

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Talitha Caiafa Ferreira Alves Botelho

**Avaliação da ação de peptídeos sintéticos derivados de *Lippia alba*
e *Lippia rotundifolia* no crescimento *in vitro* da bactéria *Brucella*
*abortus***

Juiz de Fora

2014

TALITHA CAIAFA FERREIRA ALVES BOTELHO

**Avaliação da ação de peptídeos sintéticos derivados de *Lippia alba*
e *Lippia rotundifolia* no crescimento *in vitro* da bactéria *Brucella*
*abortus***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos**

JUIZ DE FORA

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Botelho, Talitha Caiafa Ferreira Alves.

Avaliação da ação de peptídeos sintéticos derivados de *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia* no crescimento *in vitro* da bactéria *Brucella abortus* / Talitha Caiafa Ferreira Alves Botelho. -- 2014.

68 p.

Orientador: Marcelo de Oliveira Santos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Peptídeos Antimicrobianos Sintéticos. 2. Resistência a antimicrobianos. I. Santos, Marcelo de Oliveira, orient. II. Título.

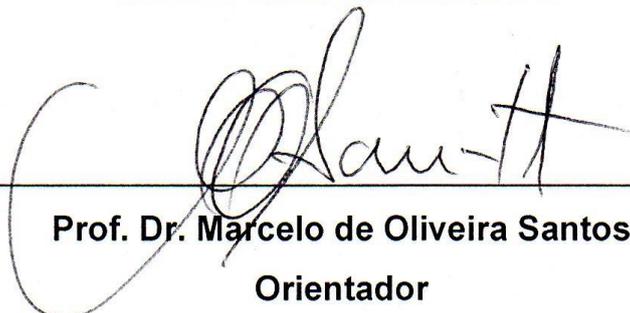
TALITHA CAIAFA FERREIRA ALVES BOTELHO

Avaliação de peptídeos sintéticos derivados de *Lippia alba* e *L. rotundifolia* no crescimento *in vitro* da bactéria *Brucella abortus*

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 26/05/14.

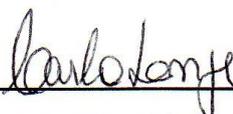
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

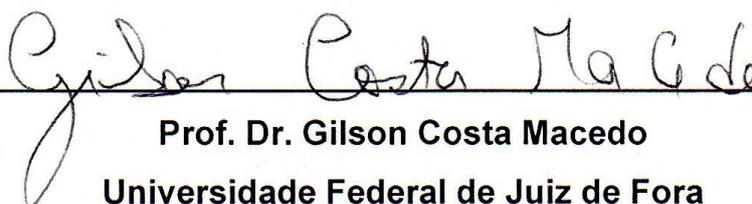
Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª. Dr.ª. Carla Christine Lange

EMBRAPA Gado de Leite



Prof. Dr. Gilson Costa Macedo

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho aos meus filhos Gabriel e Davi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade e à CAPES pela bolsa de estudos;

A Deus pela força e por estar sempre ao meu lado durante as tormentas;

Aos meus filhos pelo amor incondicional, paciência e compreensão nos momentos que estive ausente;

A minha mãe por me apoiar em tudo e estar sempre ao meu lado;

Ao meu orientador Professor Doutor Marcelo pelo apoio, confiança, paciência e conhecimento adquirido durante a realização desse trabalho.

As minhas amigas Letícia e Renata por estarem sempre presentes e dispostas a me ensinar, apoiar e me ajudar a relaxar em momentos difíceis;

Aos professores do Departamento de Biologia pela confiança e disponibilidade de ajudar em qualquer momento;

Ao Professor Gilson Costa Macedo pela compreensão e ensinamentos;

A Társila, Letícia e as alunas de iniciação científica do Laboratório de Imunologia, sempre dispostas a me ajudar;

As alunas de Doutorado Shayane e Camila pelo apoio e pelas conversas;

Ao Francisco pelos ensinamentos farmacológicos cruciais no entendimento de algumas reações e por ser meu amigo de coração;

Aos colegas de mestrado que durante as aulas me ajudaram muito no entendimento das matérias;

A todos que direta ou indiretamente ajudaram nesse trabalho.

RESUMO

A crescente busca por novos compostos antimicrobianos, devido a altas taxas de resistência aos mesmos, tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores no desenvolvimento de ferramentas para descobrimento e desenho de novos antimicrobianos. No presente trabalho utilizamos três estirpes de *Brucella abortus*: RB51, S19 e S2308. As bactérias são cocobacilos, gram-negativas, intracelulares facultativas e, agente etiológico da brucelose em bovinos, bubalinos, humanos, ovinos e outros animais. O difícil tratamento da doença através da combinação de diferentes antibióticos está associado às altas taxas de resistência aos antibióticos utilizados contra a *Brucella abortus*, tornando-a uma bactéria de difícil controle e ao mesmo tempo um campo extenso de estudo para novos agentes antimicrobianos. Os peptídeos sintéticos são uma alternativa promissora como agentes antimicrobianos. No presente trabalho foram usados os peptídeos (Lalb1; Lalb1.2; Lalb1.3; Lrot3.5; Lrot3.6; Lrot3.7 e Lrot3.8) que possuem características baseadas em peptídeos naturais produzidos pelas plantas *Lippia alba*(Lalb) e *Lippia rotundifolia* (Lrot), e que foram modificados utilizando-se ferramentas computacionais de modelagem. Todos os peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana em alguma das concentrações testadas (8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL). Os peptídeos Lrot3.5 e Lrot3.6 além de apresentarem atividade antimicrobiana contra as três estirpes estudadas na concentração 32µg/mL e demonstraram não diminuir a viabilidade celular de macrófagos em testes com redução de tetrazolio (MTT). Estes são, portanto, peptídeos promissores para estudos adicionais.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos sintéticos; Resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

The search for new antimicrobial compounds leads many researchers to the development of tool for antimicrobial prospection and design due to the increasing of antibiotic resistance by bacteria. In the present study, three strains of *Brucella abortus* were used: RB51, S19 and S2308. The bacteria are coccobacilli, gram-negative, facultative intracellular and etiological agents of brucellosis in cattle, buffaloes, humans, sheep, and other animals. The treatment is very difficult and a combination of different antibiotics associated to high antibiotic resistance rates for commonly used drugs against *Brucella abortus* increases the difficult of microorganism control. Thus, an avenue of opportunities for an extensive research field for antimicrobial agents' studies is opened. Synthetic peptides are a promising alternative for the development of new antimicrobial agents. In this study, the following synthetic peptides were used: Lalb1.2; Lalb1.3; Lrot3.5; Lrot3.6; Lalb1; Lrot3.7 and Lrot3.8 against *Brucella* strains. These peptides were developed based on natural characteristics of antimicrobial peptides produced by plants using *Lippia alba* (Lalb) and *Lippia rotundifolia* (Lrot) leaf transcriptome for antimicrobial prospection. All peptides showed antimicrobial activity for all of the evaluated concentrations (8, 16,32, 64 and 128 mg/mL). TheLrot3.5 and Lrot3.6 peptides showed antimicrobial activity against all of the three studied strains at the concentration 32µg/mL. These peptides at this concentration do not decrease cell viability of macrophages in tetrazolium reduction (MTT) tests and are prospective peptides for additional studies.

Keywords: Antimicrobial synthetic peptides; antimicrobial resistance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peptídeos antimicrobianos isolados de plantas.	27
Tabela 2	Peptídeos antimicrobianos de escorpião e as respectivas espécies das quais foram isolados (ZENG et al, 2013).	29
Tabela 3	Peptídeos iniciais e peptídeos remodelados utilizados em testes antimicrobianos com <i>Brucella abortus</i> RB51, S19 e S2308 oriundos da espécie <i>Lippia alba</i> .	34
Tabela 4	Peptídeos remodelados utilizados em testes antimicrobianos com <i>Brucella abortus</i> RB51, S19 e S2308 oriundos da espécie <i>Lippia rotundifolia</i> .	34
Tabela 5	Concentração inibitória mínima (MIC) para os testes antimicrobianos realizados com <i>Brucella abortus</i> RB51, S19 e S2308 tratadas com peptídeos sintéticos Lalb1; Lalb1.2; Lalb1.3; Lrot3.5; Lrot3.6; Lrot3.7 e Lrot3.8.	48
Tabela 6	Avaliação da atividade bactericida/bacteriostática de peptídeos antimicrobianos sintéticos contra <i>Brucella abortus</i> RB51, S19 e S2308.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura de Lipopolissacarídeo.	18
Figura 2	Relação entre a densidade turbimétrica (OD) a 625nm da cultura bacteriana de <i>Brucella abortus</i> RB51 e o tempo de incubação da cultura (horas).	38
Figura 3	Relação entre o tempo de incubação da cultura de <i>Brucella abortus</i> RB51 (horas) e o número de Unidades Formadoras de Colônias na diluição 1:1000000 .	39
Figura 4	Relação entre a densidade turbimétrica (OD) a 625nm da cultura bacteriana de <i>Brucella abortus</i> S19 e o tempo de incubação da cultura (horas).	39
Figura 5	Relação entre o tempo de incubação da cultura de <i>Brucella abortus</i> S19 (horas) e o número de Unidades Formadoras de Colônias na diluição 1:1000000 .	40
Figura 6	Relação entre a densidade turbimétrica (OD) a 625nm da cultura bacteriana de <i>Brucella abortus</i> S2308 e o tempo de incubação da cultura (horas).	40
Figura 7	Relação entre o tempo de incubação da cultura de <i>Brucella abortus</i> S2308 (horas) e o número de Unidades Formadoras de Colônias na diluição 1:1000000	41
Figura 8	Resultado representativo dos grupos controle negativo, controle negativo tampão, controle positivo e controle positivo tampão dos ensaios antimicrobianos de peptídeos sintéticos contra <i>Brucella abortus</i> RB51.	43
Figura 9	Resultado representativo dos grupos controle negativo, controle negativo tampão, controle positivo e controle positivo tampão dos ensaios antimicrobianos de peptídeos sintéticos contra <i>Brucella abortus</i> S19.	44
Figura 10	Resultado representativo dos grupos controle negativo, controle negativo tampão, controle positivo e controle positivo tampão dos ensaios antimicrobianos de peptídeos sintéticos contra <i>Brucella abortus</i> S2308.	44
Figura 11	Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lalb1, Lalb1.2 e Lalb1.3 e do antibiótico gentamicina contra <i>Brucella abortus</i> RB51. Os resultados apresentados são as médias, das médias das triplicatas, dos dois bioensaios realizados.	45
Figura 12	Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lrot3.5, Lrot3.6, Lrot3.7 e Lrot3.8 e do antibiótico gentamicina contra <i>Brucella abortus</i> RB51. Os resultados apresentados são as médias, das médias das triplicatas ,dos dois bioensaios realizados.	45
Figura 13	Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lalb1, Lalb1.2 e Lalb1.3 e do	46

- antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* S19. Os resultados apresentados são as médias, das médias das triplicatas, dos dois bioensaios realizados.
- Figura 14 Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lrot3.5, Lrot3.6, Lrot3.7 e Lrot3.8 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* S19. Os resultados apresentados são as médias, das médias das triplicatas ,dos dois bioensaios realizados. 46
- Figura 15 Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lalb1, Lalb1.2 e Lalb1.3 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* S2308. Os resultados apresentados são as médias, das médias das triplicatas, dos dois bioensaios realizados. 47
- Figura 16 Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lrot3.5, Lrot3.6, Lrot3.7 e Lrot3.8 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* S2308. Os resultados apresentados são as médias, das médias das triplicatas ,dos dois bioensaios realizados. 47
- Figura 17 Resultado do teste de viabilidade celular de peptídeos sintéticos Lrot3.5; Lrot3.6; Lrot3.8; Lalb1 e Lalb1.3 em macrófagos. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
BB	Meio de cultura Brucella Broth
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais)
DC	Células Dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IFN- γ	Interferon gama
IFN	Interferons
IL-10	Interleucina 10
LPS	Lipopolissacarídeo
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
OD	Densidade Turbidimétrica
OM	Membrana Externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares conservados associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salino
PGLA	Glicina-leucina-amida peptídica
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
SAR	Relações estrutura-atividade
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	O GÊNERO BRUCELLA.....	16
2.1.1	<i>Brucella abortus</i> Rb51.....	17
2.1.2	<i>Brucella abortus</i> S19.....	19
2.1.3	<i>Brucella abortus</i> S2308.....	19
2.2	<i>Brucella abortus</i> E RESPOSTA IMUNE.....	20
2.3	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	22
2.3.1	Peptídeos Antimicrobianos Isolados de Plantas.....	25
2.3.2	Peptídeos Antimicrobianos Isolados de Animais.....	27
2.3.3	Peptídeos Antimicrobianos Sintéticos.....	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAIS e MÉTODOS	33
4.1	BACTÉRIAS E MEIOS DE CULTURA.....	33
4.2	CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES RB51, S19 E S2308.....	33
4.3	PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	34
4.4	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS PEPTÍDEOS.....	35
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICA.....	36
4.6	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE - MTT.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	CURVA DE CRESCIMENTO.....	38
5.2	ENSAIOS ANTIMICROBIANOS E MTT.....	42
6	CONCLUSÕES	52
7	PERSPECTIVAS	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas enfrentados pelos serviços de saúde atualmente é o aumento de bactérias resistentes a antimicrobianos (COSTELLOE et al., 2010). Diversos estudos vêm sendo realizados nessa área justamente pela importância biológica e econômica desse assunto. O aumento da frequência de bactérias multirresistentes e uma desaceleração recente no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos colocam a humanidade em estado de emergência no que diz respeito à ameaça de novas infecções bacterianas (ROSCIA et al., 2013). Segundo Tavares e colaboradores (2013) a resistência pode ser associada com mutações cromossômicas ou genes importados através de recombinação genética. Em microrganismos resistentes a antimicrobianos, os genes de resistência, contidos em plasmídeos, transposons e integrons podem ser inserido no cromossomo ou genoma extra-cromossômico. A resistência também pode ser associada com uma impermeabilidade do envelope da célula bacteriana.

A brucelose é uma zoonose re-emergente em todo o mundo que causa grandes perdas econômicas e graves doenças humanas. Na última década, a brucelose deixou de ser uma doença de profissionais e passou a ser uma doença de origem alimentar (GHODASARA, ROY E BHANDERI, 2010). Segundo Azira (2007) a bactéria *Brucella melitensis* continua a ser a principal causa da doença humana em todo o mundo, seguida de *B. abortus* e *B. suis*. O número de casos de infecções por *Brucella melitensis* chega a 500.000 por ano em humanos (PAPPAS et al., 2006)

Avaliações soro epidemiológicas, em rebanhos de bovinos, realizadas no período de 2001 a 2004 em 13 unidades federativas brasileiras (BA, ES, GO, MG, MT, PR, SC, RJ, RS, SP, SE, TO e DF) mostraram que a doença está disseminada em todas as áreas estudadas e que a situação é heterogênea entre estados e mesmo entre regiões de um mesmo estado. Evidenciou-se uma tendência de crescimento da prevalência no sentido Centro-Oeste/Norte do país, com prevalências mais elevadas especialmente naqueles estados produtores de carne tradicionais (LAGE et al., 2008).

O tratamento ideal para a brucelose é um regime de combinação utilizando dois antibióticos (doxiciclina e estreptomicina), pois monoterapias com antibióticos

individuais têm sido associadas a altas taxas de recaída (SELEEM et al., 2009; SOLERA et al., 1997). Adesiyun (2011) realizou o teste de susceptibilidade por difusão em ágar com oito antibióticos (azitromicina, ciprofloxacina, doxiciclina, moxifloxacina, rifampicina, tetraciclina, estreptomicina e sulfametoxazola/trimetoprima) e concluiu que 100% das estirpes analisadas (isoladas de animais) apresentaram resistência a pelo menos uma droga utilizada. Abdel-Maksoud e colaboradores (2012) realizaram o teste de susceptibilidade utilizando estirpes oriundas do Egito e concluíram que 64% das estirpes apresentaram resistência à rifampicina, um antibiótico utilizado como referência no tratamento da brucelose. Várias drogas como doxiciclina, rifampicina, estreptomicina e os corticosteróides têm sido testadas isoladamente ou em combinações em infecções simples e crônicas com altas taxas de sucesso; no entanto, têm sido relatadas recidivas em certos casos (ABDEL-MAKSOUUD et al., 2012). Testes de susceptibilidade antimicrobiana de rotina não são, geralmente, conduzidos para *Brucella*, devido à sua exigência de requisitos de crescimento, risco de adquirir infecções laboratoriais e a necessidade de nível dois ou três de segurança biológica (ABDEL-MAKSOUUD et al., 2012).

