

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Fighting bacteria using selective drugs for membranes

Versão Pública

Susana Filipa Almeida Dias

Dissertação
Mestrado em Bioquímica
Especialização: Bioquímica Médica

Orientadores:
Professor Doutor Miguel Augusto Rico Botas Castanho
Professora Doutora Ana Isabel Abrantes Coutinho

2015

RESUMO

Os antibióticos são fármacos utilizados no tratamento e prevenção de infecções causadas por bactérias ou fungos. Devido à sua elevada eficácia, baixo custo e fácil acesso, as últimas décadas foram marcadas pelo uso excessivo destes fármacos. Como consequência, bactérias e fungos acabaram por desenvolver resistência aos antibióticos convencionais. O desenvolvimento de mecanismos de resistência e a propagação de estirpes resistentes a nível mundial ameaçam a saúde pública de todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), a estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) foi, em 2005, a principal causa das 94 000 infecções hospitalares nos Estados Unidos da América, de que resultaram 19 000 mortes. Mais recentemente, em 2013, foram identificados 480 000 novos casos de infecção pela estirpe multi-resistente *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) em 100 países. Assim sendo, existe uma necessidade crescente de desenvolver novos e eficazes agentes antimicrobianos, sobretudo com mecanismos de ação diferentes dos usados pelos antibióticos convencionais. Só desta forma será possível garantir que, num futuro próximo, existirão alternativas eficazes para curar infecções graves e evitar, por exemplo, que intervenções médico-cirúrgicas, mesmo as mais simples, se tornem procedimentos de alto risco.

De acordo com o seu mecanismo de ação, os antibióticos podem ser classificados como bacteriostáticos, quando inibem o crescimento bacteriano, ou bactericidas, quando causam a morte das bactérias.

Os péptidos antimicrobianos (AMPs) têm ganho bastante visibilidade nas últimas décadas. Este grupo de péptidos está presentes em grande parte dos organismos vivos, desde bactérias, fungos, plantas e diversos animais. Além disso, são elementos fundamentais da imunidade inata da maioria dos organismos multicelulares. Ao contrário dos antibióticos convencionais, os péptidos antimicrobianos têm um largo espectro de ação contra bactérias, fungos e vírus, atuando através de mecanismos frequentemente relacionados com a disrupção de membranas, ao contrário dos antibióticos convencionais cujos alvos principais são processos metabólicos intracelulares. Vários estudos indicam que o desenvolvimento de resistência bacteriana contra AMPs é muito difícil porque as lesões nas membranas lipídicas são dificilmente reparáveis. Desta forma, os péptidos antimicrobianos têm sido propostos como solução

para contornar a problemática associada à crescente resistência bacteriana. Em termos gerais, os péptidos antimicrobianos são caracterizados por serem pequenos (11 a 50 resíduos de aminoácidos), possuírem carga global positiva devido à presença de aminoácidos carregados positivamente, tais como lisinas e argininas, e por adquirirem uma estrutura anfipática que os torna solúveis em ambientes aquosos sem impedir a sua interação com membranas.

Os péptidos translocadores de membranas (CPPs) são, tal como os AMPs, um grupo de péptidos bioativos em membranas. Estas moléculas são capazes de translocar membranas biológicas sem as destruir, e por isso têm sido utilizados como vetores de transporte de outras moléculas para o interior das células. Os CPPs partilham várias características estruturais com os AMPs, como a presença de cargas positivas em excesso e o facto de ambos serem moléculas anfipáticas, o que tem impulsionado o estudo de CPPs como possíveis AMPs, e vice-versa.

