

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**Laura Marise de Freitas**

**COMBINAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA A PEPTÍDEOS  
ANTIMICROBIANOS: EFEITOS E MECANISMOS**

**Araraquara**

**2018**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**Laura Marise de Freitas**

**COMBINAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA A PEPTÍDEOS  
ANTIMICROBIANOS: EFEITOS E MECANISMOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana

**Araraquara**

**2018**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

F888o Freitas, Laura Marise de  
Combinação da terapia fotodinâmica a peptídeos antimicrobianos: efeitos e mecanismos / Laura Marise de Freitas. – Araraquara, 2018.  
98 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração em Microbiologia.

Orientador: Carla Raquel Fontana.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Peptídeos antimicrobianos. 3. Terapia combinada. 4. Azul de metileno. 5. Clorina-e6. 6. Curcumina. 7. Enterococcus faecalis. I. Fontana, Carla Raquel, orient. II. Título.

CAPE3: 40300005



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMBINAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA A PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS: EFEITOS E MECANISMOS

AUTORA: LAURA MARISE DE FREITAS

ORIENTADORA: CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: MICROBIOLOGIA pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MAURICIO DA SILVA BAPTISTA (membro titular participante por videoconferência)  
Departamento de Bioquímica / Universidade de São Paulo - USP - São Paulo

Profa. Dra. ANA CLAUDIA PAVARINA  
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. DENISE MARIA ZECELL (membro titular participante por videoconferência)  
Laboratório de Biofotônica / Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleraes- IPEN/CNEN - SP

Araraquara, 23 de agosto de 2018



**DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA**

DISCENTE: LAURA MARISE DE FREITAS

TÍTULO DA TESE: COMBINAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA A PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS:  
EFEITOS E MECANISMOS

DATA: 23/08/2018

APROVADO

REPROVADO

PARECER A SER EMITIDO NO MOMENTO DA DEFESA :

---

---

---

---

---

---

Araraquara, 23 de agosto de 2018.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. MAURICIO DA SILVA BAPTISTA  
Membro Titular participante por meio de videoconferência



**DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA**

DISCENTE: LAURA MARISE DE FREITAS

TÍTULO DA TESE: COMBINAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA A PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS:  
EFEITOS E MECANISMOS

DATA: 23/08/2018

APROVADO

REPROVADO

PARECER A SER EMITIDO NO MOMENTO DA DEFESA :

A aluna foi arguida sobre a irradiância e exposição radiante utilizadas, assim como sobre os métodos de análise dos resultados de espectroscopia de absorção no infravermelho. Respondeu adequadamente e com propriedade todos questionamentos referentes a sua excelente e original tese.

Araraquara, 23 de agosto de 2018.

---

Profs. Dra. DENISE MARIA ZEZELL  
Membro Titular participante por meio de videoconferência

*Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me incentivaram intelectualmente e me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, pela educação, amor e carinho. À minha mãe, pelas conversas que sempre me mostram o caminho certo. Ao meu pai pelo apoio incondicional, mesmo estando longe.*

*Ao meu irmão Luís, que mesmo com todos os nossos desentendimentos esteve sempre presente para me apoiar.*

*Aos amigos e amigas que apoiaram os momentos difíceis e compartilharam as alegrias e conquistas, e aos colegas de laboratório, pelo convívio e ajuda neste trabalho.*

*Ao Esteban, cujo trabalho e apoio foi fundamental para o desenvolvimento desta tese.*

*Aos professores Eduardo e Kléber, pelas discussões científicas e por abrirem as portas de seus laboratórios, permitindo a realização deste trabalho.*

*Ao professor Thomas Mang, orientador do meu período de estágio no exterior, pela oportunidade e confiança.*

*A todos na State University of New York at Buffalo, por todo o apoio e amizade.*

*A todos os funcionários da FCFAr que trabalham diariamente para tornar nosso trabalho mais fácil: às meninas da limpeza, do café, o pessoal da portaria, da administração. Especialmente às funcionárias da seção de pós-graduação.*

*À FCFAr-UNESP, pelo apoio institucional.*

*À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho: processos nº 2014/24581-5 e 2016/18378-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).*

*À Deus, por ter colocado em meu caminho tantas pessoas boas e oportunidades.*

*Replace the fear of the unknown with curiosity.*

*- Penelope Ward*

## Combinação da terapia fotodinâmica a peptídeos antimicrobianos: efeitos e mecanismos

### RESUMO

Nos últimos anos, a Organização Mundial da Saúde vem alertando que a era pós-antibióticos é uma ameaça cada vez mais real. Além da resistência individual das células bacterianas, essas podem se tornar ainda mais tolerantes aos agentes antimicrobianos ao crescerem em biofilmes. A maior tolerância aos antibióticos observada nos biofilmes baseia-se principalmente na proteção das bactérias pela matriz polimérica extracelular autoproduzida, e nos diversos fenótipos de crescimento encontrados na estrutura, que podem ser refratários à ação os fármacos convencionais. Nesse cenário de crescente e disseminada resistência a antimicrobianos, a busca por novos fármacos e terapias alternativas se tornou crucial, especialmente aqueles que sejam capazes de eliminar os microrganismos resistentes, impedir o desenvolvimento de novas formas de resistência, e serem ativos contra biofilmes. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*) e os peptídeos antimicrobianos (PAM) ganham destaque nesse contexto, em especial para o tratamento de infecções localizadas. Entretanto, ambas as abordagens apresentam limitações terapêuticas quando empregadas individualmente. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos e mecanismos da combinação dos PAMs aureína 1.2 (AU) e seu dímero (AU)<sub>2</sub>K com a aPDT mediada pelos fotossensibilizadores (FS) azul de metileno (AM), clorina-e6 (Ce6) ou curcumina (CUR), usando como modelo a bactéria *Enterococcus faecalis*, em fase planctônica e biofilme. O dímero (AU)<sub>2</sub>K não apresentou atividade antibacteriana em fase planctônica, sendo a parte inicial do estudo conduzida, então, apenas com o monômero. Os resultados mostram que a combinação da aPDT com AU se provou capaz de eliminar *E. faecalis*, *in vitro*, com baixas concentrações de FS e peptídeo e menores doses de luz, em comparação às monoterapias. O efeito sinérgico foi observado apenas quando a AU foi associada à aPDT mediada por AM ou Ce6, não sendo encontrada vantagem na terapia combinada quando o FS era CUR, revelando um mecanismo dependente do FS. O efeito sinérgico entre AU e AM-PDT foi resultado de uma maior penetração do FS na bactéria em presença do peptídeo, ao passo que o efeito sinérgico entre AU e Ce6-PDT se deu por uma interação entre as moléculas que levou a uma maior instabilidade da membrana plasmática. O tratamento combinado também foi eficaz contra diferentes cepas, incluindo a eliminação completa de uma cepa de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, um resultado sem precedentes. O protocolo de terapia combinada foi testado quanto à sua capacidade de inibir a formação de biofilme de *E. faecalis*. Embora não apresente atividade contra bactérias em fase planctônica, o dímero (AU)<sub>2</sub>K foi incluído nos estudos com biofilmes, mostrando alta

capacidade de impedir a fase inicial do desenvolvimento dos biofilmes, tanto sozinho quanto combinado à aPDT. O monômero (AU) também apresentou atividade significativa para impedir que *E. faecalis* forme biofilme, particularmente quando combinado à Ce6-PDT. Outras espécies bacterianas também foram avaliadas, sendo os protocolos de combinação capazes de impedir a formação de biofilme por todas elas de forma significativa. Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo revelam que a combinação de aPDT com um PAM pode provocar a morte bacteriana com concentrações mínimas de FS e PAM e baixas doses de luz, o que, por sua vez, minimizaria os efeitos adversos no tecido do hospedeiro. Além disso, a capacidade de inibir a formação de biofilme por parte dessa abordagem demonstra seu potencial para impedir o estabelecimento de infecções crônicas, fortemente relacionadas a biofilmes microbianos. Essa abordagem sinérgica tem o potencial de eliminar infecções localizadas e, ao mesmo tempo, minimizar o uso de antimicrobianos sistêmicos e impedir o desenvolvimento de novos perfis de resistência.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; peptídeos antimicrobianos; terapia combinada; azul de metileno; clorina-e6; curcumina; *Enterococcus faecalis*.

## Combination of photodynamic therapy with antimicrobial peptides: effects and mechanisms

### ABSTRACT

In the past few years, the World Health Organization has been warning that the post-antibiotic era is an increasingly real threat. In addition to the individual resistance of bacterial cells, they may be even more tolerant to antimicrobial agents by growing in biofilms. The higher tolerance to antibiotics observed in biofilms is mainly based on the protection of bacteria by the self-produced extracellular polymeric matrix, and in the various growth phenotypes found in the structure, which may be refractory to the action of conventional drugs. In this scenario of increasing and widespread antimicrobial resistance, the search for new drugs and alternative therapies has become crucial, especially for those that are capable of eliminating resistant microorganisms, preventing the development of new forms of resistance, and are active against biofilms. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) and antimicrobial peptides (AMP) are highlighted in this context, especially for the treatment of localized infections. However, both approaches have therapeutic limitations when used individually. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects and mechanisms of the combination of the AMPs aurein 1.2 (AU) and its dimer (AU)<sub>2</sub>K with aPDT mediated by the photosensitizers (PS) methylene blue (MB), chlorine-e6 (Ce6) or curcumin CUR), using the bacteria *Enterococcus faecalis* as a model, in planktonic phase and biofilm. The dimer (AU)<sub>2</sub>K did not present antibacterial activity in planktonic phase, so the initial part of the study was conducted only with the monomer. The results show that the combination of aPDT with AU proved to be able to eliminate *E. faecalis*, *in vitro*, with low concentrations of PS and peptide and lower light doses, compared to the monotherapies. The synergistic effect was observed only when AU was associated with MB or Ce6-mediated aPDT, and no advantage was found in the combination therapy when the PS was CUR, revealing a PS-dependent mechanism. The synergistic effect between AU and MB-PDT was a result of a greater penetration of the PS in the bacterium in the presence of the peptide, whereas the synergistic effect between AU and Ce6-PDT was due to an interaction between the molecules that led to greater instability of the plasmatic membrane. The combination treatment was also effective against different strains, including a complete elimination of a strain of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, an unprecedented result. The combination therapy protocol was tested for its ability to inhibit *E. faecalis* biofilm formation. Although it did not present activity against planktonic bacteria, the (AU)<sub>2</sub>K dimer was included in the biofilm studies, showing high capacity to prevent the initial phase of biofilm development, both alone and combined with aPDT. The monomer AU also showed significant activity to prevent *E. faecalis* from forming biofilm, particularly when combined with Ce6-PDT. Other bacterial species were also evaluated, and the combination protocols were

able to prevent biofilm formation by all of them in a significant way. Taken together, the results obtained in this study reveal that the combination of aPDT with an AMP can lead to bacterial death with minimal concentrations of PS and AMP and low light doses, which in turn would minimize adverse effects on host tissue. In addition, the ability of this approach in inhibiting the formation of biofilms reveals its potential to prevent the establishment of chronic infections, strongly related to microbial biofilms. This synergistic approach has the potential to resolve localized infections while minimizing the use of systemic antimicrobials and preventing the development of new resistance profiles.

Keywords: photodynamic therapy; antimicrobial peptides; combination therapy; methylene blue; chlorin-e6; curcumin; *Enterococcus faecalis*.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AGT	Aglutinina de germe de trigo
ALT	Ácido lipoteicoico
AM	Azul de metileno
AM-PDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por AM
APF	3'-(p-aminofenil) fluoresceína
AU	Aureína 1.2
(AU) <sub>2</sub> K	Dímero C-terminal da aureína 1.2
BHI	Meio de cultura de infusão de cérebro e coração
CBM	Concentração bactericida mínima
Ce6	Clorina-e6
Ce6-PDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por Ce6
CUR	Curcumina
CUR-PDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por CUR
DC	Dicroísmo circular
DMSO	dimetilsulfóxido
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
IP	Iodeto de propídeo
LED	<i>Light-emitting diode</i>
LPC	lipofosfatidilcolina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NaOH	Hidróxido de sódio
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDT	Terapia fotodinâmica
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SPE	Substância polimérica extracelular
SOSG	<i>Singlet oxygen sensor green</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VRE	Enterococos resistente à vancomicina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações tipo I e tipo II na Terapia Fotodinâmica.....	20
Figura 2 – Estrutura dos peptídeos e mecanismos de ação dos PAM.....	24
Figura 3 – Fontes de luz e fotossensibilizadores.....	30
Figura 4 – Aparato utilizado para os experimentos de MAIR-IR.....	37
Figura 5 – Toxicidade dos fotossensibilizadores no escuro.....	41
Figura 6 – Terapia Fotodinâmica antimicrobiana.....	42
Figura 7 – Concentração bactericida mínima dos peptídeos.....	45
Figura 8 – Terapia fotodinâmica antimicrobiana combinada a aureína 1.2....	47
Figura 9 – Combinação dos fotossensibilizadores a aureína 1.2 no escuro...	48
Figura 10 – Internalização de fotossensibilizadores.....	50
Figura 11 – Geração de espécies reativas de oxigênio.....	52
Figura 12– Espectros de absorção e taxa de fotobranqueamento dos fotossensibilizadores.....	56
Figura 13 – Espectros de dicroísmo circular do peptídeo aureína 1.2.....	58
Figura 14 – Efeitos da clorina-e6 e aureína 1.2 sobre a membrana de <i>E.</i> <i>faecalis</i> .....	60
Figura 15 – Atividade da terapia combinada contra espécies de importância clínica.....	63
Figura 16 – Inibição da formação de biofilme de <i>E. faecalis</i> : viabilidade metabólica.....	66
Figura 17 – Biofilmes analisados por microscopia confocal.....	68
Figura 18 – Adesão ao substrato e espessura dos biofilmes.....	69
Figura 19 – Espectros MAIR-IR subtraídos do controle não tratado (regiões ii, iii e iv).....	72
Figura 20 – Espectros MAIR-IR subtraídos do controle não tratado (região i)	73
Figura 21 – Quantificação da matriz extracelular dos biofilmes.....	76
Figura 22 – Proliferação celular após o tratamento planctônico.....	77
Figura 23 – Interação dos peptídeos com o ácido lipoteicoico (ALT).....	80
Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (x10k).....	82

Figura 25 – Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (x30k).....	83
Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura dos filamentos induzidos por clorina-e6 (x15k).....	84
Figura 27 – Inibição da formação de biofilme de outras espécies bacterianas.....	86

