

HEMOCIDINAS DERIVADAS DA HEMOGLOBINA: ESTRUTURAS, PROPRIEDADES E PERSPECTIVAS

Larissa A. C. Carvalho e Maria Teresa Machini*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 748, Butantã, 05508-900 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 13/12/12; aceito em 23/4/13; publicado na web em 10/6/13

HEMOCIDINS DERIVED FROM HEMOGLOBIN: STRUCTURES, PROPERTIES AND PERSPECTIVES. The increasing incidence of microbial infections, high toxicity, and high level of resistance associated with conventional antibiotics has created a need for new drugs. Antimicrobial peptides (AMPs) constitute a promising alternative and/or an important source of knowledge given their ability to inhibit the growth and/or to kill bacteria, fungi, parasites and/or viruses through mechanisms of action different from those of non-peptide drugs. This review focused on this important class of organic compounds that includes hemocidins resulting from hemoglobin proteolysis *in vivo* and *in vitro* or from chemical synthesis, subject of research in foreign and Brazilian laboratories.

Keywords: hemoglobin; antimicrobial peptides; microbial resistance.

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs)

Há décadas, o fato de sermos constantemente bombardeados por inúmeras espécies de microrganismos capazes de nos causar doenças chamou a atenção da comunidade científica, a qual acabou por evidenciar em nosso corpo um sistema imune inato adaptativo capaz de enfrentar esse problema. Faz parte desta imunidade inata os peptídeos antimicrobianos (geralmente denominados AMPs), que são rapidamente mobilizados para neutralizar um amplo espectro de micróbios.^{1,2}

O primeiro relato da existência dos AMPs se deu em 1980 com o isolamento das cecropinas a partir da hemolinfa de mariposa *Hyalophora cecropia*.³ Um ano depois, as α -defensinas também foram isoladas e caracterizadas de leucócitos de mamíferos.⁴ Nos humanos, os AMPs inatos mais proeminentes são as catelicidinas e defensinas (produzidas pelas células do sistema imune), bem como as histatinas (produzidas e secretadas na saliva pelas glândulas salivares).¹

Segundo Cederlund e colaboradores, até 2011, mais de 1700 AMPs haviam sido identificados em fontes naturais variadas ou previstos através das sequências de genes que os codificam.⁵ Embora este número seja alto e eles exibam vasta diversidade de sequências de aminoácidos, algumas características químicas e estruturais são compartilhadas.

Características gerais dos AMPs

De fato, a maioria dos AMPs que atuam sobre a membrana celular é formada por 12-50 resíduos de aminoácidos unidos entre si por ligações amida (denominadas peptídicas), apresenta carga líquida positiva (+2 a +9) em pH fisiológico e estrutura anfipática⁶ com aproximadamente 50% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos.⁷ Estas características parecem ser fundamentais para a atividade contra a célula microbiana, já que a etapa inicial de seus mecanismos de ação é a sua atração eletrostática pelos grupos carregados negativamente de compostos da parede e da membrana celular. A hidrofobicidade dos AMPs auxilia posteriormente na sua inserção e forte interação com a bicamada lipídica.⁵

Muitos AMPs são amidados em sua carboxila terminal e/ou

contém pontes dissulfeto envolvendo resíduos de cisteína e/ou piroglutamato como resíduo de aminoácido N-terminal e/ou são ricos em um determinado aminoácido.⁸⁻¹⁰ Eles podem apresentar estruturas em α -hélice ou folha β -pregueada, estruturas estendidas e/ou em *loop*⁶, sendo que o conhecimento de tal diversidade estrutural é essencial para a concepção e produção de análogos sintéticos mais ativos, seletivos ou quimicamente mais estáveis do que os AMPs naturais com grande potencial para aplicações clínicas.¹¹

Uma diferença marcante dos AMPs em relação aos antibióticos convencionais é a sua rápida ação bactericida em concentrações próximas ou iguais às MICs (mínimas concentrações inibitórias do crescimento dos microrganismos sobre os quais eles atuam),¹² o que dificulta o surgimento da resistência microbiana. Além disso, em concentrações superiores às MICs, alguns AMPs chegam a matar 99,999% das bactérias em poucos minutos.¹³

Alguns AMPs são capazes de matar microrganismos e apresentar baixa toxicidade para as células do hospedeiro. De fato, este é o tipo de comportamento esperado para biomoléculas que fazem parte da imunidade inata. É o caso da magainina 2, isolada da pele do sapo africano *Xenopus laevis*, que apresenta atividade bacteriana com MIC na faixa de 2-50 μ M e na concentração 1000 μ M causa apenas 50% de hemólise em eritrócitos humanos.¹⁴ Tal seletividade decorre da interação preferencial de AMPs catiônicos anfipáticos com superfícies negativas e/ou hidrofóbicas da parede celular. A composição desta estrutura varia de acordo com o organismo, mas para bactérias e fungos ela age como uma barreira protetora. Assim, fica evidente que para exercer a atividade bacteriostática ou bactericida, os AMPs que têm como alvo celular a membrana plasmática, devem primeiro ser atraídos eletrostaticamente, danificar e atravessar a parede celular. No caso das células humanas, desprovidas de parede celular, a interação inicial com a membrana plasmática é eletrostática e a interação principal é a hidrofóbica, Figura 1,¹⁰ sendo a última determinante da toxicidade que alguns AMPs apresentam (como será discutido a seguir).

As paredes celulares bacterianas contêm moléculas aniônicas atrativas aos AMPs como os lipopolissacarídeos (Gram-negativas), o ácido teicóico e o ácido lipoteicóico (Gram-positivas).¹⁴ Elas, de fato, desempenham papel importante na eficácia dos AMPs, pois: 1) já foi demonstrado que *Staphylococcus aureus* aumenta a carga positiva de sua parede celular com vistas a repelir AMPs como as protegrinas;¹⁵

*e-mail: mtmachini@iq.usp.br

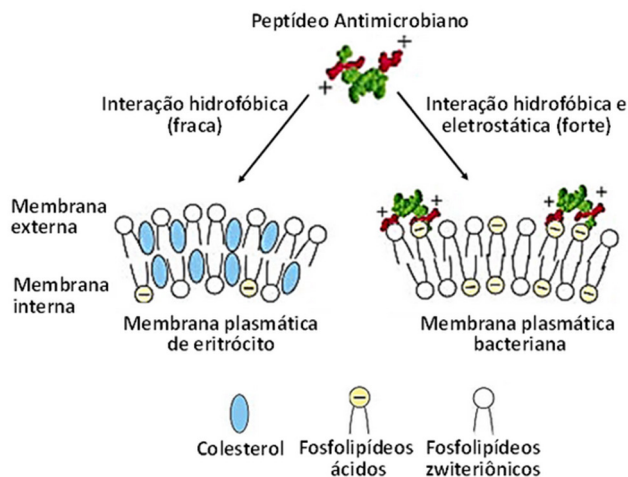


Figura 1. Bases moleculares da seletividade dos AMPs (adaptado da ref. 10)

2) estudos de microscopia eletrônica mostraram também que a ação inibitória de crescimento microbiano de uma série de AMPs pode ser parcialmente explicada pelos efeitos que eles causam na parede celular, tais como quebras em sua estrutura, desintegração, afinamento e septação anormal.¹⁶ Quanto às membranas plasmáticas bacterianas, elas também são carregadas negativamente, uma vez que são ricas em fosfolípidos ácidos, como fosfatidilglicerol e cardiolipina. Já foi comprovado que bactérias com maior quantidade de cargas negativas em suas membranas são mais suscetíveis à magainina 2, um AMP catiônico amplamente estudado.¹⁷

