temporal da sepse, um composto que ative o sistema imune após esse período, tende a aumentar significativamente a sobrevivência dos pacientes.

Estas observações reforçam a ideia de que as clavaninas A e MO podem ser eficientemente utilizadas como agentes anti-sépticos *in vivo*, uma vez que estes peptídeos foram eficazes na eliminação de bactérias patogênicas humanas *in vitro*, apresentaram atividade imunomodulatória sobre células RAW 264.7 e contribuíram para a cicatrização de feridas, três aspectos fundamentais da defesa do hospedeiro. Em adição, aumentam significativamente a sobrevivência de animais portadores de sepse polimicrobiana grave. Evidentemente, outras investigações envolvendo análises toxicológicas, bem como estudos clínicos, são necessárias, a fim de explorar este potencial das clavaninas A e MO, para

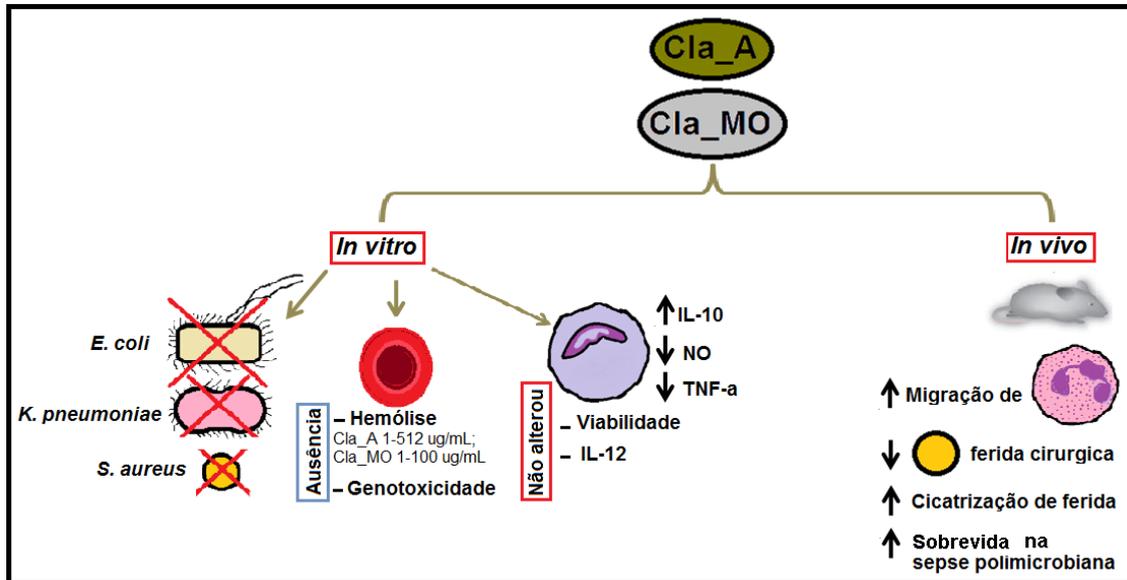
seu uso terapêutico, em comparação com compostos semelhantes, como as polimixinas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que as clavaninas A e MO:

- ✓ Foram eficazes na inibição do crescimento *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*, *in vitro*.
- ✓ Não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (clavanina MO) e de 1 a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (clavanina A).
- ✓ Não interferiram na viabilidade de células RAW 264.7.
- ✓ Não apresentaram qualquer efeito genotóxico em nível cromossômico.
- ✓ Apresentam atividade imunomodulatória, pois quando em contato com células RAW 264.7 estimularam a secreção de IL-10 e inibiram/não alteraram os níveis de NO, TNF- α e IL-12.
- ✓ Estimularam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal.
- ✓ Reduziram as unidades formadoras de colônias de *S. aureus* em um modelo de ferida cirúrgica.
- ✓ Aumentaram significativamente a sobrevida de animais com sepse polimicrobiana grave.