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens da PDT.....	18
Tabela 2 - Soluções estoque e de trabalho dos fotossensibilizadores utilizados.....	29
Tabela 3 - Grupos de tratamento.....	31
Tabela 4 - Comprimentos de onda de excitação e emissão dos fotossensibilizadores.....	32
Tabela 5 - Parâmetros sub inibitórios da aPDT.....	40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1. Resistência bacteriana.....	15
1.2. Terapia Fotodinâmica.....	17
1.2.1. Mecanismo de ação.....	19
1.3. Peptídeos antimicrobianos.....	21
1.4. Terapia combinada.....	25
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. Cepas bacterianas.....	28
3.2. Meios de cultivo.....	28
3.3. Peptídeos antimicrobianos – aureína 1.2 e seu dímero, (AU) <sub>2</sub> K.....	28
3.4. Fontes de luz e Fotossensibilizadores.....	29
3.5. Terapia Fotodinâmica, tratamento com aureína 1.2 e terapia combinada	31
3.6. Internalização de fotossensibilizadores.....	32
3.7. Geração de ERO.....	32
3.8. Espectros de absorção.....	33
3.9. Fotobranqueamento.....	33
3.10. Dicroísmo Circular.....	34
3.11. Potencial zeta.....	34
3.12. Dano de membrana.....	35
3.13. Desenvolvimento de biofilme.....	35
3.14. Microscopia confocal.....	36
3.15. Espectroscopia de infravermelho com múltiplas atenuações.....	36
3.16. Quantificação de exopolissacarídeos.....	37
3.17. Proliferação celular.....	38
3.18. Interação com ácido lipoteicoico (LTA) .....	38
3.19. Microscopia eletrônica de varredura.....	38
3.20. Análise estatística.....	39
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Fase planctônica.....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Terapia Fotodinâmica antimicrobiana.....	40
4.1.2. Atividade dos peptídeos antimicrobianos.....	43
4.1.3. Terapia combinada.....	46

4.1.3.1. Viabilidade bacteriana frente aos tratamentos.....	46
4.1.3.2. Internalização de fotossensibilizadores.....	49
4.1.3.3. Geração de ERO.....	51
4.1.3.4. Espectros de absorção e fotobranqueamento dos FS.....	53
4.1.3.5. Dicroísmo circular.....	57
4.1.3.6. Potencial zeta e dano de membrana.....	59
4.1.3.7. Atividade da terapia combinada contra outras espécies.....	61
<b>4.2. Fase biofilme.....</b>	<b>64</b>
4.2.1. Inibição de formação de biofilme.....	64
4.2.2. Microscopia confocal.....	67
4.2.3. Espectroscopia de infravermelho com múltiplas atenuações (MAIR-IR)	70
4.2.4. Quantificação de EPS e ensaio de proliferação.....	74
4.2.5. Interação com ácido lipoteicoico.....	78
4.2.6. Microscopia eletrônica de varredura.....	81
4.2.7. Atividade de inibição de biofilme sobre outras espécies.....	87
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Resistência bacteriana

A resistência bacteriana a antimicrobianos pode ser classificada, de forma simplificada, em duas categorias: intrínseca e extrínseca. Resistência intrínseca se refere a uma habilidade inata da bactéria em impedir a ação do fármaco, o que pode se dar pela inativação da molécula (por exemplo, pela ação de enzimas), pelo influxo diminuído e/ou efluxo aumentado ou pela baixa afinidade do alvo terapêutico pelo fármaco (COX; WRIGHT, 2013). A resistência adquirida, por outro lado, é consequência de respostas adaptativas da bactéria frente ao tratamento, o que pode se dar através de mutações, aumento da expressão do alvo molecular, ativação de vias compensatórias ou aquisição de genes exógenos (AMMOR et al., 2008; HOLOHAN et al., 2013).

Ainda, a capacidade de uma espécie em formar biofilmes é considerada uma das formas de tolerância a antimicrobianos mais desafiadoras da atualidade: a matriz extracelular produzida pela comunidade do biofilme é capaz de impedir o reconhecimento das bactérias pelos fagócitos e a ativação do sistema complemento (DOMENECH et al., 2013), além de se ligar a agentes antimicrobianos, bloqueando sua difusão, ou neutralizá-los, impedindo sua ação. A matriz polimérica também permite que o biofilme se desenvolva com uma arquitetura tridimensional, com várias camadas de crescimento bacteriano, gerando um gradiente de nutrientes e oxigênio que reduz drasticamente a taxa de crescimento das células nas camadas mais internas (BJARNSHOLT, 2013; HOBLEY et al., 2015; JONES; COCHRANE; PERCIVAL, 2015). Essa estratificação limita a ação dos antimicrobianos que tem seu mecanismo de inativação dependente de processos biológicos ativos, como a síntese da parede celular, por exemplo (HOBLEY et al., 2015; STREMPER; STREHMEL; OVERHAGE, 2015b). Ainda, o íntimo contato entre as células pertencentes à comunidade do biofilme favorece a transferência horizontal de genes de resistência, dificultando ainda mais a ação desses fármacos.

Desde a descoberta da penicilina o tratamento de infecções é baseado na quimioterapia antimicrobiana, mas seu uso está limitado pela crescente resistência dos microrganismos aos fármacos, em grande parte resultado do uso indevido e da prescrição inadequada de antibióticos. Já foram identificadas formas de resistência a todos os fármacos disponíveis no mercado, incluindo aqueles considerados último recurso, como cefalosporinas de quinta geração, carbapenêmicos e, mais recentemente, polimixinas. Adicionalmente, muitas cepas expressam múltiplos mecanismos de resistência, tornando o tratamento de infecções cada vez mais complexo e oneroso (KLEVENS et al., 2007; VENTOLA, 2015).

Dentre as cepas de maior relevância clínica nesse cenário se destacam as espécies do gênero *Enterococcus*, principalmente *E. faecalis* e *E. faecium*. Essas espécies gram-positivas são integrante da microbiota intestinal de humanos, mas também são uma das maiores causas de infecções nosocomiais no mundo (KAYAOGU; ORSTAVIK, 2004). A resistência a antibióticos apresentada especialmente por *E. faecalis* é cada vez maior, e cepas como o enterococos resistente à vancomicina (VRE) apresentam alta morbidade (ELIOPOULOS; GOLD, 2001). Ainda, a resistência à vancomicina é mediada por plasmídeos e transposons, elementos genéticos móveis facilmente compartilhados com outras bactérias, o que contribui disseminação de resistência (COURVALIN, 2006).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), infecções por bactérias resistentes afetam mais de 2 milhões de pessoas e provocam mais de 20 mil mortes por ano nos Estados Unidos e na União Europeia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A infecção provocada por cepas resistentes reduz drasticamente a probabilidade de um tratamento efetivo, elevando a morbidade e mortalidade de infecções comuns e os gastos de saúde associados, que chegam a cifras de bilhões por ano (FAIR; TOR, 2014; KLEVENS et al., 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Nos últimos anos a OMS tem alertado que a “era pós-antibióticos”, onde infecções comuns podem voltar a matar, é uma ameaça cada vez mais concreta; cirurgias, transplantes, quimioterapia do câncer, cuidados com neonatos prematuros e pacientes gravemente enfermos, são exemplos de áreas médicas que podem ser profundamente comprometidas nesse cenário (WORTHINGTON; MELANDER, 2013). E, embora a resistência bacteriana continue a surgir, a taxa de desenvolvimento de novos antibióticos diminuiu nas últimas três décadas, com nenhuma nova classe terapêutica significativa descoberta desde a década de 1980, um déficit de desenvolvimento atribuído à falta de incentivos econômicos e desafios regulatórios do setor farmacêutico (CASSIR; ROLAIN; BROUQUI, 2014; VENTOLA, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

A alarmante e disseminada resistência aos antibióticos disponíveis tornou imprescindível a busca por novos fármacos e/ou terapias alternativas que não apenas sejam capazes de eliminar os microrganismos resistentes, mas também possuam características que dificultem o desenvolvimento de novas formas de resistência. É nesse contexto que a terapia fotodinâmica e os peptídeos antimicrobianos têm ganhado destaque, sendo apontados como as mais promissoras alternativas aos fármacos antimicrobianos para o tratamento de infecções localizadas (BAHAR; REN, 2013; GIULIANI et al., 2010).

## 1.2. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT – *photodynamic therapy*) é uma modalidade terapêutica baseada na administração de um agente fotossensibilizador (FS) não-tóxico ao paciente com posterior exposição à luz de comprimento de onda específico em presença de oxigênio, provocando a morte das células-alvo via dano oxidativo (MROZ et al., 2011).

O uso associado de corantes e luz para o tratamento de doenças tem registro desde o Egito antigo, onde condições como psoríase e vitiligo eram tratadas com substâncias vegetais e a luz do sol (PATHAK; FITZPATRICK, 1992). Mas foi apenas no início do século XX que a terapia fotodinâmica moderna teve início, com as descobertas de O. Raab, H. von Tappeiner e A. Jesionek, que observaram inicialmente o efeito deletério do corante laranja de acridina sobre *Paramecium caudatum* após exposição à luz solar, e em seguida a ação tumoricida da eosina associada à luz branca em tumores de pele (SELLERA; SABINO; HAMBLIN, 2017). Em 1903, von Tappeiner e Jesionek cunharam o termo “ação fotodinâmica”.

Embora o efeito fotodinâmico tenha sido descoberto no campo da microbiologia, o emprego da PDT no tratamento de infecções sofreu um revés após a introdução dos antibióticos na clínica na década de 1940, ressurgindo nos últimos anos como uma terapia alternativa frente ao grande aumento da resistência bacteriana aos fármacos existentes (KHARKWAL et al., 2011). A PDT avançou principalmente a partir da década de 1970 no tratamento do câncer e outras doenças não-infecciosas, como vitiligo, degeneração da mácula e psoríase, com diversos protocolos clínicos aprovados para o tratamento de lesões pré-malignas e malignas (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

Por suas características, a PDT apresenta várias vantagens no tratamento de infecções, sumarizadas na Tabela 1, dentre as quais se destacam os mínimos efeitos adversos sistêmicos devido à sua dupla seletividade, resultando em tratamento da infecção de forma localizada (a irradiação precisa da área-alvo aumenta a seletividade da terapia, uma vez que somente na área irradiada ocorre o efeito fotodinâmico) e a redução do tempo de tratamento (BROWN; BROWN; WALKER, 2004; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009). Como toda terapia, porém, apresenta algumas limitações: funciona apenas no local irradiado pela luz, independentemente de o FS ter atingido várias regiões do corpo, o que a impossibilita de ser utilizada em casos de infecções generalizadas (BROWN; BROWN; WALKER, 2004; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009).

Tabela 1. Vantagens e desvantagens da Terapia fotodinâmica

	VANTAGENS	DESVANTAGENS
<b>Tratamento de infecções</b>	-Baixo custo	
	-Início de ação imediato (antimicrobianos podem levar dias)	-O efeito microbiano cessa com o fim da irradiação
	-Não exige adesão do paciente à terapia	-Pouca seletividade bactéria/célula do hospedeiro, dependente da carga do FS e do tempo de pré-irradiação
	-Elimina fatores de virulência secretados	-Impossibilidade de tratar infecções generalizadas
	-Tem ação sobre patógenos resistentes aos antimicrobianos	
	-Efeito deletério independe do estado metabólico da célula-alvo	

Fonte: DAI, T.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 6 (3-4), p. 170-88, 2009.

Diversas moléculas fotossensibilizadoras vêm sendo empregadas em estudos envolvendo a PDT antimicrobiana (aPDT), incluindo derivados fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina) e tetrapirrólicos (porfirinas, ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas), xantenos (rosa bengala e eritrosina B), triaurilmetanos (cristal violeta e verde malaquita), produtos naturais (hipericina, curcumina, riboflavina) e à base de metais (compostos de rutênio, ródio e irídio) (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). De forma geral, moléculas com carga líquida positiva são mais eficazes contra bactérias devido às interações eletrostáticas com a parede celular bacteriana. Moléculas neutras ou carregadas negativamente podem ter boa atividade contra gram-positivas, mas tem pouco ou nenhum efeito sobre gram-negativas (HAMBLIN; SABINO, 2016); entretanto, a combinação de um agente desestabilizador de membrana a um FS neutro ou aniônico pode melhorar sua eficácia fotodinâmica (ALVES et al., 2009).

Além das exigências em termos de carga, os FS devem apresentar outras características para serem considerados ideais, as principais sendo: (i) ser uma substância pura de composição conhecida, estável à temperatura ambiente e de fácil obtenção; (ii) não apresentar toxicidade significativa ao hospedeiro; (iii) ter alto rendimento ( $\Phi_{\Delta}$ ) de geração de oxigênio singlete; (iv) apresentar bandas de absorção intensas ( $\epsilon > 20.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), minimizando a dose de luz e concentração de FS necessárias para atingir o efeito fotodinâmico; (v) absorver luz em comprimento de onda na região do vermelho, vermelho profundo e infravermelho-próximo do espectro eletromagnético ( $\lambda = 600-900 \text{ nm}$ ), região conhecida como “janela óptica” por abranger os comprimentos de onda com maior capacidade de penetração tecidual por apresentarem menores índices de absorção por moléculas biológicas (e.g., proteínas com grupo prostético heme, melanina, água, gordura),

refração e espalhamento na interação com tecidos biológicos (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009; SABINO et al., 2016). Entretanto, comprimentos de onda menores, como a luz azul, por exemplo, também podem ser utilizados quando se objetiva o tratamento de lesões mais superficiais.

Para a ativação dos FS, diversas fontes de luz já foram descritas em estudos na literatura, as mais populares sendo os lasers e os sistemas à base de LED (*light-emitting diode*). Os LEDs são mais vantajosos em relação aos lasers por apresentarem melhor custo-benefício e maiores possibilidades de serem arranjados em configurações que permitem uma irradiação homogênea de grandes áreas. Independentemente do tipo de fonte, entretanto, é crucial que a luz seja entregue em baixa irradiância para evitar efeitos térmicos inespecíficos e manter a especificidade do efeito fotodinâmico sobre as células que preferencialmente acumulam o fármaco fotossensibilizador (RIBEIRO; SABINO, 2016).

### **1.2.1. Mecanismo de ação**

Três fatores atuam concomitantemente na PDT: o fotossensibilizador, a luz e o oxigênio. Quando o FS é excitado por luz de comprimento de onda específico sua interação com o meio pode ocorrer de duas formas, chamadas reações tipo I e II (Figura 1). Na reação tipo I, o FS no estado tripleto excitado transfere cargas ( $e^-$  ou  $H^+$ ) um substrato para dar origem a espécies radicalares. Já na reação tipo II, o FS tripleto excitado transfere energia para o oxigênio tripleto em seu estado fundamental, em um fenômeno chamado aniquilação tripleto-tripletto, formando oxigênio singleto como espécie excitada, que por sua vez é uma ERO altamente reativa e citotóxica. Ambas as reações geralmente ocorrem simultaneamente, e a relação entre esses dois processos depende principalmente do fotossensibilizador utilizado e da concentração de oxigênio no ambiente de reação (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; MACHADO, 2000; KHARKWAL et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011).

