

Cátia Sofia Alves Ferreira

Peptídeos como alternativas terapêuticas

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2020

Cátia Sofia Alves Ferreira

Peptídeos como alternativas terapêuticas

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2020

Cátia Sofia Alves Ferreira

Peptídeos como alternativas terapêuticas

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa

como parte dos requisitos para obtenção de grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Cátia Sofia Alves Ferreira

RESUMO

Nos últimos anos tem havido um aumento significativo de aparecimento de estirpes, mecanismos de resistência que tem conferido resistência bacteriana a inúmeros antibióticos convencionais, assim as opções terapêuticas tendem a encurtar cada vez mais e a possibilidade de escolha dos antibióticos adequados torna-se cada vez menor. Os péptidos possuem vários mecanismos, atuando na membrana das bactérias, verificando-se uma alternativa a esses problemas existentes.

Desta forma, o estudo sobre a utilização de Péptídeos Antimicrobianos (AMPs do inglês Antimicrobial peptides) tornou-se impreterível devido a todo o potencial que apresentam, pois para além da sua atividade antimicrobiana também possuem ação anti-inflamatória e imunológica.

Palavras-chave: AMP; resistência bacteriana; peptídeos antimicrobianos; resistência a antibióticos; CAMP; bactérias multirresistentes; péptidos antimicrobianos; mecanismos de ação AMPs.

ABSTRACT

In recent years there has been a significant increase in the appearance of strains, resistance mechanisms that provide bacterial resistance to the numerous conventional antibiotics, as well as therapeutic options tend to shorten more and more and the possibility of choosing the appropriate antibiotics becomes less and less. The peptides have several mechanisms, acting on the bacterial membrane, proving an alternative to these existing problems.

Thus, the study on the use of Antimicrobial Peptides (AMPs from English Antimicrobial peptides) became imperative due to all the potential they present, because in addition to their antimicrobial activity they also have anti-inflammatory and immunological action.

Keywords: AMP; bacterial resistance; antimicrobial peptides; antibiotic resistance; CAMP; multidrug-resistant bacteria; antimicrobial peptides; mechanism of action.

AGRADECIMENTOS

Presto um agradecimento em especial ao meu orientador de estágio por toda a paciência, dedicação e por fazer sempre questão de me transmitir todos os seus conhecimentos e o gosto pela procura constante pelo conhecimento.

Quero agradecer a todos os que contribuíram para a minha formação, desde os colegas de turma por todo o companheirismo e bons momentos de convívio, aos professores por toda a aprendizagem e por proporcionarem sempre um excelente ambiente.

Um obrigado à minha família e namorado será sempre pouco. Tenho a maior sorte do mundo por ter a melhor família do mundo, por todo o apoio e amor que sempre me deram, em especial para a minha mãe por ser a maior responsável pela minha presença hoje aqui, por ter acreditado em mim e me incentivar com a maior convicção do mundo.

Ao longo destes anos tive a sorte de encontrar bons amigos, amigos para a vida que sempre recordarei com o maior carinho do mundo.

Não posso esquecer de agradecer à minha primeira “casa” Instituto Politécnico de Bragança, que apesar de não ter concluído a licenciatura recordo e levo no coração todos os bons momentos, de aprendizagem e amor que aquela instituição e cidade me deu.

“Amigos para sempre seremos até morrer

Eu chorarei quando tiver que partir

Da academia saudades eu vou ter

Amigos para sempre”

O meu sincero obrigada...

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. DESENVOLVIMENTO.....	4
1. Estrutura celular bacteriana.....	4
i. Composição e estrutura da parede celular.....	5
Parede celular das bactérias Gram-positiva.....	6
ii. Membrana Citoplasmática.....	9
2. Sobre os peptídeos antimicrobianos.....	11
3. Classificação dos peptídeos antimicrobianos.....	13
4. Atividade antibacteriana.....	15
i. Mecanismo de ação dos Peptídeos antimicrobianos.....	15
ii. Mecanismo de Ação de Alvo Não-Membrana.....	20
5. Resistência Bacteriana aos AMPs.....	23
i. Mecanismos de resistência bacteriana aos AMPs.....	25
Degradação ou sequestro proteolítico por proteínas secretadas;.....	25

6. Antibióticos e AMPs	27
i. Daptomicina.....	29
ii. Gramicidina S.....	31
iii. Polimixinas	32
iv. Doenças em humanos relacionadas com AMPs.....	35
7. Terapêutica com peptídeos	36
III. CONCLUSÃO	38
BIBLIOGRAFIA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evolução temporal de novos antibióticos. Adaptado de Hutchings <i>et al.</i> , 2019.	2
Figura 2: Antibióticos agrupados em Famílias, consoante o seu mecanismo de ação.....	3
Figura 3: Esquema ilustrativo da estrutura celular de um microorganismo procariota e eucariota adaptado de Pilling <i>et al.</i> , 2013.....	5
Figura 4: Estrutura química do peptidoglicano (PG) em <i>S. aureus</i> . Imagem cedida pelo Doutor João Carlos Sousa.	6
Figura 5: Parede celular de uma bactéria Gram-positivo. Parede celular (PC) e a membrana celular (MC). Fotografia de microscopia eletrónica cedida pelo Doutor João Carlos Sousa.....	7
Figura 6: Estrutura química dos ácidos teicóicos (à esquerda) e organização estrutural da PC de <i>S. aureus</i> (à direita) Adaptado de Wang <i>et al.</i> , 2014.....	7
Figura 7: Envelope celular da Parede Gram-negativa onde é visível a camada de peptidoglicano (PG), membrana externa (OM), a membrana plasmática (PM) e o Periplasma. Adaptado de Beveridge, 1999.	8
Figura 8: Esquema dos invólucros (PC e membranas) bacterianos de Gram-negativo. Adaptado de Wang <i>et al.</i> , 2014.....	8
Figura 9: Estrutura de um Lipopolissacarídeo. Adaptado de Microbiology Book, 2020.	9
Figura 10: Organização da membrana citoplasmática (modelo de Singer e Nicholson)	10
Figura 11: Estrutura química dos fosfolípidos. Adaptado de Ernst e Peshel, 2011.....	11
Figura 12: Esquema ilustrativo de Modelos de proteínas representando as diferenças estruturais das quatro classes de peptídeos antimicrobianos. Adaptado de Peter <i>et al.</i> , 2010.	14
Figura 13: Vários mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. MN: neutrófilos polimorfonucleares; ADP: difosfato de adenosídeo; ATP: trifosfato de adenosídeo. Adaptado de Kumar <i>et al.</i> , 2018.	16

Figura 14: Esquema ilustrativo dos Modelos responsáveis pela desintegração da membrana. Adaptado de Raheem e Straus, 2019.....	18
Figura 15: Estrutura de lipídio II com pirofosfato circulada em vermelho. Adaptado de Kumar <i>et al.</i> , 2018.	20
Figura 16: Características imunomodeladoras das catelicidinas. Adaptado de Alford <i>et al.</i> , 2020.	22
Figura 17: Mecanismo de resistência aos antimicrobianos. Imagem adaptada de Ernst e Peshel, 2011.....	25
Figura 18: (A) Desvantagem do uso único de um medicamento; (B) Vantagem no uso de tratamentos combinatórios. Adaptado de León-Buitimea <i>et al.</i> , 2020.....	29
Figura 19: Esquema ilustrativo da Estrutura da Daptomicina Adaptado de Steenberg <i>et al.</i> , 2005.....	30
Figura 20: Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da Daptomicina Adaptado de Steenberg <i>et al.</i> , 2005.	31
Figura 21: Esquema ilustrativo da Estrutura da Gramicidina S. Adaptado de Swierstra <i>et al.</i> , 2016.....	32
Figura 22: Esquema ilustrativo da Estrutura da Polimixina B. Adaptado de Zavascki <i>et al.</i> , 2007.....	34
Figura 23: Esquema ilustrativo da interação da Polimixina B com a porção lipídica da membrana externa do lipopolissacarídeo (LPS). Adaptado de Trimble <i>et al.</i> , 2016.	34
Figura 24: Aplicações clínicas AMPs. Adaptado de Alford <i>et al.</i> , 2020.	37

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de Adenosídeo
AMP	<i>Antimicrobial Peptides</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Trifosfato de Adenosídeo
Ca ²⁺	Catião Cálcio
CAMP	Antimicrobianos Catiônicos
CIB	Concentrações Mínimas Bactericidas
CIM	Concentrações Inibitórias Mínimas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EPS	Substância Polimérica Extracelular
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp</i>
HDPs	Peptídeos de defesa do hospedeiro
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HIV-1 e 2	<i>Human Immunodeficiency Virus 1 e 2</i>
hLF 1 a 11	Lactoferrina Humana 1 a 11
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
HSV 1 e 2	<i>Herpes Simplex Virus 1 e 2</i>

K ⁺	Iões de Potássio
LL-37	Catelicidina Humana
LPS	Lipopolissacarídeo
MC	Membrana Citoplasmática
MDR	Bactérias Multirresistentes
Mg ²⁺	Catião Magnésio
MN	Neutrófilos Polimorfonucleares
MRSA	<i>S.aureus</i> Resistente à Meticilina
NAG	N-acetilmurâmico
NAM	N-acetilglucosaminas
OM	Membrana Externa
PC	Parede Celular
PG	Peptidoglicano
pH	Potencial de Hidrogénio
PM	Membrana Plasmática
RNA	Ácido Ribonucleico
SAAP-148	<i>Synthetic Antimicrobial Antibiofilm Peptide 148</i>
TA	Ácidos Teicóicos Alanilados
TG	Transglicolases
VRE	Vancomicina
XDR	<i>Extensively Drug Resistant</i>

I. INTRODUÇÃO

A monografia que se apresenta tem como tema proposto “Peptídeos antimicrobianos como alternativas terapêuticas” no âmbito de conclusão do Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Fernando Pessoa.

O século XX ficou marcado como uma nova era da medicina no uso clínico. O desenvolvimento de antibióticos possibilitou o avanço de vários procedimentos médicos modernos que ainda hoje são utilizados, em diversas terapêuticas como no tratamento de doenças infecciosas. (Sousa *et al.*, 2016; Hutchings *et al.*, 2019).

A descoberta dos antibióticos revolucionou o tratamento das infeções bacterianas, baixando drasticamente a mortalidade causada por diversos agentes bacterianos.

Inicialmente os antibióticos eram obtidos a partir de produtos metabólicos associados a *Actinomycetos* ou *Streptomyces* (Donadio *et al.*, 2002; Cundliffe *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2016).

A história dos antibióticos começa com a descoberta da penicilina, produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, e posteriormente foram descobertas novas moléculas antibióticas produzidas por *Streptomyces* spp (Figura 1).

Descoberta de antibióticos

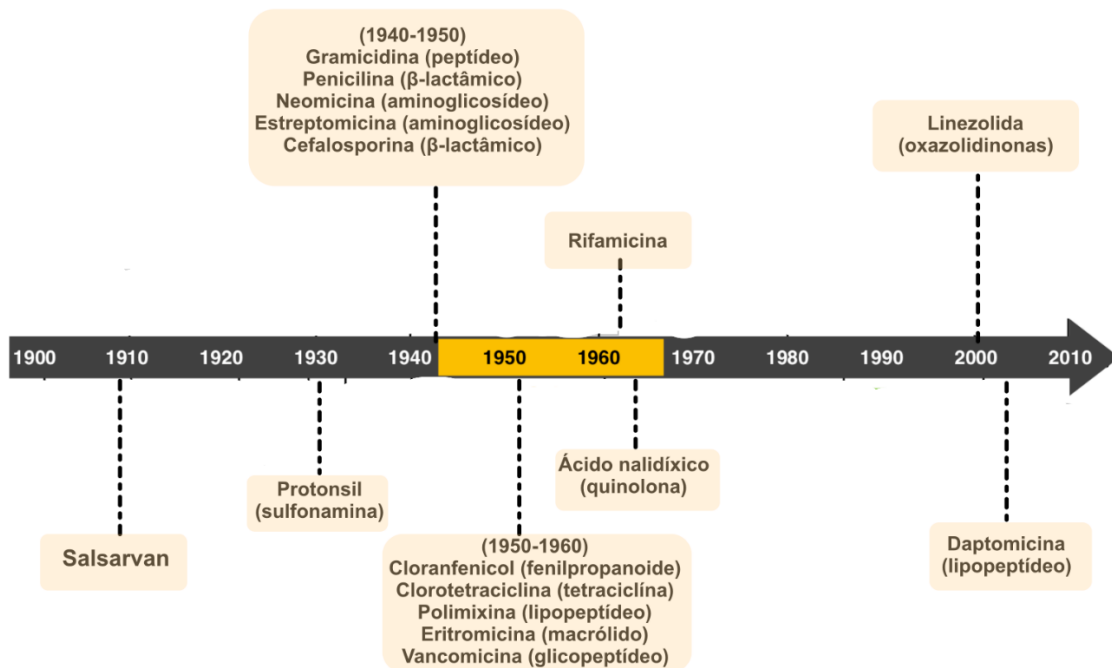


Figura 1: Evolução temporal de novos antibióticos. Adaptado de Hutchings *et al.*, 2019.

Presentemente, são também considerados antibióticos as moléculas de síntese química, como é o caso das sulfamidas e quinolonas (Madigan *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2016).