Conclui-se desta forma que: As clavaninas A e MO apresentam efeito antimicrobiano e imunomodulador importantes para potencial terapêutico de feridas cirúrgicas e quadros de sepsisemia.



8. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580p.

Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res*. 1970. 30(8): 2213-22.

Alalwani SM, Sierigk J, Herr C, Pinkenburg O, Gallo R, Vogelmeier C, Bals R. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *Eur J Immunol*. 2010. 40(4): 1118-26.

Associação paulista de estudos e controle de infecção Hospitalar - APECIH. Infecções hospitalares no Brasil: uma medida de sua magnitude nos anos 1990 e comparação com os índices europeus. 2005. Disponível em http://www.apecih.org.br/infeccoes_hospitalares.htm. Acesso em 20.03.2010.

Ayres SM. SCCM's new horizons conference on sepsis and septic shock. *Crit. Care. Med*. 1985. 13(10): 864-66.

Auvynet C, Rosenstein. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J*. 2009. 276(22): 6497–6508.

Azumi K, Yokosawa H, Ishi S. Halocyamines: novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry*. 1990. 29(1):159-165

Balk RA, Bone RC. The septic syndrome. Definition and clinical implications. *Crit. Care. Clin*. 1989. 5(1):1-8.

Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol.* 1999. 163(2): 947-953.

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001. 344(10): 699-709.

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukocyte Biol.* 2007. 81(1):1–5.

Bignami GS. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon.* 1993. 31(6): 817–820.

Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW. *Toll-like* receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science.* 2002. 298(5595):1025-9.

Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995. 13(1):61-92 .

Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000. 405(6785): 458-462.

Bowdish DM, Davidson DJ, Speert DP, Hancock RE. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol.* 2004. 172(6): 3758-65.

Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock RE. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 49(5):1727-32.

Bradbury AF, Smyth DG. Biosynthesis of the C-terminal amide in peptide hormones. *Biosci Rep.* 1987. 7(12):907–916.

Braff MH, Hawkins MA, Di Nardo A, Lopez-Garcia B, Howell MD, Wong C, Lin K, Streib JE, Dorschner R, Leung DY, Gallo RL. Structure–function relationships among human cathelicidin peptides: dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities. *J Immunol.* 2005. 174(7): 4271-4278.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. 2004. 1(1):1-9.

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005. 3(3): 238-250.

Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp.* 2010. 58(1):1 5-25.

Butcher, E. C., M. Williams, K. Youngman, Rott L., M. Briskin. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv. Immunol.* 1999. 72(1): 209-215.

Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* 2004. 198(1): 169-184.

Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L, Heumann D, Männel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med.* 2000. 6(2): 164-170.

Chalekson CP, Neumeister MW, Jaynes J. Treatment of infected wounds with the antimicrobial peptide D2A21. *J Trauma*. 2003. 54(4): 770-774.

Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, Voitenok NN. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw*. 2000. 11(2): 257-266.

Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru H, Hoffmann JA, Bulet P. Innate immunity: isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem*. 1996. 271(36):21808-21813.

Chertov, O., D. F. Michiel, L. Xu, J. M. Wang, K. Tani, W. J. Murphy, D. L. Longo, D. D. Taub, J. J. Oppenheim. Identification of defensin-1, defensin-2 and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem*. 1996. 271(6):29-35.

Chung CS, Xu YX, Wang W, Chaudry IH, Ayala H. Is Fas ligand or endotoxin responsible for mucosal lymphocyte apoptosis in sepsis? *Arch Surg*. 1998. 133(11): 1213-1220.

Ciornei CD, Sigurdardóttir T, Schmidtchen A, Bodelsson M. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. 49(7): 2845-2850.

Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Bergnach C, Orlando F, Silvestri C, Mocchegiani F, Licci A, Skerlavaj B, Rocchi M, Saba V, Zanetti M, Scalise G. LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006. 50(5): 1672-1679.