**FIGURA 1 – Reações tipo I e tipo II na Terapia Fotodinâmica.**

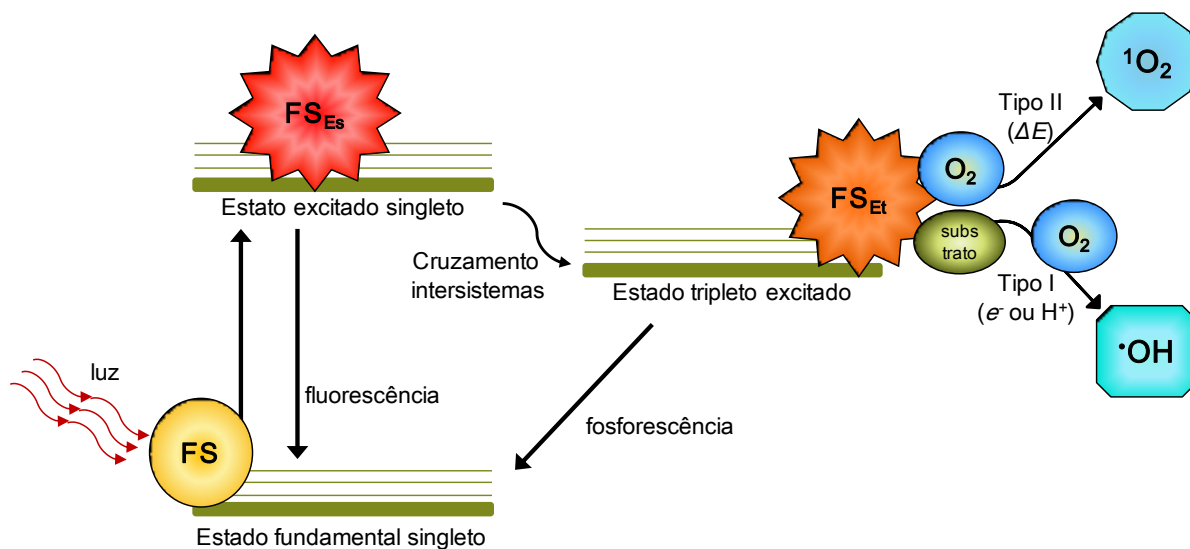


Diagrama de Jablonski esquemático mostrando o mecanismo de fotodinâmico de geração de EROs. Ao absorver luz o fotossensibilizador passa a seu estado singlete excitado. Após passar por cruzamento intersistemas, o FS passa para seu estado tripleto excitado de menor energia ( $T_1$ ), que por sua vez pode sofrer dois tipos de reação: transferência de carga (tipo I) ou transferência de energia (tipo II). O radical hidroxila representa um exemplo das espécies radicalares formadas na reação tipo I. FS: fotossensibilizador;  $FS_{Es}$ : FS estado excitado singlete;  $FS_{Et}$ : FS estado excitado tripleto;  $\cdot OH$ : radical hidroxila;  $^1O_2$ : oxigênio singlete. (elaborada pela autora)

Devido ao caráter múltiplo e não específico da morte provocada pela aPDT, o desenvolvimento de resistência por parte das células bacterianas é tido como improvável (AKILOV et al., 2006). O curto tempo de contato do fotossensibilizador com as bactérias e a ação fotodinâmica sobre diversas moléculas biológicas ao mesmo tempo (e.g., proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos) dificulta a expressão de fatores protetores, como proteínas de estresse, minimizando a possibilidade de surgimento de resistência adquirida (GIULIANI et al., 2010). Entretanto, estudos de Kohanski e colaboradores (KOHANSKI et al., 2007; KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010) demonstraram que antimicrobianos com atividade bactericida induzem a formação de ERO nas bactérias, independentemente de seus mecanismos de ação. Ainda, doses sub-letais desses antimicrobianos geram baixas concentrações de ERO que não levam à morte bacteriana, mas têm grande potencial em provocar mutações que levam à resistência (KOHANSKI; DEPRISTO; COLLINS, 2010). Ainda, diversos estudos têm apontado o desenvolvimento de resistência à PDT por células tumorais expostas a condições sub-letais da terapia (CASAS et al., 2011; DEWAELE et al., 2011; OLSEN et al., 2017). Diante desses dados, é preciso considerar que doses sub-letais desse tratamento também podem ter potencial para induzir resistência em bactérias.

Esse aspecto da aPDT tem sido investigado na última década, apesar dos estudos ainda serem escassos, e comumente controversos e/ou não-padronizados. Tavares e colaboradores (TAVARES et al., 2010) reportaram que mesmo após 10 ciclos consecutivos de inativação parcial e recuperação nenhuma das duas cepas avaliadas (*Vibrio fischeri* e *Escherichia coli*) desenvolveu resistência à aPDT, resultado similar ao encontrado em outros dois estudos (GIULIANI et al., 2010; LAURO et al., 2002). Por outro lado, os estudos de Nakonieczna e St. Denis e colaboradores demonstraram que, após a aPDT, há suprarregulação da enzima superóxido dismutase em *Staphylococcus aureus* (NAKONIECZNA et al., 2010) e de proteínas de choque térmico em *Streptococcus mutans* (NAKONIECZNA et al., 2010) e em *E. coli* (ST DENIS et al., 2011-Maio), indicando uma resposta regulatória frente à exposição à aPDT em condição sub-inibitória. Ainda, Park e colaboradores encontraram em *S. aureus* a super-expressão do regulador gênico acessório *Agr* (PARK et al., 2013), o qual está envolvido na resposta foto-oxidativa e foi relacionado à tolerância à aPDT. Pelo exposto, fica evidente que o desenvolvimento de resistência a doses sub-inibitórias de aPDT precisa ser mais profundamente investigado.

Independentemente da capacidade da aPDT de induzir resistência ser comprovada ou não, diversos estudos têm demonstrado que sua aplicação como parte de uma terapia combinada é mais eficaz na eliminação de patógenos que quando empregada individualmente (DE FREITAS et al., 2017; GURSOY et al., 2013; SHRESTHA; KISHEN, 2014; TARDIVO et al., 2005a). Ainda, a combinação da aPDT com outros fármacos, além de permitir o uso de menores doses e, com isso a minimização do surgimentos e efeitos adversos, também tem grande potencial em inibir o surgimento de novas formas de resistência bacteriana, principalmente pela ação deletéria de EROs sobre unidades genéticas transferíveis, como plasmídeos (KÖMERIK; WILSON; POOLE, 2000; TUBBY; WILSON; NAIR, 2009).

### **1.3. Peptídeos antimicrobianos**

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) são oligopeptídeos com até 50 aminoácidos que apresentam amplo espectro de ação contra microrganismos, incluindo vírus, bactérias, fungos e parasitas (BAHAR; REN, 2013; HANCOCK; BROWN; MOOKHERJEE, 2006). Os PAM ocorrem naturalmente em procariotos e eucariotos, compondo nos organismos multicelulares parte da linha de defesa do sistema imune inato contra microrganismos potencialmente prejudiciais (GANZ, 2003). O epitélio gengival é um exemplo de tecido que produz PAM que atuam sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas, leveduras e

alguns vírus, prevenindo doenças orais como a periodontite, cárie e candidíase (DIAMOND; BECKLOFF; RYAN, 2008).

Os PAM com atividade antibacteriana são os mais estudados e apresentam em sua maioria carga global positiva e natureza anfipática, tendo como principal alvo de ação a bicamada lipídica da membrana plasmática das bactérias, além de alvos intracelulares (BAHAR; REN, 2013; GANZ, 2003). Por agir principalmente sobre a membrana, os PAM apresentam a grande vantagem de provocar a morte bacteriana muito rapidamente (LOEFFLER; NELSON; FISCHETTI, 2001). Em alguns casos, o PAM é capaz de eliminar uma população bacteriana em 15 minutos (YENUGU, S. et al, 2004), enquanto o início da ação dos fármacos antibacterianos convencionais pode levar horas (LEVISON; LEVISON, 2009). Diante dessas vantagens, diversos PAM antibacterianos têm sido sintetizados a partir de seus homólogos encontrados naturalmente em diversos organismos. O PAM aureína 1.2 (Figura 2A), por exemplo, hoje amplamente estudado e facilmente sintetizado em laboratório, foi encontrado na pele de espécies do sapo Australiano do gênero *Litoria* (ROZEK, T. et al., 2000).

A ação dos PAM sobre a membrana plasmática das bactérias depende de sua interação eletrostática e hidrofóbica com a bicamada lipídica, levando à desestabilização da mesma e provocando o extravasamento do conteúdo celular (GANZ, 2003). Essa ação pode se dar por três mecanismos principais (Figura 2B): *barrel-stave* (formação de barril) e *toroidal pore* (poro toroidal), em que os peptídeos formam poros na membrana; *carpet-like* ou *detergent-like* (formação de tapete ou ação similar a detergente), em que há uma desestabilização da membrana pela formação de micelas entre os peptídeos e os fosfolipídeos (GANZ, 2003). A aureína 1.2 tem seu mecanismo de ação definido como *carpet-like*, apresentando um limiar de concentração abaixo do qual praticamente não há efeito e que varia de acordo com a composição de fosfolipídios da membrana-alvo (CHEN; MARK, 2011; MECHLER et al., 2007). Uma concentração limiar é sempre necessária para a ruptura da membrana, independentemente do modelo de perturbação: sem essa propriedade, os peptídeos antimicrobianos não seriam armas de autodefesa eficazes, pois causariam danos a todas as células em qualquer concentração (SENGUPTA et al., 2008).

Partindo desse princípio, as moléculas de peptídeo devem formar oligômeros, antes ou depois de se ligarem à membrana plasmática, a fim de exercer sua ação (LORENZÓN et al., 2013; SENGUPTA et al., 2008). Esse conhecimento levou ao desenvolvimento de peptídeos diméricos, com a racionalidade de fornecer mais moléculas ao mesmo tempo para o sistema, o que traria benefícios como atividade antimicrobiana melhorada, maior resistência contra proteases e melhor solubilidade (LORENZÓN et al., 2013). Buscando

acrescentar essas vantagens ao peptídeo aureína 1.2, o estudo de Lorenzón e colaboradores (LORENZÓN et al., 2013) sintetizou algumas formas diméricas, incluindo o dímero (AU)<sub>2</sub>K, que consiste em duas moléculas de aureína ligadas através de suas extremidades C-terminais por um resíduo de lisina. Essa modificação reduziu a toxicidade do peptídeo contra células de mamífero e induziu a agregação celular de *Candida albicans*, uma característica capaz de impedir a formação de biofilmes.

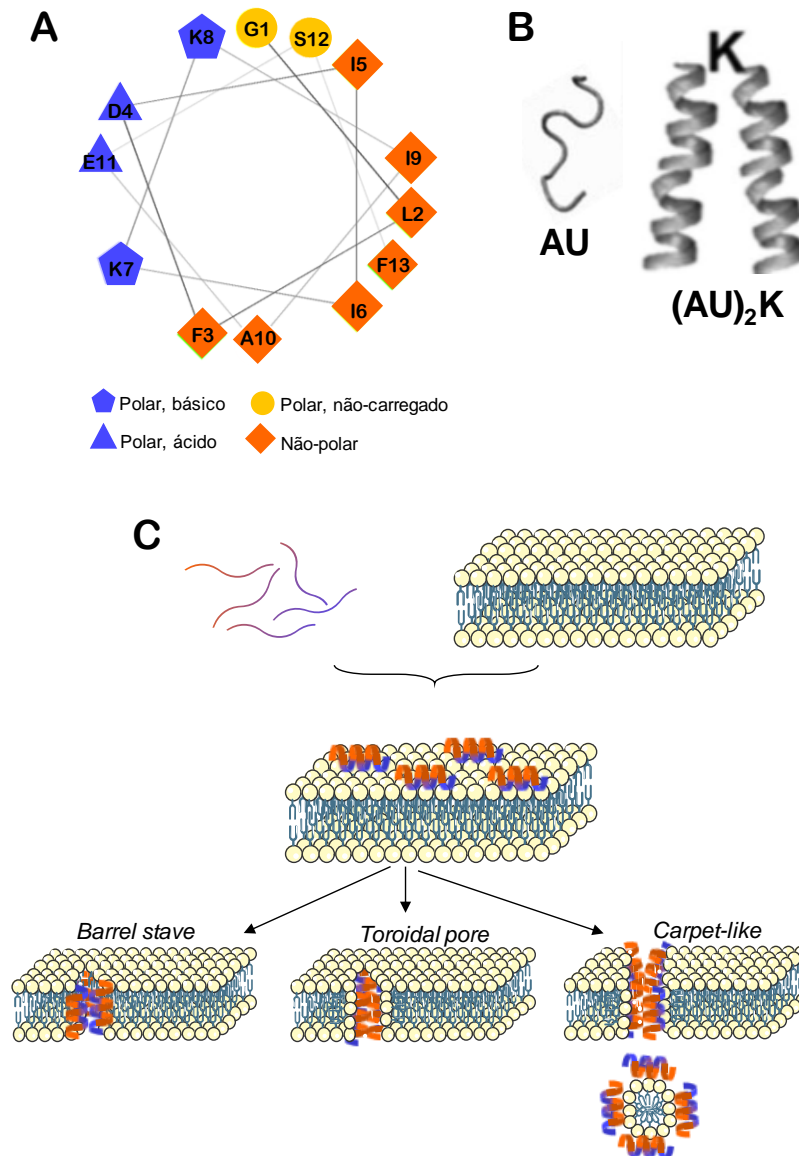
Já foi demonstrado que os PAM são capazes de matar bactérias resistentes a antibióticos, incluindo as cepas *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE) (BRUMFITT; SALTON; HAMILTON-MILLER, 2002) e que os PAM melhoram a atividade de antibióticos através de efeitos sinérgicos (NAGHMOUCHI et al., 2012). Isso porquê, ao contrário dos antibióticos, os PAM não atuam sobre funções celulares específicas como a síntese de DNA, de proteínas ou da parede celular, o que favorece sua ação sobre cepas resistentes e torna o surgimento de resistência adquirida contra essas moléculas uma condição também improvável (GANZ, 2003; HANCOCK; CHAPPLE, 1999; PATHAK; CHAUHAN, 2011).

Por outro lado, muitas cepas bacterianas são intrinsecamente resistentes aos peptídeos antimicrobianos. Isso se deve ao fato de os PAM serem originários do sistema de defesa dos organismos multicelulares e, com o passar do tempo, patógenos e hospedeiros evoluíram juntos. O principal mecanismo de resistência aos PAM está na modificação da superfície celular, diminuindo a concentração de cargas negativas (GUILHELMELLI et al., 2013): como os PAM interagem com as células bacterianas principalmente via interações eletrostáticas, a menor disponibilidade de cargas negativas diminui a ligação dessas moléculas à superfície bacteriana e, conseqüentemente, minimiza sua ação.

Além da carga da superfície celular, as bactérias ainda podem alterar a rigidez da membrana (SHIREEN et al., 2013), produzir cápsulas (CAMPOS et al., 2004), secretar proteases que degradam os peptídeos, inibir a expressão dos genes relacionados aos PAM nas células do sistema imune do hospedeiro (SPERANDIO et al., 2008), ou ainda formar biofilmes, cujas matrizes extracelulares interagem com os PAM, impedindo sua ligação às células (CHAN et al., 2004).