O principal objetivo deste trabalho foi validar experimentalmente a hipótese de que as proteínas estruturais de vírus são uma fonte rica em sequências de potenciais péptidos antibacterianos. A atividade antibacteriana de dezasseis AMPs e sete CPPs obtidos a partir de proteínas estruturais de diferentes vírus, foi determinada em quatro estirpes bacterianas, duas Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA), e duas Gram-negativas, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. As estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram selecionadas para este estudo pois são frequentemente utilizadas como estirpes de referência para Gram-positiva e Gram-negativa, respetivamente. A estirpe *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* ATCC 33591 foi selecionada pois, além de representar uma estirpe cujas infeções têm taxas de mortalidade muito elevadas, permite introduzir uma bactéria resistente no estudo. A estirpe *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi testada uma vez que representa a principal bactéria Gram-negativa causadora de infeções em ambientes hospitalares. Através da determinação da concentração mínima inibitória (MIC), três péptidos revelaram elevada atividade antibacteriana contra todas as estirpes testadas: o vAMP 059, com valores de MIC entre 0.78 μM e 6.25 μM ; o vCPP 0769, com valores de MIC entre 3.13 μM e 25 μM ; e o vCPP 2319, com valores de MIC entre 1.56 μM e 3.13 μM . Para os três péptidos mais ativos foi determinada a concentração mínima bactericida (MBC). O péptido vCPP 2319 revelou ser bactericida contra todas as estirpes testadas, com um valor de MBC de 3.13 μM . O péptido vAMP

059 mostrou ter uma ação bacteriostática contra *Escherichia coli* ATCC 25922, com um valor de MBC igual a 25 µM, mas bactericida para as restantes bactérias testadas, com valores de MBC entre 1.56 µM e 6.25 µM. Por fim, o péptido vCPP 0769 revelou ser bactericida contra as duas estirpes Gram-negativas testadas, com valores de MBC entre 50 µM e 6.25 µM, mas bacteriostático contra as duas estirpes Gram-positivas, com um valor de MBC superior a 100 µM. Para os péptidos vAMP 059 e vCPP 2319, com ação bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, determinou-se a cinética de morte. Para tal, foram realizados dois métodos distintos: 1) Um método convencional baseado na contagem de colónias bacterianas obtidas após diferentes tempos de atuação de cada péptido. Para este ensaio, testou-se as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC; 2) Um método inovador que permite seguir a cinética de morte bacteriana em tempo real por citometria de fluxo através da marcação de bactérias com o kit de viabilidade celular “live/dead”. Uma vez que as sondas que constituem o kit “live/dead” permitem distinguir rapidamente bactérias vivas, com a membrana intacta, de bactérias mortas, com a membrana permeabilizada, este método também permite determinar se os péptidos têm capacidade de permeabilizar a membrana bacteriana. Para este ensaio testou-se o efeito dos péptidos na bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De acordo com os resultados obtidos pelo método convencional, o péptido vAMP 059 revelou atuar por um mecanismo de morte rápido para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, conseguindo matar 99.9% das bactérias em 5 minutos, e para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, conseguindo matar 99.4% das bactérias em 2 horas. O ensaio da citometria de fluxo confirmou uma cinética de morte rápida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e além disso, provou que o péptido vAMP 059 causa permeabilização da membrana celular desta estirpe. Relativamente ao péptido vCPP 2319, e de acordo com o método baseado na contagem de colónias, a sua cinética de morte também revelou ser rápida para as duas estirpes testadas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, conseguindo matar 98.8% e 99.5% da população bacteriana, respetivamente, ao fim de 4 horas de atuação. O ensaio de citometria confirmou uma cinética de morte rápida para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e estabeleceu que o péptido vCPP 2319 atua por um mecanismo de morte baseado na permeabilização da membrana desta estirpe.

Os dados obtidos permitem concluir que os vírus são fontes de péptidos antibacterianos, sendo que se encontrou um AMP com elevada atividade antibacteriana.

Também se confirmou que a dicotomia entre CPPs e AMPs é ténue; de uma biblioteca de sete CPPs, dois CPPs revelaram elevada atividade antibacteriana. Os três AMPs encontrados têm atividade elevada e um espectro de ação alargado, embora com modos de atuação diferentes.

Palavras-Chave: Péptidos Antimicrobianos; Concentração Mínima Inibitória; Concentração Mínima Bactericida; Cinética de Morte; Citometria de Fluxo.