Quanto às paredes celulares e membranas plasmáticas de fungos, como as de *Candida albicans*, elas são abundantes em compostos orgânicos que, em pH fisiológico, estão carregados negativamente e conferem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas à superfície celular. As paredes celulares são ricas em manoproteínas contendo cadeias longas e ramificadas com ligações *N*-glicosídicas entre resíduos manosil e cadeias menores lineares de manana unidas por ligações *O*-glicosídicas (que constituem cerca de 30-40% do peso seco da parede celular),¹⁸ quitina e cadeias β -1,3 e β -1,6 glicanas. Estudos anteriores demonstraram que, devido à perda de manosilfosfato e drástica redução de cargas negativas da parede celular, células de *Saccharomyces cerevisiae* se tornaram incapazes de interagir com o marcador fluorescente carregado positivamente *Alcian Blue* (utilizado para corar polissacarídeos ácidos como glicosaminoglicanos).¹⁶ Quanto às membranas plasmáticas de fungos, elas são constituídas de proteínas (52%), de fosfolípidos (7%) e de ergosterol (4%), além de outros compostos minoritários.¹⁹ Dentre os componentes lipídicos estão as fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilserinas (PS), que se localizam preferencialmente na face citoplasmática, fosfatidilcolinas (PC), esfingolipídeos e pequenas quantidades de gangliosídeos na face externa da membrana plasmática.^{20,21}

As interações hidrofóbicas iniciais desempenham papel fundamental na interação entre os AMPs anfipáticos e células de mamíferos, já que nestas células os fosfolípidos ácidos encontram-se no interior da membrana plasmática. Embora comprovadamente certos AMPs sejam seletivos aos microrganismos,¹⁴ muitos são altamente hemolíticos (ativos frente aos eritrócitos), como é o caso da melitina que foi isolada do veneno da abelha *Apis mellifera* e é muito utilizado como controle positivo em ensaios hemolíticos ou de dano na membrana celular, mas também como agente antimicrobiano.²²

Vários AMPs foram isolados de fontes naturais diversas e estão sendo ampla e eficientemente estudados por diferentes grupos de pesquisa brasileiros,^{9,23-28} incluindo o nosso [além de realizar pesquisa em química de peptídeos,²⁹⁻³¹ colaboramos com alguns desses

grupos em estudos da migalina³² e da gomesina,^{9,33} bem como vimos estudando o fragmento C-terminal de acanthoscurrina,³¹ hemocidinas sintéticas³⁴ e a cheferina I (dados em publicação)].

Mecanismos de ação dos AMPs

O modo pelo qual os AMPs são capazes de matar os microrganismos é tópico de grande interesse científico, uma vez que a sua elucidação pode auxiliar no *design* de novas drogas com potencial terapêutico. Com base nesta informação e nas estruturas assumidas pelos AMPs em ambientes hidrofóbicos, foram propostos os modelos apresentados na Figura 2: (1) ripas de barril; (2) tapete e (3) poro toroidal.³⁵ Os três têm como finalidade explicar como atuam os AMPs catiônicos anfipáticos que formam α -hélice e tem como alvo a membrana plasmática.

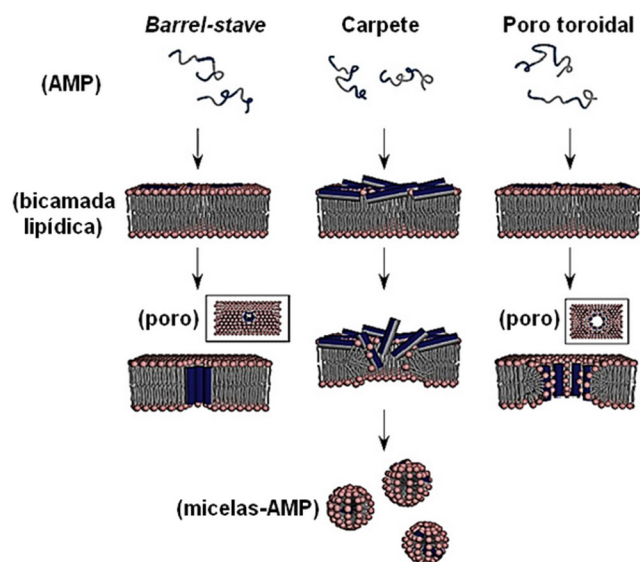


Figura 2. Modelos de mecanismos de ação propostos para a permeabilização de membranas celulares por AMPs. Esses estão representados como cilindros, cuja face cinza é hidrofóbica e a azul hidrofílica (adaptado da ref. 35)

Segundo o modelo ripas de barril (*barrel-stave*; Figura 2A), a face hidrofóbica do AMP interage com as cadeias carbônicas dos lipídeos da membrana plasmática e a sua face hidrofílica fica exposta, de modo a compor o lúmen do canal transmembranar formado. Já o modelo tapete (Figura 2B) prevê inicialmente a interação eletrostática entre os resíduos carregados positivamente do peptídeo e as cargas negativas dos fosfolípidos; em seguida, o AMP se acumula na superfície da membrana plasmática, recobrando-a de forma análoga a um tapete, podendo causar a sua permeabilização. Finalmente, no modelo poro toroidal (Figura 2C), o peptídeo anfipático interage eletrostaticamente com a membrana plasmática fosfolipídica e une-se paralelamente à mesma. Dessa forma, o peptídeo separa as cabeças polares dos fosfolípidos e induz a monocamada lipídica superior a dobrar-se através do poro. Assim, neste modelo, o lúmen do poro é formado por moléculas de peptídeos e cabeças polares dos fosfolípidos intercaladas.³⁵

Diversas estratégias experimentais têm sido usadas para desvendar o modo de ação de AMPs: 1) marcação do peptídeo com molécula fluorescente, para visualizar a sua distribuição na célula microbiana;³⁶ 2) utilização de marcadores fluorescentes de potencial de membrana, caso seja necessário saber se o peptídeo rompe a membrana biológica ou forma poros nela;³⁷ 3) uso de marcadores fluorescentes de núcleo ou organelas, para saber se o peptídeo possui um alvo interno

celular;³⁸ 4) emprego de desacopladores da cadeia respiratória como o 2,4-dinitrofenol (DNP) ou azida sódica (NaN_3), para descobrir se a ação do AMP consome ou não ATP;³⁷ 5) microscopia confocal e citometria de fluxo, para examinar o processo de permeabilização celular³⁸ e até ensaios de apoptose.³⁹

Resistência dos microrganismos associada às drogas antibióticas comerciais

A introdução dos antibacterianos ou antibióticos na terapia foi um marco na história da medicina devido à redução da morbidade e mortalidade de pessoas infectadas por bactérias. Em 1941, estava disponível no mercado o primeiro antibiótico: a penicilina. Desde então, outras preocupações começaram a surgir, tais como as bactérias desenvolverem resistência aos antibióticos comerciais, um dos graves problemas de saúde pública da atualidade.^{40,41}

O uso indiscriminado e o tratamento interrompido de antibióticos acarretam a seleção de bactérias resistentes e colaboram para a disseminação destes microrganismos. Assim, para controlar a situação no Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) proibiu a venda de antimicrobianos sem prescrição médica. Portanto, desde 28 de novembro de 2010, os antibióticos devem ser receitados em duas vias, sendo uma retida no estabelecimento de compra e a outra permanecendo em posse do consumidor.⁴²