O desenvolvimento de novos antibióticos se faz necessário para diminuir os casos de reincidência da doença, uma vez que estirpes resistentes aos antibióticos comumente utilizados têm se tornado mais frequentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.10 Gênero *Brucella*

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são taxonomicamente colocadas na subdivisão alfa-2da classe Proteobacteria. Há 10 espécies de brucela com base na especificidade com o hospedeiro preferencial: *B. melitensis* (caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (suínos), *B. canis* (cães), *B. ovis* (ovinos), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. cetaceos* (cetáceos), *B. pinnipedia* (foca), *B. microti* (ratazanas) e *B. inopinata* (desconhecido) (HE, 2012).

As espécies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. canis* são patogênicas para humanos (HE, 2012). *Brucella* spp. são bactérias intracelulares facultativas, Gram-negativas, coco bacilos, não formadores de esporos e não encapsulados (SELEEM et al., 2009). Uma importante característica da brucelose é a colonização bacteriana persistente do sistema reticuloendotelial. Como algumas espécies são reservatório de *Brucella* spp., estas são naturalmente transmitidas durante acasalamento e parto e não persistem no meio ambiente. Um aspecto importante da ecologia de *Brucella* é a capacidade das bactérias persistirem dentro de tecidos do hospedeiro (ATLURI et al., 2011).

Algumas bactérias do gênero *Brucella* causam doenças (brucelose) em bovinos, que resultam em graves perdas econômicas devido a abortos, natimortos e bezerros fracos. As lesões consistem de placentite necrótica e mastite intersticial em vacas prenhas, e pleurite fibrinosa com pneumonia intersticial em fetos abortados e bezerros recém-nascidos (NETA et al., 2010).

Em humanos, a infecção é adquirida pelo consumo de produtos lácteos não pasteurizados ou pelo contato com animais infectados. Não há contágio de humano para humano e, dado que não existe uma vacina humana, a vacinação dos animais é essencial para controlar a brucelose (CONDE-ÁLVAREZ et al., 2012). Os seres humanos têm, geralmente, um período de duas a quatro semanas de latência, após o contato com a bactéria, para o surgimento dos primeiros sintomas (ATLURI et al.,

2011). Esta doença bacteriana é caracterizada por ser altamente debilitante e incapacitante, causando febre, sudorese, fadiga, perda de peso, dor de cabeça, dor nas articulações e que persiste por semanas a meses. Complicações neurológicas, endocardite e formação de abscesso testicular ou nos ossos também podem ocorrer (CORBEL, 2006).

As bactérias do gênero *Brucella* são altamente infecciosas para os seres humanos, estima-se que uma dose de apenas 10-100 organismos seja suficiente para estabelecer uma infecção por via aérea (BOSSI et al., 2004).

As infecções bacterianas são uma das principais causas de complicações na gravidez e a placenta tem um papel crítico na proteção do feto, garantindo a tolerância imunológica. A barreira entre a mãe e o feto é estabelecida por trofoblastos, uma linhagem celular epitelial de origem fetal especializada, que se diferencia em várias sub-populações durante o implante (SALCEDO et al., 2013). Salcedo e colaboradores (2013) também constataram que algumas bactérias do gênero *Brucella* proliferaram extensivamente no interior das diferentes sub-populações de trofoblastos, sugerindo que esses constituem um nicho importante nos casos em que a barreira materno-fetal é violada. Em trofoblastos extravilosos (EVTs), *B. abortus* e *B. suis* replicam-se dentro da membrana de um único lisossomo, ao passo que *B. melitensis* replica-se no retículo endoplasmático.

2.1.1 *Brucella abortus* RB51

As estirpes de *Brucella abortus* são classificadas morfológicamente como lisas e rugosas de acordo com a presença ou ausência do antígeno-O do lipopolissacarídeo (LPS) (Figura 3). Em *B. abortus*, o LPS completo demonstrou ser um fator de virulência, uma vez que estirpes rugosas atenuadas são derivadas de estirpes virulentas com LPS completo (VEMULAPALLI et al., 2000).

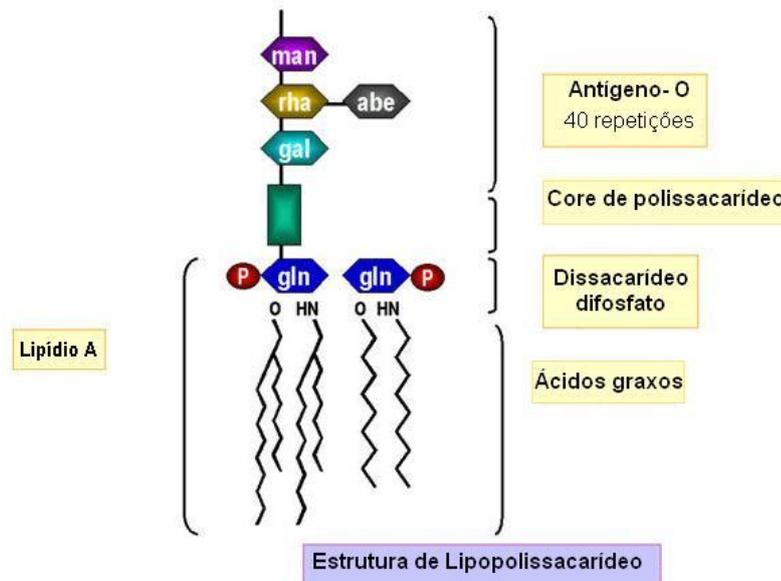


FIGURA 1 - Estrutura de Lipopolissacarídeo. FONTE: http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/chapter_4_bp.htm

A linhagem RB51 (SRB51) consiste de bactérias mutantes (mutante laboratorial) deficiente no antígeno-O e oriunda da estirpe virulenta 2308 (S2308) (STEVENS E OLSEN, 1996) submetida a diversas passagens em meios seletivos contendo subdoses de rifampicina (LAGE et al., 2008). Essa estirpe foi aprovada em 1996, nos Estados Unidos, para utilização como uma vacina para gado bovino, substituindo a estirpe S19. Desde então, vários países como África do Sul, Argentina, Chile, Espanha, México, Uruguai e Venezuela vêm adotando a vacina RB51 em seus programas de controle, isoladamente ou em conjunto, com a utilização da outra estirpe de *Brucella* (B19) para vacinação de fêmeas jovens e adultas. Os resultados da utilização da RB51 nestes programas de controle têm sido muito eficazes e promissores. A utilização da RB51 no Brasil está regulamentada pela Instrução Normativa 33/2007 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LAGE et al., 2008).

Uma vez que o lipopolissacarídeo da *B. abortus* RB51 é desprovido de cadeia lateral O, os anticorpos induzidos pela vacinação com esta estirpe não interferem com a sorologia convencional. Por ser a fração antigênica mais imunodominante, a cadeia O é a responsável pela resposta de anticorpos na maioria dos animais expostos a *Brucella* spp. lisas. Medidas de segurança devem ser tomadas no manuseio da vacina, pois a RB51 é patogênica para o homem (LAGE et al., 2008).

Vemulapalli e colaboradores, em 1999, descobriram que a ruptura do gene *wboA* em estirpes lisas, como *B. abortus* S2308, resulta em uma conversão para o fenótipo rugoso e esta se dá pela inserção do elemento IS711. O gene *wboA* de *B. abortus*, codifica glicosiltransferase, uma enzima essencial na biossíntese do antígeno O.

2.1.2 *Brucella abortus* S19

B. abortus cepa "19" ou S19 é uma cepa atenuada espontaneamente descoberta pelo Dr. John Buck em 1923. Os mecanismos moleculares subjacentes ou fisiológicos, que causam a perda de virulência, não são bem compreendidos. (CRASTA et al., 2008). Crasta e colaboradores (2008) observaram também que a comparação entre os genomas de S19 com S2308 e 9-941 (estirpes virulentas) revelou que apenas 263 *open reading frames* eram não idênticos entre as estirpes S19/2308 e S19/9-941. Segundo Lamontagne e colaboradores (2009) a estirpe virulenta S2308 e a estirpe vacinal S19 possuem genomas altamente homólogos, no entanto, as duas estirpes diferem significativamente no componente do envelope da sua célula e exibem comportamentos distintos durante a infecção. Acredita-se que essas diferenças funcionais podem ser também refletidas em seus proteomas durante o ciclo de infecção de células.

2.1.3 *Brucella abortus* S2308

A estirpe virulenta *B. abortus* S2308 inibe a morte celular programada de macrófagos e replica-se dentro deles (CHEN e HE, 2009). A autofagia é um processo de degradação celular que pode capturar e eliminar microrganismos intracelulares, fornecendo os lisossomos para a destruição. No entanto, os patógenos desenvolveram mecanismos para subverter este processo. As bactérias intracelulares *Brucella abortus* asseguram a sua sobrevivência, formando o vacúolo

contendo *Brucella* (BCV), que trafega a partir do compartimento de endocitose para o retículo endoplasmático (ER), em que a bactéria prolifera (STARR et al., 2012).

O tipo de sistema de secreção virB IV de *Brucella* desempenha um papel central no processo de proliferação da bactéria no interior do fagócito, provavelmente pela translocação de proteínas efetoras, que modificam o transporte vesicular do hospedeiro. Além disso, vários fatores, tais como moduladores imunitários, lipopolissacarídeos liso (LPS) e cíclicos β -glucanas também podem contribuir para a virulência (BUKATA et al., 2008).

O LPS de *Brucella*, que na estirpe S2308 é completo, já foi identificado por prejudicar as respostas antimicrobianas por meio da inibição do complemento, ataque a peptídeos antimicrobianos e prevenção à síntese de mediadores imunitários (ZHANG et al., 2013). Além disso, já foi relatado que, durante uma infecção, a entrada de estirpes lisas de *Brucella*, dentro das células do hospedeiro, são lipídio-dependente e evitam a fusão fagossoma-lisossoma, favorecendo a sobrevivência no interior das células hospedeiras (NAROENI e PORTE, 2002).

2.2 *Brucella abortus* e resposta imune

A *Brucella abortus* é um agente patogênico intracelular, que provoca a doença no gado e nos seres humanos. A resposta imune efetiva contra bactérias do gênero *Brucella* precisa envolver todo o sistema imune, desde a imunidade inata à imunidade adaptativa, resultante da estimulação de células apresentadoras de antígeno, células NK, células T CD4⁺ e T CD8⁺ assim como células B (GOLDING et al., 2001).

A resposta imune contra bactérias intracelulares como a *Brucella* se inicia com o reconhecimento do microorganismo por células da imunidade inata tais como macrófagos e células dendríticas, conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs) (MACEDO et al., 2008). Neste contexto, os macrófagos são elementos chave da resposta imune uma vez que são os principais locais de sobrevivência e replicação da bactéria. Macrófagos ativados estão preparados para a fagocitose e para a destruição do patógeno através da produção de produtos bactericidas, tais como as enzimas hidrolíticas degradativas, acidificação do

fagolisossomo, defensinas, privação nutricional e explosão oxidativa. Na resposta contra a infecção por *Brucella*, a indução e superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO) são de fundamental importância (BALDWIN; GOENKA, 2006; GROSS et al., 2004). Além disso, ao serem estimulados pelo microrganismo, os macrófagos são capazes de produzir diversos tipos de citocinas e quimiocinas, dentre as quais a IL-12 e o TNF- α apresentam papel importante. A IL-12 age sobre os linfócitos T helper induzindo a formação de um perfil de resposta do tipo T_H1, caracterizado pela intensa produção da citocina IFN- γ . O IFN- γ por sua vez é capaz de ativar os macrófagos e estimular a produção de substâncias bactericidas e bacteriostáticas (como o superóxido e o óxido nítrico) sendo apontada como a citocina de maior relevância no combate a este patógeno (MURPHY et al., 2001).

O TNF- α também se mostrou importante em eliminar a bactéria em culturas de macrófagos. Esta citocina age principalmente estimulando o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção além de ativar estas células para destruir os micro-organismos (JIANG et al., 1993).

Apesar de controversa, as células NK ativadas também podem matar células alvo que estejam infectadas pelo patógeno. Além disso, as células NK também produzem IFN- γ que, como já explicitado, estimula a atividade microbicida de fagócitos (GOLDING et al., 2001).

A resposta imune adaptativa na brucelose pode ser classificada em três mecanismos. Primeiro, a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e CD8⁺ ativam a função bactericida em macrófagos a fim de dificultar a sobrevivência intracelular da *Brucella*. Segundo, a citotoxicidade exibida pelas células T CD8⁺ matam os macrófagos infectados pelo patógeno. Terceiro, os anticorpos induzidos pelo perfil T_H1, como IgG2a e IgG3, opsonizam o patógeno facilitando a fagocitose e a lise intracelular (MARTIROSYAN; GORVEL, 2013).

Após ativação, linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em células efetoras ou de memória programadas para secretar diferentes padrões de citocinas. Os linfócitos do tipo T_H1 secretam IFN- γ como principal citocina efetora contra infecções causadas por bactérias intracelulares, incluindo a *Brucella* (JONES e WINTER, 1992). Esta citocina possui duas principais funções no controle da brucelose: (1) ativa os macrófagos a produzirem reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, além de enzimas capazes de destruir as bactérias fagocitadas; e (2) estimula a produção de

subclasses de anticorpos, como IgG2a em camundongos, ativando o sistema de complemento e opsonizando a bactéria de forma a facilitar a fagocitose e favorecer as funções efetoras dos macrófagos (ABBAS et al., 1996).

Linfócitos T CD8⁺ também participam da resposta imune contra a *Brucella*. Estas células se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTLs) após o reconhecimento antigênico associado a moléculas de MHC de classe I. Após a diferenciação, estas células reconhecem e eliminam células alvo infectadas através da liberação de proteínas citotóxicas (como perforina e granzima). Além disso, os CTLs são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ e TNF- α , que ativam os fagócitos (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A contribuição da resposta imune humoral na eliminação do patógeno é pouco eficiente. Embora os anticorpos possam opsonizar o agente infeccioso durante as primeiras horas de infecção (CHEERS e HO, 1983), tornando a fagocitose mais eficiente (WINTERET et al., 1989), eles não são capazes de reduzir a taxa de crescimento intracelular da bactéria *in vivo*, e não conferem resistência a animais suscetíveis. A habilidade do patógeno de sobreviver e replicar no interior das células torna-o inacessível aos mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (CHEERS e HO, 1983). Dessa forma, a proteção efetiva contra a infecção fica dependente da imunidade celular (ARAYAET et al., 1989).

2.3 Peptídeos Antimicrobianos

A descoberta dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) data de 1939, quando Dubos (DUBOS, 1939) extraiu um agente antimicrobiano a partir de uma cepa de *Bacillus* do solo. Este extrato demonstrou proteger camundongos da infecção por pneumococos. No ano seguinte, Hotchkiss e Dubos (1940) fracionaram este extrato e identificaram o AMP que foi nomeado gramicidina. No total mais de 5.000 AMPs foram descobertos ou sintetizados até hoje. AMPs naturais podem ser encontrados em procariontes (por exemplo, bactérias) e eucariontes (por exemplo, protozoários, fungos, plantas, insetos e animais). Nos animais, os AMP são encontrados principalmente em tecidos e órgãos que estão expostos a agentes patógenos

transportados pelo ar, e acredita-se que esses são a primeira linha de defesa imune inata contra vírus, bactérias e fungos (BAHAR e REN, 2013).

Peptídeos antimicrobianos que ocorrem naturalmente têm sido investigados como uma potencial fonte de novos agentes anti-infecciosos. Muitos estudos têm explorado combinações sinérgicas entre AMPs ou AMPs com antibióticos para atingir as bactérias patogênicas (MACCALLUM, DESBOIS E COOTE, 2013), bem como, agentes imunoestimulantes que aumentam a imunidade inata e os agentes de neutralização de endotoxinas para se evitar o choque séptico (GORDON, ROMANOWSKI E MCDERMOTT, 2005). Devido ao seu elevado potencial de biocompatibilidade, biodegradabilidade moderada e baixa resistência desenvolvida pelos microrganismos alvo, AMPs oferecem grandes perspectivas como uma nova classe de antibióticos com aplicação em diversas áreas (BADOSA et al., 2013).