Cirioni O, Ghiselli R, Silvestri C, Kamysz W, Orlando F, Mocchegiani F, Di Matteo F, Riva A, Lukasiak J, Scalise G, Saba V, Giacometti A. Efficacy of

tachyplesin III, colistin, and imipenem against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. 51(6): 2005-2010

Coopersmith CM, Stromberg PE, Dunne WM, Davis CG, Amiot DM 2nd, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA.* 2002. 287(13): 1716-1721.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 2008. 180(9): 5771-5777.

Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med.* 1999. 5(7): 788-792.

Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J. Infect. Dis.* 1994. 170(3): 720-723.

Darveau RP, Cunningham MD, Seachord CL, Cassiano-Clough L, Cosand WL, Blake J, Watkins CS. Beta-lactam antibiotics potentiate Magainin 2 antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991. 35(3): 1153-1159.

Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, Hancock RE, Speert DP. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol.* 2004. 172(2):1146-56.

Debets JMH, Kampmeijer R, van der Linden MPMH, Buurman WA, van der Linden CJ. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med.* 1989. 17(6): 489-494.

Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998. 9(1): 1-11.

Derendorf H. Pharmacokinetic evaluation of beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1989. 24(3): 407-13.

De Yang, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*. 2000. 192(7): 1069-74.

Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997. 3(6): 678-681.

Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington D.C.: ASM Press, 1997.

Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*. 1996. 381(6577): 75-77.

Echtenacher B, Weigl K, Lehn N, Mannel DN. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect Immun*. 2001. 69(6): 3550-3555.

Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg FW. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*. 1995. 85(5): 1341-1347.

Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, De Forge LE, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol.* 1992.148(9): 2724-2730.

Evans HJ. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat Res.* 1997. 392(1-2):5-10.

Fehri LF, Wróblewski H, Blanchard A. Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007. 51(2):468-74.

Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990. 49(2): 186-196.

Finlay BB, Hancock RE. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat Rev Microbiol.* 2004. 2(6):497-504.

Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2000. 55(1): 31-49.

Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Scalise G. In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000. 38(2): 115-118.

Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Orlando F, Silvestri C, Bozzi A, Di Giulio A, Luzi C, Mangoni ML, Barra D, Saba V, Scalise G, Rinaldi AC. Interaction of antimicrobial peptide temporin L with lipopolysaccharide in vitro and in experimental rat models of septic shock caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006. 50(7): 2478-2486.

Giaimis J, Lombard Y, Makaya-Kumba M, Fonteneau P, Poindron P. A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. *J Immunol Methods*. 1992. 154(2): 185-193.

Girardin E, Grau GE, Dayer J-M, Roux-Lombard P, J5 Study Group, Lambert PH. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med*. 1988. 319(7): 397-400.

Goldfarb RD, Marton A, Szabó E, Virág L, Salzman AL, Glock D, Akhter I, McCarthy R, Parrillo JE, Szabó C. Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase in a porcine model of severe bacterial sepsis. *Crit Care Med*. 2002. 30(5): 974-980.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper I, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and 15nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982. 126(1): 131-137.

Guo RF, Huber-Lang M, Wang X, Sarma V, Padgaonkar VA, Craig RA, Riedemann NC, McClintock SD, Hlaing T, Shi MM, Ward PA. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis. *J Clin Invest*. 2000. 106(10): 1271-1280.

Gurr E. The rational use of dyes in biology. Leonard Hill, London. 1965. 115-116.

Hancock REW. Peptide antibiotics. *Lancet*. 1997. 349(9049):418422.

Hancock RE, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett*. 2002. 206(2):143-149.

Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006. 24(12): 1551-1557.

Hancock RE, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proc Natl Acad Sci USA. 2000. 97(16): 8856-8861.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005. 6(11):1123-1132.

Hatherill M, Tibby SM, Turner C, Ratnavel N, Murdoch IA. Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock. Crit Care Med. 2000. 28(7): 2591-2594.

Hayashi, M. In Vivo Rodent Micronucleus Assay. Chrom Alterations. 2007. 16(3): 257-270.