O impacto econômico de pacientes internados com infecções bacterianas também chama a atenção, pois podem variar de US\$150 milhões a US\$ 30 bilhões por ano. Sem dúvida, estima-se que uma pessoa doente tenha seu tempo de internação, bem como o custo da mesma, dobrado se for infectada.⁴²

Os mecanismos de resistência de bactérias estão associados à seleção de cepas capazes de sobreviver e se reproduzir mesmo em presença do antibiótico, ou seja, se readaptar às novas condições. Atualmente, pesquisas apontam para a reversibilidade da resistência bacteriana, já que as bactérias selvagens seriam capazes de competir com as resistentes se não estivessem sob a seleção do antibiótico. No entanto, os dados disponíveis sugerem que o processo de reversibilidade é bastante lento.⁴⁰

Diversas são as classes de agentes antibióticos disponíveis no mercado. Eles apresentam mecanismos de ação variados e sendo, por isso, indicados para diferentes tratamentos. Os seus mecanismos de ação incluem a inibição das sínteses da parede celular, de proteínas, de DNA ou RNA, de ácido fólico e de ácidos graxos, bem como alteração da permeabilidade da membrana plasmática⁴³ (Tabela 1).

A utilização constante dos antibióticos comerciais levou ao aumento de cepas resistentes a várias classes de antibióticos, criando as bactérias multi-resistentes. Os seus mecanismos de resistência também são variados, mas os mais comuns incluem: 1) ação direta sobre a droga, como é o caso das β -lactamases que destroem penicilinas e cefalosporinas; 2) transporte da droga, como o efluxo ativo de tetraciclina, clorofenicol e fluoroquinolonas, 3) alteração do alvo da droga, como pequenas alterações nos ribossomos, enzimas ou paredes celulares, para que o composto não seja capaz de exercer sua ação.⁴³

Resistência dos microrganismos associada às drogas antifúngicas comerciais

A resistência antifúngica pode ser definida como microbiológica ou clínica. A microbiológica ocorre quando se inibe o microrganismo com uma concentração de droga um pouco maior do que a utilizada em cepas selvagens. A clínica é associada à falha no tratamento, provavelmente relacionada ao fato de que a dose necessária para inibição do crescimento do fungo é muito maior do que a definida como segura para o composto.⁴⁴

Tabela 1. Classes e mecanismos de ação de antibióticos e antifúngicos disponíveis atualmente⁴⁴⁻⁴⁶

Mecanismo de ação	Classes
Antibióticos	
Inibição da síntese da parede celular	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenem, daptomicina, monobactamas, glicopeptídeos, carbacefem, bacitracina, etambutol, fosfomicina
Alteração da permeabilidade da membrana plasmática	Polimixina B, colistina
Inibição da síntese de proteína	Tetraciclina, aminoglicosídeo, oxazolidinonas, estreptograminas, que-tolidos, macrolídeos, lincosamidas, cloranfenicol, clindamicina, ácido fusídico, linezolida, quinupristina
Inibição da síntese de DNA	Fluoroquinolonas, furazolidona
Inibição da síntese de ácido fólico	Sulfonamida, trimetoprim
Inibição da síntese de RNA	Rifampin
Inibição da síntese de ácidos graxos	Isoniazida, platensimicina, pirazinamida
Outros mecanismos	Timidazol, metronidazol, arsfenamina
Antifúngicos	
Inibição não-competitiva da enzima lanosterol 14 α -desmetilase, responsável pela síntese de ergosterol	Azóis e Triazóis
Interações hidrofóbicas com o ergosterol para formação de poros e danos oxidativos na membrana plasmática	Polienos
Inibição da replicação do DNA e síntese proteica	Flucitossina
Inibição não-competitiva da enzima $\beta(1,3)$ -glucana sintase, responsável pela síntese de $\beta(1,3)$ -glucana, componente da parede celular	Equinocandinas

Nos últimos anos, o uso indiscriminado de agentes antifúngicos levou ao aumento do número daqueles tolerantes às drogas em doses terapêuticas. Tal situação representa um grave risco às pessoas imunocomprometidas, tais como os portadores do vírus HIV, os pacientes em tratamento quimioterápico, aqueles que receberam transplantes de órgãos e os recém-nascidos. De fato, as doenças causadas por fungos são as maiores causas de morbidade e mortalidade desses indivíduos,⁴⁵ além de terem grande impacto econômico mundial. Tal afirmação é corroborada por relatos de 2008 e 2011 de que os Estados Unidos da América gastavam US\$ 4-7 bilhões de dólares/ano para tratar infecções por fungos resistentes às drogas comerciais⁴⁶ e que o tratamento de um paciente americano com infecção fúngica invasiva era muito caro (cerca de US\$ 55 mil a mais do que o de um paciente internado sem a infecção).⁴⁷

Ironicamente, a maioria dos fungos causadores de doenças em seres humanos apresenta baixa virulência e é contida pelo próprio sistema imune. Um exemplo é o comensal *Candida albicans*, que está presente na microbiota natural, na mucosa da boca e no sistema reprodutor feminino. Entretanto, sendo um patógeno oportunista, ele se torna virulento quando seu hospedeiro encontra-se imunocomprometido,⁴⁵ deficiência essa do sistema imune que pode ocasionar infecções superficiais, localizadas (candidíase) e sistêmicas (candidemia).

A candidemia é a apresentação da patogenidade do gênero mais preocupante. Trata-se da 4ª causa mais comum de infecção sanguínea

nosocomial^{44,48} e é responsável por índices mundiais e brasileiros de mortalidade de até 40% e 61%, respectivamente. Ambos ultrapassam os índices de mortalidade causados por infecções bacterianas e, por isso, requerem maior preocupação. Além disso, o número de infecções fúngicas no Brasil é 2-8 vezes maior do que nos Estados Unidos e na Europa.^{49,50}

A utilização irresponsável, a falta de hábitos higiênicos (para a não disseminação de doenças) e a limitação na escolha da droga são as causas do aumento de resistência microbiana às drogas antifúngicas comerciais. Os maiores obstáculos no desenvolvimento de novas drogas alternativas parecem ser: (1) falta de incentivo da indústria farmacêutica que não vê nos antifúngicos um mercado lucrativo; (2) dificuldade em encontrar drogas de baixa toxicidade que não compartilhem rotas ou intermediários metabólicos com os hospedeiros.⁵⁰ Assim sendo, ao contrário das infecções bacterianas, as fúngicas têm sido combatidas com o rol limitado de opções do mercado: (1) os azóis e os triazóis (miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol); (2) os polienos (nistatina e anfotericina B); (3) a flucitosina (5-fluorocitosina); (4) as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina)² citadas na Tabela 1, sendo o fluconazol e a anfotericina B as mais utilizadas. Entre os mecanismos de resistência estão o efluxo celular ativo para expulsão da droga, mutações no gene *ERG11* (lanosterol 14 α -demetilase), superexpressão da enzima e/ou substituição do ergosterol por outro composto de mesma função (azóis e triazóis), alterações qualitativas ou quantitativas de ergosterol na membrana (polienos), mutações nos genes *FCY2* (citosina permease), *FCY1* (citosina deaminase) ou *FURI* (uracil fosforibosil-transferase; flucitocina) e efluxo celular ativo para expulsão da droga, mutações no gene *Fsk1* ($\beta(1,3)$ -glucanase sintase) e/ou superexpressão da enzima (equinocandinas).^{45,51}

Potencialidades e dificuldades de uso de AMPs na terapêutica

Com a descoberta do papel dos AMPs produzidos por plantas e animais no combate às infecções microbianas, foi proposto que os mesmos pudessem ser base de uma nova classe de antimicrobianos clínicos.⁵² A lista de vantagens associadas às propriedades dos AMPs inclui: (1) fácil metabolização; (2) baixa resistência microbiana; (3) ação microbicida; (4) efeito sinérgico com outras drogas antibióticas; (5) amplo espectro de ação; (6) uso científico para ampliação do conhecimento e concepção de novas drogas. Dentre as suas desvantagens estão: (1) alta suscetibilidade à proteólise, principalmente aqueles formados exclusivamente de L-aminoácidos; (2) alto custo; (3) citotoxicidade; (4) perda significativa da potência em meios de alta força iônica.