Os antibióticos estão agrupados farmacologicamente em Famílias: Anti membranares, Antiparietais, Inibidores da síntese proteica, Inibidores da síntese dos ácidos nucleicos e Antimetabólitos, de acordo com o respetivo mecanismo de ação (Sousa *et al.*, 2016) (Figura 2).

Mecanismo de ação dos Antibióticos

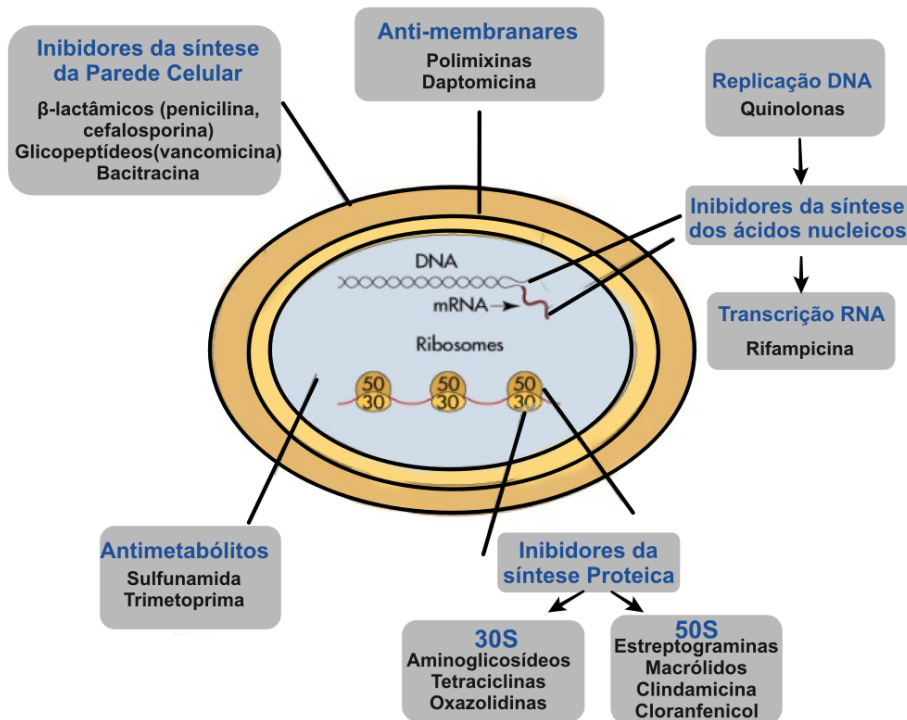


Figura 2: Antibióticos agrupados em Famílias, consoante o seu mecanismo de ação

Criou-se, inicialmente, a ideia que os antibióticos eram fármacos milagrosos, sendo defendido por diversos autores como o fim das doenças infecciosas. Tal desiderato, foi rapidamente ultrapassado com o aparecimento de isolados clínicos resistentes aos antibióticos usados no armamentário terapêutico, resistentes a antibióticos pertencentes a diversas famílias, sendo designadas por estirpes multirresistentes (MDR) (Sousa *et al.*, 2016).

Com o aparecimento de isolados multirresistentes aos antibióticos de diversas famílias, ficam reduzidas as possibilidades da eficácia dos esquemas terapêuticos instituídos.

A diminuição da eficácia terapêutica não poupa os países desenvolvidos e estende-se a todos os tipos de doenças microbianas, desde origem bacteriana, vírica ou fúngica (Chung e Khanum, 2017).

Os Péptidos Antimicrobianos (AMPs do inglês Antimicrobial peptides) são excelentes alternativas à utilização excessiva da terapêutica convencional, pois agem sem alta especificidade em relação a um alvo proteico, deste modo, a probabilidade de resistência é

reduzida (Wimley e Hristova, 2011). As moléculas dos antibióticos são cada vez menos eficientes devido à resistência bacteriana, de forma que, o desenvolvimento de peptídeos como futuros métodos para combater a resistência tornar-se-á necessária (Pirri *et al.*, 2009; Zhang e Gallo, 2016).

Os AMPs demonstram uma potente atividade antimicrobiana que podem ser mobilizados sem problema algum de forma a conseguir neutralizar vírus, bactérias, protozoários e fungos (Berglund *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2020). É pertinente desenvolver estudos e aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos exercidos pelos peptídeos de forma a facilitar novas abordagens terapêuticas e, assim, lograr forma de descobrir e desenvolver novos agentes farmacológicos (Peters *et al.*, 2010).

Sabe-se os AMPs têm diversos modos de ação, dependendo dos alvos bacterianos com os quais interagem e, portanto, são candidatos promissores para tratamentos antibacterianos de múltiplos alvos (Cardoso *et al.*, 2020).

Apesar de todas as funções e atividades que apresentam, a classe mais estudada de peptídeos antimicrobianos é, sem sombra de dúvida, os que apresentam atividade antibacteriana (Jenssen *et al.*, 2006).

II. DESENVOLVIMENTO

1. Estrutura celular bacteriana

Todos os seres vivos são constituídos por células, sendo a célula a principal unidade estrutural e funcional de todos eles. Toda a célula viva é classificada como:

- procariota do grego pro (antes) e karyon (núcleo)
- eucariota do grego eu (verdadeiro) e karyon (núcleo)

Organismos procariotas (bactérias) e eucariotas (fungos e protozoários) exibem algumas semelhanças, entre elas a presença de membrana celular e de ribossomas, todavia a organização celular dos organismos eucariotas apresentam uma maior complexidade em comparação com os procariotas (Figura 3) (Navarre, 1999; Sousa *et al.*, 2016).

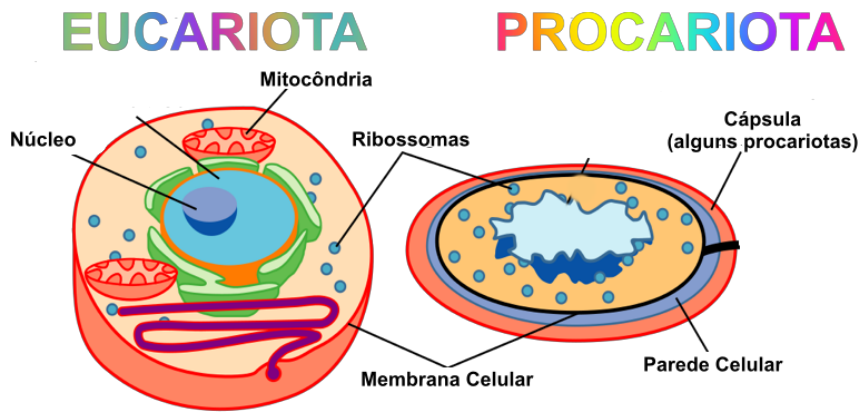


Figura 3: Esquema ilustrativo da estrutura celular de um microorganismo procariota e eucariota adaptado de Pilling *et al.*, 2013.

i. Composição e estrutura da parede celular

A célula bacteriana possui uma estrutura anexa à superfície externa da membrana citoplasmática (MC), a parede celular (PC), com composição e estrutura diferente entre as bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, o que vai influenciar a atividade antibacteriana dos antibióticos.

Na organização da PC, encontra-se o polímero peptidoglicano (PG) ou mucopeptídeo responsável pela rigidez da PC (Navarre, 1999; Sousa *et al.*, 2016). Esta molécula mantém a forma bacteriana e a viabilidade celular em ambientes hipotônicos.

O mucopeptídeo é um polímero dos aminoaçucars N-acetilglucosamina (NAM) e N-acetilmurâmico (NAG), unidas por ligações glicosídicas β -1-4, mediadas por transglicolases (TG) (Figura 4) (Navarre, 1999; Sousa *et al.*, 2016).

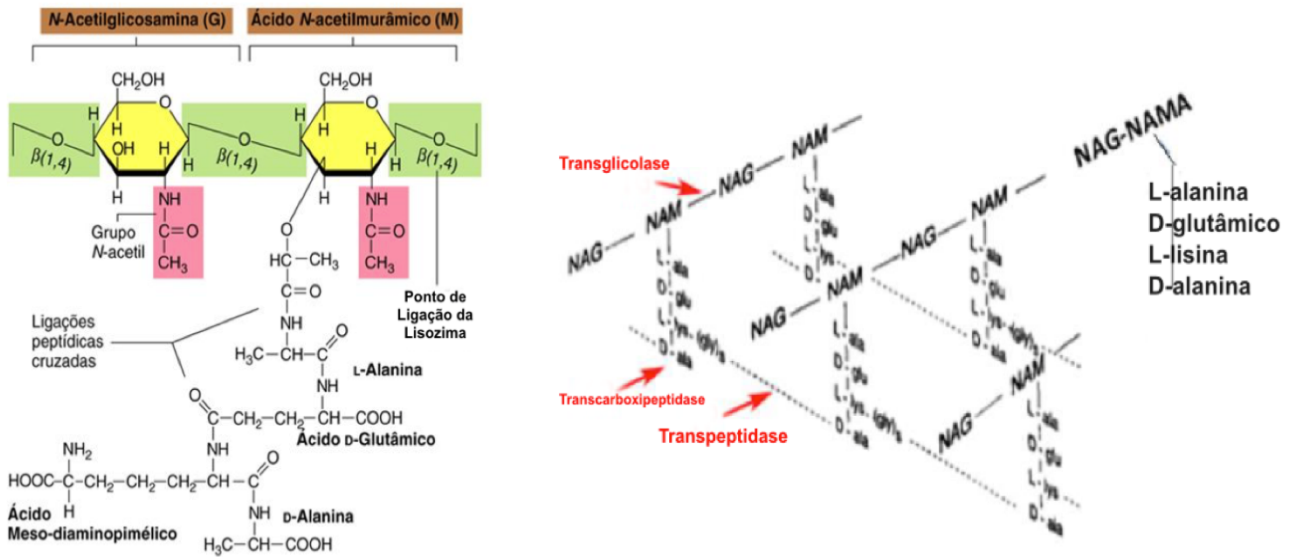


Figura 4: Estrutura química do peptidoglicano (PG) em *S. aureus*. Imagem cedida pelo Doutor João Carlos Sousa.

Parede celular das bactérias Gram-positiva

A PC das bactérias Gram-positivo é constituída quimicamente por PG, ácidos teicóicos e ácidos lipoteicoicos (Figura 5) (Wang *et al.*, 2014).

Morfologicamente apresenta-se como uma camada espessa encostada ao folheto externo da membrana citoplasmática e dada a porosidade da sua estrutura não dificulta a difusão dos antibióticos até à MC (Bechinger e Gorr, 2017).

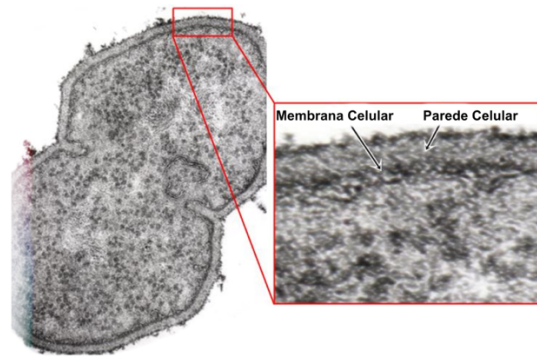


Figura 5: Parede celular de uma bactéria Gram-positivo. Parede celular (PC) e a membrana celular (MC). Fotografia de microscopia eletrônica cedida pelo Doutor João Carlos Sousa.

Na parede celular das bactérias de Gram-positivo existem também os ácidos teicóicos, fortemente associados ao PG. Os ácidos teicóicos são polímeros aniônicos de glicerol-fosfato, ribitol-fosfato ou glicosil-fosfato (Figura 6). Os ácidos lipoteicóicos são polímeros inseridos no folheto externo da MC por meio de uma fração lipídica, cuja função é desconhecida (Navarre, 1999). Os ácidos teicoicos e os lipoteicoicos conferem uma carga eletronegativa à PC devido aos grupos fosfato das suas moléculas (Sousa *et al.*, 2016).

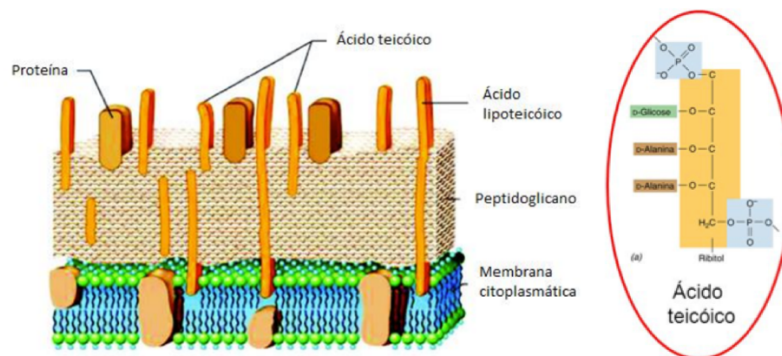


Figura 6: Estrutura química dos ácidos teicóicos (à esquerda) e organização estrutural da PC de *S.aureus* (à direita) Adaptado de Wang *et al.*, 2014.

Parede celular das bactérias Gram-negativa

No caso da PC das bactérias Gram-negativas, verifica-se uma maior complexidade no que toca à sua composição e mais uniformidade quanto ao seu formato estrutural (Figura 7 e 8). Apresentam uma pressão osmótica interna bastante inferior (10 atmosferas) em relação à PC das bactérias Gram-positivas (20 atmosferas) (Sousa *et al.*, 2016).