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 1997. 40(1):135-6.

Hirata IY, Cezari MHS, Nakate CR, Boschkov P, Ito AS, Juliano MA, Juliano L. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-amino benzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. Lett Pept Sci, 1994, 1(6): 299-308.

Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. Proc Natl Acad Sci. 1999. 96(25): 14541-14546.

Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW,

Karl IE. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol*. 2000. 1(6): 496-501.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003. 348(2): 138-50.

Huang HJ, Ross CR, Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol*. 1997. 61(5):624-629.

Huang PH, Chen JY, Kuo CM. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions. *Mol Immunol*. 2007. 44(8): 1922-34.

Huber-Lang MS, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Younkin EM, Laudes IJ, Riedemann NC, Younger JG, Ward PA. Protective effects of anti-C5a peptide antibodies in experimental sepsis. *FASEB J*. 2001. 15(3): 568-570.

Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T. *Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression*. *J Dermatol Sci*, 2006. 42(3): 203-14.

Kilpatrick L., Harris MC. Cytokines and the inflammatory response. In: *Fetal and Neonatal Physiology*. Polin RA, Fox WW, editors. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998. pp. 1967-1979.

Klevens RM, Edwards JR, Horan TC, Gaynes RP, Pollack DA, Cardo DM. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Reports*. 2007. 122(1):160-166.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK; Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA

Investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007. 298(15):1763-71.

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin. Microbiol. Rev. 1997. 10(3): 505-520.

Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. J Clin Invest. 2003. 111(11): 1665-72.

Kuckelhaus S, Leite JRSA, Neves MP, Frota KS, Abdala LF, Muniz-Junqueira MI, Bloch Jr C, Tosta CE. Toxicity evaluation to mice of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). Int J Peptide Res Ther. 2007. 13(3): 423-429.

Kurien, B. T., Scofield, R. H. Western Blotting. Methods 2006. 38:283-93.

Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol. 2009. 30(3): 131-141.

Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. Shock. 1999. 11(3): 153-159. Oberholzer A, Oberholzer C,

Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research. 2003. 2(1):63-76.

Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. Journal of Endodontics. 1993. 19(11):541-544.

Lee IH, Cho Y, Lehrer RI. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect Immun*. 1997. 65(7): 2898-903.

Lee YS, Shin YP, Shin SH, Park S, Kim MH, Lee IH. Therapeutic Efficacy of Halocidin-Derived Peptide HG1 in a Mouse Model of Surgical Wound Infection with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011. Epub ahead of print.

Lewis RN, Kiricsi M, Prenner EJ, Hodges RS, McElhaney RN. Fourier transform infrared spectroscopic study of the interactions of a strongly antimicrobial but weakly hemolytic analogue of gramicidin S with lipid micelles and lipid bilayer membranes. *Biochemistry*. 2003. 42(2): 440-449.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998. 339(8): 520-32.

Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med*. 2008. 59(1): 415-428.

Machado PRL, Araujo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An. Bras. Dermatol*. 2004. 79(6): 647-662.

Maini RN, Taylor PC. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu Rev Med*. 2000. 51(1): 207-229.

Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham S. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*. 1996. 381(6577): 77-80.

Malmsten M, Kasetty G, Pasupuleti M, Alenfall J, Schmidtchen A. Highly Selective End-Tagged Antimicrobial Peptides Derived from PRELP. *PLoS ONE*. 2011. 6(1): e16400.

Marshall JH, Wilmoth GJ. Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. J. Bacteriol. 1981. 147(3): 900-913.

Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. J. Leukoc. Biol. 1995. 58(2): 128-136.

Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochim. Biophys. Acta. 1999. 1462(1-2): 1-10.

Matthay MA. Severe sepsis - a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. N Engl J Med. 2001. 344(10): 759-762.

McKibben L, Horan TC, Tokars JI, Fowler G, Cardo DM, Pearson ML, Brennan PJ; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guidance on Public Reporting of Healthcare-Associated Infections: Recommendations of the HICPAC. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005. 26(6): 580-587.