As desvantagens têm sido alvos de estudo de pesquisadores em todo o mundo. Relatos na literatura indicam maior resistência

à proteólise do AMP com a amidação da sua porção C-terminal³⁴ ou ciclização envolvendo aminoácidos D e L.⁵³ Em relação ao alto custo de produção, estudos da relação estrutura-atividade vem sendo realizados com o objetivo de gerar peptídeos menores, portanto, mais baratos, tão ou mais ativos do que os naturais.⁵³ Quanto à redução de potência em alta força iônica, pesquisas indicam que mudanças na hidrofobicidade, anfipaticidade, carga e grau de α -hélice auxiliam a solucionar o problema.⁵³ Assim, pode-se comparar os AMPs e os antimicrobianos disponíveis no mercado (Tabela 2).

Apesar das dificuldades mencionadas anteriormente, peptídeos catiônicos cíclicos como a Gramicidina S (GS) e Polimixinas B e E foram aprovados para uso em formulações comerciais; a pomada Oncilon-A M[®] contém GS e é indicada no alívio de inflamação e coceiras causadas por dermatoses; o medicamento Bedfordpoly B[®] contém sulfato de polimixina B e é indicado em infecções sanguínea, do trato urinário e meninges causadas principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Acredita-se que seus mecanismos de ação estejam relacionados à simples perturbação da integridade da membrana plasmática microbiana, mas as polimixinas apresentam nefrotoxicidade e neurotoxicidade e a GS alta atividade hemolítica.^{54,55} O Pexigan (variante da magainina 2) chegou até a fase III de estudos e mostrou-se eficiente na cicatrização de feridas, apresentando baixa toxicidade. Entretanto, em 1999, a FDA o rejeitou alegando que o mesmo não trazia nenhuma vantagem em relação às drogas antibióticas convencionais.⁵²

Assim, conclui-se que os AMPs são compostos promissores no que diz respeito à aprovação clínica, mas que para isso eles precisam ser melhor estudados em relação às suas propriedades e modos de ação.

Peptídeos microbicidas derivados da hemoglobina: hemocidinas

Diversos estudos mostraram que as proteínas que contém grupo heme intacto, como hemoglobina, mioglobina e citocromo c, não apresentam propriedades antimicrobianas, mas desprovidas do grupo heme exibem um amplo espectro de ação antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos filamentosos e leveduras, além de alguns parasitas.⁵⁵ Além disso, já foi comprovado que a hemoglobina pode ser fonte de outros peptídeos que atuam como opióides, analgésicos e vaso-construtores, por exemplo.^{56,57}

Esta proteína existe como um tetrâmero com duas subunidades α e duas subunidades β . Por clivagem proteolítica (*in vivo* ou *in vitro*), a hemoglobina produz as hemocidinas. Este termo (*hemoglobin microbicidal peptides*) foi citado pela primeira vez em 2000 por Mak e colaboradores⁵⁵ que propuseram o mesmo para descrever AMPs provenientes de proteínas que tem o heme como grupo prostético.

Tabela 2. Comparação entre antibióticos convencionais e os AMPs catiônicos (adaptada da ref. 7)

Propriedades	Antimicrobianos convencionais	Peptídeos antimicrobianos catiônicos
Espectro de ação	Geralmente seletivos	Amplo
Mecanismos	Específicos	Geralmente por atração eletrostática e dano a membrana celular ou alvo interno
Alvos celulares	Geralmente um ou uma classe de alvos	Menos específicos
Índice de resistência	Após algumas utilizações na sub-MIC*	Geralmente não é detectada, necessitaria de muitas passagens pela sub-MIC para induzir resistência
Farmacocinética	Variável, mas os ingeríveis por semana estão sendo desenvolvidos	Tempo de meia-vida curtos devido à susceptibilidade a proteases
Toxicologia	Costumam ser o grupo mais seguro de fármacos	Não há estudos de toxicidade tópica ou sistêmica, mas podem ser citotóxicos
Custos	Geralmente baratos (US\$ 0,80/g)	Geralmente caros (US\$ 50-400/g)

*sub-MIC: concentração da droga inferior à MIC; concentração sub-inibitória do crescimento do microorganismo-alvo. Se o medicamento for utilizado algumas vezes na sub-MIC, a probabilidade de desenvolvimento de resistência microbiana é alto, visto que é uma concentração não letal ao patógeno e pode selecionar cepas resistentes.

As hemocidinas derivadas da hemoglobina também apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana, atividade dependente da força iônica do meio em que atuam, mecanismo de ação em que o alvo primário são as membranas celulares, atividade microbicida em concentrações micromolares e, para a maioria, estruturação em α -hélice e natureza catiônica.⁵⁵

Estudos sobre os seus mecanismos de ação mostraram que a atividade antimicrobiana das hemocidinas estão relacionadas à sua anfipaticidade, carga positiva e estrutura em α -hélice formada em presença da membrana plasmática microbiana carregada negativamente. Estas características possibilitam a destruição da integridade da membrana com consequente morte celular.^{56,57}

Assim, desde a descoberta dessas hemocidinas, muitos grupos de

pesquisa pelo mundo se interessam pelo seu estudo e melhor compreensão. Já foram, por exemplo, documentadas hemocidinas provenientes de fontes variadas, como nos sangues de ovelhas, bois, coelhos e humanos. Em humanos, foi relatada a presença desses AMPs no sangue menstrual que, curiosamente são ativos contra *Escherichia coli*, um patógeno urogenital comum, mas inativas contra *Candida albicans*. Assim, foi proposto que essas hemocidinas eram parte de um mecanismo bactericida que auxiliava na homeostase da vagina humana durante a menstruação como forma de conter infecções.⁵⁶ A Tabela 3 lista diversas hemocidinas derivadas da hemoglobina e isoladas a partir de diversas fontes naturais ou obtidas *in vitro* após clivagem proteolítica, respectivamente.