O mecanismo de ação contra bactérias inclui morte celular, quer por ruptura da membrana das células microbianas, por inibição da síntese do polímero extracelular ou por impedimento das funções intracelulares. Preferencialmente os AMPs atuam em componentes estruturais da parede celular e podem ter múltiplos alvos celulares (THOMAS et al., 2010). Quando o alvo do peptídeo não é a membrana ou a parede celular, eles atuam em outros processos.

Informação da sequência de mais de 1500 proteínas já foram obtidas através de animais, e essas são conhecidas popularmente como peptídeos antimicrobianos (AMPs) (SMITH et al, 2010). Wang, Li e Wang (2009) descreveram a presença de um banco de dados que contém informações sobre peptídeos antimicrobianos (o banco de dados pode ser acessado através de um navegador web na URL:<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) onde atualmente são descritos 2336 peptídeos antimicrobianos (210 bactericidas, 302 peptídeos antimicrobianos de plantas, e 1765 peptídeos de defesa de hospedeiro animal com as mais diversas atividades antiviral, antibacteriana, antitumoral, antifúngica, antiparasita, inseticida, espermicida, anti HIV e peptídeos antimicrobianos com atividade quimiotática).

A grande maioria dos AMPs naturais conhecidos possuem propriedades físicas semelhantes que proporcionam suas habilidades multifacetadas. A potente atividade antimicrobiana é devida à carga catiônica, pela presença de múltiplas lisinas, triptofanos, resíduos de arginina, grande porção dos resíduos hidrofóbicos (50% ou superior), hidrofobicidade e anfipaticidade (DIAMOND et al., 2009).

Com base nos modelos naturais, dezenas de peptídeos catiônicos antimicrobianos estruturalmente diferentes foram projetados, fabricados tanto químicamente e biologicamente, e testados para a atividade contra patógenos específicos (HANCOCK E PATRZYKAT, 2002); a manipulação da estrutura química para criar peptídeos sintéticos representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de AMPs como uma nova classe de medicamentos com o intuito de prevenir e tratar infecções sistêmicas e tópicas (GORDON, ROMANOWSKI E MCDERMOTT, 2005).

Apesar da baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência pelos microrganismos aos AMPs, novos peptídeos estão sendo desenvolvidos com base em estudos da relação estrutura-atividade em AMPs naturais. Pequenas sequências truncadas que contêm o domínio mínimo de atividade têm sido desenvolvidas, assim como construções quiméricas. Abordagens de química combinatória também são ferramentas poderosas que têm sido utilizadas para otimizar o perfil de atividade biológica de AMPs, identificar sequências com atividade melhorada, diminuir a toxicidade para os organismos não-alvo e diminuir a susceptibilidade à hidrólise proteolítica (BADOSA et al., 2013).

Defensinas humanas, catelicidina, e um número significativo de diferentes AMPs de bactérias, vírus, plantas, animais vertebrados e invertebrados, parecem ter uma assinatura multidimensional universal (isto é, uma estrutura tridimensional comum que define a atividade antimicrobiana (GORDON, ROMANOWSKI E MCDERMOTT, 2005).

Segundo Brogden (2011) a pesquisa atual é dividida em três áreas. Uma área continua a se concentrar em identificar o espectro de AMPs na natureza, determinando a sua gama de atividades antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus, identificando seus mecanismos de ação antimicrobiana em sistemas de membranas modelo, em microrganismos intactos, e avaliando sua citotoxicidade em as células eucarióticas e eritrócitos. Uma segunda área de investigação centra-se no estudo do papel dos AMPs na imunidade inata, a sua capacidade de atenuar a indução de citocinas pró-inflamatórias e de seu papel nos mecanismos imunes adaptativos. A terceira área de pesquisa é o desenvolvimento de peptídeos modificados com propriedades únicas. Isso inclui miméticos AMPs, amplificadores híbridos, AMPs congêneres, AMPs estabilizados, AMPs conjugados e amplificadores imobilizados.

Controlado por apenas um gene, AMPs podem ser produzidos rapidamente após a infecção, com o consumo de pouca energia; no entanto, alguns são constitutivamente expressos (RAHNAMAEIAN, 2011).

Vários tipos de classificação têm sido propostos para AMPs, um deles é baseado em suas estruturas secundárias onde os mesmos são divididos em quatro grupos: peptídeos α -helicoidais lineares contendo hélices anfipáticas catiônicas, que realizam atividades inibitórias em geral contra as bactérias; peptídeos cíclicos com a estrutura β folhas que formam predominantemente β folhas incluindo acoplados β -fios, devido à presença de duas ou mais ligações de dissulfeto; peptídeos com β hairpin ou configuração oval que incluem aqueles que contêm uma estrutura em laço, devido à presença de uma única ligação dissulfureto e / ou circundando a cadeia de peptídeo; e peptídeos lineares com viés incomum em aminoácidos específicos (RAHNAMAEIAN, 2011).

2.3.1 Peptídeos antimicrobianos isolados de plantas

Peptídeos antimicrobianos de plantas são componentes de seu sistema de defesa. Eles têm sido isolados a partir de raízes, sementes, flores, caules, folhas, de uma grande variedade de espécies e têm atividade contra fitopatógenos, assim como contra bactérias patogênicas para o ser humano. Assim, AMPs vegetais são considerados como compostos antibióticos promissores com aplicações biotecnológicas importantes. AMPs de plantas são agrupados em diversas famílias de acordo com suas características gerais, tais como a carga positiva, presença de ligações dissulfureto (que estabilizam a estrutura), bem como um mecanismo de ação para combater as estruturas da membrana externa de organismos procariotos (NAWROT et al., 2014).

Embora as plantas cresçam normalmente em substratos que são extremamente ricos em microrganismos, uma infecção raramente acontece. Para impedir a entrada de potenciais invasores, as plantas produzem uma gama de compostos antimicrobianos, quer de um modo constitutivo ou de forma induzida (CAMMUE et al, 1992). A primeira linha de defesa da planta contra patógenos (bactérias e fungos) é fornecida por receptores de reconhecimento de

padrões transmembrana que detectam padrões moleculares conservados associados a patógenos (PAMPs). Estratégias que ajudam os microrganismos a escaparem da defesa inata envolvem produção de proteínas com uma função primária de suprimir a resposta imune. Em casos específicos, as plantas desenvolveram resistência intracelular de proteínas e detecção de patógenos específicos que é associada a uma resposta de hipersensibilidade e morte celular programada (ZVEREVA E POOGGIN, 2012).

Os compostos produzidos mais estudados são os metabólitos secundários que possuem uma ampla atividade antimicrobiana, especificamente sintetizada na presença de moléculas sinais relacionadas com uma defesa específica contra o patógeno (CAMMUE et al., 1992). Dentre os metabólitos secundários produzidos podemos citar os taninos, terpenóides, alcalóides e flavonóides, com comprovada ação antimicrobiana *in vitro* (COWAM, 1999). Segundo Cowan (1999) 12.000 metabólitos secundários já foram isolados, um número estimado em menos de 10% do total.

O primeiro peptídeo antimicrobiano a partir de um organismo eucariota foi denominado trigo α -purotionina, descoberto em 1942 por Balls e colaboradores (HAMMAMI et al., 2009). Muitos peptídeos antimicrobianos de plantas, já foram identificados (Tabela 1).

Tabela 1 – Peptídeos antimicrobianos isolados de plantas.

Nome do Peptídeo	Espécie de origem	Referência
Ct-AMP1	<i>Clitoria ternatea</i>	OSBORN et al, 1995
So-D1	<i>Spinacia oleracea</i>	SEGURA et al, 1998
So-D4		
So-D5		
So-D7		
Fabatin-1	<i>Vicia faba</i>	ZHANG e LEWIS, 1997
Fabatin-2		
Ginkbilobin	<i>Ginkgo biloba</i>	WANG E NG, 2000
MiAMP1	<i>Macadamia integrifolia</i>	MARCUS et al, 1997
Shepherin I	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	PARK et al, 2000
Shepherin II		
Ib-AMP3	<i>Impatiens balsamina</i>	TAYLOR et al, 1997
Ib-AMP4		
Ac-AMP2	<i>Amaranthus caudatus</i>	BROEKAERT et al, 1992
Mj-AMP2	<i>Mirabilis jalapa</i>	CAMMUE et al, 1992
Mj-AMP1		
Pyricularia thionin	<i>Pyricularia pubera</i>	VERNON et al, 1985
Pn-AMP1	<i>Pharbitis nil</i>	KOO et al, 1998
Circulin A	<i>Chassalia parviflora</i>	FUJIKAWA et al., 1965
Circulin B		
Cyclopsychotride A	<i>Psychotria longipes</i>	WITHERUP et al., 1994
Tu-AMP 2	<i>Tulipa gesneriana</i> L	FUJIMURA et al., 2004
Lunatusin	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	WONG e NG, 2005
Dendrocinn	<i>Dendrocalamus latiflora</i> Munro	WANG e NG, 2003
PvD1r	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	GAMES et al., 2008
Potide-G	<i>Solanum tuberosum</i> L	KIM et al., 2006
Snakin-2 (StSN2)	<i>Solanum tuberosum</i>	BERRICAK-KIBO et al., 2002

2.3.2 Peptídeos antimicrobianos isolados de animais

Todos os organismos eucarióticos, unicelular ou multicelular, produzem um conjunto diversificado de agentes anti-infecciosos naturais e os AMPs já foram descritos em todo o reino animal (SMITH, DESBOIS e DYRYNDA, 2010). Em animais, AMPs encontram-se nos tecidos que possam estar em contato com os

microrganismos, tais como superfícies mucosas, bem como, no interior de células imunogênicas (LUDERS et al., 2005).

Smith, Desbois e Dyrinda (2010) descreveram em seu trabalho uma variedade de antimicrobianos convencionais (AMPs) e não convencionais (histonas, ácidos graxos, componentes estruturais de células de pigmentos e de proteínas reguladoras) isolados de peixes, invertebrados marinhos e micro-algas.

Há também a descrição de peptídeos antimicrobianos identificados de uma gama de espécies de anfíbios, especialmente do gênero *Rana* (UM et al., 2013). Os peptídeos antimicrobianos de anfíbios, geralmente sintetizados, possuem uma estrutura familiar relacionada. Temos como exemplos: magaininas e glicina-leucina-amida peptídica (PGLA) a partir de *Xenopus laevis*; brevininas, esculentinas, ranalexina, ranatuerinas e temporinas, a partir de uma variedade de espécies de rãs do gênero *Ranid*; bombininas de *Bombina variegata* e *Bombina orientalis*; dermaseptinas de *Phyllomedusa sauvagii* e *Phyllomedusa bicolor*; caerinas a partir de *Litoria chloris* e *Litoria splendida* e uperinas a partir de *Uperoleia mjobergii* (MATTURE, KNOOP E CONLON, 2000).

Um estudo realizado por Asoodeh, Sepahi e Ghorani-Azam (2014) revelou que peptídeos antimicrobianos purificados de secreções da pele de *Euphlyctis cyanophlyctis* (anfíbio) e nomeados como brevinin-UE e cyanophlyctin β , possuem propriedades antibacterianas favoráveis contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas e apresentaram atividade hemolítica ignorada de menos de 1,9% e 0,7%. Os autores sugerem que o brevinin-UE possa se ligar de forma eficiente e destruir a membrana bacteriana, mas que o cyanophlyctin β usa um modo diverso de ação.

Até agora, pelo menos trinta AMPs também foram identificados a partir do veneno de escorpião de diferentes espécies (Tabela 2).

Tabela 2 – Peptídeos antimicrobianos de escorpião e as respectivas espécies das quais foram isolados (ZENG et al., 2013).

<u>Nome do Peptídeo</u>	<u>Espécie de origem</u>	<u>Nome do Peptídeo</u>	<u>Espécie de origem</u>
Hadrurin	<i>Hadrurus aztecus</i>	VmCT2	<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>
Parabutoporin	<i>Parabuthus schlechteri</i>	VsCT1	<i>Vaejovis subcristatus</i>
BmKn1	<i>Mesobuthus martensii</i>	VsCT2	<i>Vaejovis subcristatus</i>
BmKn2	<i>Mesobuthus martensii</i>	Imcroporin	<i>Isometrus maculistas</i>
BmKb1	<i>Mesobuthus martensii</i>	Mucroporin	<i>Lychas mucronatus</i>
BmKbpp	<i>Mesobuthus martensii</i>	Ctriporin	<i>Chaerilus tricostatus</i>
Karsch	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>	Hp1090	<i>Heterometrus petersii</i>
ISCT	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>	Hp1035	<i>Heterometrus petersii</i>
IsCT2	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>	HSAP	<i>Heterometrus spinifer</i>
StCT1	<i>Scorpiops tibetanus</i>	HsAp2	<i>Heterometrus spinifer</i>
StCT2	<i>Scorpiops tibetanus</i>	HsAp3	<i>Heterometrus spinifer</i>
CII-dlp	<i>Centruroides limpidus limpidusin,</i>	HsAp4	<i>Heterometrus spinifer</i>
Pandinin 1,	<i>Pandinus imperator</i>	UyCT1	<i>Urodacus yaschenkoii</i>
Pandinin 2	<i>Pandinus imperator</i>	UyCT2	<i>Urodacus yaschenkoii</i>
Opistoporin 1	<i>Opistophtalmus carinatus</i>	UyCT5	<i>Urodacus yaschenkoii</i>
Opistoporin 2	<i>Opistophtalmus carinatus</i>		
Vejovine	<i>Vaejovis mexicanus</i>		
VmCT1	<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>		

Entre esses AMPs de escorpião, Ctriporina, StCT2 e Imcroporina têm demonstrado grande potencial para tratar infecções bacterianas multirresistentes (ZENG et al., 2013). Gordon, Romanowski e Mcdermott (2005) descrevem alguns peptídeos que estão em processo de validação para o uso terapêutico, isolados de porcos, bovinos e humanos.

2.3.3 Peptídeos antimicrobianos sintéticos

Nos últimos anos, tem-se verificado que fragmentos peptídicos derivados de auto-proteínas são agentes ideais para o tratamento de doenças humanas com alta segurança, baixa toxicidade e tolerância imunológica, sugerindo que as proteínas humanas podem ser exploradas para gerar novos e seguros AMPs (YAN et al., 2013).

Para enfrentar os novos desafios na área dos antimicrobianos, são necessárias abordagens multidisciplinares que possam aproveitar a eficiência e versatilidade das plataformas biológicas dentro de um contexto definido. O nexo entre tal abordagem biológica e a engenharia é a biologia sintética. Por modular elementos biológicos utilizando genética e engenharia de proteínas, os sintéticos biológicos são capazes de incorporar novas funcionalidades dentro das plataformas biológicas pré-existentes para abrangerem um novo espaço químico (ZAKERI e LU, 2013).

Compreender as relações estrutura-atividade (SAR) de AMPs é essencial para a concepção e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com propriedades melhoradas. Em particular, as estruturas em nível atômico podem fornecer informações versáteis para todas as fases de desenvolvimento de medicamentos, incluindo o desenho e modificação de peptídeos para aplicação farmacêutica. O conhecimento sobre as estruturas funcionais de AMPs também permite o desenho racional de um modelo de peptídeos sintéticos (SEO et al., 2012).