Apesar das bactérias Gram-negativas possuírem uma camada mais fina de PG, apresentam uma membrana externa adicional (OM, do inglês “*Outer membrane*”) (Joo *et al.*, 2016).

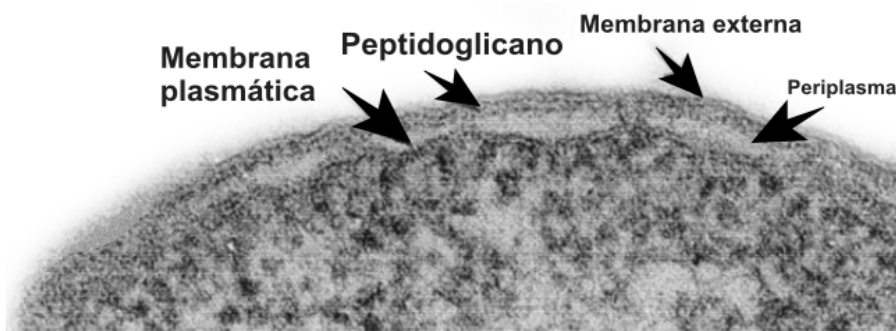


Figura 7: Envelope celular da Parede Gram-negativa onde é visível a camada de peptidoglicano (PG), membrana externa (OM), a membrana plasmática (PM) e o Periplasma. Adaptado de Beveridge, 1999.

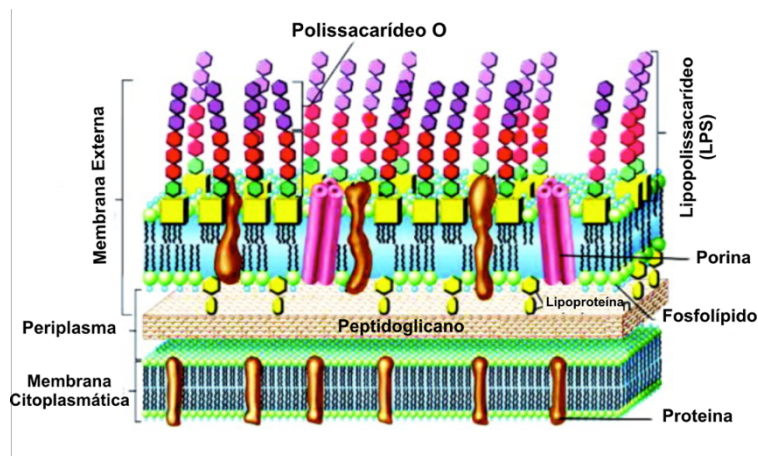


Figura 8: Esquema dos invólucros (PC e membranas) bacterianos de Gram-negativo. Adaptado de Wang *et al.*, 2014.

A OM, tal como outras membranas biológicas funciona como barreira à permeabilidade, dificultando a difusão de moléculas. É considerada a membrana mais externa da parede das bactérias Gram-negativo, a OM exibe no folheto interno fosfolípidos e no folheto externo o lipídeo A dos lipopolissacarídeos (LPS), tendo portanto uma constituição assimétrica (Figura 8) (Beveridge, 1999; Band e Weiss, 2014; Sousa *et al.*, 2016). O LPS localiza-se unicamente no folheto externo da OM, constituído por três regiões: polissacarídeo O, núcleo polissacarídeo e o lipídeo A (Figura 9).

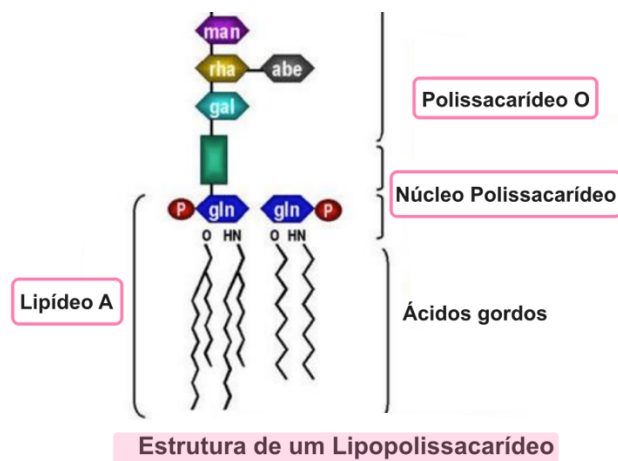


Figura 9: Estrutura de um Lipopolissacarídeo. Adaptado de Microbiology Book, 2020.

O lipídeo A é constituído por subunidades dissacarídicas de D-glucosamina interligadas (Sousa *et al.*, 2016; Bechinger e Gorr, 2017).

A carga negativa do lipídeo A deve-se à presença dos grupos fosfato, sendo esta estrutura estabilizada pelos iões (Ca^{2+} e Mg^{2+}). Na presença de peptídeos catiónicos ocorre uma deslocação dos iões Ca^{2+} ou Mg^{2+} e instabiliza a OM, o que facilita o acesso dos aminopetideos catiónicos (CAMPs) e outros antibióticos catiónicos à MC bacteriana (Bechinger e Gorr, 2017; Zasloff, 2019).

ii. Membrana Citoplasmática

A MC é uma estrutura lípido-proteica que separa o citoplasma e o meio ambiental, dotada de permeabilidade seletiva. A microscopia eletrónica revelou que esta estrutura tem uma

configuração trilaminar, apresentando dois folhetos eletrodensos, separados por uma camada transparente (Figura 10). Esta membrana é maioritariamente constituída por fosfolípidos e proteínas. Diversos antibióticos, como Daptomicina (lipopeptídeos), causam despolarização membranar e conduzem à morte celular exercendo uma atividade bactericida (Sousa *et al.*, 2016).

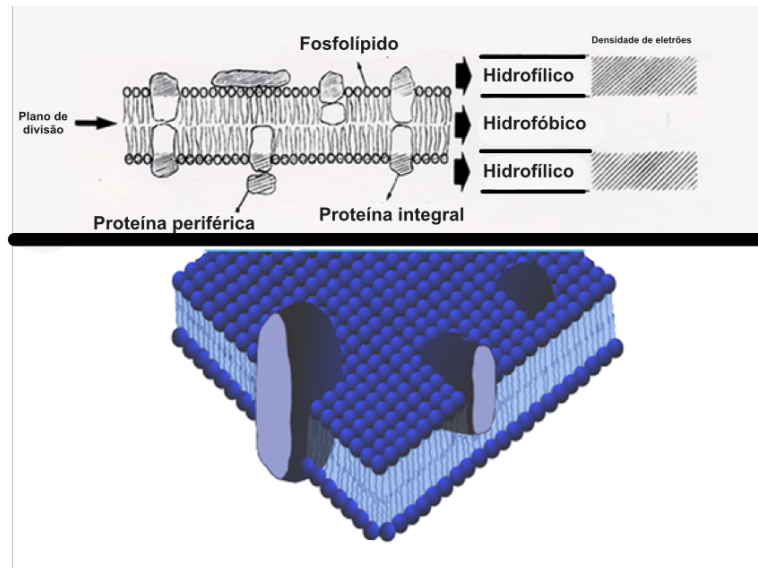


Figura 10: Organização da membrana citoplasmática (modelo de Singer e Nicholson).

O folheto exterior da MC é predominantemente constituída por fosfolípidos aniônicos (fosfatidiglicerol e cardiolopina) (Figura 11) o que lhe confere carga elétrica negativa à superfície da membrana o que vai permitir a interação dos antibióticos catiónicos, afetando a estabilidade da MC, causando a morte celular (Wang *et al.*, 2014).

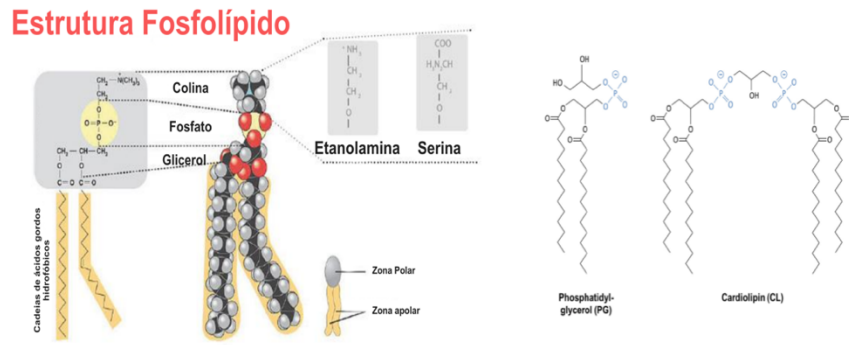


Figura 11: Estrutura química dos fosfolípidos. Adaptado de Ernst e Peshel, 2011.

2. Sobre os peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos são uma classe única de compostos, molecularmente posicionados entre pequenas moléculas e proteínas, embora a sua bioquímica e a sua terapêutica sejam distintos entre ambos (Lau e Dunn, 2018).

Pertencem a um grupo variado de moléculas que são produzidas por todas as formas de vida, desde procariontes a humanos numa vasta diversidade de organismos (Cardoso *et al.*, 2020).

Há uma variedade de AMPs sintéticos que são desenvolvidos em laboratório e também há uma grande diversidade de AMPs que são produzidos por bactérias e leveduras, além daqueles encontrados naturalmente em animais e plantas (León-Buitimea *et al.*, 2020).

Desde 1885, fluídos como o sangue, suor, saliva, plasma, secreções de leucócitos e extratos de grânulos são valorizados pelas suas propriedades antimicrobianas (Kumar *et al.*, 2018).

São um conjunto único e variado de moléculas carregadas positivamente que possuem uma região hidrófila e outra hidrófoba, são constituídos por aminoácidos que apresentam comprimentos diferentes e que são produzidos por organismos vivos (Peters *et al.*, 2010).

A sua ampla distribuição por todos os Reinos sugere que estes peptídeos apresentem uma evolução bem sucedida e que apesar da sua linhagem antiga subsistem como armas defensivas

eficazes, sendo designados de “armas antigas” revolucionárias devido a todo o potencial e propriedades que apresentam (Zasloff, 2019).

Em 1922, foi identificada por Alexander Fleming a primeira proteína antimicrobiana, a lisozima, presente no muco nasal. Contudo esta descoberta foi ofuscada aquando da descoberta na década de 1940 da penicilina, pela qual recebeu uma parte do Prémio Nobel de Medicina em 1945. Assim, houve uma perda de interesse em todo o potencial terapêutico dos AMPs naturais na altura (Zhang e Gallo, 2016).

Foi durante os anos 90 que surgiram novas importantes classes de AMPs em humanos, as β -defensinas e as Catelicidinas. Após a descoberta de peptídios bactericidas catiónicos em leucócitos polimorfos nucleares retornou o interesse e a pesquisa na variedade de AMPs humanos. E posteriormente, as suas possíveis aplicações em terapia antimicrobiana. (Andersson *et al.*, 2016).

Apresentam também uma função de sinalização, ou seja, conseguem conferir proteção através de quimiocinas, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e modulam a resposta imune podendo ativar componentes do sistema imunológico adquirido humano, como as células T e as células dendríticas. Desempenham assim, um papel fulcral na imunidade humana (Joo *et al.*, 2016; Chung e Khanum, 2017; Pizzolato-Cezar *et al.*, 2019).

A identificação de peptídeos antivirais tem vindo a ganhar cada vez mais força, alguns AMPs como a catelicidina humana LL-37 são conhecidos pelos seus efeitos antivirais. Conseguem inibir a replicação do vírus orpox, e é potente contra *Influenza A*, uma vez que rompe diretamente as membranas virais. Mostrou também eficácia na inibição da replicação do HIV-1 em células mononucleares do sangue periférico, através da ligação à transcriptase reversa (Wang *et al.*, 2014).

Devido a todo o potencial apresentado pelos AMPs e principalmente devido ao seu amplo espectro antimicrobiano dispõem destes como limitadores de doenças sexualmente transmissíveis (DST) incluindo: *Neisseria*, *Chlamydia*, HIV e *Herpes simplex vírus* (HSV). Os AMPs exibem forte atividade antiviral por integração no envelope viral ou membrana da célula hospedeira. Ligam-se a frações de sulfato de heparano na superfície celular e previnem infeções com vírus envelopados distintos, incluindo o HSV 1 e 2 (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

Relativamente à atividade antifúngica, os antifúngicos baseiam-se principalmente em dois modos distintos de ação: os peptídeos atravessam a membrana e levam à formação de poros ou têm alvos fúngicos específicos, como a síntese de quitina e β -glucano. (Pfalzgraff *et al.*, 2018). A combinação de um lipopeptídeo com Anfotericina B antifúngica conduz a exímias propriedades antibiofilme e de cicatrização de feridas contra *Candida albicans* (Marr *et al.*, 2006).

A maioria dos AMPs são CAMPs e são extremamente importantes na defesa imunológica, pois contribuem para a eliminação de infecções e inibem a colonização por agentes patogênicos. (Band e Weiss, 2014).

A carga destes peptídeos deve-se ao excesso de aminoácidos básicos tais como, lisina e arginina que possuem carga positiva (Baltzer e Brown, 2011).