Muito embora a aPDT e os PAM sejam considerados tratamentos antimicrobianos promissores, diante das limitações apresentadas por ambos e da crescente necessidade de uma terapia eficaz e segura alternativa aos antibióticos, a investigação de protocolos de tratamento para infecções pautados na combinação de terapias pode trazer mais vantagens e ser mais eficaz que utilizá-los individualmente, conforme descrito a seguir.

**FIGURA 2 – Estrutura dos peptídeos e mecanismos de ação dos PAM**



**A:** Estrutura helicoidal da aureína 1.2 (AU), peptídeo antimicrobiano (PAM) catiônico consistindo de 13 resíduos de aminoácidos (sequência GLFDIIKKIAESF), gerada através do software online RZLAB (rzlab.ucr.edu). Nota-se a distribuição dos resíduos polares de um lado e apolares do outro lado da  $\alpha$ -hélice, conformação essencial para o mecanismo de ação da AU. A = alanina; D = ácido aspártico; E = ácido glutâmico; F = fenilalanina; G = glicina; I = interleucina; K = lisina; L = leucina; S = serina. **B:** conformação dos peptídeos em solução, mostrando AU sem estrutura secundária, e o dímero  $(AU)_2K$  já estruturado em alfa-hélices (LORENZÓN et. al, 2013). **C:** Representação esquemática dos principais mecanismos de ação dos PAM que atua sobre a membrana plasmática. Em solução aquosa o PAM não apresenta estrutura secundária definida; ao se deparar com um ambiente hidrofóbico (representado pela membrana plasmática) adquire conformação em  $\alpha$ -hélice. No modelo de formação de barril (*barrel-stave*) as moléculas do PAM se inserem na membrana perpendicularmente, via interação hidrofóbica. O modelo poro toroidal (*toroidal pore*) se assemelha ao modelo barril, mas os PAM estão sempre em contato com as cabeças fosfolípídicas, via interação hidrofílica. No modelo carpete (*carpet-like*) pequenas regiões da membrana são revestidas por moléculas do PAM com os lados hidrofóbicos voltados para dentro, deixando poros na membrana. A cor azul representa as porções hidrofílicas e a cor laranja representa as regiões hidrofóbicas. (elaborada pela autora)

#### 1.4. Terapia combinada

A terapia combinada é muito comum e de suma importância para diversas condições clínicas. Combinar fármacos é a chave para o sucesso no tratamento da infecção por HIV, malária, toxoplasmose e tuberculose, além da maioria dos casos de câncer (WORTHINGTON; MELANDER, 2013), pois direciona o tratamento a diferentes alvos celulares, com maior efetividade de destruição das células-alvo. Dentre as vantagens que se obtém com terapias combinadas estão o maior espectro de ação, a prevenção do surgimento de resistência e a melhora da resposta terapêutica (KMEID et al., 2013; MOUTON, 1999).

No caso de infecções bacterianas, são empregadas combinações antimicrobiano/adjuvante ou antimicrobiano/antimicrobiano. Os adjuvantes são moléculas que não tem ação antibacteriana intrínseca, mas aumentam a atividade dos antibióticos por inibirem mecanismos de resistência específicos, como a degradação enzimática. Os inibidores de beta-lactamase (e.g., ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) são o exemplo mais clássico, administrados em conjunto com antibióticos beta-lactâmicos (e.g., ampicilina, amoxicilina, piperacilina, ticarcilina e cefoperazona). A combinação de dois ou mais fármacos antimicrobianos com mecanismos de ação diferentes é geralmente utilizada para o tratamento de sepse e choque séptico, com a justificativa de ampliação do espectro de ação da terapia e redução da possibilidade de falha terapêutica devido à resistência, uma vez que a chance de a bactéria ser resistente a ambos os antimicrobianos simultaneamente é considerada pequena (KUMAR et al., 2010; MOUTON, 1999).

Com o surgimento de cepas multi-resistentes (MDR – do inglês, *multidrug resistant*) e extensivamente resistentes (XDR – do inglês, *extensively drug resistant*) a fármacos antimicrobianos, entretanto, nem a combinação de antimicrobianos de última linha é capaz de combater a infecção de forma eficaz. Além disso, a introdução de novos fármacos baseados apenas no mecanismo bactericida/bacteriostático convencional invariavelmente leva à seleção de novas cepas resistentes após o início de seu uso na clínica (WORTHINGTON; MELANDER, 2013). Nesse cenário, buscar novas estratégias que permitam minimizar o uso de antimicrobianos em infecções localizadas, assegurando fármacos efetivos para infecções mais graves, parece ser o caminho mais factível.

Tanto a aPDT quanto os PAM já tiveram suas capacidades de eliminar cepas sensíveis e resistentes comprovadas em diversos estudos (DA SILVA et al., 2013; KHARKWAL et al., 2011; KRELING et al., 2016; MARIS et al., 2015; PAGONIS et al., 2010; SOUZA et al., 2010; TARDIVO et al., 2005b), porém, ambos apresentam limitações terapêuticas quando empregados individualmente, conforme já mencionado. A combinação

da PDT e dos PAM com fármacos antimicrobianos vem sendo explorada ao longo da última década (ANDERSSON; HUGHES, 2014; CHOI; LEE, 2012; DI POTO et al., 2009; NUDING et al., 2014; RONQUI et al., 2016), bem como a combinação de peptídeos com a PDT. Neste caso, no entanto, todos os estudos exploraram a conjugação do fotossensibilizador com o peptídeo, este sendo empregado como elemento de direcionamento ao alvo (DOSSELLI et al., 2013; JOHNSON et al., 2014; MORET; GOBBO; REDDI, 2015; REINHARDT; NEUNDORF, 2016). Além de existir uma grande possibilidade de perda de atividade de ambas as moléculas devido a mudanças conformacionais induzidas pela conjugação, os PAM apresentam atividade antimicrobiana importante por si mesmos para serem empregados apenas como direcionadores nessa abordagem.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi combinar a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno, clorina-e6 ou curcumina a peptídeos antimicrobianos, empregando como modelo de estudo a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*, uma importante espécie comensal e patogênica com altas taxas de resistência a antimicrobianos. A hipótese levantada é que o PAM em concentrações sub-inibitórias deveria modificar a permeabilidade da membrana plasmática e ampliar a internalização dos FS, aumentando a concentração dessas moléculas em locais onde a geração de ERO provoque danos fatais, melhorando assim a performance da PDT. Com o desenvolvimento dessa abordagem, espera-se fornecer bases científicas para melhorar o tratamento de infecções localizadas, o que deve culminar no menor uso de antibióticos sistêmicos nesse contexto clínico, minimizando o surgimento de novas variantes resistentes e garantindo um arsenal de fármacos efetivos para infecções sistêmicas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar os efeitos e mecanismos da combinação da terapia fotodinâmica a peptídeos antimicrobianos sobre *Enterococcus faecalis*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1.** Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cada modalidade terapêutica (aPDT e PAM) para *Enterococcus faecalis*;
- 2.2.2.** Avaliar se há sinergismo entre a aPDT e os peptídeos aureína 1.2 monômero (AU) e dímero (AU<sub>2</sub>K), utilizando condições sub-inibitórias, em fase planctônica;
- 2.2.3.** Avaliar a atividade fotoquímica dos FS na presença e ausência de peptídeo;
- 2.2.4.** Determinar a estrutura de AU em presença dos FS;
- 2.2.5.** Investigar a capacidade da terapia combinada em inibir a formação de biofilmes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cepas bacterianas

*Enterococcus faecalis* (ATCC<sup>®</sup> 29212<sup>™</sup>), obtido do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - Manguinhos, RJ).

Foram também utilizadas *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923<sup>™</sup>), *Acinetobacter baumannii* (ATCC<sup>®</sup> 19606<sup>™</sup>), *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>), *Enterococcus faecium* VRE (ATCC<sup>®</sup> 700221<sup>™</sup>), e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC<sup>®</sup> 27853<sup>™</sup>), gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Nilton Lincopan, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (ICB II – USP).

#### 3.2. Meios de cultivo

- Caldo infusão de cérebro e coração (*brain heart infusion* – BHI; Kasvi, PR, Brasil): Infusão de Cérebro de Bezerro 20%; Infusão de Coração Bovino 25%; Protease peptona 1%; Cloreto de sódio 0,5%; Dextrose 0,2%; Fosfato Dissódico 0,25%.

- Ágar sangue de carneiro: sangue de carneiro desfibrinado 5%; BHI 2,6%; TSA 2%; extrato de levedura 1%.

As cepas foram cultivadas a 37°C.

#### 3.3. Peptídeos antimicrobianos – aureína 1.2 e seu dímero, (AU)<sub>2</sub>K

O PAM aureína 1.2 consiste de 13 aminoácidos na sequência GLFDIIKKAESF-NH<sub>2</sub>. Seu dímero C-terminal, (AU)<sub>2</sub>K, apresenta sequência (GLFDIIKKAESF)<sub>2</sub>-K. A aureína 1.2 e seu dímero foram fornecidos pelo grupo do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, do Instituto de Química de Araraquara da UNESP. Todas as etapas de síntese e purificação foram realizadas de acordo com estudos anteriores (LORENZÓN et al., 2013).

Resumidamente, os peptídeos foram sintetizados seguindo os protocolos básicos da síntese de peptídeos em fase sólida Fmoc (SPFS – MERRIFIELD, 1963), utilizando a resina Rink Amide MBHA de 0,6 mmol/g. A síntese consistiu de passos cíclicos de desproteção e acoplamento, intercalados por lavagens para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos. Ao fim da síntese, para clivar o peptídeo da resina, foi realizada uma reação utilizando uma solução composta por 2,5% de tri-isopropilsilano e 2,5% de água em TFA. Ao término, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado e lavado 3 vezes com este solvente para eliminação dos reagentes presentes na solução de clivagem. O precipitado obtido foi extraído da resina com uma solução aquosa contendo 0,045% de TFA. O sobrenadante contendo o peptídeo foi liofilizado e identificado como peptídeo bruto. A purificação do peptídeo foi realizada em modo semipreparativo utilizando um cromatógrafo Beckman (HPLC - Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), equipado com coluna C18 Kromasil®

(Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA) de tamanho 25,0 x 1,0 cm e um coletor automático. A pureza foi determinada por HPLC analítico em um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Corp. Kyoto, Japão), com coluna C18 Kromasil® (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA) de 15,0 x 0,46 cm. O conteúdo dos tubos puros foi transferido para um único tubo e liofilizado, obtendo-se as frações puras que foram analisadas na mesma coluna acima descrita. As frações puras foram liofilizadas e guardadas em geladeira até o uso. A síntese e estrutura dos peptídeos foram confirmadas por cromatografia (HPLC) e espectrometria de massas. Após solubilização em água ultrapura, a concentração obtida de peptídeo foi determinada por leitura espectrofotométrica a 275 nm (comprimento de onda de absorção da fenilalanina), com caminho óptico de 1 cm, utilizando-se a lei de Beer-Lambert:  $[\text{peptídeo}] = (\text{absorbância}) / (1 \text{ cm} \times n \times 195)$ , onde  $n$  = número de resíduos de fenilalanina no peptídeo (2 para AU; 4 para (AU)<sub>2</sub>K); e 195 = coeficiente de absorvidade molar da fenilalanina em 275 nm.

### 3.4. Fontes de luz e fotossensibilizadores

Foram empregados três fotossensibilizadores: um derivado fenotiazínico (azul de metileno); um derivado tetrapirrólico (clorina-e6, derivada da clorofila); e um produto natural (curcumina). O azul de metileno foi obtido da Sigma (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA). A clorina-e6 e a curcumina foram fornecidas pelo prof. Dr. Kleber Tiago de Oliveira (Departamento de Química, Laboratório de Química Bioorgânica UFSCar), sintetizados como descrito por Uliana (ULIANA et al., 2014) e Wichitnithad (WICHITNITHAD et al., 2011), respectivamente. As estruturas dos FS estão representadas na figura 3C.

A curcumina foi ativada por luz em 450 nm (151 mW/cm<sup>2</sup>); azul de metileno e clorina-e6 foram ativados por luz em 660 nm (153 mW/cm<sup>2</sup>). Ambas as fontes de luz consistem de um sistema de 48 LEDs com irradiâncias (mW/cm<sup>2</sup>) variáveis, apresentando área de iluminação homogênea e um sistema de resfriamento (Figura 3A e 3B - IrradLED® – biopdi, Sao Carlos, SP, Brasil).

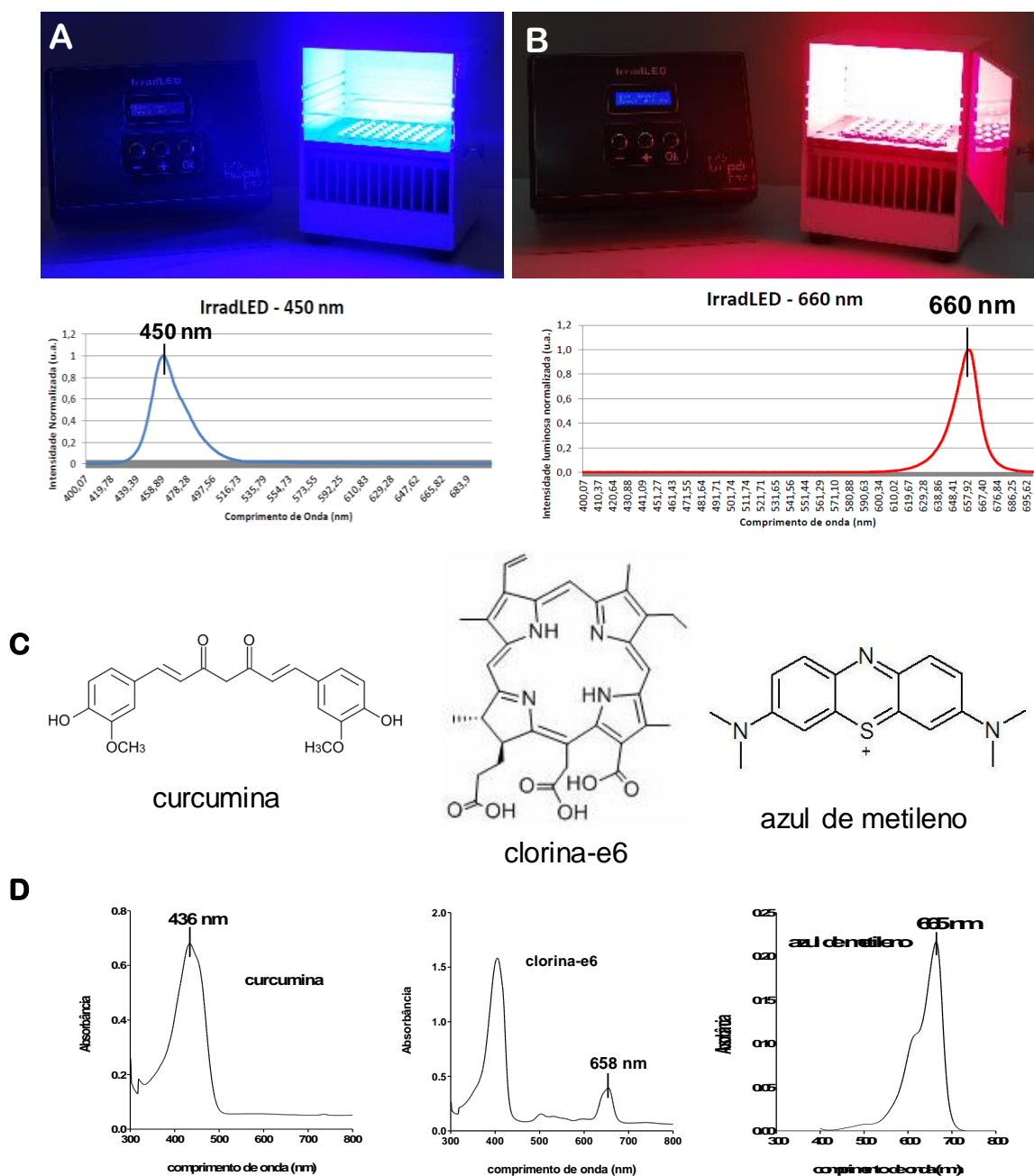
As soluções dos FS foram preparadas de acordo com suas solubilidades individuais, conforme a Tabela 2.