Meakins JL, Pietsch JB, Bubenick O, Kelly R, Rode H, Gordon J, MacLean LD. Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. Ann Surg. 1977. 186(3): 241-250.

Menzel LP, Lee IH, Sjostrand B, Lehrer RI. Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. Dev Comp Immunol. 2002. 26(6): 505-15.

Merchant D, Kahn R. Handbook of Cell and Organ Culture. Broken Arrow, Burgess Publishing. 1964. 191p.

Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. J Immunol. 2006. 176(1): 2455-2464.

Moore KW, Malefyt, RW, Coffman, RL, O'Garra. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 2001. 19(1): 683-765.

Moser C, Weiner DJ, Lysenko E, Bals R, Weiser JN, Wilson JM. beta-Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect Immun*. 2002. 70(6): 3068–3072.

Mor A, Nicolas P. The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J. Biol. Chem*. 1994. 269(3): 1934-1939.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Met*. 1983. 65(1-2): 55-63.

Mueller M, de la Peña A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: Kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. 48(2): 369-77.

Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res*. 2002. 81(12): 845-50.

Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. *J Immunol*. 2001. 167(6): 3329-3338.

Nan YH, Jeon YJ, Park I-S, Shin SY. Antimicrobial peptide P18 inhibits inflammatory responses by LPS- but not by IFN- γ -stimulated macrophages. *Biotechnology Letters*. 2008. 30(7): 1183-1187.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*,

Fourth Edition. Approved Standard. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. NCCLS Publication M7-A4.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania. 2003. 19087-1898.

Nell MJ, Tjabringa GS, Wafelman AR, Verrijck R, Hiemstra PS, Drijfhout JW, Grote JJ. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides*. 2006. 27(4): 649-60.

Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J*. 2009. 276(22): 6483-96.

Nijnik A, Hancock REW. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging Health Threats Journal*. 2009. 2(e1): 1-7.

Nijnik A, Pistolic J, Wyatt A, Tam S, Hancock RE. Human cathelicidin peptide LL-37 modulates the effects of IFN-gamma on APCs. *J Immunol*. 2009. 183(9): 5788-98.

Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol*. 2001. 31: 1066-1075.

Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J Immunol*. 2005. 175(1): 1776–1784.

Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol.* 2007. 127(3): 594-604.

Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjamas V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature.* 2001.414(6862): 454-457.

Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology.* 2003. 48(6): 1429-1449.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling -- regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* 2000. 28: Suppl:N3-N12.

Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J.* 2001a.15(1): 879-892.

Oberholzer C, Oberholzer A, Bahjat FR, Minter RM, Tannahill CL, Abouhamze A, LaFace D, Hutchins B, Clare-Salzler MJ, Moldawer LL. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc Natl Acad Sci.* 2001b. 98(1): 11503-11508.

O'Suilleabhain C, O'Sullivan ST, Kelly JL, Lederer J, Mannick JA, Rodrick ML. Interleukin-12 treatment restores normal resistance to bacterial challenge after burn injury. *Surgery.* 1996. 120(1): 290-296.

O'Reilly M, Newcomb DE, Remick D. Endotoxin, sepsis, and the primrose path. *Shock*. 1999. 12(1): 411-420.

Otero-González AJ, Magalhães BS, Garcia-Villarino M, López-Abarategui C, Sousa DA, Dias SC, Franco OL. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *FASEB J*. 2010. 24(5): 1320-34.

Papareddy P, Rydengård V, Pasupuleti M, Walse B, Mörgelin M, Chalupka A, Malmsten M, Schmidtchen A. Proteolysis of human thrombin generates novel host defense peptides. *PLoS Pathog*. 2010. 6(4): e1000857.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hecidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem*. 2001. 276(1): 7806-7810.

Perry C. *Infection Prevention and Control*. 2007. John Wiley & Sons. 294p.