O primeiro relato de possível atividade antimicrobiana da

Tabela 3. Sequências dos fragmentos derivados da hemoglobina com atividade antimicrobiana gerados *in vivo* e *in vitro*

Peptídeo	Fragmento	Fonte <i>in vivo</i>	Referência
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK	α (33-61) bovina	Conteúdo intestinal do carrapato de boi <i>B. microplus</i>	58
VLSPADKTNIK	α (1-11) coelho	Conteúdo intestinal do carrapato de coelho <i>Ornithodoros moubata</i>	59
SPADKTNIKTAWEKIGS	α (3-19) coelho		
VCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVAVAGVANALAHKYH	β (111-146) humana	Placenta humana	60
WQKMVTAVASALSSRYH	γ (130-146) humana		
SFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVK	α (35-56) humana	Sangue menstrual humano	56
AHHFGKEFTPPVQAAYQKV-VAGVANALAHKYH	β (115-146) humana		
AAHLPAEFTPAVHASLDFK	α (110-128) humana	Conteúdo da secreção cervicovaginal humana	61
LVVVLARNFGKFFTPVLQADFQKVAVAGVANALAHRYH	β (109-145) ovino	Sangue de ovelha	62
FLSFPTTKTY	α (32-41) humana	Conteúdo do endométrio humano	63
VNFKLLSHSLVTLASHL	α (97-114) bovina	Sangue de boi	64
NFKLLSHSLVTLASHL	α (98-114) bovina	Sangue de boi	65
Peptídeo	Fragmento	Obtenção <i>in vitro</i>	Referência
VLSPADKTNVKAAGWKVGAHAGEYGAEALERM	α (1-32) humana	Clivagem por Brometo de cianogênio	55
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDM	α (33-76) humana		
PNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDFKFLASVSTVLTISKYR	α (77-141) humana	Clivagem por brometo de cianogênio	67
VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGRLLLVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVM	β (1-55) humana		
GNPKVKAHGKKVLAFAFSDGLAHLAHLNKGTFATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAH-HFGKEFTPPVQAAYQKVAVAGVANALAHKYH	β (56-146) humana		
VLSPADKTNVKAAGWKVGAHAGEYGAEALER	α (1-31) humana	Digestão por Arg-C	66
MFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDM	α (32-92) humana		
VDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDFKFLASVSTVLTISKYR	α (93-141) humana		
VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGR	β (1-30) humana		
LLVVYPWTQR	β (31-40) humana		
FFESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLAFAFSDGLAHLAHLNKGTFATLSELHCDKLHVDPENFR	β (41-104) humana		
LLGNVLCVLAHFGKEFTPPVQAAYQKVAVAGVANALAHKYH	β (105-146) humana		
VLSAADKGNVKAAGWKVGGHAAE	α (1-23) bovina	Digestão por pepsina	66
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDM	α (33-76) humana		
VLSPADKTNVKAAGWKVGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGK-KVADALTNVAHVDDMR	α (1-76) humana		
PNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDFKFLASVSTVLTISKYR	α (77-141) humana	Clivagem por brometo de cianogênio	67
VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGRLLLVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVM	β (1-55) humana		
GNPKVKAHGKKVLAFAFSDGLAHLAHLNKGTFATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAH-HFGKEFTPPVQAAYQKVAVAGVANALAHKYH	β (56-146) humana		
VTLASHLPSDFTPAVHASLDFKFLANVSTVL	α (107-136) bovina	Digestão por pepsina	68
VTLASHLPSDFTPAVHASLDFKFLANVSTVLTISKYR	α (107-141) bovina		
STVLTISKYR	α (133-141) bovina	Digestão por pepsina	69
TSKYR	α (137-141) bovina		
QADFQKVAVAGVANALAHRYH	β (126-145) bovina		

Tabela 3. continuação

Peptídeo	Fragmento	Obtenção <i>in vitro</i>	Referência
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERM	α (1-32) bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEAL	α (1-29) bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEA	α (1-28) bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAE	α (1-27) bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEY	α (1-23) bovina		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	α (33-98) bovina		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	α (33-97) bovina		
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	α (34-98) bovina		
FPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	α (36-97) bovina		
PTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	α (37-98) bovina		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDL	α (33-83) bovina		
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDL	α (34-83) bovina		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALT	α (33-66) bovina		
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALT	α (34-66) bovina		
FLSFPTTKTYFPHF	α (33-46) bovina	Digestão por pepsina	70
FLSFPTTKTYFPH	α (33-45) bovina		
LSFPTTKTYFPHF	α (34-46) bovina		
FPTTKTYFPH	α (36-45) bovina		
FPTTKTYFPHF	α (37-46) bovina		
VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	α (107-141) bovina		
VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	α (107-136) bovina		
VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVS	α (107-133) bovina		
STVLTSKYR	α (133-141) bovina		
SKYR	α (137-141) bovina		
ARNFGKFFTPVLQADFQKV VAGVANALAHRYH	β (114-145) bovina		
FTPVLQADFQKV VAGVANALAHRYH	β (121-145) bovina		
QADFQKV VAGVANALAHRYH	β (126-145) bovina		
LAHRYH	β (140-145) bovina		
MLTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL	β (1-30) bovina		
MLTAEEKAAVTA	β (1-13) bovina		
KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAA	α (40-63) bovina	Digestão enzimática	71
ADFQKV VAGVANALAHRYH	β (127-145) bovina		
KYR	α (139-141) bovina	Digestão por pepsina	72
(H)LDDLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKLLGNLVVV LARNFGKEFTPV L	β 77-125 bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF	α 1-46 bovina		
(L)TKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSLL	α 67-106 bovina		
(L)LVTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	α 106-141 bovina		
(L)VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	α 107-141 bovina		
(H)LDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSL	α 73-105 bovina		
(L)ARNFGKFFTPVLQADFQKV VAGVANALAHRYH	β 114-145 bovina		
(L)SAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSF	α 3-36 bovina		
(M)LTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRLLVVY	β 2-34 bovina		
(L)ASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR	α 110-141 bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSF	α 1-33 bovina		
(F)LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAA	α 34-65 bovina		
(A)HGKVLDSFSNGMKHLDDLKGTFAALSELH	β 62-91 bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERM	α 1-32 bovina		
MLTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL	β 1-30 bovina	Digestão por pepsina	73
(L)VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	α 107-136 bovina		
(D)DLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKL	β 75-104 bovina		
(L)VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVS	α 107-133 bovina		
(D)LHAHKLRVDPVNFKLLSHSLLVTL	α 86-105 bovina		
(F)AALSELHCDKLHVDPENFKLL	β 85-105 bovina		
(L)VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	α 107-128 bovina		
(L)QADFQKV VAGVANALAHRYH	β 126-145 bovina		
(L)TKAVEHLDDLPGALSELSDL	α 67-86 bovina		
(P)VNFKLLSHSLL	α 96-106 bovina		
(L)ARNFGKFFTPV	β 114-124 bovina		
(F)KLLSHSLL	α 99-106 bovina		
(F)KLLSHSL	α 99-105 bovina		
(K)LLSHSL	α 100-105 bovina		
(L)TSKYR	α 137-141 bovina		

hemoglobina se deu em 1958 em que extratos de eritrócitos mostraram atividade *in vitro* contra bactérias Gram-negativas. No entanto, somente em 1999 é que foi descrita a geração *in vivo* de uma hemocidina. De fato, o nosso grupo de pesquisa participou do isolamento e identificação do fragmento Hb33-61 da cadeia α da hemoglobina bovina, presente no conteúdo intestinal do carrapato *Boophilus microplus*.⁵⁸ Como é sabido, os carrapatos são capazes de transmitir uma série de patógenos a seus hospedeiros, o que tem causado um grande impacto econômico mundial. Uma vez que os parasitas adquirem diversos microrganismos durante sua alimentação sanguínea, o seu intestino deve apresentar sistemas eficientes de defesa. Componentes importantes da imunidade intestinal podem incluir fragmentos derivados da hidrólise química ou enzimática da hemoglobina.^{74,75}