Uma abordagem de biologia sintética para engenharia de novos AMPs é bastante diferente da engenharia de recursos naturais, anteriormente mencionado, que acontece por vias metabólicas secundárias dentro das plantas. Devido ao pequeno tamanho dos AMPs e suas propriedades físico-químicas comuns, esforços envolvendo AMPs dentro da re-engenharia são adequados para a modelagem computacional e design de peptídeo (TYO, ALPER E STEPHANOPOULOS, 2007). A manipulação das estruturas conhecidas dos peptídeos antimicrobianos com atividade comprovada é uma fonte promissora de novos peptídeos antimicrobianos capazes de bloquear ou inibir o crescimento de bactérias, fungos, parasitas, células tumorais e vírus ainda encapsulados, como o HIV (LIRA et al., 2013). Diferentes métodos são utilizados para o desenvolvimento destes peptídeos artificiais, em particular, a síntese de peptídeos análogos, que diferem dos peptídeos naturais em uma ou mais posições da cadeia de aminoácidos por substituição, deleção ou inserção de resíduos (BOMAN et al, 1989). Jiang e colaboradores (2011) afirmam que o desenvolvimento da resistência é consideravelmente reduzida em peptídeos que atuam na membrana citoplasmática e cujas interações com componentes da membrana não são específicas. No entanto, mesmo que o seu único alvo seja a membrana da célula, pode ocorrer atividade hemolítica ou tóxica para as células de mamífero, o que é sempre uma barreira potencial a utilização dos mesmos na

terapia sistêmica. O objetivo do desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos consiste em otimizar a hidrofobicidade, minimizar a toxicidade para células eucarióticas, pois a grande maioria dos AMPs naturais são altamente hemolíticos, além de maximizar a atividade antimicrobiana, e, por sua vez otimiza o índice terapêutico.

Em 2012, Lorin e colaboradores concluíram que se fazem necessários esforços dedicados a compreender melhor a importância de cada parâmetro dos AMPs em suas atividades, tais como hidrofobicidade, modificações e as estruturas secundárias. A melhor compreensão irá ajudar a desenvolver agentes antimicrobianos mais eficazes e específicos. A observação de alguma atividade antimicrobiana é perdida por pequenas alterações nos peptídeos *in vitro* (RATHINAKUMAR, WALKENHORST e WIMLEY, 2009). A fim de projetar racionalmente peptídeos que não são tóxicos para as células hospedeiras, mas que mantenham a sua atividade antimicrobiana natural, é fundamental entender seu mecanismo de ação e identificar os passos mecanicistas e características estruturais que são mais passíveis de engenharia (BOLINTINEANU e KAZNESSIS, 2011).

Peptídeos híbridos e naturais devem compartilhar duas propriedades muito importantes, as quais acredita-se ser essencial na criação de um peptídeo antimicrobiano ativo. São elas: anfipaticidade (a distribuição da carga positiva ou da carga negativa que se estende por todo o peptídeo) e flexibilidade (que permite a inserção ou incorporação do peptídeo na bicamada lipídica). Em última análise, as variabilidades de aminoácidos, tamanhos e estruturas secundárias podem conduzir à diferenças na atividade entre cada classe ou espécie de peptídeo antimicrobiano contra diferentes tipos de microrganismos (ARRIGHI et al., 2002). A modelagem por homologia é um método com base na similaridade estrutural, ou seja, as sequências de aminoácidos similares tendem a ter uma estrutura secundária muito semelhante. Assim, é possível utilizar como uma estrutura de modelo para meios experimentais, a fim de prever a conformação 3D de peptídeos e proteínas utilizando algoritmos computacionais. Na modelação comparativa, o alinhamento da sequência a ser previsto e o molde devem apresentar uma identidade de pelo menos 30% (TAVARES et al., 2013). Portanto, os peptídeos desenvolvidos no laboratório de Genética e Biotecnologia, testados no presente trabalho, apresentaram resultados promissores no controle de *Brucella*.

3OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o potencial antimicrobiano e citotóxico de peptídeos sintéticos contra bactérias *Brucella abortus* das cepas RB51, S19 e S2308.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar a curva de crescimento de diferentes cepas de *Brucella abortus*;
- Avaliar o crescimento bacteriano na presença dos peptídeos sintéticos;
- Determinar a citotoxicidade dos peptídeos em macrófagos murinos peritoniais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bactérias e meios de cultura

As estirpes utilizadas foram RB51, S19 e S2308, gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Gilson Costa Macedo do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). O meio utilizado para o crescimento das bactérias foi o caldo Brucella Broth (BB) (DIFCO) e as mesmas foram sempre cultivadas a 37° C.

4.2 Determinação da curva de crescimento de *Brucella abortus* RB51, S19 e S2308.

A curva de crescimento para a determinação do melhor tempo de incubação dos ensaios antimicrobianos (bioensaios) foi realizada no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). A realização dessa etapa do experimento permitiu que fosse determinado o melhor tempo de incubação inicial dos inóculos para a realização dos bioensaios.

O inóculo inicial para a curva de crescimento foi feito com 2 colônias do estoque plaqueado em meio ágar Brucella (caldo de Brucella acrescido de 1,5% de ágar-ágar) diluídas em 20 mL de meio BB, incubados por 72 horas. Após 16 horas de crescimento, aliquotas foram coletadas nos tempos 16, 18, 20, 22 e 24 horas, para se analisar o crescimento bacteriano por meio da densidade turbidimétrica (OD) e o plaqueamento das mesmas após diluição seriada. Para a diluição seriada foram utilizados tubos de 2mL; 100µL da cultura foram diluídos inicialmente em 900µL de PBS e no tubo seguinte foi colocado 100µL dessa primeira solução acrescido de 900µL de PBS e assim, sucessivamente, para se atingir as diluições 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 e 1:1.000.000. O plaqueamento foi realizado em placa de Petri contendo 10 mL de caldo Brucella acrescido de 1,5% de ágar, em duplicatas, para cada tempo de incubação analisado. Apenas as diluições 1:100.000

e 1:1.000.000 foram estriadas. Após o tempo de incubação de 36 horas, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

4.3 Peptídeos Sintéticos

Os peptídeos utilizados para os ensaios antimicrobianos foram cedidos pelo grupo de pesquisa do Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Os peptídeos estão listados nas tabelas 3 e 4 abaixo:

Tabela 3 - Peptídeos iniciais e peptídeos remodelados utilizados em testes antimicrobianos com *Brucella abortus* RB51, S19 e S2308 oriundos da espécie *Lippia alba*.

Peptídeo inicial	Peptídeo remodelado
L alb 1	L alb 1.2
	L alb 1.3

Tabela 4 - Peptídeos remodelados utilizados em testes antimicrobianos com *Brucella abortus* RB51, S19 e S2308 oriundos da espécie *Lippia rotundifolia*

Peptídeo inicial	Peptídeo remodelado
L rot 3	L rot 3.5
	L rot 3.6
	L rot 3.7
	L rot 3.8

As espécies *Lippia alba* e *Lippia rotundifolia* foram selecionadas através de testes iniciais realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFJF. Após o sequenciamento do transcriptoma de folhas foi feita uma varredura com a intenção de se selecionar algumas sequências que pudessem produzir peptídeos antimicrobianos. A seleção e modelagem dos peptídeos foram realizadas por alunos de mestrado e doutorado do Laboratório de Genética (TAVARES et al., em preparação).

Todos os peptídeos foram selecionados através de instrumentos de bioinformática (modelagem) e sintetizados pela empresa Shanghai hanhong chemical group LTDA.

Os peptídeos foram armazenados em freezer - 20°C nos tubos originais fornecidos pelo fabricante. Para a realização dos bioensaios os mesmos foram diluídos em solução contendo 0,5% de dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) e 0,5% de Tween 20 e acondicionados em freezer - 20°C.

4.4 Concentração inibitória mínima dos peptídeos

A atividade antimicrobiana dos peptídeos sintéticos foi testada contra a bactérias *Brucella abortus* Rb51, *Brucella abortus* S19 e *Brucella abortus* S2308.

O inóculo inicial foi feito em tubo Falcon (50mL) com 20 mL de caldo Brucella e duas colônias da *Brucella* armazenadas em placas e cultivado a 37°C, em plataforma de agitação a 150 rpm, por um período de 20 horas para as três estirpe (RB51, S19 e S2308).

Para a realização dos ensaios antibacterianos o inóculo foi diluído em caldo Brucella duplamente concentrado até que atingisse uma concentração de 5×10^4 unidades formadoras de colônia (UFC).

Os ensaios foram realizados em microplacas de polipropileno de 96 poços contendo 100 µL de caldo Brucella (duplamente concentrado) inoculado com 5×10^4 UFC de cada bactéria e 100 µL dos peptídeos a serem testados, em diferentes concentrações. As concentrações utilizadas foram de: 128 µg/mL; 64µg/mL; 32µg/mL; 16µg/mL e 8µg/mL. A placa foi mantida sob agitação de 100 rpm a 37°C e a leitura realizada após 24 horas (estirpe RB51) e 48 horas (estirpes S19 e S2308). Os controles utilizados foram: controle negativo (200µL de caldo Brucella duplamente concentrado); controle negativo tampão (100µL de caldo Brucella, duplamente concentrado, acrescido de tampão de diluição 0,5%DMSO e 0.5% Twin20). O controle positivo era composto de caldo Brucella inoculado com 5×10^4 UFC de cada bactéria (200µL) e o controle positivo tampão de caldo Brucella inoculado com as bactérias diluídas (100µL) acrescido com o tampão de diluição 0,5%DMSO e 0.5% Twin20 (100µL).

Para a determinação do antibiótico que seria utilizado como referência neste trabalho, foram realizados testes com estreptomicina, gentamicina, ampicilina e cloranfenicol, nas concentrações de 128, 56, 32, 16 e 8 µg/mL e a gentamicina foi selecionada como antibiótico-referência. A gentamicina foi utilizada em todos os bioensaios, para posteriores comparações, nas mesmas concentrações dos peptídeos. Utilizou-se 100µL de caldo Brucella inoculado com as bactérias diluídas e 100µL das diferentes concentrações do antibiótico. Todos os testes foram realizados em triplicata.

O crescimento bacteriano foi monitorado por meio de absorvância turbimétrica a 625nm, utilizando-se o aparelho Varioskan® Flash (THERMO).

4.5 - Avaliação da atividade bacteriostática/bactericida

Para verificar se o peptídeo possui atividade antimicrobiana bactericida ou bacteriostática, após a medida do crescimento, uma alíquota de 10µL foi coletada e novamente incubada com 190 µL de caldo Brucella a 37°C, 100rpm, por 24 horas. Após esse período realizou-se a observação visual do crescimento bacteriano. O crescimento bacteriano indicou atividade bacteriostática do peptídeo, já a sua ausência, atividade bactericida do peptídeo.

4.6 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos peptídeos foi avaliada pelo método MTT, um teste colorimétrico que quantifica a redução do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em um composto roxo, os cristais de formazan, por meio da ação de desidrogenases mitocondriais. A presença destas enzimas ativas é um indicativo de viabilidade celular (MOSMANN, 1983)

A avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com os peptídeos Lrot 3.5; Lrot3.6; Lrot3.8; Lalb1; Lalb1.3 e seu controle negativo foi realizada utilizando-se cinco concentrações diferentes dos mesmos (128, 64, 32, 16 e 8µg/mL) e apenas

para o peptídeo Lalb1.3 utilizou-se as concentrações de 128 e 64µg/mL. O objetivo deste ensaio foi verificar o efeito da concentração sobre a viabilidade celular.

Para que as células fossem submetidas aos mesmos estímulos de crescimento celular (volume de meio e peptídeos), utilizou-se do mesmo volume final de meio de cultura em todos os grupos experimentais (200 µL), sendo, 100µL de meio de cultivo contendo os macrófagos e 100µL de peptídeos.

As análises foram realizadas em linhagem celular macrófago murino peritoneal e a quantificação das células foi realizada por meio de contagem direta em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Turk. Após esta etapa, as células foram semeadas em placa de cultura de 96 poços, na concentração de 5×10^5 células por poço, contendo 100 µL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico.

Após 24 horas de incubação a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 80% de umidade, foram adicionados 100 µL dos peptídeos testados diluídos em tampão de diluição e então, a placa foi incubada por mais 48 horas.

Ao final deste período, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 100 µL de uma solução contendo 10% (v/v) de MTT (5 mg/mL, Invitrogen) e meio de cultura. O sistema foi incubado por 4 horas e, ao final deste período, retirou-se novamente o sobrenadante e os cristais de formazan foram solubilizados em 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec).

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA), utilizando comprimento de onda de 550 nm. A média de absorbâncias do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade e foi empregada no cálculo de percentual de células viáveis expostas aos tratamentos. O experimento foi realizado em triplicata.

Os dados foram processados utilizando-se o software Excel (Microsoft, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de Crescimento

A curva de crescimento foi realizada com o intuito de se conhecer as fases de crescimento das bactérias utilizadas, uma vez que o protocolo base utilizado para os testes (NCCLS, 2003) recomenda que o inóculo padrão para testes de microdiluição ou microdiluição em caldo seja cultivado até a fase *log*, de crescimento exponencial dos microrganismos.

Os trabalhos encontrados na literatura geralmente não realizam esse teste e utilizam um tempo de crescimento fixo. Al-Mariri e colaboradores (2013) utilizaram um inóculo com 22 horas de cultivo, e para a realização do teste de susceptibilidade por microdiluição, em concentração de 10^6 UFC/ml.

Concluiu-se com a realização das curvas de crescimento que o tempo para atingir a fase *log* foi de 20 horas para as três estirpes estudadas. A escolha do melhor tempo não apenas considerou os dados de densidade turbidimétrica (OD), mas também, os dados obtidos com a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em placas.

As figuras 2 a 7 mostram os resultados obtidos durante a realização das curvas de crescimento das estirpes bacterianas. Os gráficos mostram a relação entre a densidade turbimétrica (OD) e o tempo de incubação das estirpes e a relação entre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) e o tempo de incubação para as três estirpes estudadas.

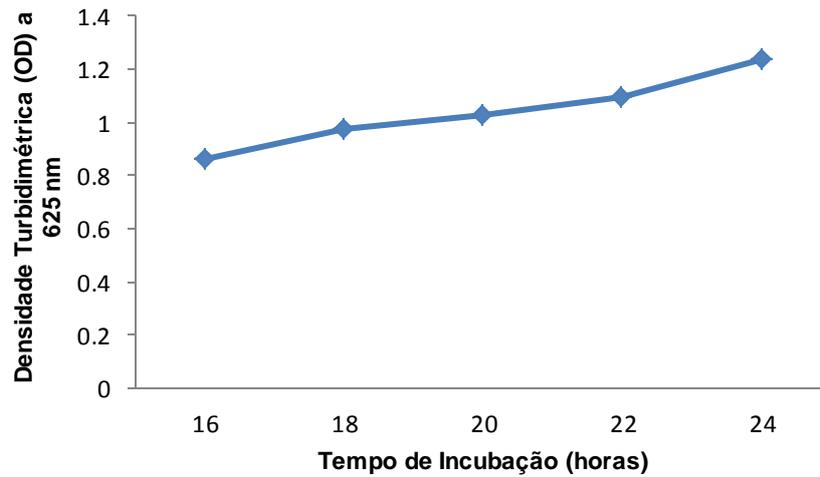


Figura2 - Relação entre a densidade turbidimétrica (OD) a 625nm da cultura bacteriana de *Brucella abortus* RB51 e o tempo de incubação da cultura (horas).

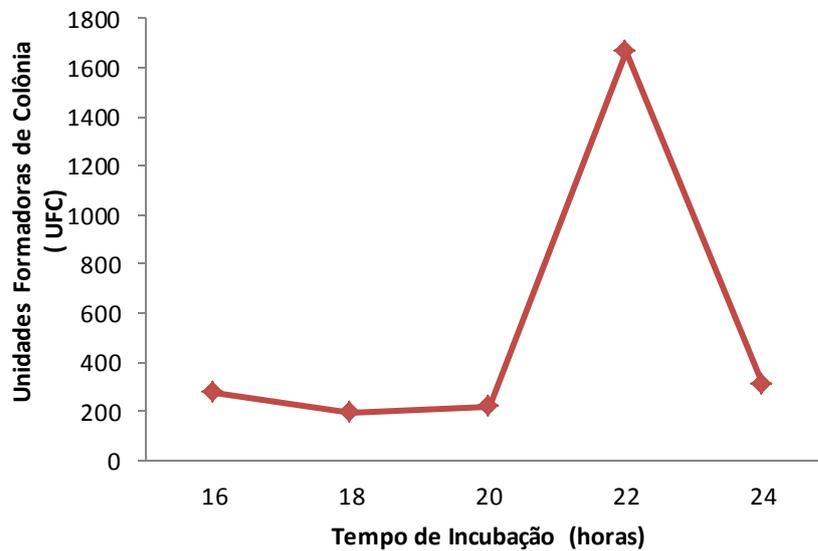


Figura 3 - Relação entre o tempo de incubação da cultura de *Brucella abortus* RB51 (horas) e o número de Unidades Formadoras de Colônias na diluição 1:1.000.000 .