Estes peptídeos possuem uma distribuição de aminoácidos básicos e resíduos hidrofóbicos, e alinham-se em três dimensões nas faces opostas. Foram assim, estruturas únicas solúveis em água, carregadas positivamente e hidrofóbicas. (Zhang e Gallo, 2016).

Na generalidade, os CAMPs são demasiado grandes para usar canais de purina, o mecanismo que é utilizado por estes para conseguir atravessar a membrana ainda não é totalmente conhecido. Ainda assim, a carga superficial e a permeabilidade que apresenta na OM apontam para uma possibilidade de que um peptídeo específico atinja o local alvo (Peschel, 2002).

Estas características permitem que os CAMPs consigam interagir com membranas bacterianas que contêm grupos aniônicos e cadeias de ácidos hidrofóbicos (Band e Weiss, 2014).

3. Classificação dos peptídeos antimicrobianos

Os AMPs são uma classe distinta e diversa de moléculas, que possui mais de 2.800 sequências de peptídeos relatadas até ao momento. São caracterizados de formas diferentes com base na sua estrutura, sequência ou mecanismo de ação (Kumar *et al.*, 2018).

São caracteristicamente curtos, entre 12 a 100 aminoácidos com carga positiva e anfífilos, ou seja, apresentam na sua estrutura uma parte hidrofílica (solúvel em água) e outra parte lipofílica (solúvel em lípidos) (Jenssen *et al.*, 2006).

Devido á presença de aminoácidos de arginina e lisina (e ás vezes histidina) os peptídeos possuem uma natureza catiónica, esses aminoácidos em pH neutro são carregados positivamente (Hancock, 1997).

A hidrofobicidade é uma característica fundamental na formação da forma estrutural dos AMPs e é definida pela percentagem de resíduos hidrofóbicos, como valina, leucina, isoleucina, alanina, metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano na sequência do peptídeo (Kumar *et al.*, 2018).

A cationicidade e a hidrofobicidade são os elementos críticos para estabelecer a estrutura anfipática, que propicia que os AMPs catiónicos tenham como alvo membranas bacterianas aniónicas, rico em fosfatidilgliceróis. (Marr *et al.*, 2006).

Em todas as classes o principio estrutural primordial é a capacidade que a molécula apresenta em adotar uma forma em que os aminoácidos são espacialmente organizados em setores da molécula (Zasloff, 2019).

Podem ser classificados em quatro classes principais: α -Helicoidal, β -Sheet, Loop e Estendido, sendo as duas primeiras classes as mais comuns (Figura 12)(Peters *et al.*, 2010; Chung e Khanum, 2017).

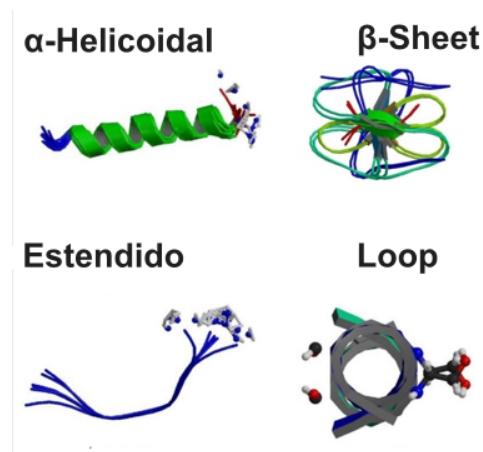


Figura 12: Esquema ilustrativo de Modelos de proteínas representando as diferenças estruturais das quatro classes de peptídeos antimicrobianos. Adaptado de Peter *et al.*, 2010.

Os peptídeos β -sheet, são estabilizados por duas a quatro pontes de dissulfureto, como é o caso das α - e β - defensinas humanas (Chung e Khanum, 2017) . A maioria dos AMPs em humanos pertencem à família β -defensina que são produzidos por queratinócitos na pele. O único membro da família Catelicidina (do inglês, cathelicidin) produzido em humanos é o peptídeo LL-37 (Joo *et al.*, 2016) um peptídeo α -helicoidal anfipático que interage com as bicamadas lipídicas, de modo a que a hélice anfipática fique orientada paralelamente à superfície da bicamada (Andersson *et al.*, 2016; Chessa *et al.*, 2020).

Os humanos também produzem um AMP aniônico, a dermicidina que tem demonstrado funcionar pela formação de poros nas membranas alvo (Joo *et al.*, 2016).

As defensinas são um grupo rico em cisteína de extremidade aberta que estão vastamente distribuídos na natureza e encontrados tanto em vertebrados como invertebrados. Com base no tamanho e padrão de ligação dissulfeto podem ser classificadas em α -, β - e θ -defensinas (Chung e Khanum, 2017). No caso do ser humano, as defensinas são divididas em α -defensinas designadas de peptídeos de neutrófilos humanos, e em β -defensinas manifestadas em células mieloides e epiteliais (Chessa *et al.*, 2020).

A classe estendido (do inglês, extended) contém AMPs sem filamentos helicoidais e sem filamentos β , como o exemplo da Indolicidina (Andersson *et al.*, 2016).

4. Atividade antibacteriana

i. Mecanismo de ação dos Peptídeos antimicrobianos

Para entender o mecanismo de ação dos AMPs é necessário o conhecimento sobre a estrutura e as propriedades físicas da membrana bacteriana. (Raheem e Straus, 2019).

Mesmo existindo uma vasta diversidade de AMPs, a maior parte atua diretamente através do envolvimento na membrana levando ao rompimento da mesma, e pela formação de poros permitindo assim o efluxo de íons e nutrientes (Peters *et al.*, 2010).

A principal atividade é a interação com a MC, através de atividades como permeabilização e lise celular, ao invés dos antibióticos que normalmente atuam por inibição da síntese da PC ou de Ácido desoxirribonucleico (DNA), Ácido Ribonucleico (ARN) e proteínas, danificando o

potencial transmembranar que por consequência resulta em morte celular (Chung e Khanum, 2017).

Contudo, têm surgido evidências de outros mecanismos de ação, que podem ser divididos em duas classes principais: a morte direta e modulação imunológica. O mecanismo de ação através de morte direta subdivide-se em dois mecanismos: Mecanismo de ação de permeabilização de membrana e Mecanismo de ação de alvo não membrana (Figura13) (Kumar *et al.*, 2018).

A natureza anfifílica e catiónica dos AMPs estão associados à sua atividade em que a carga positiva leva à acumulação nas superfícies das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Chung e Khanum, 2017).

Para além da permeabilização de membranas, os AMPs podem atuar por neutralização ou desagregação do LPS (Chung e Khanum, 2017).

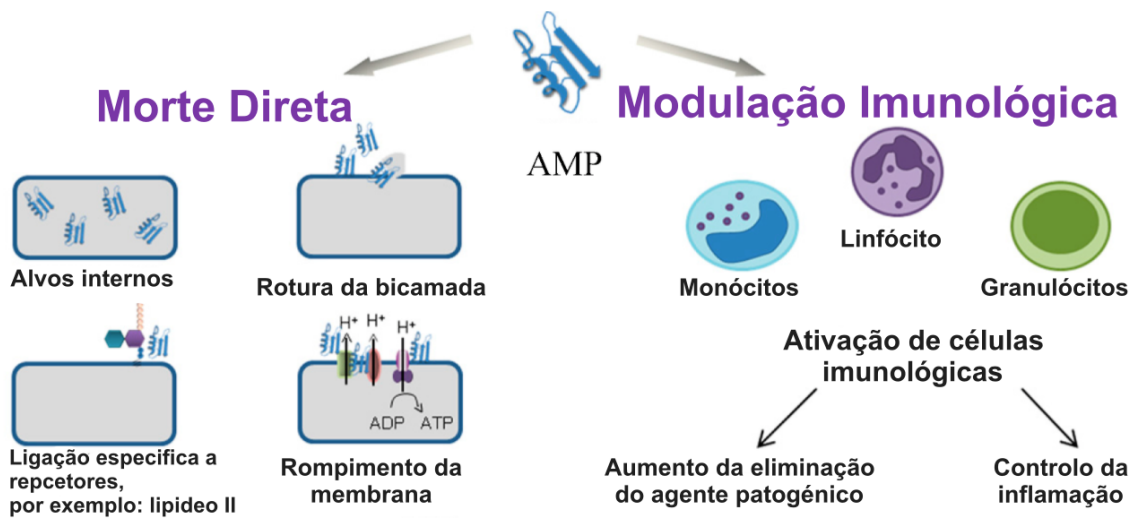


Figura 13: Vários mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. MN: neutrófilos polimorfonucleares; ADP: difosfato de adenosídeo; ATP: trifosfato de adenosídeo. Adaptado de Kumar *et al.*, 2018.

Morte Direta:

Mecanismo de Ação de Permeabilização de Membrana

Em geral, a capacidade que os AMPs apresentam para eliminar bactérias sucede da interação com as membranas bacterianas ou as PCs. Características como a carga líquida (sendo que para a grande maioria é positiva), a sua predisposição a ser anfipática e a alta extensão de aminoácidos hidrofóbicos, permitem que haja uma ligação seletiva a bactérias carregadas negativamente (Zhang e Gallo, 2016).

O primeiro procedimento é a ligação electrostática entre o peptídeo e a célula alvo de forma a viabilizar a interação dos AMPs com componentes carregados negativamente do envelope bacteriano externo, como grupos fosfato nos LPSs e ácidos teicóicos nas superfícies de bactérias Gram-negativas, ou ácidos lipoteicóicos presentes na superfície das bactérias gram-positivas (Andersson *et al.*, 2016; Jenssen *et al.*, 2006).

Nas bactérias Gram-negativas ocorre um processo cognominado de captação autopromovida (do inglês “self-promoted”). Um processo que através da inserção de peptídeos na estrutura OM provoca uma perturbação (Jenssen *et al.*, 2006). A OM de *P.aeruginosa* é permeabilizada através de polimixinas e aminoglicosídeos que competem na OM com os iões Mg^{2+} ao nível dos LPSs (Sousa *et al.*, 2016).

Após a inserção dos peptídeos na membrana, alteram a integridade física da bicamada via afinamento da membrana, porção transitória ou interrupção da função da barreira; ou então agir sobre metas internas.

Modelos responsáveis pela desintegração da membrana

Após as interações eletrostáticas e hidrofóbicas iniciais, os AMPs acumulam-se na membrana bacteriana, nesta fase são vários os modelos usados para descrever a ação dos AMPs. Podemos classificar os modelos em duas categorias:

- Modelos de poros transmembranares- barril pauta e poro toroidal;
- Modelos não porosos- tapete e agregado;

Estes modelos propõem a relação do peptídeo com a membrana, levando ao deslocamento de lípidos, alteração da estrutura da membrana e em alguns casos a entrada do peptídeo para o interior da célula (Zasloff, 2019)

Em relação ao modo de ação entre os AMPs, os que tem vindo a ser mais estudados são os α -helicoidais e são vários os modelos que explicam a sua atividade na membrana. (Sahl *et al.*, 2005)

A natureza anfipática dos AMPs é a característica primordial para todo o processo, as regiões hidrofóbicas interagem com os componentes lipídicos da membrana enquanto que as regiões hidrofílicas interagem com os principais grupos de fosfolípidos (Jenssen *et al.*, 2006). Ou seja, a natureza exata da membrana leva à formação de poros ou canais, assim, a entrada na bicamada dos peptídeos é proveniente de um alongamento e a curvatura do folheto externo dependendo também do excesso de fosfolípidos específicos na superfície para assim conseguirem afetar a concentração de peptídeo precisa para a formação de poros ou canais (Sahl *et al.*, 2005). A morte celular ocorre devido ao vazamento de metabolitos, lise celular ou dissipação de gradientes de iões eletroquímicos da membrana celular bacteriana (Pfalzgraff *et al.*, 2018)

Os poros da membrana resultam na perda do potencial da membrana e na liberação rápida de componentes intracelulares e morte (Li *et al.*, 2017).

Para a formação de poros induzida por peptídeos de rutura da membrana, diferentes modelos são sugeridos (Figura 14).

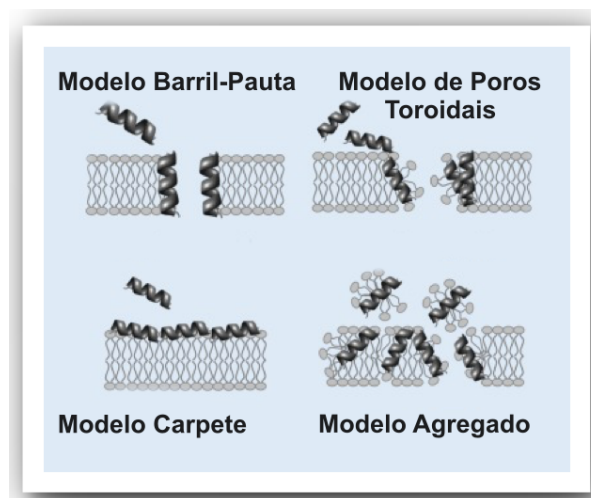


Figura 14: Esquema ilustrativo dos Modelos responsáveis pela desintegração da membrana. Adaptado de Raheem e Straus, 2019.

Modelo Barril-Pauta

Os AMPs neste modelo são inicialmente orientados paralelamente à membrana, mas eventualmente inserem-se perpendicularmente ao plano da bicamada impulsionada pela combinação hidrofóbica (Kumar, Kizhakkedathu e Straus, 2018). A hidratação da membrana permanece inalterada (Li *et al.*, 2017).