**Tabela 2. Soluções estoque e de trabalho dos fotossensibilizadores utilizados**

<b>Fotossensibilizador</b>	<b>Solução-estoque</b>	<b>Solução de trabalho*</b>
azul de metileno	31,25 mM em água deionizada	625 µM em caldo BHI
clorina e6	3,35 mM em DMSO/água deionizada (10%/90%)	335 µM em caldo BHI
curcumina	504 mM em DMSO	545 µM em sacarose 0,5%

\*Todas as concentrações de FS empregadas nos ensaios foram obtidas através da diluição das soluções de trabalho.

FIGURA 3 – Fontes de luz e fotossensibilizadores



Imagens representativas das fontes de luz de 450 nm (**A**) e 660 nm (**B**) utilizadas nos ensaios, mostrando a disposição dos 48 LEDs, e suas respectivas bandas de emissão. Fonte: <<http://www.biopdi.com.br/produtos/irradiacao/48-leds#galeria>>. **C**: estruturas moleculares dos fotossensibilizadores utilizados neste estudo. **D**: espectros de absorção UV-Visível dos FS (espectros obtidos em solução aquosa pela autora).

### 3.5. Terapia Fotodinâmica, tratamento com aureína 1.2 e terapia combinada

Soluções dos FS ou AU foram preparadas com o dobro da concentração de trabalho desejada e adicionadas aos poços correspondentes em uma placa de 96 poços. Cada grupo de tratamento foi analisado em triplicatas dentro de um mesmo ensaio, e cada ensaio foi realizado em triplicatas biológicas. Os grupos de tratamento estão descritos na Tabela 3. A cepa bacteriana, crescida em placas de ágar sangue, foi coletada do ágar e suspensa em 3 mL de caldo BHI a uma concentração de cerca de  $5 \times 10^9$  cél./mL, confirmada por leitura espectrofotométrica (630 nm). Alíquotas de 50  $\mu$ L do inóculo foram transferidos para cada poço da placa, gerando um volume final de 100  $\mu$ L e a diluição em 50% do inóculo e das soluções (concentração final de bactéria  $\approx 2,5 \times 10^8$  cél). O controle de crescimento foi composto de 50  $\mu$ L de inóculo e 50  $\mu$ L de caldo BHI, incubado pelo mesmo tempo dos grupos de tratamento. Para a aPDT, a bactéria foi incubada no escuro por 5 minutos e então irradiada pelo tempo e comprimento de onda adequados para atingir a densidade de energia desejada ( $J/cm^2$ ); a irradiação foi conduzida por baixo da placa em modo fracionado (LEDs ligados por 60 s e desligados por 60 s, automaticamente, até completar o tempo total). Para o tratamento com os peptídeos, a bactéria foi incubada por 5 a 30 minutos no escuro. Terminados os tempos de incubação/irradiação, a bactéria foi diluída seriadamente e plaqueada em ágar sangue. As colônias foram contadas após 2 dias de incubação em jarra de anaerobiose a 37°C para a determinação da densidade de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro (mL). Para a terapia combinada, a suspensão bacteriana foi incubada com cada FS e peptídeo simultaneamente por 5 minutos no escuro, sendo irradiada em seguida com o comprimento de onda e dose de luz apropriados. Todos os outros passos ocorreram como descrito acima.

**Tabela 3. Grupos de tratamento deste estudo**

Grupo de tratamento	Concentração de fotossensibilizador	Dose de luz	Concentração de peptídeo
Controle de crescimento	0	0	0
Aureína 1.2 (AU)	0	0	8 a 32 $\mu$ M
Dímero (AU) <sub>2</sub> K	0	0	12,5 a 100 $\mu$ M
AM-PDT	40 a 235 $\mu$ M	0 a 120 $J/cm^2$	0
AM-PDT+AU	40, 80 ou 160 $\mu$ M	45 $J/cm^2$	8 ou 16 $\mu$ M
AM-PDT+(AU) <sub>2</sub> K	80 $\mu$ M	45 $J/cm^2$	25 $\mu$ M
Ce6-PDT	21 a 125 $\mu$ M	0 a 90 $J/cm^2$	0
Ce6-PDT+AU	21, 42 ou 84 $\mu$ M	30 $J/cm^2$	8 ou 16 $\mu$ M
Ce6-PDT+(AU) <sub>2</sub> K	42 $\mu$ M	30 $J/cm^2$	25 $\mu$ M

### 3.6. Internalização de fotossensibilizadores (modificado de TEGOS; HAMBLIN, 2006)

Suspensões de *E. faecalis* ( $\sim 10^9$  cél./mL) foram incubadas em BHI, no escuro em temperatura ambiente, por 5 minutos com os fotossensibilizadores, aureína 1.2 ou FS e aureína 1.2, nas mesmas concentrações empregadas nos ensaios de terapia combinada, em um volume final de 1 mL (500  $\mu$ L solução + 500  $\mu$ L inóculo). Após a incubação, as suspensões foram centrifugadas (6.500 rpm por 5 min), o sobrenadante foi desprezado, a bactéria foi lavada com 1 mL de PBS 1x estéril e centrifugada novamente. O pellet celular foi suspenso em 2 mL de solução NaOH 0,1 M e SDS (dodecil sulfato de sódio) 1% e incubado por 24 horas, em temperatura ambiente, para digestão celular e obtenção de um extrato celular homogêneo. A fluorescência dos extratos foi mensurada em espectrofluorímetro (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, EUA) utilizando o modo *endpoint*. Os comprimentos de onda de excitação e emissão para cada FS foram obtidos, respectivamente, a partir de seus espectros de absorção e de fluorescência em NaOH 0,1 M - SDS 1% e estão resumidos na Tabela 4. Curvas-padrão foram obtidas a partir de soluções dos FS preparadas em NaOH 0,1 M - SDS 1% e utilizadas para determinar as concentrações de cada FS nos extratos.

Tabela 4. Comprimentos de onda de excitação e emissão dos fotossensibilizadores

Fotossensibilizador*	Comprimento de onda de excitação	Comprimento de onda de emissão
azul de metileno	660 nm	690 nm
clorina-e6	500 nm	670 nm
curcumina	450 nm	640 nm

\*As soluções de FS foram preparadas em NaOH 0,1 M - SDS 1%.

### 3.7. Quantificação de ERO

Em solução: As sondas 3'-p-(aminofenil) fluoresceína (APF) e *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG) foram obtidas da Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA USA) e preparadas de acordo com as instruções do fabricante. Ambas as moléculas passam a emitir fluorescência apenas após reagirem com ERO, sendo APF mais sensível aos radicais hidroxila ( $\cdot$ OH) e SOSG mais sensível ao oxigênio singleto ( $^1O_2$ ). Para os ensaios, soluções dos FS (156  $\mu$ M de AM e 84  $\mu$ M de Ce6) foram preparadas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) na presença e ausência de AU (16  $\mu$ M) e adicionadas em triplicatas a poços de uma

placa preta de 96 poços, onde receberam 3  $\mu\text{M}$  de APF ou SOSG, também preparadas em tampão fosfato. O volume final de reação foi de 200  $\mu\text{L}$ . A placa foi irradiada por cima pelo tempo necessário para atingir a dose de luz empregada para cada FS. As leituras de fluorescência foram feitas imediatamente após a irradiação utilizando um leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, USA). Os comprimentos de onda de excitação/emissão para APF foram 490/515 nm e para SOSG foram 505/525 nm.

Intracelular: uma suspensão bacteriana de  $\sim 10^8$  UFC/mL de *E. faecalis* foi preparada em PBS 1x, sedimentada por centrifugação (6.500 rpm, 5 minutos) e suspensa em 100  $\mu\text{L}$  de uma solução da sonda APF (5  $\mu\text{M}$ , em PBS), permeável à célula, seguido de incubação no escuro, a 35 ° C, durante 30 minutos. As células foram novamente sedimentadas, lavadas para remover o excesso de sonda e depois suspensas em 100  $\mu\text{L}$  de soluções de PBS (controle não tratado), Ce6 ou Ce6 + AU. Após 5 minutos de incubação no escuro, as suspensões foram irradiadas com 30 J/cm<sup>2</sup> (150 mW/cm<sup>2</sup>, 200 s) e depois transferidas para uma placa preta de 96 poços para leitura de fluorescência (490/515 nm). Como controle, os mesmos grupos foram tratados sem a adição de APF: as células foram incubadas em PBS durante 30 min, sedimentadas, incubadas com Ce6 ou Ce6 + AU, irradiadas com a mesma dose de luz e tiveram a sua fluorescência determinada (490/515 nm). Os valores resultantes foram utilizados para normalizar as amostras tratadas com APF. A sonda SOSG não é permeável à célula, e, por isso, não foi utilizada neste ensaio.

### 3.8. Espectros de absorção

Foram determinados os espectros de absorção UV-VIS dos FS em presença e ausência de AU para avaliar se a presença do peptídeo de alguma forma alteraria as propriedades ópticas das moléculas. Os espectros foram determinados em meio aquoso em equipamento Synergy H1M (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, EUA); o espectro UV-VIS foi registrado de 275 a 800 nm com passos de 1 nm.

### 3.9. Fotobranqueamento (*Photobleaching*)

Para determinar a taxa de fotobranqueamento dos FS em presença e ausência de aureína 1.2 o espectro de absorção UV-visível dos mesmos foi determinado antes, durante e após a irradiação. Para todos os FS as soluções foram preparadas em água deionizada a partir das soluções-estoque, nas mesmas concentrações dos ensaios de sinergismo. Cada grupo experimental foi adicionado a poços em uma placa de 96 poços em triplicatas. A irradiação foi conduzida de forma segmentada para que fosse estabelecida uma cinética de fotobranqueamento. A absorção foi mensurada de 300 a 800 nm com passos de 1 nm em

equipamento Synergy H1M (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, EUA). Os picos máximos de absorção a cada tempo também foram registrados.

**Azul de metileno:** AM na concentração de 156  $\mu\text{M}$  foi combinado ou não a 16  $\mu\text{M}$  de AU. A absorção foi mensurada nos tempos 0, 36, 72, 108, 144, 180, 216, 252 e 288 segundos de irradiação a 153  $\text{mW}/\text{cm}^2$ .

**Clorina-e6:** a Ce6 na concentração de 84  $\mu\text{M}$  foi combinada ou não a 16  $\mu\text{M}$  de AU. A absorção foi mensurada nos tempos 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 segundos de irradiação a 153  $\text{mW}/\text{cm}^2$ .

**Curcumina:** a CUR na concentração de 68  $\mu\text{M}$  foi combinada ou não a 16  $\mu\text{M}$  de aureína 1.2. As medidas foram registradas nos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 segundos de irradiação a 151  $\text{mW}/\text{cm}^2$ .

Todos os tempos foram determinados para mimetizar a dose de luz utilizadas nos ensaios microbiológicos.

### 3.10. Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos entre 190 e 260 nm sob fluxo de nitrogênio em cubetas de quartzo de 1mm de caminho óptico em temperatura ambiente, utilizando o equipamento JASCO J-715 CD spectrophotometer (JASCO, Easton, MD, EUA. Equipamento multiusuário do Instituto de Química da UNESP de Araraquara). A concentração do peptídeo foi 16  $\mu\text{M}$ ; as concentrações de AM, Ce6 e CUR foram 156, 84 e 68  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Como controle positivo de alteração conformacional de AU, uma solução a 5 mM de lisofosfatidilcolina (LPC) foi utilizada. Os espectros de DC foram obtidos como a média de 10 leituras consecutivas obtidas em *millidegrees* e convertidas a elipticidade residual média ( $\theta$ ; em  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \times 10^3$ ) como segue: os espectros foram normalizados como elipticidade residual média (MRE) de acordo com a equação  $[\theta]\text{MRE} = \theta / (c \times l \times N_r)$ , onde  $\theta$  é a elipticidade registrada, em milidegrees,  $c$  é a concentração do peptídeo em  $\text{dmol}/\text{L}$ ,  $l$  é o caminho óptico da cubeta em cm, e  $N_r$  é o número de resíduos de aminoácidos do peptídeo. A helipticidade foi calculada de acordo com a equação de Luo-Baldwin  $H\alpha = (\theta_{222\text{nm}} - \theta_C) / (\theta_{\infty 222\text{nm}} - \theta_C)$ , onde  $\theta_C = 2200 - 53 T$ ,  $\theta_{\infty 222\text{nm}} = (-44,000 + 250 T)(1 - k/N \text{resíduos})$  e  $k = 4$ , conforme descrito para peptídeos irrestritos (LUO; BALDWIN, 1997; SANI et al., 2015; SHEPHERD et al., 2005)

### 3.11. Potencial Zeta e tamanho da célula bacteriana

O tamanho da célula (diâmetro médio, nm) e o potencial Zeta (mV) de células de *E. faecalis* tratadas com AU, Ce6 ou Ce6 + AU foram mensurados no analisador ZetaPALS ZetaPotential (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY), equipado com laser 677

nm e espalhamento de luz dinâmico (PCS) a 90° para dimensionamento de partículas. O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética  $\mu$ , a 25°C, em água deionizada. As suspensões bacterianas ( $\sim 10^8$  UFC/mL) foram incubadas com as soluções de tratamento no escuro durante 5 min a um volume final de 3 mL. As suspensões foram centrifugadas (5000 rpm durante 5 min) e os sedimentos foram lavados duas vezes, sendo suspensos em 2 mL de água deionizada estéril. Cada valor é mostrado como uma média de pelo menos 3 medições individuais  $\pm$  desvio padrão médio.