Sabendo que a amidagem no C-terminal de um peptídeo leva a uma maior resistência à ação de proteases e pode potencializar a sua atividade,⁵³ em colaboração com outro pesquisadores brasileiros, sintetizamos o análogo amidado do Hb33-61 (Hb33-61a), que se mostrou ainda mais ativo do que o natural contra bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus* A270, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus epidermidis*) e contra fungos (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*).⁵⁸

Estudos estruturais do Hb33-61a usando espectroscopias de dicroísmo circular (CD) e ressonância magnética nuclear de ^1H (^1H -RMN) revelaram um comportamento conformacional randômico em solução aquosa, mas em presença de micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS), o Hb33-61a apresentou dobras β na porção N-terminal (Lys⁴⁰-Phe⁴³) e (Ser⁴⁹-Ser⁵²) seguida de α -hélice no C-terminal (Ala⁵³-Ala⁶⁰). Análises adicionais de ^1H -RMN mostraram que quando essa hemocidina ligase a membranas biológicas, as regiões N- e C-terminal são capazes de se mover independentemente graças ao segmento Pro⁴⁴-Leu⁴⁸ que age como uma “dobradiça”.³⁴ Tal estruturação pode ser parcialmente responsável pela habilidade do peptídeo de permeabilizar a membrana microbiana, tal como tem sido proposto para outros AMPs.⁷⁶

Em seqüência e diante da relevância clínica de *Candida albicans*, fragmentos truncados do Hb33-61a nas formas acetiladas, amidadas ou com carboxilas livres foram sintetizados, purificados, caracterizados e testados frente à *Candida albicans* MDM8 (Tabela 4), tendo sido observado que os análogos amidados apresentavam maior atividade antifúngica em relação àqueles contendo carboxila livre. Além disso, o fragmento Hb40-61a mostrou ser o fragmento mínimo ativo para ação antifúngica do Hb33-61a e o mesmo comportamento conformacional na presença de micelas de SDS, como mostrado na Figura 3.³⁴

Posteriormente, o comportamento do Hb40-61a foi examinado na sua capacidade de interação com bicamadas lipídicas. O uso de modelos simplificados - vesículas unilamelares grandes (LUVs) - contendo 5-carboxifluoresceína ou pirenotetrassulfonato de sódio (PTS) no seu interior, permitiu demonstrar tal propriedade, já que foi observado

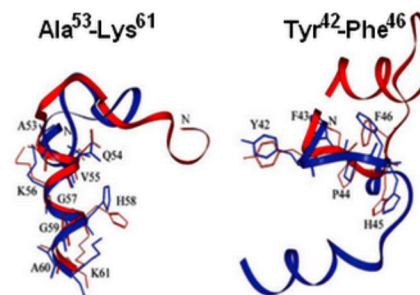


Figura 3. Sobreposição de regiões do Hb40-61a (azul) com as regiões que correspondem a elas na estrutura cristalina da cadeia α da hemoglobina bovina (vermelho) (adaptado da ref. 34)

que a exposição à hemocidina sintética levou ao extravasamento de ambos os fluorescentes para o meio em que foram colocadas as LUVs (dados ainda não publicados).⁷⁷

Em paralelo, foram concebidos e sintetizados novos análogos do Hb33-61, os quais foram ativos frente à *C. albicans* IAL2151 resistente à fluconazol, um candidacida convencional, e *Micrococcus luteus* A270. O Hb40-61a não apresentou sinergismo com fluconazol, mas apresentou uma cinética de morte rápida frente a *C. albicans* MDM8. Esta hemocidina sintética também demonstrou ser pouco hemolítica e capaz de causar morte de cepas específicas de *C. albicans*.⁷⁸

Recentemente, o Hb40-61a, seu análogo composto por D-aminoácidos (D-Hb40-61a) e o seu análogo marcado com 5(6) carboxifluoresceína (FAM-Hb40-61a) foram sintetizados por estratégia química alternativa. Depois de purificados e caracterizados, eles foram testados em eritrócitos humanos, tendo sido confirmada a sua baixa atividade hemolítica em meio de alta e baixa força iônica. O análogo D apresentou a mesma atividade antifúngica que o análogo L, evidenciando um mecanismo de ação não-estereoespecífico. Análises de células de *Candida* tratadas com FAM-Hb40-61a por microscopia confocal mostraram que em $\frac{1}{2}$ MIC e MIC o peptídeo deposita-se na membrana plasmática e é internalizado, respectivamente. Ensaios utilizando citometria de fluxo demonstraram: (1) que na MIC, cerca de 97% das células foram marcadas pelo peptídeo; (2) a influência negativa da alta força iônica em sua atividade antifúngica; e (3) que a internalização celular independe da temperatura, mas é afetada negativamente pela presença de NaN_3 , um inibidor da produção de ATP na mitocôndria. Ensaios de permeabilidade celular com *Syto* 09 (sonda fluorescente capaz de permeabilizar células com membranas intactas ou danificadas), iodeto de propídeo e Hb40-61a confirmaram danos progressivos à membrana plasmática de *C. albicans* com o aumento da concentração desta hemocidina. Experimentos usando DiBAC₄(5) (ácido bis-1,3-dibutilbarbitúrico pentametina oxonol) e de

Tabela 4. Código, seqüência, hidrofobicidade média e MICs dos peptídeos sintéticos Hb33-61a, Hb33-61, Hb33-52a, Hb40-61a, Hb40-61, Hb48-61a frente a *C. albicans* MDM8 dos peptídeos (adaptado da ref. 34)

Código	Seqüência	Hidrofobicidade média ^a	MIC ^b (μM)
Hb33-61a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	-0,70	3,12-6,25 (10,0-20,0) ^c
Hb33-61	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-OH	-0,70	12,5-25,0 (40,1-80,1) ^c
Hb33-52a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGS-NH ₂	-0,41	50,0-100,0 (116,4-232,8) ^c
Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH	-1,11	3,12-6,25 (7,54-15,1) ^c
Hb40-61	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-OH	-1,11	12,5-25,0 (30,1-60,3) ^c
Hb48-61a ^d	LSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	-0,98	>200,0 (>274,9) ^c

^aOs valores de hidrofobicidade média foram calculados de acordo com Kyte e Doolittle (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>). ^bOs MICs foram expressos no intervalo de concentração [a]-[b], em que [a] é a maior concentração testada com o microrganismo em crescimento e [b] é a menor concentração que causa 100% de inibição de crescimento. ^cOs valores em parênteses estão em $\mu\text{g}/\text{mL}$. ^dA forma de carboxila livre de Hb48-61a não foi incluída na tabela, uma vez que não apresentou atividade frente a *C. albicans*.

DPH (1,6 difenil 1,3,5 hexatrieno) revelaram que o Hb40-61a altera o potencial de membrana de *C. albicans* e afeta sua fluidez, respectivamente. Imagens preliminares das células tratadas e não tratadas com Hb40-61a por microscopia de força atômica sugeriram alterações nas células de *C. albicans* após tratamento com a hemocidina. Medidas preliminares do diâmetro médio das células de *C. albicans* revelaram que elas diminuem após o tratamento com o Hb40-61a, indício adicional de dano à membrana plasmática por formação de poros e extravasamento de conteúdo intracelular (dados parcialmente publicados^{79,80} ou em fase de publicação).