A estrutura anfipática do peptídeo é primordial na formação de poros, as regiões hidrofóbicas interagem com os lipídios da membrana e os resíduos hidrofílicos formam o lúmen dos canais (Jenssen *et al.*, 2006; Chung e Khanum, 2017).

Modelo de poros toroidais

Os peptídeos interagem com a membrana, as hélices são orientadas paralelamente à superfície, os resíduos hidrofóbicos deslocam a cabeça polar e criam uma tensão de curvatura positiva na membrana, com isto torna a membrana vulnerável às interações futuras (Yeaman e Yount, 2003).

A interação dos lipídios com a carga negativa e os peptídeos com carga positiva afetam a curvatura local da membrana que forma um buraco toroidal. Os AMPs inserem-se na membrana e induzem a curvatura local da bicamada lipídica através dos poros, de maneira a que o núcleo da água seja revestido pelos peptídeos inseridos e pelos lipídeos (Wimley e Hristova, 2011; Chung e Khanum, 2017). Como resultado os poros também são acompanhados por uma melhor hidratação da membrana, conforme a penetração de água (Li *et al.*, 2017).

Modelo Carpete

Os peptídeos são adsorvidos paralelamente à superfície e acumulam-se na mesma. Quando atinge uma concentração limite para cobrir a membrana, forma um “tapete” e conseqüentemente a integridade da membrana é perdida - ocorre a permeabilização. Este modelo não requer que o peptídeo se insira no núcleo hidrofóbico para formar canais transmembrana ou estruturas específicas de peptídeo (Wimley e Hristova, 2011; Kumar *et al.*, 2018).

No modelo carpete o folheto externo é coberto por uma alta concentração superficial de moléculas de AMP enquanto que o folheto interno está livre de ligação de AMP. O grande

desequilíbrio entre a carga e tensão superficial leva ao colapso catastrófico da integridade da membrana (Li *et al.*, 2017).

Modelo Agregado

Este modelo clarifica a desintegração da membrana com elevadas concentrações de AMPs e é frequentemente citado para explicar o colapso catastrófico da integridade da membrana (Wimley e Hristova, 2011). É proposto que os peptídeos se reorientem para abranger a membrana como um agregado com complexos semelhantes a micelas, mas sem adotar nenhuma orientação (Jenssen *et al.*, 2006).

ii. Mecanismo de Ação de Alvo Não-Membrana

Pode-se dividir o mecanismo de alvo não membrana em dois grupos: os que têm como alvo a parede celular bacteriana e aqueles que têm alvos intracelulares. Os AMPs interagem frequentemente com várias moléculas precursoras que são essenciais para a síntese da parede celular, o alvo principal é o lipídeo II. No caso das defensinas ligam-se ao pirofosfato carregada negativamente da molécula de lipídeo II (Figura 15) (Kumar *et al.*, 2018).

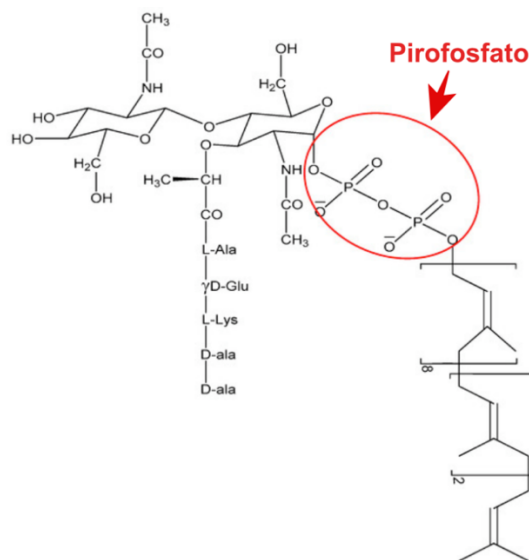


Figura 15: Estrutura de lipídeo II com pirofosfato circulado em vermelho. Adaptado de Kumar *et al.*, 2018.

Modulação Imunológica

Os AMPs são produzidos por muitas células do sistema imunológico como os neutrófilos e macrófagos, as primeiras células que encontram agentes “estranhos” no nosso organismo. Curiosamente, alguns AMPs têm a capacidade de induzir uma variedade de respostas imunes: ativação, atração e diferenciação de células brancas do sangue.(León-Buitimea *et al.*, 2020).

Uma das principais vantagens dos AMPs em relação aos antibióticos é o facto de alguns desses peptídeos apresentarem uma capacidade de modularem as respostas imunes e também atenuar os efeitos inflamatórios pela redução da expressão de quimiocinas pró-inflamatórias (Marr *et al.*, 2006; Zhang e Gallo, 2016).

Apesar de a grande parte de AMPs exibir interação com o sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos, há evidências de que também estão envolvidos na modulação do sistema imune adaptativo, ou seja, as células T e B (Kumar *et al.*, 2018).

Os peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs) são reconhecidos como componentes vitais dos processos imunes inatos, os mais abundantes e melhor caracterizados são classificados como catelicidinas e defensinas (Alford *et al.*, 2020).

As catelicidinas e as defensinas têm a capacidade de eliminar uma vasta variedade de bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas *in vitro*, são os AMPs inatos mais relevantes nos seres humanos que são sobretudo produzidas pelas células do sistema imunológico (Andersson *et al.*, 2016) (Peters *et al.*, 2010).

Os AMPs humanos (LL-37 e β defensinas), possuem a capacidade de atrair células imunes, como os mastócitos, leucócitos e células detriticas (Kumar *et al.*, 2018).

A catelicidina LL-37, não tem apenas ação antimicrobiana apresenta também outras funções como quimiotaxia, apoptose, cicatrização de feridas, modulação imunológica e metástase de cancro (Figura 16) (Marr *et al.*, 2006).

Propriedades Imunomoduladoras

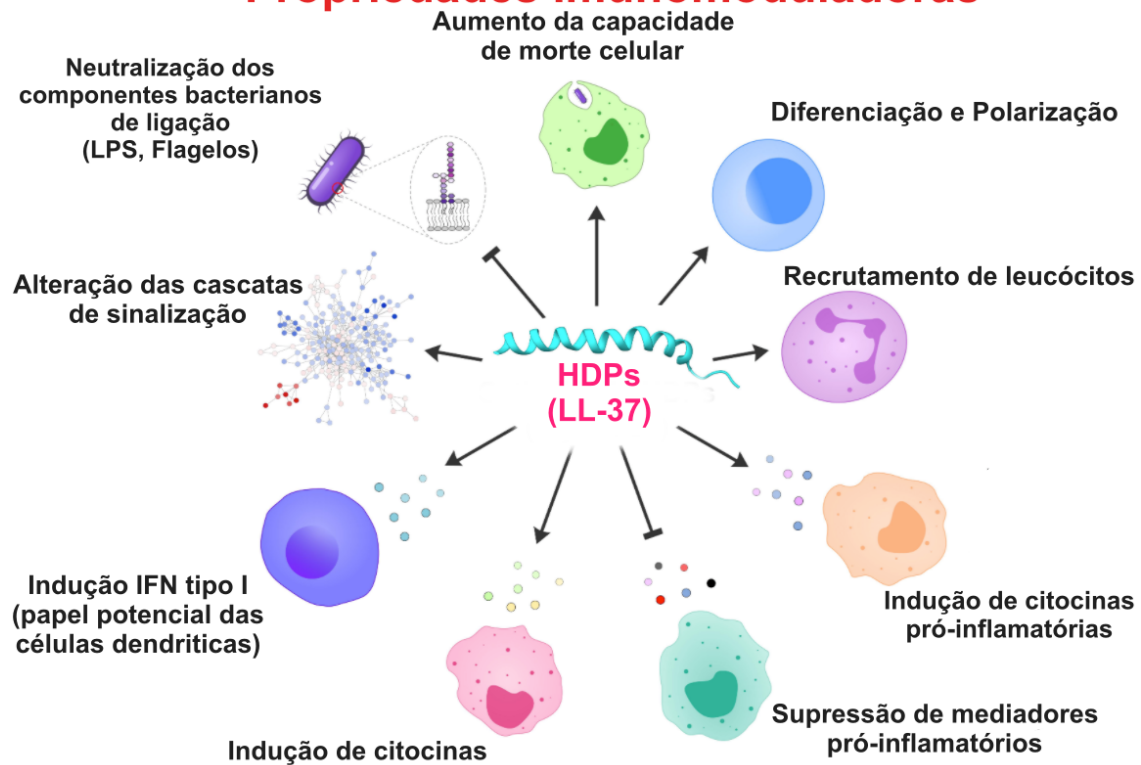


Figura 16: Características imunomoduladoras das catelicidinas. Adaptado de Alford *et al.*, 2020.

Embora a primeira catelicidina tenha sido identificada em 1988, há uma prática terapêutica que já existia à mais de 100 anos no tratamento da tuberculose. Niels Finsen ganhou o Prêmio Nobel em 1903 pelo uso da fototerapia, a luz induzia a síntese da forma didroxilada da vitamina D, que se liga ao recetor para induzir a expressão do gene da catelicidina humana. O peptídeo antimicrobiano pode ter sido o responsável pela morte do patógeno: *Mycobacterium tuberculosis* (Wang *et al.*, 2014).

Em 2018, De Breij *et al.* sintetizou um derivado LL-37 (SAAP-148) com potente atividade antimicrobiana, através da substituição de um aminoácido do carbono terminal da cadeia LL-37 e exigiu uma concentração inibitória mínima contra várias bactérias MDR sem seleção de resistência (León-Buitimea *et al.*, 2020).

A capacidade do LL-37 suprimir a sinalização pró-inflamatória é uma característica que envolve uma série complexa de mecanismos diretos e indiretos. As catelicidinas ligam-se e neutralizam o LPS ou o ácido lipoteicóico, que de outra forma desencadeariam processos inflamatórios associados à ativação em cascata de células imunes. Possuem a capacidade de alterar a resposta imune do hospedeiro antes, durante e após infecção. Influencia diretamente os

linfócitos e ao mesmo tempo consegue modificar o perfil de quimiocinas associado às células T e B, afetando as respostas imunes inatas que preparam e ativam os linfócitos, as catelicidinas ligam os sistemas imunes inato e adaptativo (Alford *et al.*, 2020).

5. Resistência Bacteriana aos AMPs

Como consequência da pressão seletiva ao uso dos antibióticos a resistência bacteriana sucede de forma natural. Contudo, tem surgido a uma velocidade superior ao suposto e são muitos os fatores que desencadearam este problema, nomeadamente, o uso inadequado e excedente de antibióticos, o uso de antibióticos potentes com um amplo espectro de ação e o uso de antibióticos adicionados na indústria pecuária e alimentar. Como resultado desta utilização inadequada, surgiram bactérias multirresistentes que provocam infeções que se tornam intratáveis (Baltzer e Brown, 2011; Loureiro *et al.*, 2016; Hutchings *et al.*, 2019).

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem causar doenças graves e o aparecimento de resistência antimicrobiana torna-se um problema (Zhou e Peng, 2013). Sendo este um dos mais sérios para os sistemas de saúde, é de principal importância um conhecimento aprofundado sobre os mecanismos de resistência aos AMPs (Joo *et al.*, 2016).

Para entender como os AMP funcionam é necessário entender os locais específicos de expressão e a regulamentação estrita da expressão. Isto pode explicar a razão pelo qual os antibióticos convencionais podem rapidamente tornar-se inúteis no desenvolvimento da resistência bacteriana enquanto que os AMPs mantêm-se como antibióticos eficazes devido às mudanças na estrutura da membrana que asseguram essa resistência à célula microbiana. (Peters *et al.*, 2010; Zhang e Gallo, 2016).

Foi citado como improvável o desenvolvimento de resistência completa a peptídeos catiónicos, visto que estes têm uma interação obrigatória com a membrana citoplasmática da membrana e a consequente necessidade de reconfigurar essa membrana. Alguns mecanismos de resistência foram retratados, mas estes apenas resultam de um aumento de duas a quatro vezes na resistência, por exemplo, são necessárias 30 passagens de *Pseudomonas aeruginosa* para aumentar a sua resistência entre duas a quatro vezes mais (Marr *et al.*, 2006).

Independentemente de que o surgimento de resistência microbiana contra AMPs seja raro, alguns agentes patogênicos revelaram medrar contramedidas para rondar o direcionamento de peptídeos antimicrobianos e evitar as defesas imunológicas do hospedeiro (Peters *et al.*, 2010).

O termo ESKAPE é um acrônimo para seis agentes patogênicos associados à resistência: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Bactérias multirresistentes (MDR) são resistentes a mais que um medicamento antimicrobiano, XDR são tipo de organismos resistentes a medicamentos que são resistentes a todos ou quase todos os agentes antimicrobianos aprovados (León-Buitimea *et al.*, 2020).

Algumas espécies bacterianas incluindo *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia* e *Burkholderia* apresentam resistência passiva aos AMPs em consequência de uma membrana externa que não possui a densidade apropriada para fornecer os locais de ligação aos peptídeos e um lipídio A mais carregado positivamente que interfere e reduz a interação com o AMP (Andersson *et al.*, 2016; Zasloff, 2019). A adição de Lisina de carga positiva, vai diminuir a carga negativa da superfície e por consequência diminuir a interação.