### 3.12. Ensaio de permeabilização celular

Suspensões de *E. faecalis* a  $\sim 10^8$  UFC/mL foram incubadas com caldo BHI (controle negativo), isopropanol 70% (controle positivo), AU 16  $\mu$ M, Ce6 42 ou 84  $\mu$ M, ou Ce6 + AU (volumes finais 100  $\mu$ L) por 5 minutos no escuro. Após as incubações, as células foram sedimentadas (6500 rpm, 5 minutos) e lavadas duas vezes para remover os tratamentos e depois incubadas com iodeto de propídeo (IP, 30  $\mu$ M em solução salina) durante 5 min. As células foram novamente sedimentadas e lavadas, para serem finalmente suspensas em 100  $\mu$ L de solução salina para leitura de fluorescência do IP (535/617 nm; Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, EUA).

### 3.13. Desenvolvimento de biofilme

As bactérias foram tratadas em suspensão como descrito no item 3.5. Após o tratamento, as placas foram incubadas 37°C no equipamento Synergy, sob agitação orbital lenta e constante por 6 horas, com leituras da absorbância em 600 nm realizadas a cada 20 minutos para avaliação da taxa de crescimento durante a fase de adesão do biofilme. Após as 6 horas, as placas foram transferidas para a estufa a 37°C e incubadas por 24 ou 48 horas para o desenvolvimento dos biofilmes. Após as incubações, os meios foram removidos e os biofilmes foram lavados com PBS para remover as bactérias não aderidas. A cada poço foram adicionados 190  $\mu$ L de meio fresco, seguido da adição de 10  $\mu$ L de solução de resazurina a 0,1 g/L. A placa foi imediatamente coberta em papel alumínio e incubada no escuro por 20 minutos a 37°C. A solução foi transferida para uma placa de 96 poços preta e a fluorescência do produto de redução (resorufina) foi determinada em leitor de microplacas (570/590 nm; Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, EUA). A viabilidade de cada biofilme foi determinada em relação ao controle, de acordo com a equação 1:

$$\% \text{ de células viáveis} = \left( \frac{I.F. \text{ tratamento} - I.F. \text{ controle sem bactérias}}{I.F. \text{ controle sem tratamento} - I.F. \text{ controle sem bactérias}} \right) \times 100$$

**Equação 1:** cálculo da viabilidade dos biofilmes através da leitura de fluorescência do produto de redução da resazurina (resorufina). I.F. = intensidade de fluorescência.

### 3.14. Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

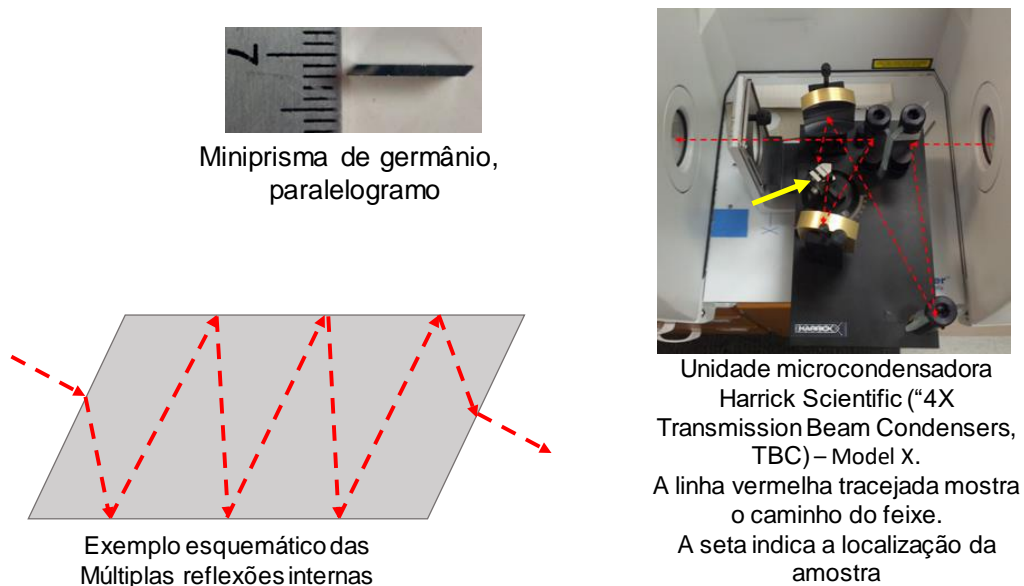
Os biofilmes foram cultivados como descrito acima em placas de micropoços de fundo de vidro (MatTek Corporation - placa de 35 mm, cavidade de 14 mm). Após 48 h, os meios foram removidos e as células foram lavadas duas vezes com solução salina. As soluções de corantes (SYTO9 e iodeto de propídeo) foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante (FilmTracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit - Molecular Probes, Invitrogen) e adicionou-se suavemente 200 µL da solução contendo ambos os corantes a cada amostra. As placas foram incubadas durante 20 minutos no escuro. A solução de corante foi removida e as amostras foram lavadas 3-4 vezes com o tampão de equilíbrio do kit anti-fading (kit SlowFade™ AntiFade - Molecular Probes, Invitrogen). Uma vez que o tampão de equilíbrio foi completamente removido, cada amostra recebeu uma gota do reagente SlowFade e foi levada para o microscópio confocal protegida da luz. As imagens foram adquiridas usando um Microscópio Confocal LSM 510 Meta NLO com Axiovert 200M (*Confocal Microscopy and Flow Cytometry Facility - Biomedical Research Building, SUNY at Buffalo, South Campus*) e o software Zeiss Axioimager Z1 foi utilizado para a coleta de imagens. As imagens foram obtidas em *z-stacks* com fatias de 1,14 µm e processadas no software ZEN Digital Imaging for Light Microscopy. A análise foi realizada para avaliar toda a profundidade do biofilme e eficácia das intervenções terapêuticas individuais, bem como os tratamentos combinados. Os *z-stacks* foram analisados com o *plugin* Comstat2 para ImageJ para determinar a adesão ao substrato e a espessura máxima de cada biofilme.

### 3.15. Espectroscopia no infravermelho no modo de múltiplas reflexões internas atenuadas (MAIR-IR)

Os biofilmes foram cultivados em miniprismas de germânio (10x5x1 mm - Harrick Scientific, Pleasantville, NY, EUA). A Figura 4 mostra um exemplo do miniprisma de germânio, o caminho do feixe de IV e o conjunto de espelhos utilizado na leitura das amostras. Antes de iniciar o crescimento do biofilme, os prismas foram limpos com um detergente isento de resíduos e submetidos a três minutos de tratamento por descarga incandescente de radiofrequência para purificar e baixar ainda mais a energia da superfície. Os prismas foram lidos antes do crescimento do biofilme para determinar o nível de

transmitância possível para cada um (leitura de linha de base; espectrômetro FT-IR - Spectrum 100, PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Após 48 horas de crescimento, os biofilmes foram lavados com solução salina estéril duas vezes e depois duas vezes com água destilada. Após a lavagem, os prismas foram mantidos sob um fluxo de ar para secar por pelo menos 24 horas. As leituras foram então obtidas usando o mesmo espectrômetro FT-IR e a linha de base foi subtraída de cada espectro. O instrumento espectroscópico MAIR-IR foi ajustado durante todos os procedimentos com o número de ondas espectrais de IV variando de  $4.000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$ , transmissão em porcentagem, 30 varreduras por amostra e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . As análises foram repetidas em 3 ocasiões diferentes. O espectro médio do controle não tratado foi subtraído dos espectros médios obtidos dos biofilmes tratados para melhor visualização das alterações provocadas por cada tratamento. Todas as análises foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Robert Bayer, na *School of Dental Medicine* da *State University of New York at Buffalo* (Buffalo, NY, EUA).

**Figura 4 – Aparato utilizado para os experimentos de MAIR-IR**



Fonte: adaptado da dissertação de mestrado de Stephen Christopher Rogers (UMI Number: 1561655; School of Dental Medicine, University at Buffalo, 2014)

### 3.16. Coloração de SPE (baseado em BURTON et al., 2007)

Lecitinas são moléculas amplamente utilizadas para a detecção de glicoconjugados. A aglutinina de germe de trigo é uma lecitina que se liga de forma específica a resíduos de N-acetilglicosamina, ácido N-acetilneuramínico e à poli-N-acetilglicosamina, todos presentes na substância polimérica extracelular (SPE) dos biofilmes. É particularmente útil para detectar e quantificar biofilmes em seu estágio inicial de formação (BURTON et al., 2007).

Os biofilmes foram cultivados em placas de 96 poços em quadruplicatas, como já descrito acima, por 48h. Uma vez formados, foram lavados duas vezes com solução salina para remoção das células não-aderidas. Cada poço recebeu então 200  $\mu\text{L}$  de solução de aglutinina de germe de trigo (AGT) conjugada com AlexaFluor488<sup>®</sup> (Life Technologies) a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em PBS. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada a 4°C por duas horas. A solução de AGT foi removida, os poços lavados 3 vezes com PBS e a placa posta a secar ao ar por 15 minutos. A AGT ligada ao biofilme foi solubilizada com 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético a 33% e a placa foi posta em banho de ultrassom por 60 segundos. Após nova incubação a 37°C por 1 hora, a placa foi novamente posta em banho de ultrassom por 60 segundos. De cada poço, foram transferidos 150  $\mu\text{L}$  para uma placa de 96 poços de fundo e laterais pretos e a fluorescência da AGT foi determinada em leitor de microplacas com excitação em 495 nm e emissão em 520 nm.

### 3.17. Proliferação celular

Após o tratamento em fase planctônica, a bactéria *E. faecalis* foi incubada por 2 horas a 37°C, para estabilização. A partir de então, sua taxa de crescimento foi acompanhada a cada 20 minutos por 4 horas através de leituras de absorbância a 600 nm em leitor de microplaca (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, EUA), com agitação orbital constante. As absorbâncias obtidas a cada leitura (absorbância A) foram normalizadas pela absorbância no tempo zero (absorbância  $A_0$ ) e plotadas em gráfico como o logaritmo neperiano da relação  $A/A_0$ .

### 3.18. Interação com ácido lipoteicoico (ALT)

Ácido lipoteicoico extraído de *Enterococcus hirae*. foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich). Empregando primeiramente análise de dicroísmo circular com os mesmos parâmetros descritos no item 3.10, os peptídeos AU e  $(\text{AU})_2\text{K}$  tiveram suas estruturas secundárias em solução determinadas, individualmente, em presença de quantidades crescentes de ALT (0, 1, 2, 4 e 8x a massa de cada peptídeo). Os espectros foram deconvoluídos de acordo com a equação também descrita no item 3.10.

Posteriormente, a atividade biológica dos peptídeos em presença do ácido também foi avaliada, utilizando a bactéria *E. faecalis*. Para o monômero AU, a bactéria foi incubada por 5 minutos com AU (16  $\mu\text{M}$ ), ALT (na maior quantidade avaliada no DC), ou AU+ALT. A bactéria foi então diluída seriadamente e 5  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram plaqueados para contagem de colônias. Para o dímero  $(\text{AU})_2\text{K}$ , a mesma bactéria foi incubada com  $(\text{AU})_2\text{K}$  (50  $\mu\text{M}$ ), ALT ou  $(\text{AU})_2\text{K}$ +ALT por 24h a 37°C para a observação da formação de agregados celulares visíveis a olho nu, que foram fotografados.

### 3.19. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As células foram tratadas como descrito acima e colocadas para formar biofilmes sobre lâminas de vidro estéreis, alocadas individualmente em poços de uma placa de 12 poços. Após 48 h o meio foi removido e as amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) para remover as células não aderidas. Os biofilmes foram fixados a 4°C por 1h30min com solução de glutaraldeído a 2%, preparado fresco em tampão fosfato. O glutaraldeído foi removido e as amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (10 minutos de incubação a temperatura ambiente para cada lavagem). As amostras foram então desidratadas em uma série crescente de etanol (EtOH), como se segue: 30%, 50%, 70%, 85% e 95% de EtOH durante 15 minutos cada; 100% de EtOH, duas vezes, 15 minutos cada. A última solução de EtOH foi removida e cada amostra recebeu 100% de hexametildisilazano (HMDS - Electron Microscopy Sciences), sendo então colocada sob para secagem em capela. Anteriormente à análise no MEV, as amostras foram recobertas com carbono. As imagens foram adquiridas usando um MEV de Campo Analítico Hitachi SU-70 (*South Campus Instrument Center, Biomedical Research Building, SUNY at Buffalo, South Campus – Buffalo, NY, EUA*).

### 3.20. Análise estatística

Para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foram utilizados testes de Análise de Variância (ANOVA – *one-way* ou *two-way*) ou teste de Mann-Whitney. Quando houve diferença entre os grupos, o pós-teste mais adequado foi utilizado para identificação do grupo significativamente diferente, indicado individualmente nas legendas das figuras. As análises foram realizadas através do software GraphPad Prism® Versão 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0.05$ . O Coeficiente de Variação (desvio padrão/média) máximo aceitável dos ensaios foi estipulado em 25%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Fase planctônica