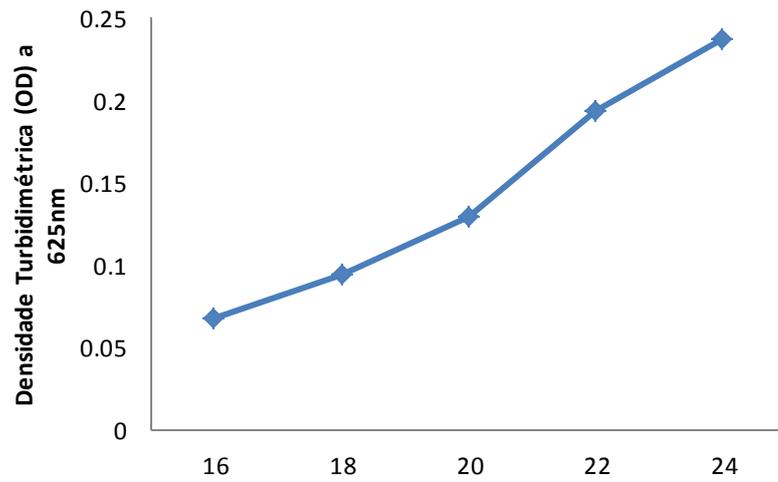


Figura 4 - Relação entre a densidade turbidimétrica (OD) a 625nm da cultura bacteriana de *Brucella abortus* S19 e o tempo de incubação da cultura (horas).

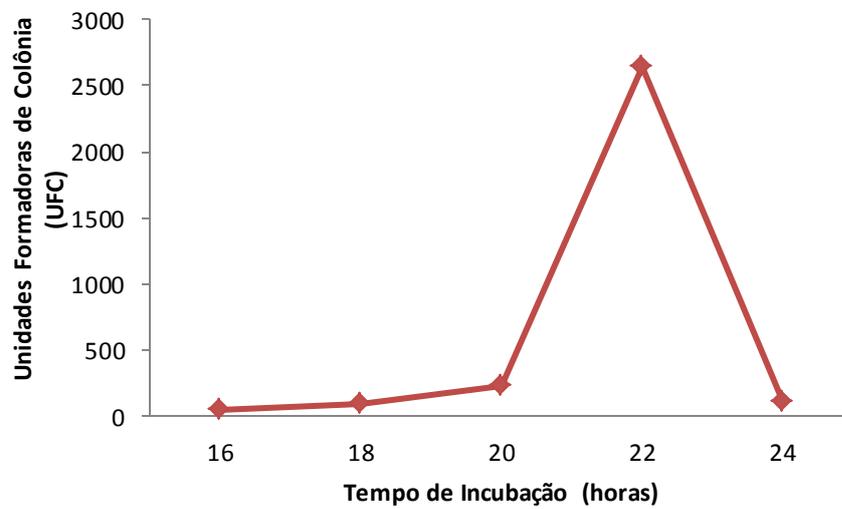


Figura 5- Relação entre o tempo de incubação da cultura de *Brucella abortus* S19 (horas) e o número de Unidades Formadoras de Colônias na diluição 1:1.000.000 .

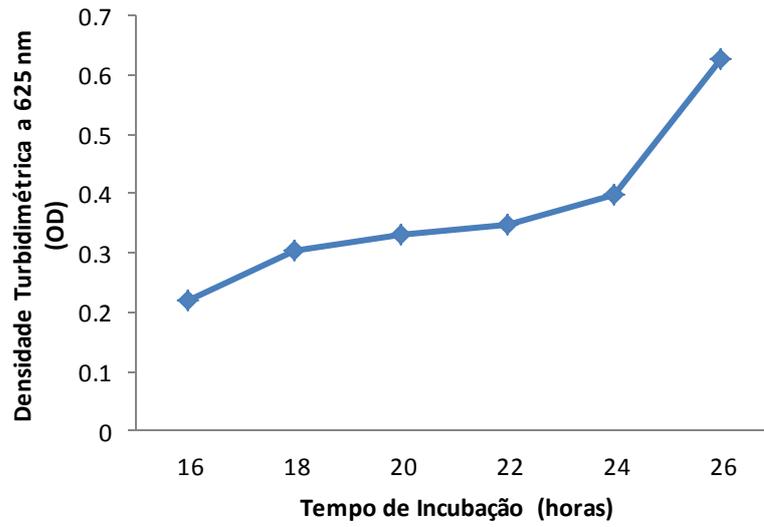


Figura 6- Relação entre a densidade turbidimétrica (OD) a 625nm da cultura bacteriana de *Brucella abortus* S2308 e o tempo de incubação da cultura (horas).

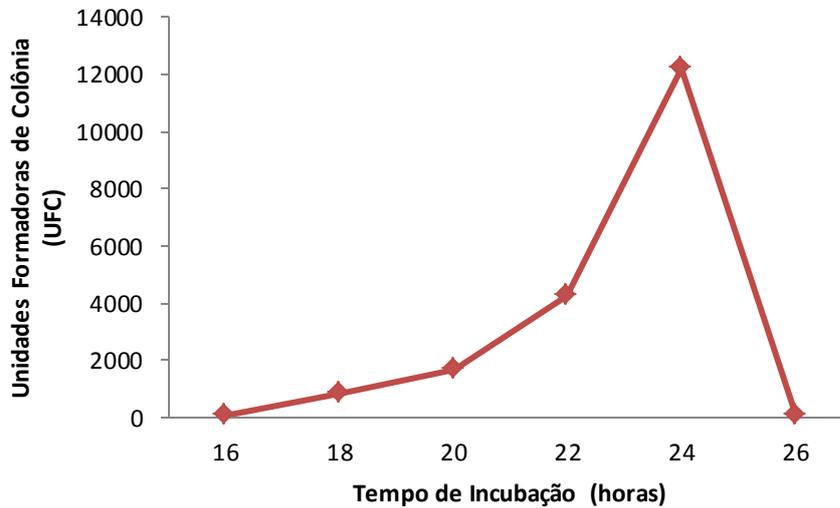


Figura 7- Relação entre o tempo de incubação da cultura de *Brucella abortus* S2308 (horas) e o número de Unidades Formadoras de Colônias na diluição 1:1.000.000.

5.2 Ensaios Antimicrobianos e Avaliação da Citotoxicidade

Muitos métodos diferentes de testes de susceptibilidade antimicrobiana, usando uma variedade de meios e condições de incubação, foram descritos para testar *Brucella* spp. (LONSWAY et al, 2010). O ensaio antimicrobiano realizado neste estudo baseou-se no protocolo do Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute). O protocolo em questão focaliza métodos de referência para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (MICs) das bactérias aeróbicas por macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo e diluição em ágar (NCCLS , 2003).

O protocolo do CSLI recomenda a utilização do caldo de Mueller-Hinton como meio de primeira escolha para testes de sensibilidade de organismos aeróbios facultativos ou organismos aeróbios de crescimento rápido mais comumente isolados do ambiente, porém foi utilizado o meio Brucella Broth (DIFCO) para a realização dos testes. O mesmo meio é utilizado largamente em testes de susceptibilidade a antimicrobianos, com *Brucella* spp., na literatura (CASWELL, 2012, 2013; ALMEIDA, 2011). Segundo Brown (2005) o caldo Brucella sem suplementação é o meio recomendado para testes de susceptibilidade pela técnica de microdiluição com *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*.

Segundo Safi e Al-Mariri (2012) bactérias do gênero *Brucella* são geralmente consideradas susceptíveis aos antibióticos que são recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS)—doxiciclina, rifampicina e estreptomicina. No entanto, casos esporádicos de resistência aos antibióticos têm sido relatados.

Drogas em estudo são tipicamente testadas em diluições em série (por exemplo, 4, 8, 16 ug / mL, e assim por diante), para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Os testes por microdiluição são confiáveis e bem padronizados e são particularmente úteis em estudos de investigação e em testes de um único agente antimicrobiano para um isolado bacteriano, bem como, para o teste simultâneo de vários antibióticos com individuais isolados bacterianos (JENKINS E SCHUETZ, 2012), como o realizado no presente estudo. Os testes utilizando o método de microdiluição permitem uma otimização do uso dos peptídeos sintéticos, visto que esses possuem um alto custo de produção em baixa escala. O uso de modelagem computacional, após testes prévios, visou aumentar a eficácia

nos testes antimicrobianos aqui testados (TAVARES et al., em preparação). Essas modificações visam a mudança da estrutura e funcionamento dos peptídeos a partir da modificação na sequência de aminoácidos, bem como, o valor da hidrofobicidade e de outros parâmetros, característicos de peptídeos antimicrobianos, que interferem diretamente na eficácia como agente bactericida. Inicialmente foram testados alguns peptídeos sintéticos, mas muitos deles não apresentaram atividade antimicrobiana significativa. Os peptídeos que obtiveram uma eficácia comprovada foram submetidos à modelagem computacional e ensaios posteriores.

Todos os resultados dos testes antimicrobianos são apresentados como resultado das médias das médias das triplicatas dos dois experimentos realizados.

Os resultados do controle negativo, controle negativo tampão, controle positivo e controle positivo tampão são apresentados na figura 8, 9 e 10, para as estirpes RB51, S19 e S2308, respectivamente.

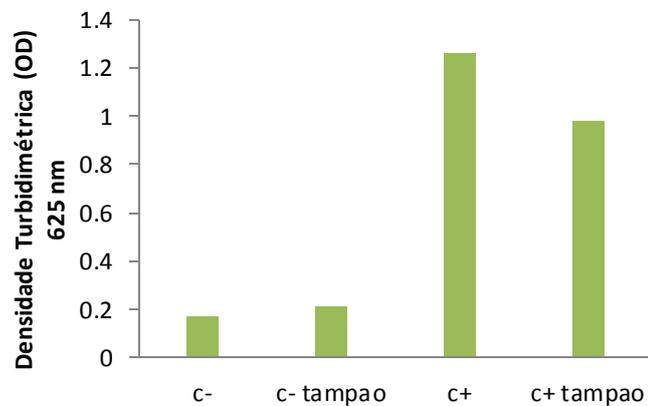


Figura 8 - Resultado representativo dos grupos controle negativo, controle negativo tampão, controle positivo e controle positivo tampão dos ensaios antimicrobianos de peptídeos sintéticos contra *Brucella abortus* RB51.

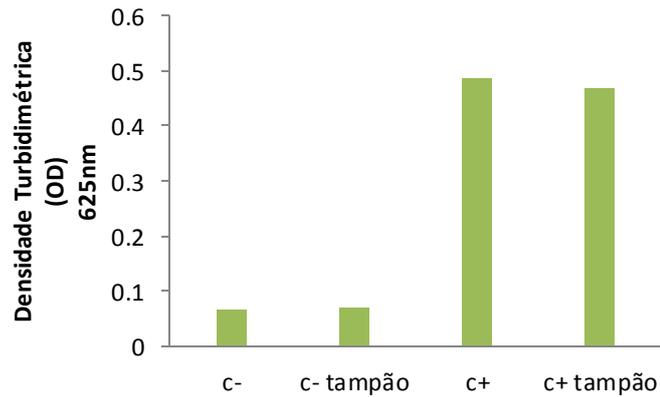


Figura 9 - Resultado representativo dos grupos controle negativo, controle negativo tampão, controle positivo e controle positivo tampão dos ensaios antimicrobianos de peptídeos sintéticos contra *Brucella abortus* S19.

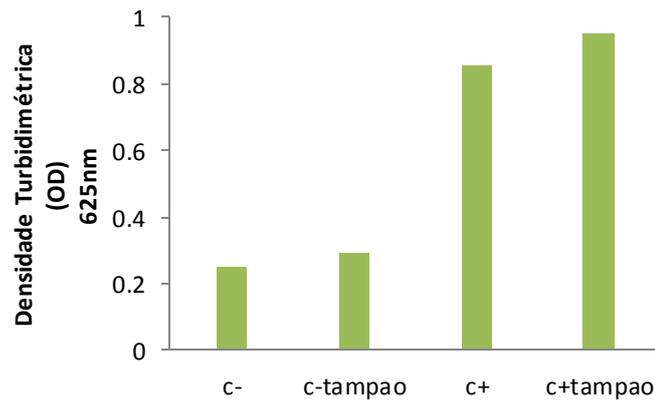


Figura 10 - Resultado representativo dos grupos controle negativo, controle negativo tampão, controle positivo e controle positivo tampão dos ensaios antimicrobianos de peptídeos sintéticos contra *Brucella abortus* S2308.

Os resultados dos bioensaios realizados com as três estirpes estão representados nas figuras 11 a 16.

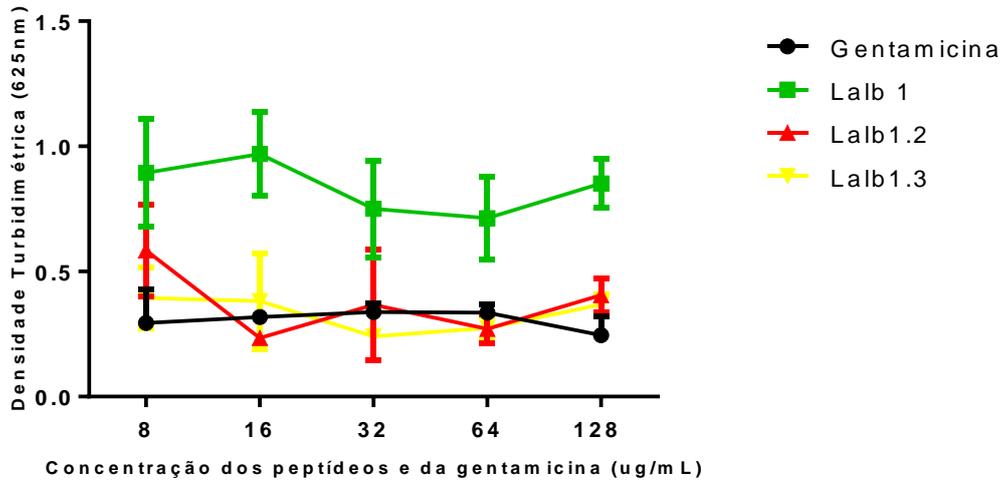


Figura 11 - Gráfico representando os resultados dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos La1b1, La1b1.2 e La1b1.3 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* RB51. Os resultados apresentados são as médias, das médias das triplicatas, dos dois bioensaios realizados.

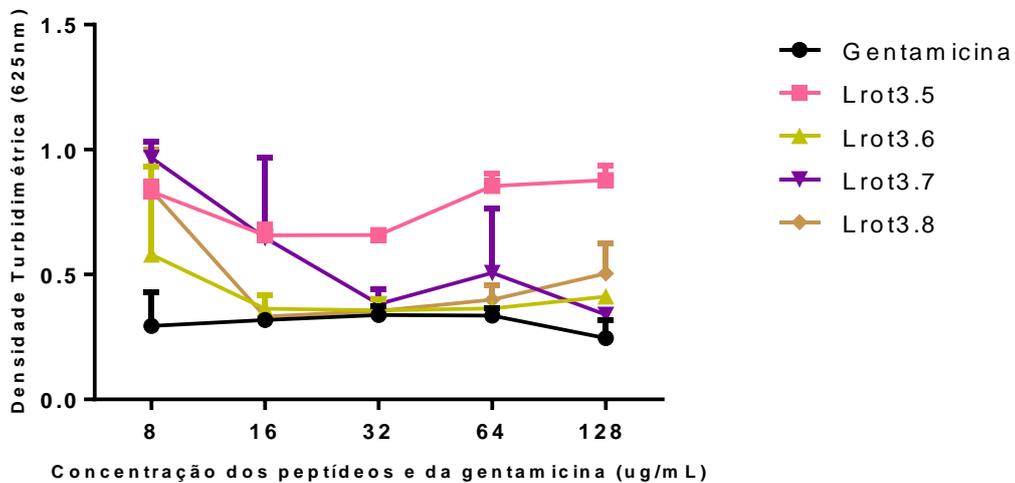


Figura 12 - Gráfico representando os resultados dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lrot3.5, Lrot3.6, Lrot3.7 e Lrot3.8 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* RB51. Os resultados apresentados são as médias, das médias das triplicatas, dos dois bioensaios realizados.