Pittet D, Allegranzi B, Storr J, Bagheri Nejad S, Dziekan G, Leotsakos A, Donaldson L. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *J Hosp Infect*. 2008. 68(4): 285-92.

Powers JP, Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 2003. 24(11): 1681-1691.

Prenner EJ, Lewis RN, Jelokhani-Niaraki M, Hodges RS, McElhaney RN. Cholesterol attenuates the interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with phospholipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. 1510(1): 83-92.

Prohaszka Z, Nemet K, Csermely P, Hudecz F, Mezo G, Fust . Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1. *Mol Immunol*. 1997. 34(1): 809-816.

Projan SJ, Novick RP. The molecular basis of pathogenicity, p. 55-81. *In* K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New-York, N.Y. 1997.

Pruitt JH, Welborn MB, Edwards PD, Harward TR, Seeger JW, Martin TD, Smith C, Kenney JA, Wesdorp RI, Meijer S, Cuesta MA, Abouhanze A, Copeland EM 3rd, Giri J, Sims JE, Moldawer LL, Oldenburg HS. Increased soluble interleukin-1 type II receptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis syndrome. *Blood*. 1996. 87(1): 3282-3288.

Rajanbabu V, Pan CY, Lee SC, Lin WJ, Lin CC, Li CL, Chen JY. Tilapia hepcidin 2-3 peptide modulates lipopolysaccharide-induced cytokines and inhibits tumor necrosis factor-alpha through cyclooxygenase-2 and phosphodiesterase 4D. *J Biol Chem*. 2010. 285(40): 30577-30586.

Ramamoorthy L, Tizard IR. Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a β -(1,4)-acetylated mannan. *Molecular Pharmacology*. 1998. 53(1): 415-421.

Rezende EM, Couto BR, Starling CE, Módena Prevalence of CM. nosocomial infections in general hospitals in Belo Horizonte. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998. 19(11): 872-876.

Ribeiro Sobrinho AP, de Melo Maltos SM, Farias LM, de Carvalho MA, Nicoli JR, de Uzeda M, Vieira LQ. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral Microbiol Immunol*. 2002. 17(6): 344-53.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999. 283(5405): 1183-1186.

Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008. 8(10): 776-87.

Rogy MA, Coyle SM, Oldenburg HS, Rock CS, Barie PS, Van Zee KJ, Smith CG, Moldawer LL, Lowry SF. Persistently elevated soluble tumor necrosis factor receptor and interleukin-1 receptor antagonist levels in critically ill patients. *J Am Coll Surg*. 1994. 178(2): 132-138.

Salmon AL, Cross LJ, Irvine AE, Lappin TR, Dathe M, Krause G, Canning P, Thim L, Beyermann M, Rothemund S, Bienert M, Shaw C. Peptide leucine arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin of the Northern Leopard frog, *Rana pipiens*. *J Biol Chem*. 2001. 276(13): 10145-10152.

Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*. 2007. 43(6): 413-23.

Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol*. 2002. 169(7): 3883-3891.

Scott MG, Dullaghan E, Mookherjee N, Glavas N, Waldbrook M, Thompson A, Wang A, Lee K, Doria S, Hamill P, Yu JJ, Li Y, Donini O, Guarna MM, Finlay BB, North JR, Hancock RE. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nat Biotechnol*. 2007. 25(4): 465-472.

Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1999. 1462(1-2): 55-70.

Shaykhiev R, Beisswenger C, Kandler K, Senske J, Puchner A, Damm T, Behr J, Bals R: Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005. 289: L842-848.

Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock*. 2002. 17(4): 286-292.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry*. 1998. 67: 227-264.

Taubes G. The bacteria fight back. *Science*. 2008. 321(5887): 356-361.

Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CHB, Murta EFC, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit. Care. Med*. 2002. 30(5): 1056-1061.

Taylor SW, Craig AG, Fisher WH, Park M, Lehrer RI, Styelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes. *J. Biol. Chem*. 2000. 275(49): 38417-38426.