Várias estratégias podem resultar na diminuição da suscetibilidade de bactérias aos AMPs, como secreção de proteínas inativadoras ou exportação por bombas de efluxo (Peters *et al.*, 2010).

No entanto, a estratégia mais utilizada tanto por Gram-positivos como Gram-negativos consiste em reduzir a carga negativa da superfície, ou seja, reduzem a acumulação de AMPs no envelope celular e evitam a morte direta (Sahl *et al.*, 2005). Algumas bactérias Gram-negativas desenvolveram-se para usar várias enzimas celulares para modificar bioquimicamente e reduzir a carga líquida negativa das suas membranas celulares. Assim, forças repulsivas estáticas antagonizam a inserção de AMPs carregados positivamente na membrana bacteriana, pelo que esta aparenta ser a estratégia mais eficaz (Peters *et al.*, 2010).

Estratégias como mecanismos de reparo da membrana, o papel da fluidez/rigidez da membrana e o envolvimento dos componentes do hospedeiro esperam uma investigação mais aprofundada (Joo *et al.*, 2016).

i. Mecanismos de resistência bacteriana aos AMPs

Segundo (Joo *et al.*, 2016) como mecanismos de resistência a AMPs incluem:

- 1- Degradação ou sequestro proteolítico por proteínas secretadas;
- 2- Impedância por exo polímeros e moléculas da matriz de biofilme;
- 3- Contenção da atração por alteração da superfície/membrana celular;
- 4- Exportação por bombas de efluxo;

Degradação ou sequestro proteolítico por proteínas secretadas;

As bactérias comensais das superfícies epiteliais produzem várias proteases ocorrendo inativação dos AMPs dependendo também da estrutura do peptídeo (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

Um dos primeiros mecanismos de defesa bacteriana é precisamente a secreção de proteínas, como as proteases quando interagem com as bactérias, uma maneira simples no entanto eficaz de fornecer a resistência (Joo *et al.*, 2016).

O gene *mprF* que codifica a proteína faz a adição de lisina ao fosfolípido fosfatidilglicerol e faz a sua translocação para o folheto exterior conferindo resistência (Figura 17).

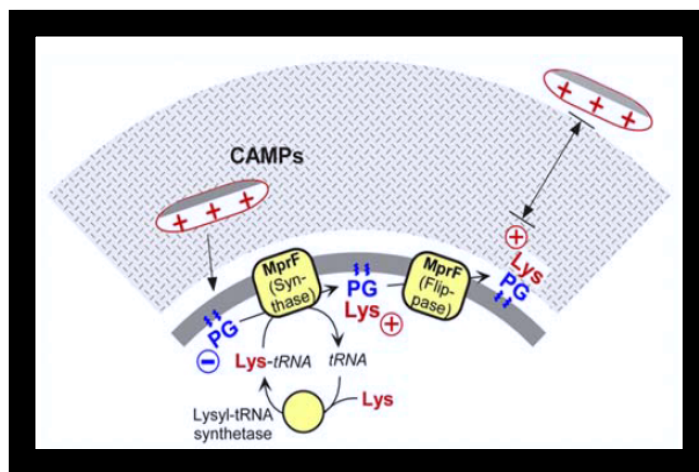


Figura 17: Mecanismo de resistência aos antimicrobianos. Imagem adaptada de Ernst e Peshel, 2011.

Biofilmes

O biofilme constitui uma barreira de permeabilidade para antibióticos e são agrupamentos de microrganismos nas superfícies cercados por uma substância polimérica extracelular (EPS) constituída por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular, água e lipídeos (Raheem e Straus, 2019).

Um biofilme é designado de uma comunidade microbiana em que as células estabelecem ligações a células do hospedeiro onde ocorrem formações de matrizes de composição polissacarídea, proteínas e DNA extracelular (Sousa *et al.*, 2016) A formação de biofilme é um dos principais problemas em infecções bacterianas, aumentando substancialmente a resistência bacteriana a antibióticos e defesa inata do hospedeiro (Ernst e Peschel, 2011; Chung e Khanum, 2017).

São particularmente difíceis de erradicar devido à sua resistência a stresses exógenos, como terapia com antibióticos convencionais e mecanismos de defesa do hospedeiro (Pfalzgraff *et al.*, 2018). As bactérias planctônicas em condições de stress, uso de antibióticos, fome e outros respondem de forma rigorosa mediadas pela síntese do nucleótido sinalizador (p) ppGpp, um mecanismo presente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que posteriormente levam à formação de biofilme (Raheem e Straus, 2019).

Na procura por combater infecções provocadas por biofilmes, os peptídeos antimicrobianos foram apontados como potenciais alternativas aos antibióticos convencionais (Chung e Khanum, 2017).

Contenção da atração por alteração da superfície/membrana celular

A alteração da composição do fosfolípido bacteriano, como aminoacilação de grupos de cabeça de fosfatidilglicerol, que dissimula os fosfatos aniônicos com aminas primárias catiónicas diminui a atração de AMPs e a inserção na membrana (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

Bombas de efluxo

Os AMP atuam de forma intracelular e são passíveis a efluxo ativo, semelhante ao que acontece na resistências aos antibióticos tradicionais (Bechinger e Gorr, 2017).

As bombas de efluxo são constituídas maioritariamente de proteínas que estão ligadas às membranas e movem os compostos tóxicos para fora das células, no caso das bombas de efluxo bacteriano requerem diretamente ATP ou usam um gradiente de potencial eletroquímico existente (Band e Weiss, 2014).

As bactérias conseguem remover os AMPs mesmo quando estes já se encontram inseridos na membrana citoplasmática usando as bombas de efluxo, presentes em muitas bactérias Gram-negativas (Joo *et al.*, 2016). Além disso, as bombas de efluxo contribuem para a defesa contra antimicrobianos do hospedeiro através da colonização e persistência, por exemplo os CAMPs (Band e Weiss, 2014).

6. Antibióticos e AMPs

Os antibióticos introduzidos passam sempre por três questões fundamentais: a sua estabilidade, a sua toxicidade e a sua formulação. A sua eficácia deve ser clinicamente comprovada e testada (Hancock e Falla, 1996). Os antibióticos salvaram milhões de vidas e aumentaram a esperança média de vida, são compostos citotóxicos/citostáticos que trouxeram qualidade de vida à nossa humanidade, no entanto a resistência a estes tem vindo a ser motivo de preocupação (Pizzolato-Cezar *et al.*, 2019).

Nestes últimos 40 anos, apareceram unicamente três novas classes de antibióticos, Lipopeptídeos, Oxazolidinonas e Espetreptograminas tudo direcionado para infeções bacterianas Gram-positivas. (Marr *et al.*, 2006; Chung e Khanum, 2017).

Uma das principais vantagens dos AMPs em relação aos antibióticos convencionais é o facto de alguns desses peptídeos apresentarem uma capacidade de modularem as respostas imunes (Zhang e Gallo, 2016). Os antibióticos à base de peptídeos incluem (Andersson *et al.*, 2016):

- Beta-lactâmicos: Penicilina;
- Peptídeos cíclicos: Polimixinas e Bacitracina;
- Glicopeptídeos: Vancomicina;
- Lipopeptídeos: Daptomicina (uma das mais novas classes de antibióticos).

Apesar de que os AMPs não sejam considerados tão potentes como os antibióticos clássicos, apresentam vantagens comparativamente a eles, como por exemplo, a sua atividade contra espécies bacterianas resistentes aos antibióticos, (exemplo: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Os AMP mesmo após várias passagens contendo o peptídeo a uma concentração de metade das concentrações mínimas inibitórias (CIM) não apresentam resistência, em comparação com os antibióticos convencionais. A morte pelos peptídios também é extremamente rápida com mais de 99,9% das bactérias mortas em 20 minutos e pode envolver múltiplos alvos celulares bacterianos, ao passo que os antibióticos convencionais mata menos de 90% em 60 minutos (Hancock e Falla, 1996; Marr *et al.*, 2006).

Não são prejudicados pela resistência provocada pelos mecanismos que ocorrem nos antibióticos usados atualmente que se encontram em risco como é o caso de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* que é resistente a vários medicamentos. Ou seja, como já referido, administrados conjuntamente poderá ocorrer um efeito sinérgico o qual ajuda a ultrapassar barreiras que as bactérias resistentes criaram contra os antibióticos usados hoje em dia (Figura 18) (Marr *et al.*, 2006; Pizzolato-Cezar *et al.*, 2019).

Os AMPs funcionam como potenciadores dos efeitos antimicrobianos e, por sua vez, o uso de tratamentos combinatórios fornece a oportunidade de diminuir a dosagem e assim diminuir a toxicidade sem comprometer o efeito desejado nas bactérias. Ao combinar dois medicamentos alcançam o mesmo efeito por mecanismos de ação diferentes e o desenvolvimento de resistência a um único na combinação pode ser menos provável de acontecer (León-Buitimea *et al.*, 2020).

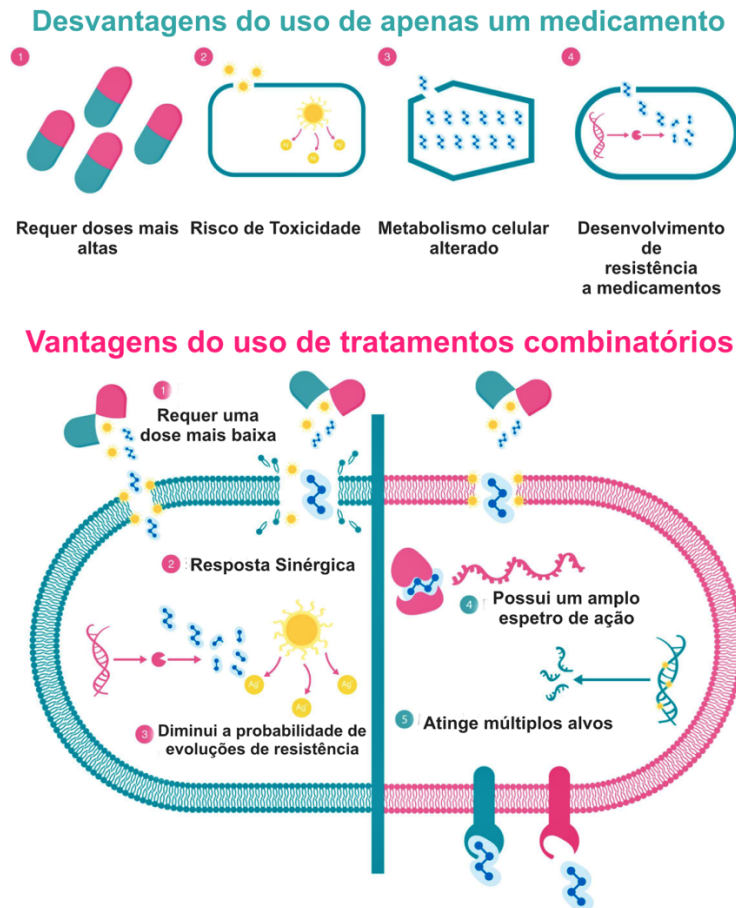


Figura 18: (A) Desvantagem do uso único de um medicamento; (B) Vantagem no uso de tratamentos combinatórios. Adaptado de León-Buitimea *et al.*, 2020.

i. Daptomicina

Daptomicina, uma classe de antibióticos lipopeptídicos cíclicos descoberto em 1980, produzida por *Streptomyces roseosporus* (Steenbergen *et al.*, 2005). Um novo agente antimicrobiano com elevada atividade bactericida contra um largo espectro de agentes patogênicos Gram-positivos (Streit *et al.*, 2004; Pirri *et al.*, 2009).

A Daptomicina é capaz de romper a membrana citoplasmática, mas não é capaz de permeabilizar a membrana externa das bactérias Gram-negativas. Logo, é altamente ativo contra bactérias Gram-positivas, mas não tem atividade contra bactérias Gram-negativas (Li *et al.*, 2017).

O espectro de atividade que a Daptomicina abrange *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina, *Enterococcus* resistentes à Vancomicina (VRE) e *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina (Thorne e Alder, 2002).

Mais de 25% das infecções na Europa são derivadas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), desta forma sucedeu o aumento do uso da Vancomicina (Steenbergen *et al.*, 2005).

Quanto à sua estrutura química (Figura 19) a Daptomicina exhibe uma estrutura única e distinta constituída por um lipopeptídeo cíclico de aminoácidos de 13 membros com uma cadeia lateral de decanoil (Steenbergen *et al.*, 2005). Além de que, possui um mecanismo de ação distinto e não apresenta resistência cruzada com nenhuma outra classe de medicamentos (Thorne e Alder, 2002).