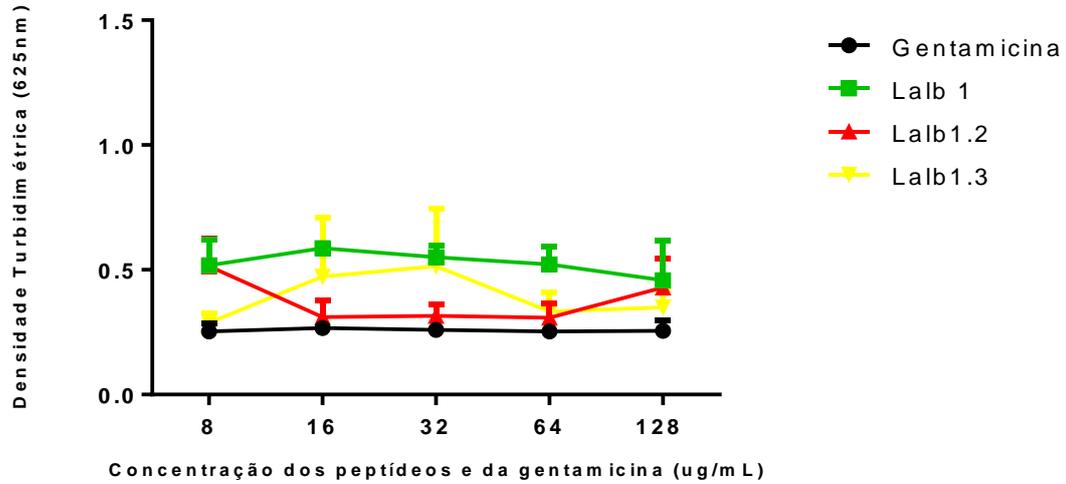


Figura 13- Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lalb1, Lalb1.2 e Lalb1.3 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* S19. Os resultados apresentados são as médias das médias das triplicatas dos dois bioensaios realizados.

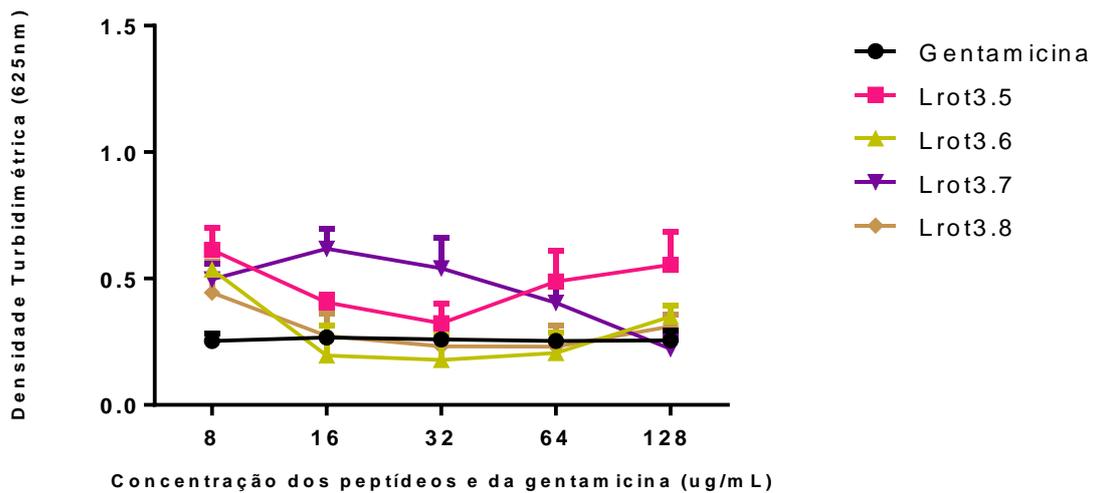


Figura 14- Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lrot3.5, Lrot3.6, Lrot3.7 e Lrot3.8 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* S19. Os resultados apresentados são as médias das médias das triplicatas dos dois bioensaios realizados.

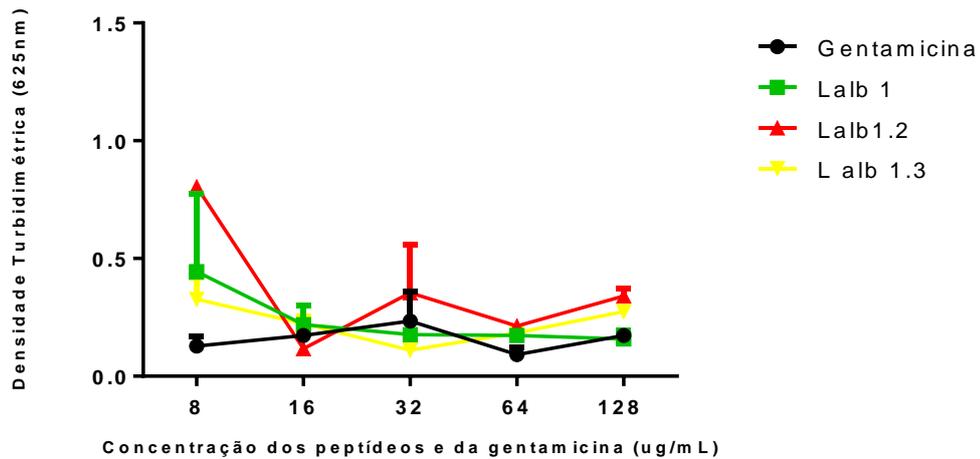


Figura 15- Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lalb1, Lalb1.2 e Lalb1.3 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* S2308. Os resultados apresentados são as médias das médias das triplicatas dos dois bioensaios realizados.

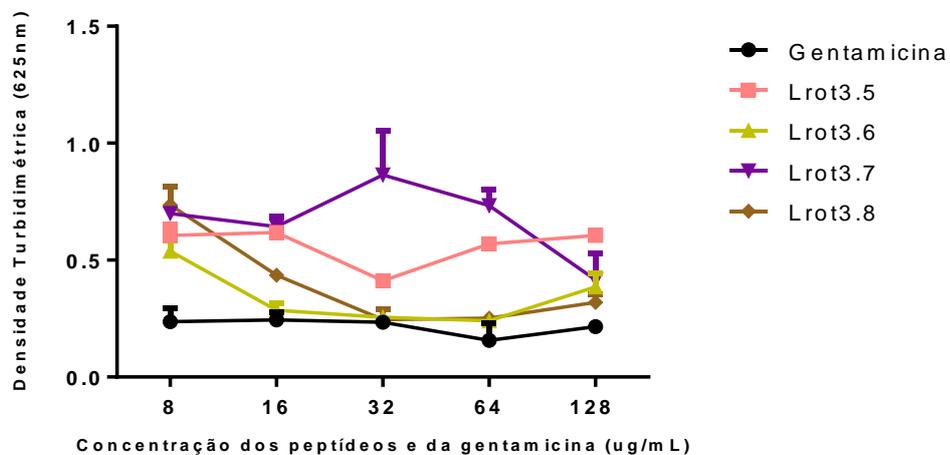


Figura 16- Gráfico representando os resultado dos testes antimicrobianos de peptídeos sintéticos Lrot3.5, Lrot3.6, Lrot3.7 e Lrot3.8 e do antibiótico gentamicina contra *Brucella abortus* S2308. Os resultados apresentados são as médias das médias das triplicatas dos dois bioensaios realizados.

A tabela 5 abaixo mostra a concentração inibitória mínima (MIC) em $\mu\text{g/mL}$ encontrada nos testes antimicrobianos realizados com as três estirpes.

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (MIC) para os testes antimicrobianos realizados com *Brucella abortus* RB51, S19 e S2308 tratadas com peptídeos sintéticos Lalb1; Lalb1.2; Lalb1.3; Lrot3.5; Lrot3.6; Lrot3.7 e Lrot3.8.

Peptídeo/Estirpe	<i>Brucella abortus</i> RB51	<i>Brucella abortus</i> S19	<i>Brucella abortus</i> S2308
Lalb1	64	128	128
Lalb1.2	64	32	16
Lalb1.3	32	64	32
Lrot3.5	32	32	32
Lrot3.6	32	32	32
Lrot3.7	128	128	128
Lrot3.8	32	32	32

Observou-se que para as três estirpes, quatro dos sete peptídeos inibiram as bactérias com uma concentração de 32 ug/mL. Os peptídeos Lrot 3.5, 3.6 e 3.8 apresentaram CIM de 32ug/mL para as três estirpes, porém o peptídeo 3.7 apresentou atividade significativa somente a uma concentração de 128ug/mL. Segundo Thomas e colaboradores (2010) mudanças de sequência dos peptídeos podem diminuir a ação antimicrobiana que possuem, mas também podem levar a mudanças na sua concentração inibitória mínima (CIM).

A análise dos gráficos das três estirpes nos mostra um comportamento similar entre as estirpes Lrot 3.5, Lrot 3.6 e Lrot 3.8, onde houve um aumento da densidade turbidimétrica (OD) observada após a concentração 32ug/mL. Esse comportamento pode ser explicado pela formação de agrupamentos de peptídeos (auto-associação) e a possível inibição do sítio de ação dos mesmos na superfície bacteriana, levando a um aumento do crescimento bacteriano, ao invés de uma inibição do crescimento. Há indícios crescentes de que interações inerentes e / ou dinâmicas entre peptídeos antimicrobianos impactam sua toxicidade seletiva em células bacterianas (YEAMAN E YOUNT,2003). Muitos estudos têm mostrado previamente que a auto-associação de peptídeos no estado ligado à membrana está relacionada com a atividade antimicrobiana, mas que a mesma auto-associação em um ambiente aquoso pode ter efeito sobre a ação antimicrobiana. Se a capacidade de auto-associação de um peptídeo é muito forte em meio aquoso, pode diminuir a capacidade do peptídeo para dissociar e passar através da cápsula de microrganismos, ou mesmo de penetrar na membrana citoplasmática para matar células alvo. A cápsula é composta principalmente de polissacarídeos de elevado peso molecular. A parede

celular de bactérias gram-negativas inclui a membrana externa, que contém proteínas, lipopolissacarídeos, porinas e lípidos da bicamada, bem como a camada de peptidoglicano entre as membranas externa e interna. Os componentes da parede celular que restringem o acesso dos dímeros de peptídeos dobrados à membrana citoplasmática permanecem desconhecidos (CHEN et al, 2007).

Segundo Tejada e colaboradores (2012) um agente antimicrobiano idealmente, deve ter um caráter duplo, ou seja, ele deve superar a barreira da parede celular bacteriana, sem induzir a liberação de substâncias pró-inflamatórias pelas bactérias. Uma importante característica da maior parte dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) é a sua capacidade de se ligar ao lipopolissacarídeo (LPS) e permeabilizar a membrana externa de bactérias gram-negativas e assim sensibilizar células bacterianas aos compostos co-administrados. Em 1995, Tejada e colaboradores descreveram que as ações de peptídeos catiônicos bactericidas (polimixina B, extratos lisossomais de polimorfonucleares de coelhos, 14 peptídeos policatiônicos: defensina NP-2, cecropin P1, lactoferricina B, e peptídeos ativos de proteína catiônica 18 e bactenecina; EDTA e Tris) em *Brucella* spp. não foram satisfatórias como bactericidas/bacteriostáticos. Esses dados reforçam a eficácia dos peptídeos sintéticos do presente trabalho. Apesar de não terem sido elucidados os mecanismos de ação dos mesmos, eles apresentam atividade bactericida e/ou bacteriostática comprovada.

Após a realização dos testes antimicrobianos foram identificados quais os peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana significativa e se os mesmos eram bactericidas ou bacteriostáticos. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação da atividade bactericida/bacteriostática de peptídeos antimicrobianos sintéticos contra *Brucella abortus* RB51, S19 e S2308.

Peptídeo Sintético	Concentração do peptídeo	<i>Brucella abortus</i> RB51	<i>Brucella abortus</i> S19	<i>Brucella abortus</i> S2308
Lalb 1.2	128 µg/mL	Bactericida	Bactericida	Bactericida
	64 µg/mL	Bactericida	Bactericida	Bactericida
	32 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	16 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	8 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
Lalb 1.3	128 µg/mL	Bactericida	Bactericida	Bacteriostático
	64 µg/mL	Bactericida	Bactericida	Bacteriostático
	32 µg/mL	Bactericida	Bactericida	Bacteriostático
	16 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	8 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
Lrot 3.6	128 µg/mL	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático
	64 µg/mL	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático
	32 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	16 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	8 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
Lrot 3.7	128 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	64 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	32 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	16 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	8 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
Lrot 3.8	128 µg/mL	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático
	64 µg/mL	Bactericida	Bacteriostático	Bacteriostático
	32 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	16 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
	8 µg/mL	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático

Em todos os ensaios antimicrobianos a gentamicina (em todas as concentrações utilizadas) apresentou ação bactericida.

Complementarmente, visando avaliar a citotoxicidade celular em macrófagos, foi realizado um teste com MTT. Conforme observado na figura 17, altas concentrações dos peptídeos tendem a interromper ou diminuir a atividade mitocondrial dos macrófagos. Algumas concentrações dos peptídeos Lalb1 e Lalb 1.3 não foram testadas por falta de material disponível. O teste não foi realizado com o peptídeo Lrot3.7, pois o mesmo não foi selecionado nos testes antimicrobianos realizados previamente como um promissor agente bactericida, uma vez que,

apenas em concentrações elevadas (128µg/mL) o mesmo apresentava atividade bacteriostática.

Observou-se que os peptídeos Lrot3.5 e Lrot3.6 apresentaram atividade antimicrobiana a partir da concentração 32µg/mL quando testados contra as três estirpes estudadas. Reforça-se a ideia de que esses sejam bons agentes antimicrobianos com o teste de MTT, uma vez que no mesmo, os peptídeos em questão apresentaram, na concentração 32µg/mL, uma taxa de sobrevivência dos macrófagos na ordem de 100%. Um requisito essencial para qualquer composto antimicrobiano ou agente terapêutico é que ele tenha uma toxicidade seletiva para o alvo microbiano em relação ao hospedeiro (YEAMAN E YOUNT, 2003).

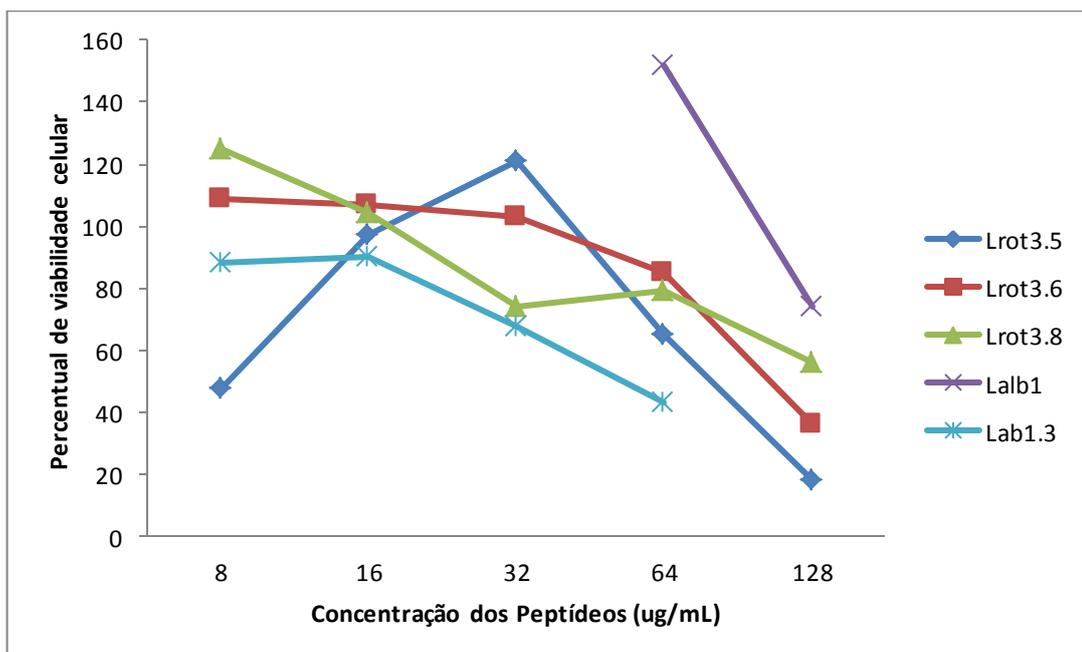


Figura 17 – Resultado do teste de viabilidade celular de peptídeos sintéticos Lrot3.5; Lrot3.6; Lrot3.8; Lalb1 e Lalb1.3 em macrófagos.