Territo, M. C., T. Ganz, M. E. Selsted, R. Lehrer. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest*. 1989. 84(6): 2017-2025

Tincu JA, Menzel LP, Azimov R, Sands J, Hong T, Waring AJ, Taylor SW, Lehrer RI. Plicatamide, an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocytes. *J. Biol. Chem*. 2003. 278(15): 13546-13553

Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, Drijfhout JW, Sorensen OE, Borregaard N, Rabe KF, Hiemstra PS. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol*. 2003. 171(12): 6690-6696.

Vallespi MG, Glaria LA, Reyes O, Garray HE, Ferrero J, Arana MJ. A Limulus antilipopolsaccharide factor-derived peptide exhibits a new immunological activity with potential applicability in infectious diseases. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000. 7(4): 669-675.

Vallespi MG, Alvarez-Obregon JC, Rodriguez-Alonso I, Montero T, Garay H, Reyes O, Arana MJ. A Limulus anti-LPS factor-derived peptide modulates cytokine gene expression and promotes resolution of bacterial acute infection in mice. *Int Immunopharmacol.* 2003. 3(2): 247-256

van der Does AM, Bogaards SJ, Ravensbergen B, Beekhuizen H, van Dissel JT, Nibbering PH. Antimicrobial peptide hLF1-11 directs granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-driven monocyte differentiation toward macrophages with enhanced recognition and clearance of pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. 54(2): 811-816.

van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppelle GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. I. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J. Immunol. Methods* 1991. 141(1): 15-22.

van Kan EJ, van der Bent A, Demel RA, de Kruijff B. Membrane activity of the peptide antibiotic clavanin and the importance of its glycine residues. *Biochemistry.* 2001. 40(21): 6398-405.

van Kan EJ, Demel RA, Breukink E, van der Bent A, de Kruijff B. Clavanin permeabilizes target membranes via two distinctly different pH-dependent mechanisms. *Biochemistry.* 2002. 41(24): 7529-39.

van Kan EJ, Ganchev DN, Snel MM, Chupin V, van der Bent A, de Kruijff B. The peptide antibiotic clavanin A interacts strongly and specifically with lipid bilayers. *Biochemistry.* 2003. 42(38): 11366-72.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006. 34(2): 344-353.

Vizioli J, Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci*. 2002. 23(11): 494-496.

Waddell WJ. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *J Lab Clin Med*. 1956. 48(2): 311-314.

Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003.47(1): 317-23.

Wang Z, Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res*. 2004. 32(1): D590-D592.

Weber G, Chamorro CI, Granath F, Liljegren A, Zreika S, Saidak Z, Sandstedt B, Rotstein S, Mentaverri R, Sánchez F, Pivarcsi A, Stähle M. Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009. 11(1): R6.

Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect*. 2009. 59: Suppl 1S4–16.

Wright RK. Urochordates. *In: Invertebrate Blood Cells*. Ratcliffe NA, Rowley AF. (eds). 1981. Academic Press, London. pp. 566–626.

Wu G, Li X, Deng X, Fan X, Wang S, Shen Z, Xi T. Protective effects of antimicrobial peptide S-thanatin against endotoxic shock in mice introduced by LPS. *Peptides*. 2011. 32(2): 353-357.

Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* 2000. 79(4): 2002-2009.

Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003. 55(1): 27-55.

Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2004. 75(1): 39-48.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002. 415(6870): 389-395.

Zhang Z, Shively JE. Generation of Novel Bone Forming Cells (Monoosteophils) from the Cathelicidin-Derived Peptide LL-37 Treated Monocytes. *PLoS One.* 2010. 5(11): e13985.

Zughaier SM, Shafer WM, Stephens DS. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cell Microbiol.* 2005. 7(9): 1251-1262.

Zughaier SM, Svoboda P, Pohl J, Stephens DS, Shafer WM. The human host defense peptide LL-37 interacts with *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharides and inhibits inflammatory mediators release. *PLoS One.* 2010. 5(10): e13627.