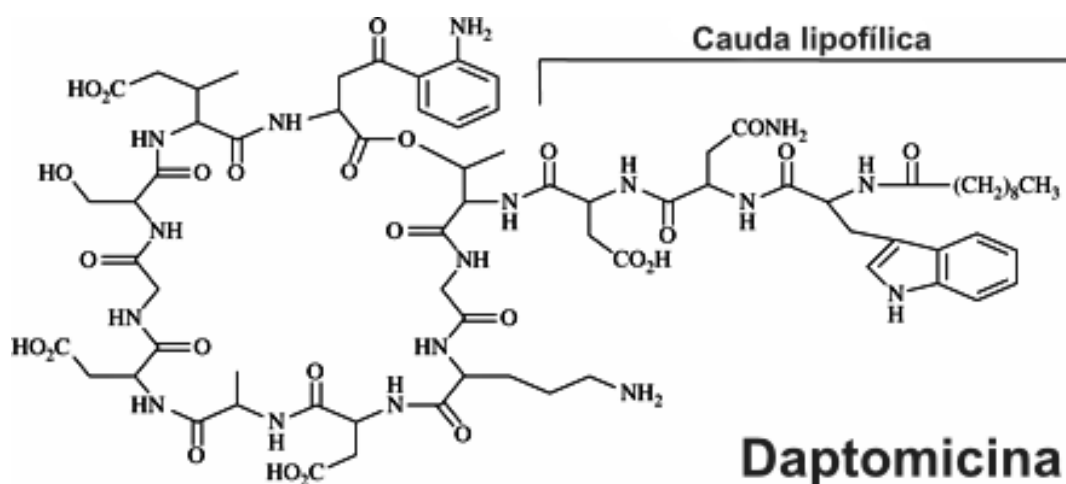


Figura 19: Esquema ilustrativo da Estrutura da Daptomicina Adaptado de Steenberg *et al.*, 2005.

Mecanismo ação

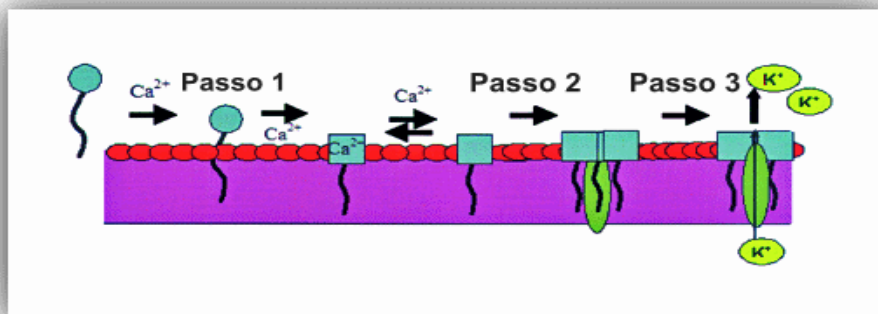


Figura 20: Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da Daptomicina Adaptado de Steenberg *et al.*, 2005.

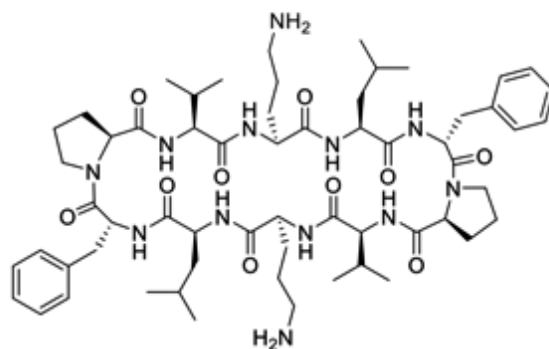
No mecanismo de ação da Daptomicina (Figura 20) há uma inserção da cauda lipofílica na membrana celular bacteriana dependente de cálcio. Este forma oligómeros na presença de Ca^{2+} para formar micelas e rompe a integridade funcional da membrana, provocando a despolarização rápida da membrana e permitindo o efluxo de íons de potássio (K^+) consecutivo á interrupção da síntese de DNA, RNA e proteínas, ocasionando a rápida morte celular (Streit *et al.*, 2004; Steenbergen *et al.*, 2005).

ii. Gramicidina S

A Gramicidina S é um peptídeo cíclico antimicrobiano de ocorrência natural foi descoberta em 1941 na União Soviética onde era utilizada no tratamento de feridas durante a Segunda Guerra Mundial, é produzida naturalmente pela *Aneurinibacillus migulanus*, apresenta atividade tanto contra agentes patogênicos Gram-positivo como Gram-negativos (Figura 21)(Swierstra *et al.*, 2016; Wenzel *et al.*, 2018; Yeoh *et al.*, 2018).

A Gramicidina S provoca uma ténue desmistificação lipídica com efeitos menores na permeabilidade e na fluidez da membrana, mistura-se na ligação da membrana da enzima de síntese da PC e da proteína da cadeia de transporte de elétrões citocromo C, melhor dizendo, deslocaliza as proteínas da membrana periférica que estão envolvidas na síntese no envelope

celular e na divisão celular, apesar de não afetar as proteínas do DNA ou as proteínas integrais da membrana (Wenzel *et al.*, 2018).



Gramicidina S

Figura 21: Esquema ilustrativo da Estrutura da Gramicidina S. Adaptado de Swierstra *et al.*, 2016.

iii. Polimixinas

São provavelmente os lipopeptídeos de ocorrência natural mais conhecidos: Polimixina B e Polimixina E (também conhecida como Colistina), ambos produzidos pela bactéria Gram-positiva *Bacillus polymyxa*. Apesar de existirem cinco Polimixinas, desde a A à E, apenas a Polimixina B e a Colistina são utilizadas em contexto clínico, destinadas para tratamentos de infecções bacterianas Gram-negativas ((Landman *et al.*, 2008; Band e Weiss, 2014; Cai *et al.*, 2015).

Novos compostos pertencentes a esta classe, Polimixina M (mattacina) isolada de *Paenibacillus kobensis*, continuam a ser descobertos (Chung e Khanum, 2017).

Surgiu como um importante agente no tratamento de infecções hospitalares causadas pelas bactérias Gram-negativas multirresistentes (MDR) apeladas de “super bactérias” (Zavascki *et al.*, 2007; Olaitan *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2015).

Bactérias MDR como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* retratam em comum resistências a vários fármacos. Verificou-se que a Polimixina B é clinicamente eficaz contra todas e tem sido administrada diretamente como antibiótico (Trimble *et al.*, 2016; Zhang e Gallo, 2016).

Apesar de terem sido utilizados esporadicamente devido aos seus efeitos colaterais, nefrotóxicos e neurotóxicos, com o aumento calamitoso de resistência a antibióticos leva à necessidade que sejam cada vez mais usados, como última linha terapêutica muitas vezes utilizadas sob a forma de formulações tópicas na prevenção e tratamento de infecções locais (Band e Weiss, 2014; Mahlapuu *et al.*, 2016).

A polimixina B apresenta uma estrutura (Figura 22) com uma cadeia lateral de tripéptido com uma cauda de ácido graxo e um anel peptídico policatiônico, possui cinco grupos amina primários e é um policatião com pH fisiológico (Zavascki *et al.*, 2007). Entre a Polimixina B e E na sua estrutura diferem por uma D-fenilalanina substituída por uma D-leucina no anel peptídico (Cai *et al.*, 2015; Trimble *et al.*, 2016).

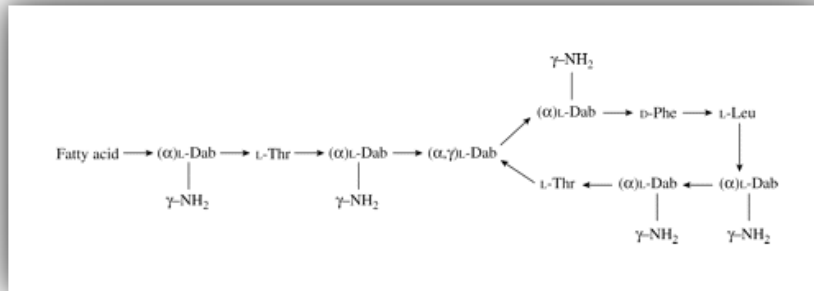


Figura 22: Esquema ilustrativo da Estrutura da Polimixina B. Adaptado de Zavascki *et al.*, 2007.

As Polimixinas em geral possuem uma afinidade elevada e interatuam com o LPS da OM das bactérias Gram-negativas e são de seguida absorvidas (Figura 23) (Pirri *et al.*, 2009). O anel peptídico policationico liga-se aos resíduos de fosfato na OM destabiliza o LPS deslocando as pontes de Ca^{2+} e Mg^{2+} , sendo capaz de desorganizar as estruturas responsáveis pela manutenção do equilíbrio osmótico (Zavascki *et al.*, 2007; Trimble *et al.*, 2016).

Esta capacidade de interferir na integridade da membrana permite que os antimicrobianos hidrofóbicos, como o caso da Eritromicina, possam atingir as bactérias Gram-negativas após a exposição às Polimixinas (Landman *et al.*, 2008).

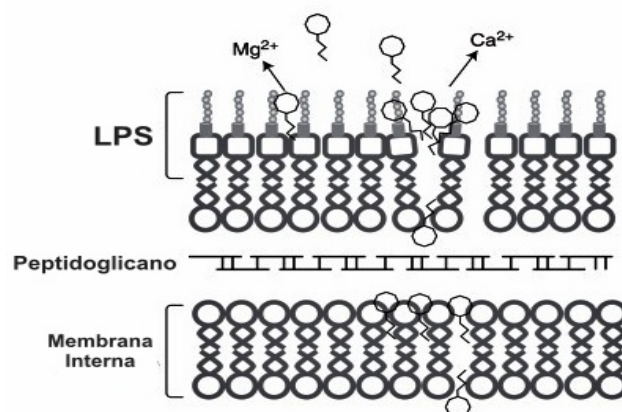


Figura 23: Esquema ilustrativo da interação da Polimixina B com a porção lipídica da membrana externa do lipopolissacarídeo (LPS). Adaptado de Trimble *et al.*, 2016.

iv. Doenças em humanos relacionadas com AMPs

Somos repetidamente bombardeados por uma infinidade de diversas espécies microbianas ao longo da nossa vida. Todavia, o nosso corpo humano está equipado de forma a inibir possíveis agentes patogênicos através de um sistema de defesa imune inato evolutivamente conservado (Peters *et al.*, 2010). Os AMPs estão presentes na maior parte das áreas do nosso corpo humano que frequentemente estão expostos a ataques de agentes patogênicos como é o caso da nossa pele, mucosa intestinal, oral, pulmão, olho e trato reprodutivo. (Zhang e Gallo, 2016).

São vários os AMPs identificados em diferentes excreções humanas e tipos de células, desde a saliva, suor, lágrimas, esperma, urina, células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células assassinas naturais (NK do inglês natural killer), células Paneth, células T e B (Andersson *et al.*, 2016).

Os AMPs contribuem na formação da composição da microbiota comensal, cooperando na manutenção da homeostase cutânea e intestinal. A cessação deste efeito pode provocar graves repercussões para a saúde incluindo: obesidade, infecções recorrentes, doenças como a síndrome do intestino inflamatório e dermatite atópica (Zhang e Gallo, 2016).

Bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são originadoras de úlceras de pressão, úlceras nas pernas e úlceras nos pés diabéticos, resultados das infecções crônicas de feridas provocadas por estas bactérias. Estas são fortes formadoras de biofilmes, a causa da má cicatrização dessas feridas e verificou-se que os AMPs revelaram propriedades antiagregantes e anti-biofilme (Chung e Khanum, 2017).

Intestino

O trato intestinal é coberto por células epiteliais, dobrada em vilosidades e criptas. Na base das criptas podem ser encontradas as células granulares especializadas, denominadas de células de Paneth. As células de Paneth produzem AMPs (alfa-defensinas) contribuindo para o funcionamento normal do intestino (Zaslloff, 2019).

Problemas de Pele

A pele é a nossa principal barreira contra agentes patogênicos e, além da barreira física, impede a penetração de microorganismos. Os queratinócitos são as células predominantes na epiderme,

que contribuem para a defesa contra infecções bacterianas da pele. São pelos menos vinte os AMPs identificados na pele entre eles a Catelicidina humana LL-37 (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

Distúrbios inflamatórios como dermatite de contacto, lúpus eritematoso e psoríase produzem através dos queratinócitos que estão presentes na nossa pele, o peptídeo LL-37 (Chessa *et al.*, 2020).

As infecções de pele e tecidos moles são principalmente causadas pelos ESKAPE, as bactérias mais resistentes a antibióticos comuns. (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

A expressão de peptídeos antimicrobianos sintetizados pelo queratinócito é aumentada no contexto de inflamação ou infecção. Por sua vez, podem estimular a expressão de citocinas pelas suas próprias propriedades pró-inflamatórias ou pela capacidade de potenciar uma resposta inflamatória já em decurso (Chessa *et al.*, 2020).

A psoríase é uma doença comum que afeta milhões de adultos, associada a níveis aumentados de LL-37 na epiderme, como uma condição autoimune, é caracterizada por uma diferenciação e maturação excessiva de células T. A inflamação epidérmica persiste e a expansão dos queratinócitos resultam na formação de placas escamosas à superfície da pele (Alford *et al.*, 2020).

7. Terapêutica com peptídeos

O uso de peptídeos como alternativa terapêutica tem ganho cada vez mais terreno, no sentido em que são fáceis de sintetizar, apresentam uma ação rápida, tamanho pequeno e apresentam um vasto espectro contra bactérias. Desta forma, podem ser usados como antimicrobianos em combinações terapêuticas (Baltzer e Brown, 2011).

Os AMPs isoladamente ou em combinação com medicamentos convencionais tem-se mostrado eficaz no combate a diferentes agentes infecciosos, principalmente bactérias MDR. (León-Buitimea *et al.*, 2020).