6 CONCLUSÕES

- As curvas de crescimento determinaram que para a realização de testes antimicrobianos com *Brucella abortus* RB51, S19 e S2308, o melhor tempo de incubação do inóculo é de 20 horas;
- Os peptídeos Lrot3.5 ; Lrot3.6 e Lrot3.8 apresentaram atividade antimicrobiana bacteriostática satisfatória, contra as três estirpes na concentração de 32µg/mL.
- A viabilidade celular de macrófagos foi mantida em 100% quando em contato com os peptídeos Lrot3.5 e Lrot3.6, na concentração de 32µg/mL.

7 PERSPECTIVAS

A continuidade dos testes com os peptídeos em questão pode objetivar as seguintes etapas:

- Realização de testes *in vivo* em camundongos visando à observação das reações dos animais à presença dos peptídeos no organismo;
- Determinação da carga bacteriana presente no interior de macrófagos *in vitro* após o contato com os peptídeos;
- Teste de caracterização do tipo de interação dos peptídeos com a membrana das bactérias, bem como testes de entrada dos peptídeos em macrófagos;
- Modificações computacionais estruturais dos peptídeos visando o aumento na atividade antimicrobiana dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLAHZADE, P.; SHAPOURI, R.;NASIRI SEMNANI, S.H. 2011. Antimicrobial effects of *Eucalyptus globulus* extracts on *Brucella melitensis* M 16 and *Brucella abortus* S99 *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ardabil University of Medical Sciences**, **11(3 (41))**: 218-227.

ABDEL-MAKSOUND, M.;HOUSE, B.;WASFY, M.;ABDEL-RAHMAN, B.;PIMENTEL, G.; ROUSHDY, G.; DUEGER, E. 2012. In vitro antibiotic susceptibility testing of *Brucella* isolates from Egypt between 1999 and 2007 and evidence of probable rifampin resistance. **Annals of Clinical Microbiology and antimicrobial**, **11:24**. doi:10.1186/1476-0711-11-24

ADADE, C.M.; OLIVEIRA, I.R.; PAIS, J.A.; SOUTO-PADRÓN, T. 2013. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**. Apr 2.

ADESIYUN, A.A.; BAIRD, K.; STEWART-JOHNSON, A. 2011. Antimicrobial resistance, phenotypic characteristics and phage types of *B. abortus* strains isolated from cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Veterinary Archives**, **81**: 391 – 404.

AL-MARIRI, A.; SAFI, M.E. 2010. The antibacterial activity of selected labiatae (*Lamiaceae*) essential oils against *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, **48(3)**: 952 – 956.

AL-MARIRI, A.; SWIED, G.; ODA, A.; AL HALLAB, L. 2013. Antibacterial activity of thymus syriacus boiss essential oil and its components against some syrian gram-negative bacteria isolates.**Iranian Journal of Medical Sciences**, **38(2)**:180-6.

ALMEIDA, L.A.; CARVALHO, N.B.; OLIVEIRA, F.S.; LACERDA, T.L.S.; VASCONCELOS, A.C.; NOGUEIRA, L.; BAFICA, A.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, S.C. 2011. MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-Mediated IFN- β induction in response to *Brucella abortus* infection. **PLoS ONE** **6(8)**: e23135. doi: 10.1371/journal.pone.0023135.

ARAYA, L.M.; ELZER, P.H.; ROWE, G.R.; ENRIGHT, R.M.; WINTER, A.J. 1989. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. **The Journal of Immunology**, **143**: 3330-3337.

ARRIGHI, R. B. G.; NAKAMURA, C.; MIYAKE, J.; HURD, H.; BURGESS, J. G.; 2002. Design and Activity of Antimicrobial Peptides against Sporogonic-Stage Parasites Causing Murine Malarías. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **46(7)**: 2104 - 2110.

ASOODEH, A.; SEPAHI, S.; GHORANI-AZAM, A. 2014. Purification and modeling amphipathic alpha helical antimicrobial peptides from skin secretions of *euphlyctis cyanophlyctis*. **Chemical Biology and Drug Design**, **83(4)**: 411-7.

ATLURI, V. L.; XAVIER, M. N.; JONG, M. F.; HARTIGH, A. B.; TSOLIS, R. M.; 2001. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. **Annual Review of Microbiology**, **65**: 523 – 541.

ATLURI, V.L.; XAVIER, M.N.; JONG, M.F.; HARTIGH, A.B.D.; TSOLIS, R.M. 2011. Pathogenic brucella species with their hosts. **Annual Review of Microbiology**, **65**: 523–41.

AZIRA, J.; BOSILKOYSKI, M.; CASCIO, A.; COLMENERO, J.D.; CORBEL, M.J.; FALAGAS, M.E.; MEMISH, Z.A.; ROUSHAN, M.R.H.; RUBISTEIN, E.; SIPSAS, N.V.; SOLERA, J.; YOUNG, E.J.; PAPPAS, G. 2007. Perspectives for the treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina recommendations. **PLoS Med** **4(12)**: e317.

BADOSA, E.; MOISET, G.; MONTESINOS, L.; TALLEDA, M.; BARDAJÍ, E.; FELIU, L.; PLASNAS, M.; MONTESINOS, E.; 2013. Derivatives of the Antimicrobial Peptide BP100 for Expression in Plant Systems. **PLoS ONE** **8(12)**: e85515. doi:10.1371/journal.pone.0085515.

BAHAR, A. A.; REN, D.; 2013. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, **6(12)**: 1543 - 1575.

BALDWIN, C. L., Goenka, R. 2006. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? **Critical Reviews in Immunology**, v. **26**, p. 407-442.

BARQUERO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D.S.; GUZMAN-VERRI, C.; CHACON-DIAZ, C.; RUCAVADO, A.; MORIYON, I.; MORENO, E. 2007. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. **PLoS ONE**. **2007**; **2(7)**: e631.

BARRINUEVO, P.; DELPINO, M.V.; POZNER, R.G.; VELASQUEZ, L.N.; CASSATARO, J.; GIAMBARTOLOMEI, G.H. 2013. *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8+ T cell responses. **Cellular Microbiology**, **15 (4)**:487–502.

BERRICAK-KIBO, M.; SEGURA, A.; MORENO, M.; LOPEZ, G.; GARCIA-ALMEDO, F.; MOLINA, A. 2002. Snain-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant Physiology**, **128**: 951–961.

BILLARD, E.; DORNAND, J.; GROSS, A. 2007. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. **Infection Immunity**, v. **75**, p. 5916-5923.

BOLINTINEANU, D. S.; KAZNESSIS, Y. N.; 2011. Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: a review. **Peptides**, **32(1)**: 188 - 201.

BOMAN, H.; WADE, D.; BOMAN, I.; WAHLIN, B.; MERRIFIELD, R. 1989. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittinhybrids. **FEBS Letters**. **259**:103–106.

BOSSI, P.; TEGNELL, A.; BAKA, A.; VAN LOOCK, F.; HENDRIKS, J.; WERNER, A.; MAIDHOF, H.; GOUVRAS, G.; 2004. Task Force on biological and Chemical Agent Threats. **Euro surveillance**, **9(12)**: e21 - 2.

BROEKAERT, W.F.; MARRIEN, W.; TERRAS, F.R.; DE BOLLE, M.F.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; DILLEN, L.; CLAEYS, M.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; 1992. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. **Biochemistry**, **31(17)**: 4308 - 4314.

BROGDEN, N.K.; BROGDEN, K.A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? 2011. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **38(3)**:217-25.

BROWN, S.D.; TRACZEWSKI, M.M. 2005. Broth microdilution susceptibility testing of *Brucella* species: quality control limits for ten antimicrobial agents against three standard quality control strains. **Journal of Clinical Microbiology**, **43(11)**: 5804-5807.

BUKATA, L.; ALTABE, S.; MENDOZA, D.; UGALDE, R.A.; COMERCI, D.J. 2008. Phosphatidylethanolamine synthesis is required for optimal virulence of *Brucella abortus*. **Journal of bacteriology**, **190 (24)**: 8197-8203.

CAMMUE, B.P.; DE BOLLE, M.F.; TERRAS, F.R.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; REES, S.B.; VADERLEYDEN, J.; BROAKAERT, W.F.; 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, **267(4)**: 2228 - 2233.

CARVALHO NETA, A.V.; MOL, J.P.; XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. **Veterinary Journal**, **184 (2)**: 146-155.

CASWELL, C.C.; GAINES, J.M.; CIBOROWSKI, P.; SMITH, D.; BORCHERS, C.H.; ROUX, C.M.; SAYOOD, K.; DUNMAN, P.M.; ROOP II, R.M. 2012. Identification of two small regulatory RNAs linked to virulence in *Brucella abortus* 2308. **Molecular Microbiology**, **85(2)**:345-360.

CASWELL, C.C.; BAUMGARTNER, J.E.; MARTIN, D.W.; ROOP II, R. M. 2012. Characterization of the organic hydroperoxide resistance system of *Brucella abortus* 2308. **Journal of Bacteriology**, **194(8)**: 5065-5072.

CHEN, Y.; GUARNIERI, M.T.; VASIL, A.I.; VASIL, M.L.; MANT, C.T.; HODGES, R.S. 2007. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **54(4)**: 1398-1406.

CHEN. F.; HE. Y. 2009. Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, **77 (4)**: 1719.

CHEERS, C.; HO, M. 1983. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. **Journal of Reticuloendothelial Society**, v. **34**, n. **4**, p. 299-309.

CLAYTON C. CASWELL, C.C; ELHASSANNY, A.E.M; PLANCHIN, E.E.; ROUX, C.M.; WEEKS-GOROSPE, J.; FICHT, T.A.; DUNMAN, P.M.; ROOP II, R.M. 2013. Diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in *Brucella abortus* 2308. **Infection and Immunity**, **81(4)**: 1040-1051.

CONDE-ÁLVAREZ, R.; ARCE-GORVEL, V.; GIL-RAMÍREZ, Y.; IRIARTE, M.; GRILLO, M.J.; GORVEL, J.P.; MORIYON, E.U. 2012. Lipopolysaccharide as a target for brucellosis vaccine design. **Microbial Pathogenesis**, **58**: 29-34.

CORBEL, M.J. 1997. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 213-221.

CORBEL, M., 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organization for Animal Health.

COSTELLOE, C.; METCALFE, C.; LOVERING, A.; MANT, D.; HAY, A.D. 2010. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**, 340:c2096-c2107.

COWAN, M. M.; 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4): 564 - 582.

CRASTA, O.R.; FOLKERTS, F.; FEI, Z.; MANE, S.P.; EVANS, C.; MARTINO-CATT, S.; BRICKER, B.; YU, G.; DU, L.; SOBRAL, B.W. 2008. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. **PLoS ONE**, 3(5): e2193.

DE ALMEIDA, L. A.; MACEDO, G. C.; MARINHO, F. A. V.; GOMES, M.R.T.; CORSETTI, P. P.; SILVA, A. M.; CASSATARO, J.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; OLIVEIRA, S. C.; 2013. Toll-Like Receptor 6 Plays an Important Role in Host Innate Resistance to *Brucella abortus* Infection in Mice. **Infection and Immunity**, 81(5): 1654 - 1662.

DIAMOND, G.; BECKLOFF, N.; WEINBERG, A.; KISICH, K.O.; 2009. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. **Current Pharmaceutical Design**, 15(21): 2377 - 2392.

DUBOS, R.J. 1939. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. **The Journal of Experimental Medicine**, 70: 1 - 10.

FU, S.; XU, J.; LI, X.; XIE, Y.; QIU, Y.; DU, X.; YU, S.; BAI, Y.; CHEN, Y.; WANG, T.; WANG, Z.; YU, Y.; PENG, G.; HUANG, L.; HUANG, K.; WANG, Y.; CHEN, Z. 2012. Immunization of mice with recombinant protein CobB or AsnC confers protection against *Brucella abortus* infection. **PLoS ONE** 7(2): e29552.

FUJIKAWA, K.; SUKETA, Y.; HAYASHI, K.; SUZUKI, T.; 1965. Chemical structure of circulin A. **Experientia**, 21(6): 307 - 308.

FUJIMURA, M.; IDEGUCHI, M.; MINAMI, Y.; WATANABE, K.; TADERA, K.; 2004. Purification, characterization, and sequencing of novel antimicrobial peptides, Tu-AMP 1 and Tu MP 2, from Bulbs of tulip (*Tulipa gesneriana* L.). **Bioscience, Biotechnology and biochemistry**, **68**: 571 - 577.

GAMES, P.D.; SANTOS, I.S.; MELLO, E.O.; DIZ, M.S.S.; CARVALHO, A.O.; SOUZA-FILHO, G.A.; DA CUNHA, M.; VASCONCELOS, I.M.; FERREIRA, B.S.; GOMES, V.M. 2008. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, **15**:2090–2100.

GARCIA-YOLDI, D.; MARIN, C.M.; MIGUEL, M.J.; MUNOZ, P.M.; VIZMANOS, J.L.; LOPEZ-GON, M. 2006. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all brucella species and the vaccine strains *Brucella abortus* s19 and rb51 and *Brucella melitensis*. **Clinical Chemistry**, **52 (4)**: 779-781.

GOENKA, R.; GUIRNALDA, P. D.; BLACK, S. J.; BALDWIN, C. L.; 2012. B Lymphocytes Provide an Infection Niche for Intracellular Bacterium *Brucella abortus*. **The Journal of Infectious Diseases**, **206(1)**: 91 - 98.

GOLDING, B.; SCOTT DE SCHARF, O.; HUANG, L.Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. **Microbes and Infection, Rockville**, v. **3**, p. 43-48.

GORDON, Y.J.; ROMANOWSKI, E.G.; MCDERMOTT, A.M. 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. **Current Eye Research**, **30(7)**: 505-15.

GHODASARA, S.N.; ROY, A.; BHANDERI, B.B. 2010. Comparison of rose bengal plate agglutination, standard tube agglutination and indirect ELISA tests for detection of *Brucella* antibodies in cows and buffaloes. **Veterinary World**, **3**: 61-64.

GROSS, A.; BERTHOLET, S.; MAUEL, J.; DORNAND, J.; 2004. Impairment of *Brucella* growth in human macrophagic cells that produce nitric oxide. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, p. 75-82.

HAMMAMI, R.; HAMIDA, J, B.; VERGOTEN, G.; FLISS, I.; 2009. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. **Nucleic Acids Research**, **37(Database issue)**: D963–D968.

HAN, F.F.; GAO, Y.H.; LUAN, C.; XIE, Y.F. WANG, Y.Z. 2013. Comparing bacterial membrane interactions and antimicrobial activity of porcine lactoferricin-derived peptides. **Journal of Dairy Science**, **5**.

HANCOCK, R.E.; PATRZYKAT, A. 2002. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**, **2 (1)**:79-83.

HE, Y. 2012. Analyses of Brucella pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**,**2**: 2.

HOTCHKISS, R.D.; DUBOS, R. J. 1940 . Fractionation of the bactericidal agent from cultures of a soil bacillus. **The Journal of Biological Chemistry**, **132**: 791-792.
JENKINS, S.G.; SCHUETZ, A.N. 2012. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, **87(3)**: 290-308.

JIANG, X., LEONAR, B., BENSO, r., BALDWIN, C.L. 1993. Macrophage Control of Brucella abortus: Role of Reactive Oxygen intermediates and Nitric Oxide. **Cellular Immunology**, v.**151**, p. 309-319.

JIANG, Z.; VASIL, A. I.;GERA, L.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S.; 2011 . Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides to Target Gram-negative Pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Utilization of Charge, "Specificity Determinants", Total Hydrophobicity, Hydrophobe Type and Location as Design Parameters to Improve the Therapeutic Ratio. **Chemical Biology & Drug Design**, **77(4)**: 225 - 240.