#### 4.1.1. Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

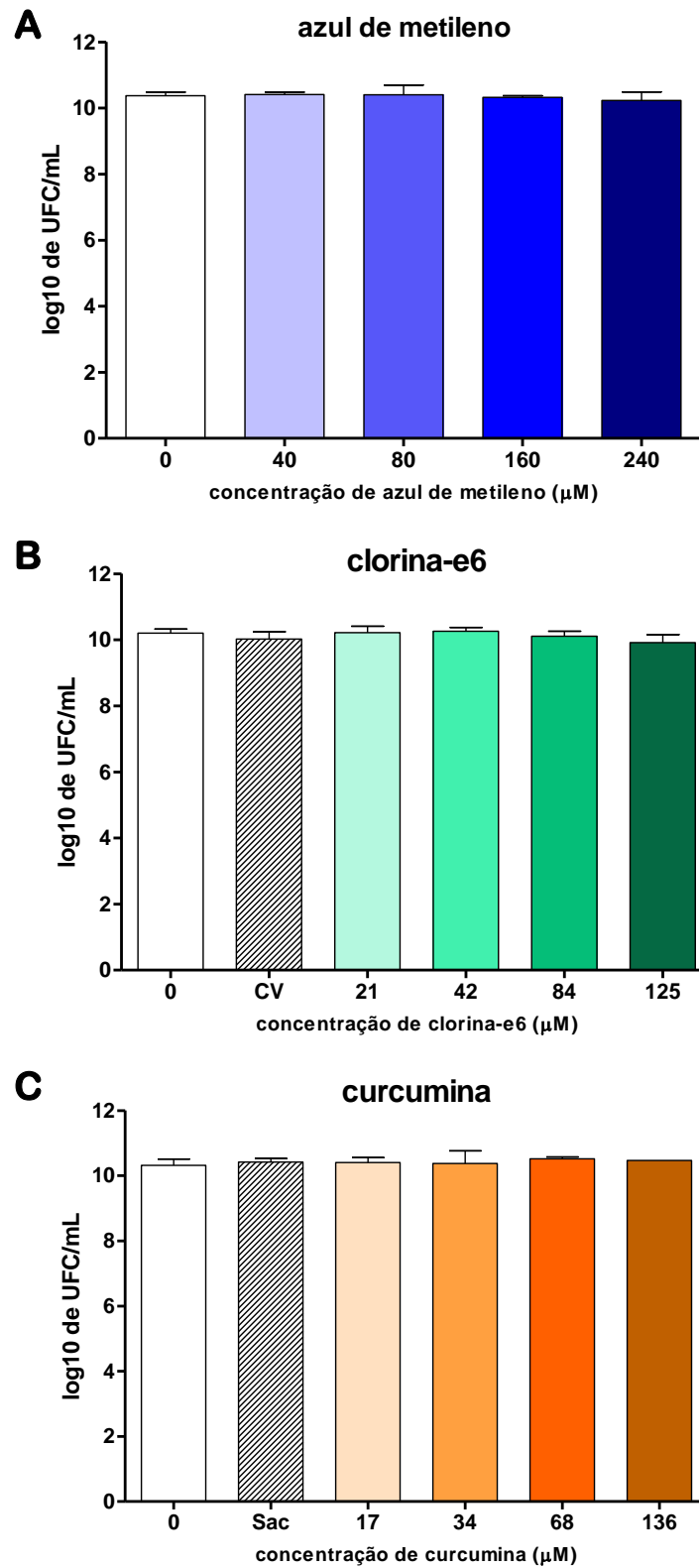
Primeiramente, a toxicidade dos FS no escuro, isto é, na ausência de irradiação, foi determinada. Na Figura 5 pode-se observar que nenhum dos FS foi tóxico nas concentrações avaliadas, condição essencial para a análise de sua atividade fotodinâmica. Da mesma forma, as doses de luz empregadas não devem provocar redução bacteriana significativa na ausência dos FS. Fica evidente na Figura 6 que essa condição também foi atendida (grupos correspondentes a 0  $\mu\text{M}$  de FS). Diante disso, é possível afirmar que todo efeito tóxico encontrado quando na combinação de cada FS com suas respectivas doses de luz é resultado da ação fotodinâmica (Figura 6). Fica evidente nesse contexto que a aPDT é capaz de eliminar completamente a cepa *E. faecalis*, uma das cepas de maior importância clínica na atualidade, a qual é capaz de sobreviver em ambientes extremamente hostis e resistir a tratamentos antimicrobianos (STUART et al., 2006). Entretanto, os resultados obtidos mostram que para conseguir eliminar *E. faecalis* foi necessária a aplicação de doses de luz elevadas.

Um exame atento da Figura 6 mostra que a redução bacteriana não progride de forma linear e gradual com o aumento da concentração de FS e/ou da dose de luz. O que se obtém, de fato, é um efeito próximo de tudo ou nada, em que o aumento da dose de luz resulta em eliminação total da viabilidade bacteriana com a mesma concentração de FS que anteriormente provocava pouca ou nenhuma redução. Para conduzir os ensaios de terapia combinada foi feita a escolha de doses sub inibitórias (redução de UFC/mL maior que 1 e menor que 3  $\log_{10}$ ), visando simular uma condição de tratamento ineficaz. Portanto, após análise dos dados iniciais, as condições escolhidas estão descritas na Tabela 5:

**Tabela 5. Parâmetros sub inibitórios de aPDT para cada fotossensibilizador**

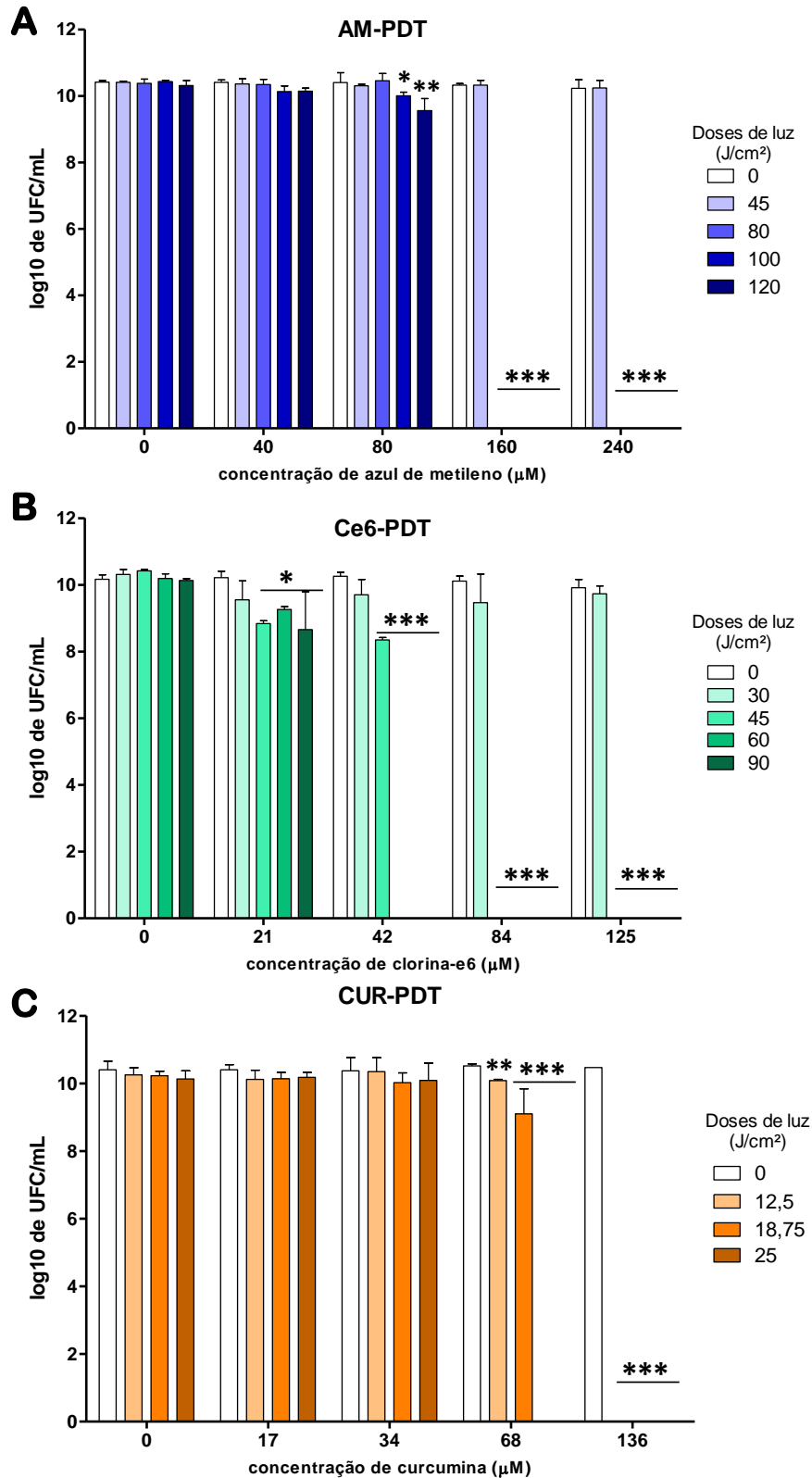
Fotossensibilizador	Condição para terapia combinada
Azul de metileno	39, 78 e 156 $\mu\text{M}$ ; 45 $\text{J}/\text{cm}^2$
Clorina-e6	21, 42 e 84 $\mu\text{M}$ ; 30 $\text{J}/\text{cm}^2$
Curcumina	17, 34 e 68 $\mu\text{M}$ ; 12,5 $\text{J}/\text{cm}^2$

FIGURA 5 – Toxicidade dos fotossensibilizadores no escuro



Suspensões padronizadas de *Enterococcus faecalis* foram submetidas a diferentes concentrações de cada fotossensibilizador. As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes (n=9) e as barras representam o desvio-padrão. Não houve diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA *one-way*. CV = controle de veículo (DMSO 0,75%); Sac = sacarose 0,5%.

FIGURA 6 – Terapia Fotodinâmica antimicrobiana



Suspensões padronizadas de *Enterococcus faecalis* foram submetidas à terapia fotodinâmica em diferentes condições. As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes (n=9) e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA two-way, com pós-teste de Bonferroni. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

#### 4.1.2. Atividade dos peptídeos antimicrobianos

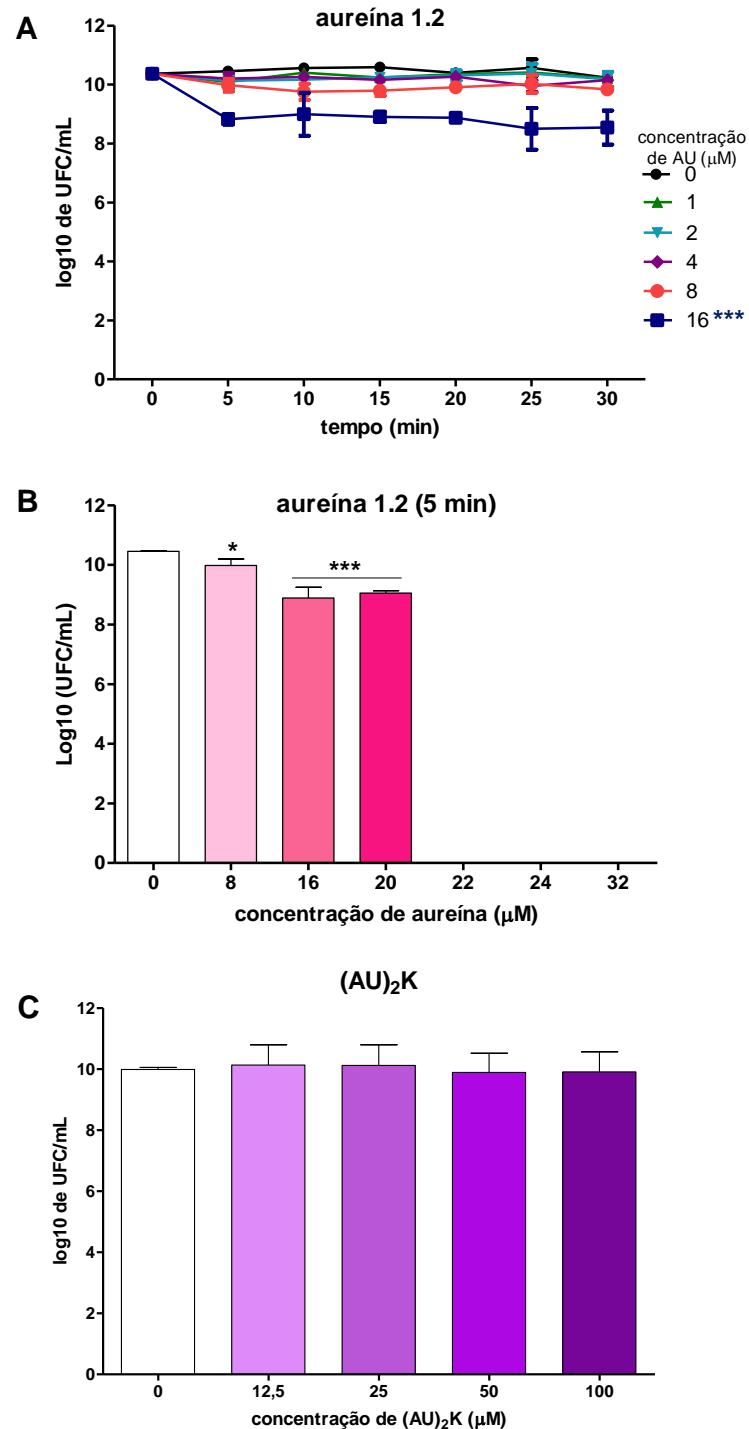
Para determinar a atividade da aureína 1.2, primeiramente foi realizado um ensaio de cinética de morte celular para estabelecimento do tempo de incubação ideal. Na Figura 7A vemos que não há diferença significativa entre os tempos de incubação avaliados, considerando uma mesma concentração. Sendo assim, como os tempos de incubação pré-irradiação dos FS foram estabelecidos como 5 minutos, todos os ensaios seguintes envolvendo AU foram realizados nesse tempo. A Figura 7B mostra a concentração bactericida mínima do peptídeo para *E. faecalis*, 22  $\mu\text{M}$ , com um perfil de morte similar a tudo-ou-nada. Esse efeito é esperado, dado o mecanismo de ação de AU, e os resultados estão de acordo com os obtidos em um estudo prévio (GIACOMETTI et al., 2007). Como também deveriam ser utilizadas concentrações sub inibitórias do peptídeo para os protocolos de terapia combinada, foram escolhidas as concentrações de 8 e 16  $\mu\text{M}$  (que provocam uma redução de 1 e 1,5  $\log_{10}$  de UFC/mL, respectivamente) para a combinação.

Também foi avaliada a ação do dímero C-terminal de AU,  $(\text{AU})_2\text{K}$ , sobre *E. faecalis* em suspensão. Podemos ver pela Figura 7C que a CBM para o dímero não foi determinada entre as concentrações avaliadas, evidenciando que a dimerização da molécula reduz drasticamente a atividade bactericida do peptídeo. Este mesmo efeito foi demonstrado para outras cepas bacterianas em um estudo realizado por Lorenzón e colaboradores (LORENZÓN et al., 2013). A racionalidade por trás da dimerização de um peptídeo é encontrada em seu mecanismo de ação: como é necessário que uma concentração limiar do peptídeo seja atingida na membrana-alvo para se ter o efeito, a dimerização teria o papel de reduzir o limiar por prover mais moléculas por vez, em teoria agilizando o processo, o que já foi de fato observado para alguns dímeros. Além disso, também se esperam vantagens farmacotécnicas, como aumento de estabilidade e solubilidade (HARA et al. 2001; DEMPSEY et al. 2003; PINI et al. 2005; LIU et al. 2010).

Entretanto, o efeito da modificação pode ser deletério para a atividade antimicrobiana ou até mesmo aumentar a toxicidade contra células de mamífero. No caso de  $(\text{AU})_2\text{K}$ , a dimerização reduziu a toxicidade do peptídeo (teste de hemólise, realizado anteriormente por Lorenzón e colaboradores (LORENZÓN et al., 2013)), porém também reduziu ou aboliu sua atividade antimicrobiana. Por outro lado, no mesmo trabalho mencionado, foi observado que  $(\text{AU})_2\text{K}$  induz a agregação de células de *Candida albicans*, em suspensão. A agregação foi atribuída à interação do dímero com carboidratos da parede celular da levedura, em particular com as mananas. Também já foi relatado que dímeros são capazes de interagir com ácidos lipoteicóicos e lipopolisacarídeos de bactérias gram-positivas e negativas, respectivamente (LORENZÓN; PICCOLI; CILLI, 2014a).

Embora a dimerização da aureína 1.2 desvalorize sua atividade contra células em suspensão, os efeitos de agregação observados para o dímero  $(AU)_2K$  podem ter papel importante na inibição da formação de biofilmes bacterianos.