Uma vez que a alta suscetibilidade à proteólise e a citotoxicidade de muitos AMPs reduzem significativamente o seu potencial de uso terapêutico, estão sendo feitos testes preliminares de adsorção de um análogo truncado da hemocidina sintética Hb40-61a, o Hb40-58a³⁴ à nanopartículas derivadas de poliestireno (um sistema de *drug-delivery*). O arranjo peptídeo-nanopartícula resultante apresenta atividade antifúngica e baixa atividade hemolítica (dados publicados parcialmente⁸⁰ ou em fase de publicação).

Assim, foram obtidos fortes indícios de que o alvo do Hb40-61a é, de fato, a membrana plasmática das células de *Candida*, de que ele apresenta potencial de uso tópico para tratamento de candidíase e pode servir como modelo para o desenho de novas drogas antimicrobianas, peptídicas ou não, com propriedades ainda mais valiosas e índices terapêuticos elevados.

Milhares de AMPs – incluindo as hemocidinas derivadas da hemoglobina – já foram descobertos, isolados e estudados. Hoje, muitos têm elucidadas as suas características, bem como os seus alvos celulares, mecanismos de ação, estruturas, indução ou redução de resistência microbiana, potencialidades e dificuldades de uso em terapêutica. Entretanto, questões como métodos e custos de sua produção, susceptibilidade à proteólise, citotoxicidade e redução ou perda de atividade em alta força iônica ainda estão sendo amplamente estudados em laboratórios estrangeiros e brasileiros. As hemocidinas naturais podem ser sintetizadas e quimicamente modificadas com vistas a ampliar tal conhecimento e gerar análogos peptídicos ou peptideomiméticos com potencial de uso para diminuir a alta taxa de mortalidade decorrente das infecções microbianas.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPq, CAPES, RUSP e a todos os colaboradores dos nossos estudos de hemocidinas derivadas da hemoglobina bovina citados neste artigo de revisão.

REFERÊNCIAS

- Peters, B. M.; Shirtliff, M. E.; Jabra-Rizk, M. A.; *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, 1.
- Perlin, D. S. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*, 1st ed. Springer: New York, 2010.
- Hultmark, D.; Steiner, H.; Rasmuson, T.; Boman, H. G.; *Eur. J. Biochem.* **1980**, *106*, 7.
- Patterson-Delafield, J.; Szslarek, D.; Martinez, R. J.; Lehrer, R. I.; *Infect. Immunol.* **1981**, *31*, 723.
- Cederlund, A.; Gudmundsson, G. H.; Agerberth, B.; *FEBS J.* **2011**, *278*, 3942.
- Lai, Y.; Gallo, R. L.; *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 131.
- Marr, A.K.; Gooderham, W.J.; Hancock, R.E.W.; *Curr. Opin. Pharm.* **2006**, *6*, 468.
- Bosch, T.C.G.; Augustin, R.; Anton-Erxleben, F.; Fraune, S.; Hemmrich, G.; Zill, H.; Rosenstiel, P.; Jacobs, G.; Schreiber, S.; Leippe, M.; Stanisak, M.; Grotzinger, J.; Jung, S.; Podschun, R.; Bartels, J.; Harder, J.; Schoder, J. M.; *Dev. Com. Immunol.* **2009**, *33*, 559.
- Silva, P. I.; Daffre, S.; Bulet, P.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 33464.
- Zasloff, M.; *Nature* **2002**, *415*, 389.
- Nijnik, A.; Hancock, R. E. W.; *Emerg. Health Threats J.* **2009**, *2*, 1.
- Fernandez-Lopez, S.; Kim, H.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, I.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. M.; Ghadiri, M. R.; *Nature* **2001**, *142*, 452.
- Steiberg, D. A.; Hurst, M. A.; Fujii, C. A.; Kung, A. H.; Ho, J. F.; Cheng, F. C.; Loury, D. J.; Fiddes, J. C.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1738.
- Matsuzaki, K.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1788*, 1687.
- Peschel, A.; Otto, M.; Jack, R. W.; Kalbacher, H.; Jung, G.; Gotz, F.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8405.
- Harris, M.; Mora-Montes, H. M.; Gow, N. A. R.; Coote, P. J.; *Microbiol.* **2009**, *155*, 1058.
- Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Harada, M.; Fujii, N.; Miyajima, K.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, *1327*, 119.
- Klis, F. M.; Groot, P.; Hellingwerf, K.; *Med. Mycol.* **2001**, *39*, 1.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Principles of Biochemistry*. 4th ed. Freeman: New York, 2005.
- Hitchcock, C. A.; Pye, G. W.; Troke, P. F.; Johnson, E. M.; Warnock, D. W.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1962.
- Van der Rest, M. E.; Kamminga, A. H.; Nakano, A.; Anraku, Y.; Poolman, B.; Konings, W. N.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1995**, *59*, 304.
- Pandey, B. K.; Ahmad, A.; Asthana, N.; Azmi, S.; Srivastava, R. M.; Srivastava S.; Verma, R.; Vishwakarma, A. L.; Ghosh, J. K.; *Biochemistry.* **2010**, *49*, 7920.
- Verly, R. M.; Rodrigues, M. A.; Daguastanli, K. R. P.; Denadai, A. M. L.; Cuccovia, I. M.; Bloch JR, C.; Frézard, F.; Santoro, M. M.; Pilo-Veloso, D.; Bemquerer, M. P.; *Peptides.* **2008**, *29*, 15.
- Cabrera, M. P. S.; Costa, S. T. B.; Souza, B. M.; Palma, M. S.; Ruggiero, J. R.; Ruggiero Neto, J.; *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 879.
- Crusca JR, E.; Rezende, A. A.; Marchetto, R.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Fontes, W.; Castro, M. S.; Cilli, E.; *Biopolymers.* **2010**, *86*, 41.
- Calderon, L. A.; Silva, A. A. E.; Ciancaglini, P.; Stábeli, G.; *Amino acids.* **2011**, *40*, 29.
- Bozelli, J. C.; Sasahara, E. T.; Pinto, M. R. S.; Nakaie, C. R.; Schreier, S. *Chem. Phys. Lipids.* **2012**, *165*, 365.
- Rádis-Baptista G; Kerkis I.; *Curr Pharm Des.* **2011**, *17*, 4351.
- Machado, A.; Liria, C.W.; Proti, P.B.; Remuzgo, C.; Miranda, M. T. M.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 781.
- Loffredo, C.; Assunção, N. A.; Miranda, M. T. M.; *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *611*, 165.
- Remuzgo, C.; Andrade, G. F. S.; Temperini, M. L. A.; Miranda, M. T. M.; *Biopolymers* **2009**, *92*, 65.
- Pereira, L. S.; Silva Jr., P. I.; Miranda, M. T. M.; Almeida, I. C.; Naoki, H.; Konno, K.; Daffre, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *352*, 953.
- Fázio, M. A.; Jouvensal, L.; Vovelle, F.; Bulet, P.; Miranda, M. T. M.; Daffre, S.; Miranda, A.; *Biopolymers* **2006**, *88*, 386.
- Machado, A.; Sforça, M. L.; Miranda, A.; Daffre, S.; Pertinhez, T. A.; Spisni, A.; Miranda, M. T. M.; *Biopolymers* **2007**, *88*, 413.
- Toke, O.; *Biopolymers* **2005**, *80*, 717.
- Fischer, R.; Mader, O.; Jung, G.; Brock, R.; *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 653.
- Kim, D. H.; Lee, D. G.; Kim, K. L.; Lee, Y.; *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 4449.
- Taylor, B. N.; Rajeshwari, R. M.; Yamada, T.; Lekmine, F.; Chistov, K.; Chakrabaty, A. M.; Green, A.; Bratescu, L.; Shilkaitis, A.; Beattie, C. W.; Gupta, T. K.; *Cancer Res.* **2009**, *2*, 546.
- Park, C.; Lee, D. G.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *394*, 170.
- Andersson, D. I.; Hughes, D.; *Nature* **2010**, *8*, 260.
- McAdam, A. L.; Hooper, D.; DeMaria, A.; Limbago, B. M.; O'Brien, T. F. McCaughey, B.; *Clin. Chem.* **2012**, *58*, 1182.

42. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c13443804478bef68eefc7d15359461/resolucao+antibioticos.pdf?MOD=AJPERES>, acessada em Outubro 2012.
43. Levy, S. B.; Marshall, B.; *Nature* **2004**, *10*, S122.
44. Pfaller, M. A.; *Am. J. Med.* **2012**, *125*, S3-S13.
45. Kanafani, Z. A.; Perfect, J. R.; *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, 120.
46. React, 2008. <http://www.reactgroup.org/uploads/publications/react-publications/economic-aspects-of-antibiotic-resistance>, acessada em Agosto de 2012.
47. Menzlin, J.; Meyers, J. L.; Friedman, M.; Korn, J. R.; Perfect, J. R.; Langston, A. A.; Danna, R. P.; Papadopoulos, G.; *Am. J. Infect. Control.* **2011**, *39*, 15.
48. Zilberberg, M. D.; Shorr, A. F.; Kollef M. H.; *Inf. Control Hosp. Epidemiol.* **2008**, *29*, 978.
49. Colombo, A. L.; Guimarães, T.; Silva, L. R. B. F.; Monfardini, L. P. A.; Cunha, A. K. B.; Rady, P.; Alves, T.; Rosas, R.; *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2007**, *28*, 570.
50. Rossi, F.; *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *52*, 1138.
51. Papon, N.; Noel, T.; Florent, M.; Gibot-Leclerc, S.; Jean, D.; Chastin, C.; Villard, J.; Chapeland-Leclerc, F.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 369.
52. Wiesner, J.; Vilcinskas, A.; *Virulence* **2010**, *1*, 440.
53. Machado, A.; Fázio, M. A.; Miranda, A.; Daffre, S.; Machini, M. T.; *J. Pept. Sci.* **2012**, *18*, 588.
54. Mogi, T.; Kita, K.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3821.
55. Mak, P.; Wójcik, K.; Silberring, J.; Dubin, A.; *Antonie van Leeuwenhoek – J. Microbiol.* **2000**, *77*, 197.
56. Mak, P.; Wójcik, K.; Wicherek, L.; Suder, P.; Dubin, A.; *Peptides* **2004**, *25*, 1839.
57. Sheshadri, P. Abraham, J.; *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2012**, *6*, 896.
58. Fogaça, A. C.; Silva Jr., P. I.; Miranda, M. T.; Bianchi, A. G.; Miranda, A.; Ribolla, P. E.; Daffre, S.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25330.
59. Nakajima, Y.; Ogihara, K.; Taylor, D.; Yamakawa, M.; *J. Med. Entomol.* **2003**, *40*, 78.
60. Liepke, C.; Bacmann, S.; Heine, C.; Breithaupt, N.; Standker, L.; Forssmann, W. G.; *J. Chrom. B.* **2003**, *791*, 345.
61. Brown, A. G.; Leite, R. S.; Engler, A. J.; Discher, D. E.; Strauss III, J. F.; *Peptides* **2006**, *27*, 1794.
62. Tharp, S. M. S.; Ackermann, M. R.; Gallup, J. M.; Brogden, K. A. *The IADR/AADR/CADR 85th General Session and Exhibition*. New Orleans, Estados Unidos, 2007.
63. Deng, L.; Pan, X.; Wang, Y.; Wang, L.; Zhou, X. E.; Li, M.; Feng, Y.; Wu, Q.; Wang, B.; Huang, N.; *Hum. Reprod.* **2009**, *24*, 211.
64. Hu, J.; Xu, M.; Hang, B.; Wang, L.; Wang, Q.; Chen, J.; Song, T.; Fu, D.; Wang, Z.; Wang, S.; Liu, X.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *27*, 767.
65. Belmonte, R.; Cruz, C. E.; Pires, J. R.; Daffre, S.; *Peptides* **2012**, *37*, 120.
66. Froidevaux, R.; Krier, F.; Nedjar-Arroume, N.; Vercaigne-Marko, D.; Kosciarz, E.; Ruckebusch, C.; Dhulster, P.; Guillochon, D.; *FEBS Lett.* **2001**, *491*, 159.
67. Parish, C. A.; Jiang, H.; Tokiwa, Y.; Berova, N.; Nakanishi, K.; McCabe, D. Zuckerman, W.; Xia, M.; Gabay, J.E.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 377.
68. Daoud, R.; Dubois, V.; Bors-Dodita, L.; Nedjar-Arroume, N.; Krier, F.; Chihib, N. E.; Mary, P.; Kouach, M.; Briand, G.; Guillochon, D.; *Peptides*, **2005**, *26*, 713.
69. Nedjar-Arroume, N.; Dubois-Delval, V.; Miloudi, K.; Daoud, R.; Krier, F.; Kouach, M.; Briand, G.; Guillochon, D.; *Peptides* **2006**, *27*, 2082.
70. Nedjar-Arroume, N.; Dubois-Delval, V.; Adje, E. Y.; Traisnel, J.; Krier, F.; Mary, P.; Kouach, M.; Briand, G.; Guillochon, D.; *Peptides* **2008**, *29*, 969.
71. Cruz, C. E.; Fogaça, A. C.; Nakayasu, E. S.; Angeli, C.B.; Belmonte, R.; Almeida, I. C.; Miranda, A.; Miranda, M. T. M.; Tanaka, A. S.; Braz, G. R.; Craik, C. S.; Schneider, E.; Caffrey, C. R.; Daffre, S.; *Parasit. Vectors* **2010**, *3*, 63.
72. Catiau, L. Traisnel, J.; Chihib, N-E.; Flem, G. L.; Blanpain, A.; Melnyl, O.; Guillochon, D.; Nedjar-Arroume, N.; *Peptides* **2011**, *32*, 1463.
73. Adje, E. Y.; Balti, R.; Kouach, M.; Dhulster, P.; Guillochon, D.; Nedjar-Arroume, N.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *49*, 143.
74. Sforça, M. L.; Machado, A.; Figueredo, R. C.; Oyama, S., Silva Jr., F. D.; Miranda, A.; Daffre, S.; Miranda, M. T. M.; Spisni, A.; Pertinhez, T. A.; *Biochemistry* **2005**, *44*, 6440.
75. Cruz, C. E.; Daffre, S.; *Revista da Biologia* **2011**, *6*, 17.
76. Gazit, E.; Lee, W. J.; Brey, P. T.; Shai, Y.; *Biochemistry* **1994**, *33*, 10681.
77. Perez, K. R.; Pisco, T. B.; Nogueira, E.; Miranda, M. T. M.; Cuccovia, I. M.; Resumos da XXXVIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia, Brasil, 2009, S-24.
78. Nogueira, E.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 2007.
79. Carvalho, L. A. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2012.
80. Carvalho, L. A. C.; Remuzgo, C.; Machini, M. T.; *Proc. 32nd Eur. Pept. Symp.* Megaron Athens, Greece, 2012.