KIM, M.H.; PARK, S.C.; KIM, J.Y.; LEE, S.Y.; LIM, H.T.; CHEONG, H.; HAHM, K.S.; PARK, Y. 2006. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley". **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **346 (3)**:681-6.

KOO, J.C.; LEE, S.Y.; CHUN, H.J.; CHEONG, Y.H.; CHOI, J.S.; KAWABATA, S.I.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; HA, K.S.; BAE, D.W.; HAN, C.D.; LEE, B.L.; CHO, M.J. 1998. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1382**: 80 - 90.

LAGE, A.P.; POESTER, F.P.; PAIXÃO, T.A.; SILVA, T.M.A.; XAVIER, M.N.; MINHARRO, S.; MIRANDA K.L.; ALVES, C.M.; MOL, J.P.S.; SANTOS, R.L. 2008; Bovine brucellosis: an updated review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, **32 (3)**: 202-212.

LAMONTAGNE, J.; FOREST, A.; MARAZZO, E.; DENIS, F.; BUTLER, H.; MICHAUD, J.; BOUCHER, L.; PEDRO, I.; VILLENEUVE, A.; SITNIKOV, D.; TRUDEL, K.; NASSIF, N.; BOUDJELTI, D.; TOMAKI, F.; CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; BRUNET, S.; CÔTÉ-MARTIN, A.; HUNTER, J.; MORENO, E.; PARAMITHIOTIS, E. 2009. Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. **Journal of Proteomic Research**, **8(3)**: 1594-1609.

LIRA, F.; PEREZ, P.S.; BARANAUSKAS, J.A.; NOZAWAA, S.R. 2013. Prediction of antimicrobial activity of synthetic peptides by a decision tree model. **Applied and Environmental Microbiology**, **79 (10)**: 3156-3159.

LONSWAY, D.R.; JEVITT, L. A.; UHL, J. R.; COCKERILL, F. R.; ANDERSON, M. E.; SULLIVAN, M. M.; DE, B. K.; EDWARDS, J. R.; PATEL, J. B. 2010. Effect of carbon dioxide on broth microdilution susceptibility testing of *Brucella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, **48(3)**: 952-956.

LORIN, A.; NOËL, M.; PROVENCHER, M.È.; TURCOTTE, V.; CARDINAL, S.; LAGÜE, P.; VOYER, N.; AUGER, M. 2012. Determining the mode of action involved in the antimicrobial activity of synthetic peptides: a solid-state NMR and FTIR study. **Biophysical Journal**, **103(7)**: 1470-9.

LUDERS, T.; BIRKEMO, G.A.; NISSEN-MEYER, J.; ANDERSEN, O.; NES, I.F. 2005. Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone h1 N-terminal Peptide fragment isolated from the skin mucus of Atlantic salmon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49**:2399–2406.

MACCALLUM, D.M.; DESBOIS, A.P.; COOTE, P.J. 2013. Enhanced efficacy of synergistic combinations of antimicrobial peptides with caspofungin versus *Candida albicans* in insect and murine models of systemic infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**. **10**.

MACEDO, G.C.; MAGNANNI, D. M.; CARVALHO, N. B.; ROMERO, O. B.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. 2008. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. **Journal of Immunology**, **v.180, n. 2**, p. 1080–1087.

MARCUS, J.P.; GOUTLER, K.C.; GREEN, J.L.; HARRISON, S.J.; MANNERS, J.M. 1997. Purification, characterization and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. **European Journal of Biochemistry**. **244**:743-749.

MARTIROSYAN, A.; GORVEL, J. P. 2013. *Brucella* evasion of adaptive immunity. **Future Microbiol**, **v. 8, n. 2**, p. 147-54.

MATTURE, B.; KNOOP, F.C.; CONLON, J.M.; 2000. Kassinatuerin-1: um peptídeo com largo espectro de atividade antimicrobiana, isolado a partir da pele do sapo, *Kassina senegalensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **268 (2)**:433-6.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, **65(1-2)**:55-63.

MURPHY, E. A., et al. 2001. Interferon- γ is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. **Immunology**, vol. **103**, n. **4**, p. 511–518.

NAROENI, A.; PORTE, F. 2002. Role of cholesterol and the ganglioside GM1 in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. **Infection and Immunity**, **70**: 1640–1644;

NAWROT, R.; BARYLSKI, J.; NOWICKI, G.; BRONIARCZYK, J.; BUCHWALD, W.; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, A. 2014. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, **59(3)**: 191-196.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NETA, A. V. C.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, **184(2)**:146-155.

OSBORN, R.; DE SAMBLANX, G.; THEVISSSEN, K.; GODERIS, I.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; ATTENBOROUGH, S.; REES, S.; BROEKAERT, W. 1995. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. **Febs Letters**, **368**:257–262.

PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N.; TSIANOS, E. 2005. Effective treatments in the management of brucellosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, **6**: 201 – 209.

PAPPAS, G.; PANAGOUPPOULOU, P.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. 2006. *Brucella* as a biological weapon. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **63**: 2229 – 2236.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E. V. 2006. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, **6**: 91 – 99.

PARK, C.J.; PARK, C.B.; HONG, S.S.; LEE, H.S.; LEE, S.Y.; KIM, C. 2000. Characterization and cDNA cloning of two olivine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. **Plant Molecular Biology**,**44**: 187–197.

PASQUEVICH, K.A.; ESTEIN, S.M.; GARCIA SAMARTINO, C.; ZWERDLING, A.; CORIA, L.M.; BARRIONUEVO, P.; FOSSATI, C.A.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; CASSATARO, J. 2009. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. **Infection and Immunity**,**77**: 436–445.

PASQUEVICH, A.K.; SAMARTINO, C.G.; CORIA, L.M.; ESTEIN, S.M.; ZWERDLING, A.; IBANEZ, A.S.E.; BARRIONUEVO, P.; OLIVEIRA, F.S.; CARVALHO, N.B.; BORKOWSKI, J.; OLIVEIRA, S.C.; WARZECHA, H.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; CASSATARO, J. 2010. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a th1 immune response, and is a promising self-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. **Journal of Immunology**, **184**: 5200-5212.

PEI, J.; ZHAO, G.; WANG, B.; WANG, H. 2013. Three novel antimicrobial peptides from the skin of *Rana shuchinae*. **Gene**,**1**;**521(2)**:234-7.

RAHNAMAEIAN, M.2011. Antimicrobial peptides: Modes of mechanism, modulation of defense responses. **Planta Signaling and Behavior**, **6 (9)**: 1325-1332.

RAJASEKARAN, P.; ALEXANDER, J.C.; SELEEM, M.N.; JAIN, N.; SRIRANGANATHAN, N.; WATTAM, A.R.; SETUBAL, J.C.; BOYLE, S.M. 2013. Peptide nucleic acids inhibit growth of *Brucella suis* in pure culture and in infected murine macrophages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **41(4)**: 358-362.

RATHINAKUMAR, R.; WALKENHORST, W. F.; WIMLEY, W. C.; 2009. Broad-spectrum Antimicrobial Peptides by Rational Combinatorial Design and High-throughput Screening: The Importance of Interfacial Activity.**Journal of the American Chemical Society**, **131(22)**: 7609 - 7617.

RODRÍGUEZ, M.C.; VIADAS, C.; SEOANE, A.; SANGARI, F.J.; LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-LOBO, J.M. 2012. Evaluation of the effects of erythritol on gene expression in *Brucella abortus*. **Journal of Infectious Diseases**, **207(7)**:1075-1083.

ROSCIA, G.; FALCIANI, C.; BRACCO, L.; PINI, A.; 2013. The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs. **Current Protein & Peptide Science**, **14 (8)**: 641-649.

ROSCIA, G.; FALCIANIN C.; BRACCI, L.; PINI, A. 2013. The Development of Antimicrobial Peptides as New Antibacterial Drugs. **Current Protein and Peptide Science**, **14(8)**: 641-649.

SAFI, M.; AL-MARIRI, A. 2012. Efficacy evaluation of some antibiotics against syrian *brucella* spp isolates, *in vitro*. **Brazilian Journal of Microbiology**, **43(4)**: 1269-73.

SALCEDO, S.P.; CHEVRIER, N.; LACERDA, T.L.; BEN AMARA, A.; GERART, S.; GORVEL, V.A.; DE CHASTELLIER, C.; BLASCO, J.M.; MEGE, J.L.; GORVEL, J.P. 2013. Pathogenic brucellae replicate in human trophoblasts. **The Journal of Infectious Diseases**, **207 (7)**: 1075-1083.

SEGURA, S.; MORENO, M.; MOLINA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. 1998. Novel defensin subfamily de espinafre (*Spinacia oleracea*). **Febs letters**, **435**: 159-162.

SELEEM, M.N.; JAIN, N.; POTHAYEE, N.; RANJAN, A.; RIFFLE, J.S.; SRIRANGANATHAN, N. 2009. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. **FEMS Microbiology Letters**, **294**: 24 – 31.

SEO, M.D.; WON, H.S.; KIM, J.H.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B.J. 2012. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, **17(10)**: 12276-86.

SMITH, V.J.; DESBOIS, A.P.; DYRYNDA, E.A. 2010. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. **Mar Drugs**, **8(4)**: 1213–1262.

SOLERA, J.; MARTINEZ-ALFARO, E.; ESPINOSA, S. 1997. Recognition and optimum treatment of brucellosis. **Drugs**, **53**: 245 – 256.

STARR, T.; CHILD, R.; WEHRLY, T. D.; HANSEN, B.; HWANG, S.; LOPEZ-OTIN, C.; VIRGIN, H. W.; CELLI, J. 2012. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle. **Cell Host Microbe**, **11**: 33–45.

STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C. 1996. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B. abortus* RB51. **Infection and Immunity**, **64(3)**: 1030 - 1034.

STEWART, C.D.; STOCKER, S.A.; SWENSON, J.M.; O'HARA, C.M.; EDWARDS, J.R.; GAYNES, R.P.; MCGOWAN, J.R.; TENOVER, F.C. 1999. Comparison of agar dilution, disk diffusion, MicroScan, and Vitek antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of fluoroquinolone-resistant isolates of the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, **37(3)**: 544-547.

TAILOR, R.H.; ACLAND, D.P.; ATTENBOUROUGH, S.; CAMMUE, B.P.; EVANS, I.J.; OSBORN, R.W.; RAY, J.A.; REES, S.B.; BROUEKAERT, W.F. 1997. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. **Journal of Biological Chemistry**. **272(39)**:24480–24487.

TAVARES, L.S.; RETTORE, J.V.; FREITAS, R.M.; PORTO, W.F.; DUQUE, A.P.; SINGULANI, J.D.L.; SILVA, O.N.; DETONI, M.D., L.; VASCONCELOS, E.G.; DIAS, S.C.; FRANCO, O.L.; SANTOS, M.D. O. 2012. Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. **Peptides**, **37(2)**: 294-300.

TAVARES, L. S.; SILVA, C. S. F.; DE SOUZA, V. C.; DA SILVA, V. L.; DINIZ, C. G.; SANTOS, M. O.; 2013 .Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**.doi: **10.3389/fmicb.2013.00412**.

TEJADA, G. M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, S.; RÁZQUIN-OLAZARAN, I.; KOWALSKI, I.; KACONIS, Y.; HEINBOCKEL, L.; ANDRÄ, J.; SCHÜRHOZ, T.; HORNEF, M.; DUPONT, A.; GARIDEL, P.; LOHNER, K.; GUTSMANN, T.; DAVID, S.A.; BRANDENBURG, K. 2012. Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines. **Current drug targets**, **13(9)**: 1121-30.

THOMAS, S.; KARNIK, S.; BARAI, R.S.; JAYARAMAN, V. K.; IDICULA-THOMAS, S.; 2010. CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, **38(Database issue)**:D774-80. doi: 10.1093/nar/gkp1021.

TYO, K.E.; ALPER, H.S.; STEPHANOPOULOS, G.N. 2007. Expanding the metabolic engineering toolbox: More options to engineer cells. **Trends Biotechnology**. **25**: 132–137.

UM, L.; ZHANG, Y.; WANG, C.; WU, L.; WANG, Z. 2013. Purification, molecular cloning, and antimicrobial activity of peptides from the skin secretion of the black-spotted frog, *Rana nigromaculata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23632907>.

VEMULAPALLI, R.; HE, Y.; BUCCOLO, L.S.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURIG, G.G. 2000. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. **Infection and immunity**, **68 (7)**: 3927 – 3932.

VEMULAPALLI, R.; MCQUISTON, J.R.; SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; HALLING, S.M.; BOYLE, S. M.; 1999. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, **6 (5)**: 760-764.

VERNON, L.P.; EVETT, G.E.; ZEIKUS, R.D.; GRAY, W.R.; 1985. A toxic thionin from *Pyricularia pubera*: purification, properties, and amino acid sequence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **238**: 18-29.

WANG, H.; NG, T.B.; 2000. Ginkbilobin, a novel antifungal protein from Ginkgo biloba seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, **279**: 407-411.

WANG, H.X.; NG, T.B.; 2003. Dendrocin, a distinctive antifungal protein from bamboo shoots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **307(3)**: 750 - 755.

WANG, Z.; WANG, G. 2004. APD: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research**, **1**: 32

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research** **37**, D933-D937.

WANG, Y.; CHEN Z.; QIU, Y.; KE, Y.; YUAN, X.; LI, X.; FU, S; CUI, M.; XIE, Y.; DU, X.; WANG, Z.; HUANG, L. 2012. Identification of *Brucella abortus* virulence proteins that modulate the host immune response. **Bioengineered**, **3 (5)**: 303-305.

WITHERUP, K.M.; BOGUSKY, M.J.; ANDERSON, P.S.; RAMJIT, H.; RANSOM, R.W.; WOOD, T.; SARDANA, M. 1994. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. **Journal of Natural Products**, **57(12)**: 1619-25.

WONG, J. H.; MG, T.B.; 2005. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). **Peptides**, **26(11)**: 2086 - 2092.

XAVIER, M. N.; WINTER, M. G.; SPEES, A. M.; NGUYEN, K.; ATLURI, V. L.; SILVA, T. M. A.; BÄUMLER, A. J.; MÜLLER, W.; SANTOS, R. L.; TSOLIS, R. M.; 2013. CD4⁺ T Cell-derived IL-10 Promotes *Brucella abortus* Persistence via Modulation of Macrophage Function. **PLOS Pathogens**, **9(6)**: e1003454.

XAVIER. M.N.: COSTA. E.A.: PAIXAO. T.A.S. 2009. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. **Ciência Rural**, **39 (7)**: 2252-2260.

YAN, G.; YAN, Y.; LIU , H.; Q, LV. 2013. Stepwise identification of potent antimicrobial peptides from human genome. **Biosystems**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2013.03.021>.

YANG, X.; SKYBERG, J. A.; CAO, L.; CLAPP, B.; THORNBURG, T.; PASCUAL, D. W.; 2013 .Progress in *Brucella* vaccine development. **Frontiers in Biology**, **8(10)**: 60 - 77.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, **55(1)**: 27-55.

ZAKERI, B.; LU, T. K. 2013. Synthetic Biology of Antimicrobial Discovery. **ACS Synthetic Biology**, **2(7)**: 358-372.

ZENG, Z.C.; ZHOU, L.; SHI, W.; LUO, X.; ZHANG, L.; NIE, Y.; WANG, J.; WU, S.; CAO, B.; CAO, H. 2013. Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator*. **Peptides**. <http://dx.doi.org/sci-hub.org/10.1016/j.peptides.2013.03.026>.

ZHANG, M.; HAN, X.; LIU, H.; TIAN, M.; DING, C.; SONG, J.; SUN, X.; LIU, Z.; YU, S. 2013. Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria. **Veterinary Microbiology**, **164 (3-4)**: 322 – 329.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. 1997. F abatins: new antimicrobial plant peptides. **Fems Microbiology Letters**, **149 (1)**:59–64.

ZHAO, X.; WU, H.; LU, H.; LI, G.; HUANG, Q.; 2013. LAMP: A database linking antimicrobial peptides. **PLoS One** **2013, 8**, e66557.

ZVEREVA, A. S.; POOGGIN, M. M.; 2012. Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. **VIRUSES**, **4(11)**: 2578 - 2597.