A combinação destes com outros antibióticos tais como: Vancomicina, Penicilina, Ampicilina, Polimixina E, Doxiciclina, Daptomicina, Linezolida, Teicoplanina, Azitromicina,

Ciprofloxacina e Claritromicina que quando usados associados a AMPs apresentaram atividade sinérgica potente. (Chung e Khanum, 2017).

São repetidamente usados para melhorar os resultados dos novos tratamentos, logo a associação de antibióticos existentes pode entender a vida útil dos antibióticos tradicionais e reduzir a quantidade de peptídeo precisa para o tratamento (Marr *et al.*, 2006).

Inesperadamente, embora atividade antimicrobiana dos AMPs seja o papel biológico fundamental, foram consideradas novas funções incluído neutralização de endotoxinas e propriedades antineoplásicas (Peters *et al.*, 2010). Também tem sido avaliada a sua função como novos anti-infecciosos, novos agentes para modular a resposta imune, cicatrização de feridas e impedir adesões pós-cirúrgicas tornando estes compostos relevantes para o progresso em eventuais terapêuticas futuras (Mahlapuu *et al.*, 2016).

Aplicações Clínicas



Figura 24: Aplicações clínicas AMPs. Adaptado de Alford *et al.*, 2020.

Os peptídeos antimicrobianos podem alertar o sistema imunológico adaptativo para possíveis problemas. As alfa- defensinas dos neutrófilos atraem células T do sangue periférico que expressam CD4/CD45RA e antígenos CD8 e, também, conseguem atrair células dendríticas (Zasloff, 2019). Em estados de inflamação da pele e pulmão o LL37 é induzido dentro das células epiteliais destes e espera-se que atraia neutrófilos, monócitos e células T para o local. (Zasloff, 2019).

Na atualidade, encontram-se muitos AMPs em desenvolvimento para tratamento antibacteriano, mas a maior parte destina-se a uso tópico, provavelmente devido à toxicidade

verificada após a administração via intravenosa da polimixina B e Colistina. O único AMP que tem sido usado em ensaios clínicos por esta via de administração é a Lactoferrina 1 a 11 produzida pelo homem (hLF 1 a 11) (Andersson *et al.*, 2016).

Como exemplos de uso dos AMPs em aplicações tópicos temos no local do cateter, cicatrização de feridas e fibrose cística (Chung e Khanum, 2017).

Estima-se que nos próximos anos, tendo em conta os vários AMPs que se encontram em desenvolvimento e estudo clínico em diferentes áreas terapêuticas, esta nova estratégia terapêutica virá a confirmar um benefício que levará à autorização de introdução no mercado de novos medicamentos baseados em AMP. (Mahlpuu et al., 2016).

III. CONCLUSÃO

Os últimos 50 anos foram descritos como a “era dos antibióticos”. Porém essa “era” poderá estar a chegar ao fim, já que a eficiência dos antimicrobianos está comprometida devido aos mecanismos de resistência preocupantes e alarmantes que as bactérias desenvolveram.

Como resultado da pressão seletiva ao uso de antibióticos a resistência bacteriana tem surgido de uma forma natural, contudo a uma velocidade superior ao esperado. Vários agentes patogênicos causam milhares de mortes por ano e caso não sejam tomadas medidas, prevê-se que mais de 10 milhões de pessoas possam morrer de doenças infecciosas até 2050.

A eficiência dos antimicrobianos está cada vez mais comprometida, representando uma ameaça global crescente e impiedosa para a saúde pública, pelo que se torna iminente a procura por uma solução.

Os AMPs são moléculas que fazem parte da resposta de defesa de várias espécies de organismos vivos, são caracterizados de formas diferentes com base na estrutura, sequência e mecanismo de ação que apresentam. Os AMPs são encontrados em várias áreas do nosso corpo, desde a pele, às secreções humanas e tipos de células, estando relacionadas com várias doenças seja pela presença em excesso ou pela escassez dos mesmos.

Apesar do surgimento de vários mecanismos de ação exercidos por estes peptídeos, a principal atividade exercida por estes é a interação com a membrana citoplasmática

Visto que o aparecimento de novas classes de antibióticos é cada vez menor e tendo em conta que os AMPs possuem vantagens comparativamente aos antibióticos clássicos é benéfico o uso dos AMPs em tratamentos de doenças infecciosas.

Ainda não está claro se o uso de AMPs em tratamentos de primeira linha será a melhor opção, visto que alguns podem apresentar um nível de toxicidade superior ao pretendido. De forma a melhorar a eficiência e taxa de "risco-benefício" dos tratamentos, propõe-se que a associação de um antibiótico clássico com um AMP forneça um efeito sinérgico no tratamento e uma diminuição na probabilidade de evolução de resistência, não necessitando de doses tão elevadas, e, conseqüentemente diminui a toxicidade provocada no organismo.

É necessária uma exposição muito superior de AMPs comparativamente com os antibióticos clássicos para o desenvolvimento de resistência, mesmo que o surgimento da resistência seja raro alguns agentes patogênicos apresentam resistência aos AMPs, de forma que uma terapêutica combinada será muito mais vantajosa para o sucesso terapêutico e para o combate de doenças infecciosas.

O desenvolvimento e estudo sobre os AMPs podem trazer várias soluções para um futuro muito próximo, não só pela sua atividade antimicrobiana como pelo fato de poder ser explorado para vários problemas de saúde, desde a sua utilização no tratamento do cancro, distúrbios inflamatórios na nossa pele, DSTs, etc.

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas únicas e candidatos promissores para o tratamento de organismos multirresistentes, devido aos seus mecanismos de ação e às atividades que exibem.

Os AMPs, designados por vários autores como "armas antigas", com todo o potencial e propriedades que apresentam, poderão ser o segredo para a resolução de tantos problemas que matam milhares de pessoas. Além disso, o estudo e desenvolvimento de terapêuticas baseadas nestes compostos, ou em associação destes compostos com antibióticos pode ser o marco de uma evolução na medicina, na medida em que se previne a falta de tratamento em infeções recorrentes e intratáveis.

BIBLIOGRAFIA

Alford, M. A. *et al.* (2020). Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance. *Frontiers in Microbiology*, 11(August), pp. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2020.01902.

Andersson, D. I., *et al.*, (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*. Elsevier Ltd, 26, pp. 43–57. doi: 10.1016/j.drug.2016.04.002.

Baltzer, S. A. e Brown, M. H. (2011). Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(4), pp. 228–235. doi: 10.1159/000331009.

Band, V. I. e Weiss, D. S. (2014). Mechanisms of antimicrobial peptide resistance in gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 4(1), pp. 18–41. doi: 10.3390/antibiotics4010018.

Bechinger, B. e Gorr, S. U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), pp. 254–260. doi: 10.1177/0022034516679973.

Berglund, N. A. *et al.* (2015). Interaction of the Antimicrobial Peptide Polymyxin B1 with Both Membranes of *E. coli*: A Molecular Dynamics Study. *PLoS Computational Biology*, 11(4), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004180.

Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, 181(16), pp. 4725–33. doi: 10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999.

Cai, Y. *et al.* (2015). Polymyxin B versus colistin: An update. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(12), pp. 1481–1497. doi: 10.1586/14787210.2015.1093933.

Cardoso, M. H. *et al.* (2020). Computer-aided design of antimicrobial peptides: are we generating effective drug candidates? *Frontiers in Microbiology*, 10(January), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2019.03097.

- Chessa, C. *et al.* (2020). Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2020.01155.
- Chung, P. Y. e Khanum, R. (2017). Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(4), pp. 405–410. doi: 10.1016/j.jmii.2016.12.005.
- Cundliffe, E. (2006). Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), pp. 500-506.
- Donadio, S. *et al.* (2002). Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4), pp. 377-380.
- Ernst, C. M. e Peschel, A. (2011). Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids. *Molecular Microbiology*, 80(2), pp. 290–299. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07576.x.
- Hancock, R. E. W. (1997) Peptide antibiotics. *Lancet*, 349(9049), pp. 418–422. doi: 10.1016/S0140-6736(97)80051-7.
- Hancock, R. E. W. e Falla, T. J. (1996). Antimicrobial peptides: broad-spectrum antibiotics from nature. *Clinical Microbiology and Infection*, 1(4), pp. 226–229. doi: 10.1016/s1198-743x(15)60279-8.
- Hutchings, M. *et al.* (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(Figure 1), pp. 72–80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- Jenssen, H. *et al.* (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), pp. 491–511. doi: 10.1128/CMR.00056-05.
- Joo, H. S. *et al.* (2016). Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695). doi: 10.1098/rstb.2015.0292.

Kumar, P. *et al.* (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1). doi: 10.3390/biom8010004.

Landman, D. *et al.* (2008). Polymyxins revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), pp. 449–465. doi: 10.1128/CMR.00006-08.

Lau, J. L. e Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(10), pp. 2700–2707. doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.

León-Buitimea, A. *et al.* (2020). The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2020.01669.

Li, J. *et al.* (2017). Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design. *Frontiers in Neuroscience*, 11(FEB), pp. 1–18. doi: 10.3389/fnins.2017.00073.

Loureiro, R. J. *et al.* (2016). Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. *Revista Portuguesa de Saude Publica*, 34(1), pp. 77–84. doi: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003.

Madigan, M. T. *et al.* (2009). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Prentice hall, 13th edn.

Mahlapuu, M. *et al.* (2016). Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(DEC), pp. 1–12. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194.

Marr, A. K. *et al.* (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), pp. 468–472. doi: 10.1016/j.coph.2006.04.006.

Microbiology Book (2020) Lipo-Portuguese.jpg. Disponível em: <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/lipo-portuguese.jpg>

- Navarre, W. W. (1999). Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), pp. 174–229.
- Olaitan, A. O. *et al.* (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV), pp. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643.
- Peschel, A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology*, 10(4), pp. 179–186. doi: 10.1016/S0966-842X(02)02333-8.
- Peters, B. M. *et al.* (2010). Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 6(10), pp. 4–7. doi: 10.1371/journal.ppat.1001067.
- Pfalzgraff, A. *et al.* (2018). Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAR), pp. 1–23. doi: 10.3389/fphar.2018.00281.
- Pilling, S. *et al.* (2013). Aula 2 - Moléculas anfífilas, fosfolípidios, micelas, vesículas e rotocélulas. *Acidomonanóico em meteoritos*. Universidade do Vale do Paraíba.
- Pirri, G. *et al.* (2009). Lipopeptides as anti-infectives: A practical perspective. *Central European Journal of Biology*, 4(3), pp. 258–273. doi: 10.2478/s11535-009-0031-3.
- Pizzolato-Cezar, L. R. *et al.* (2019). Combinatory antimicrobial peptide-antibiotic to minimize the ongoing rise of resistance. *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY), pp. 1–5. doi: 10.3389/fmicb.2019.01703.
- Raheem, N. e Straus, S. K. (2019). Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Frontiers in Microbiology*, 10(December), pp. 1–14.
- Sahl, H.-G. *et al.* (2005). Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(4), pp. 466–475. doi: 10.1189/jlb.0804452.
- Sousa, J. C. *et al.* (2016). *Antibióticos*. Edições Universidade Fernando Pessoa.

Steenbergen, J. N. *et al.* (2005). Daptomycin: A lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), pp. 283–288. doi: 10.1093/jac/dkh546.

Streit, J. M. *et al.* (2004). Daptomycin activity and spectrum: A worldwide sample of 6737 clinical Gram-positive organisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(4), pp. 669–674. doi: 10.1093/jac/dkh143.

Swierstra, J. *et al.* (2016). Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(5), pp. 763–769. doi: 10.1007/s10096-016-2595-y.

Thorne, G. M. e Alder, J. (2002). Daptomycin: A novel lipopeptide antibiotic. *Clinical Microbiology Newsletter*, 24(5), pp. 33–40. doi: 10.1016/S0196-4399(02)80007-1.

Trimble, M. J. *et al.* (2016). Polymyxin: Alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10). doi: 10.1101/cshperspect.a025288.

Wang, G. *et al.* (2014). High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(9), pp. 2160–2172. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.016.

Wenzel, M. *et al.* (2018). The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. *mBio*, 9(5), pp. 1–20. doi: 10.1128/mBio.00802-18.

Wimley, W. C. e Hristova, K. (2011). Antimicrobial peptides: Successes, challenges and unanswered questions. *Journal of Membrane Biology*, 239(1–2), pp. 27–34. doi: 10.1007/s00232-011-9343-0.

Yeaman, M. R. e Yount, N. Y. (2003). The Metamorphosis of the Kappa. *Pharmacological reviews*, 57(1), pp. 27–55. doi: 10.1124/pr.55.1.2.27.

Yeoh, Y. Q. *et al.* (2018). Photopharmacological Control of Cyclic Antimicrobial Peptides. *ChemBioChem*, 19(24), pp. 2591–2597. doi: 10.1002/cbic.201800618.

Zasloff, M. (2019). Antimicrobial peptides of multicellular organisms: My perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1117(January), pp. 3–6. doi: 10.1007/978-981-13-3588-4_1.

Zavascki, A. P. *et al.* (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: A critical review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), pp. 1206–1215. doi: 10.1093/jac/dkm357.

Zhang, L. J. e Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology Magazine*, pp. R14–R19.

Zhou, Y. e Peng, Y. (2013). Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(4), pp. 1000–1004. doi: 10.3892/etm.2013.1231.