Figura 7 – Concentração bactericida mínima dos peptídeos



Suspensões padronizadas de *Enterococcus faecalis* foram submetidas à incubação com o peptídeo aureína 1.2 (A e B) e (AU)<sub>2</sub>K (C – 5 min) em diferentes concentrações. Os símbolos representam as médias de 3 experimentos independentes (n=9) e as barras representam o desvio-padrão. *One-way ANOVA*;  $p < 0,0001$ . Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem aureína 1.2 – 0 μM). (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 4.1.3. Terapia combinada

#### 4.1.3.1. Viabilidade bacteriana frente aos tratamentos

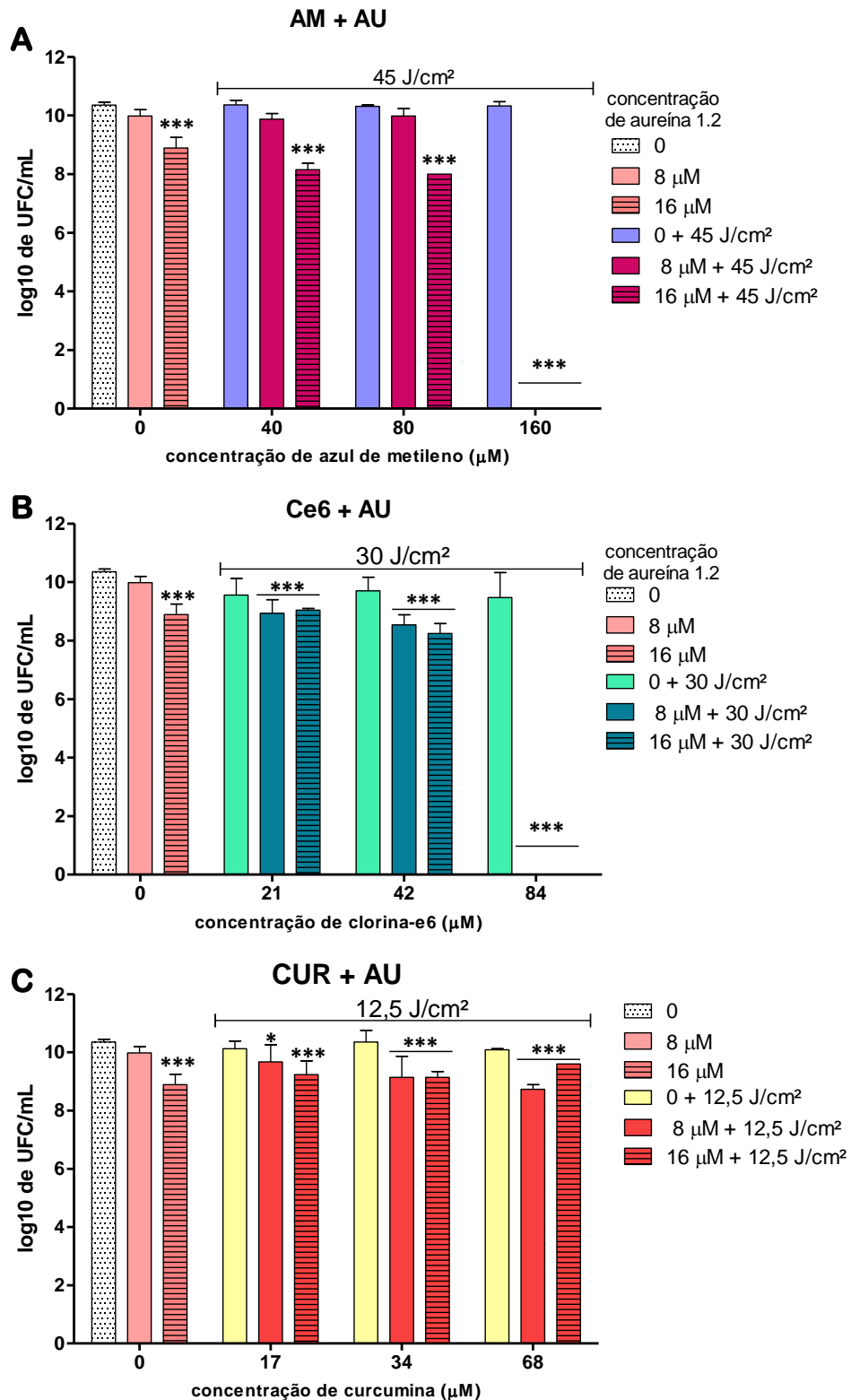
A duas concentrações de AU foram combinadas individualmente com 3 diferentes concentrações e 1 dose de luz para cada FS. As condições escolhidas assim o foram por serem aquelas em que se obteve pouca ou nenhuma redução bacteriana individualmente. O protocolo de terapia combinada foi estabelecido com a incubação simultânea do FS com o peptídeo por 5 minutos no escuro, seguida da irradiação das amostras com a dose de luz desejada. A Figura 8 traz os resultados obtidos nos experimentos de combinação.

Para o azul de metileno, a aPDT com 39, 78 ou 156  $\mu\text{M}$  de AM com 45  $\text{J}/\text{cm}^2$  de energia não provoca redução bacteriana significativa (barras azuis, Fig. 8A), mas a AM-PDT usando 156  $\mu\text{M}$  de AM combinada com 8 ou 16  $\mu\text{M}$  de AU leva à eliminação completa de *E. faecalis*, não sendo recuperada nenhuma colônia após o tratamento. No caso da clorina-e6, com 21, 42 ou 84  $\mu\text{M}$  de Ce6 com 30  $\text{J}/\text{cm}^2$  de energia também não há redução bacteriana significativa (barras verde-claro da Fig. 8B; redução  $<1\log_{10}$ ), mas também a combinação da Ce6-PDT usando 84  $\mu\text{M}$  de Ce6 com 8 ou 16  $\mu\text{M}$  de AU provoca eliminação completa da bactéria.

Além da eliminação bacteriana completa na maior concentração desses dois FS, há uma pequena melhora da redução bacteriana nas duas concentrações menores, em comparação à aPDT sozinha. Com a curcumina, por outro lado, a combinação da aPDT com AU não resultou em melhora do efeito bactericida com nenhuma das 3 concentrações de CUR testadas, gerando resultado similar ao obtido com a AU isoladamente (Fig. 8C). Ficou comprovado, assim que, nas condições testadas, a aureína 1.2 é capaz de potencializar a ação fotodinâmica quando a aPDT é mediada por azul de metileno ou clorina-e6, mas não curcumina, evidenciando um efeito sinérgico fotossensibilizador-específico.

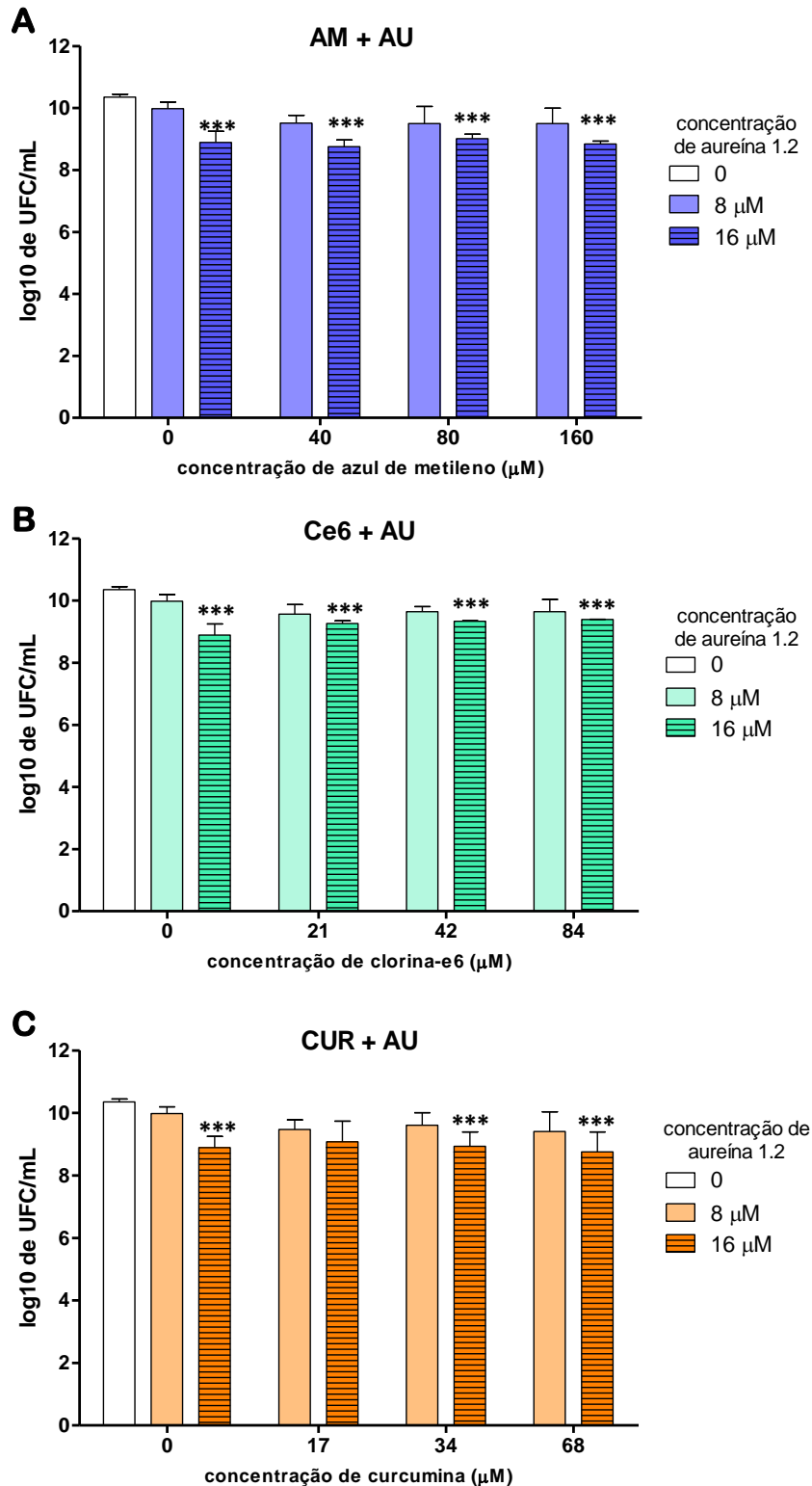
Todas as combinações foram também avaliadas no escuro, sem a ativação dos FS (Figura 9). Nesse ensaio não foi observado nenhum tipo de melhora na redução bacteriana, evidenciando que o efeito sinérgico é dependente da ativação pela luz, ou seja: a reação fotodinâmica é o fator limitante do sinergismo.

FIGURA 8 – Terapia fotodinâmica antimicrobiana combinada a aureína 1.2



Suspensões padronizadas de *Enterococcus faecalis* foram submetidas à terapia fotodinâmica em condições subinibitórias combinada ou não ao peptídeo aureína 1.2. As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes (n=9) e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem tratamento). ANOVA *two-way*, com pós-teste de Bonferroni. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

FIGURA 9 – Combinação dos fotossensibilizadores a aureína 1.2 no escuro



Suspensões padronizadas de *Enterococcus faecalis* foram submetidas incubação com azul de metileno (A), clorina-e6 (B) ou curcumina (C) em combinação com aureína 1.2, por 5 minutos no escuro. As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes (n=9) e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem tratamento). ANOVA *One-way*, com pós-teste de Tukey. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

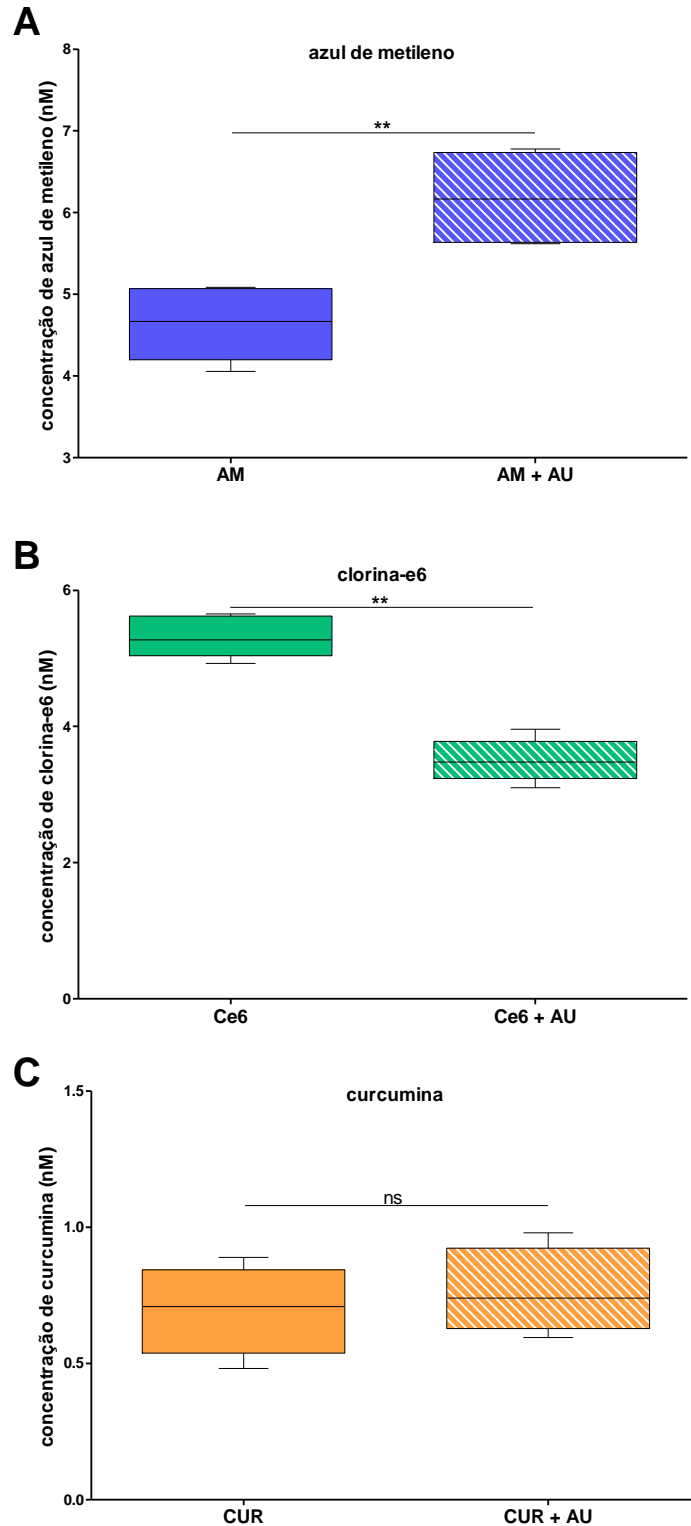
#### 4.1.3.2. Internalização de fotossensibilizadores

Na hipótese inicial deste estudo, a associação da AU ao tratamento fotodinâmico deveria resultar em efeito sinérgico por aumentar a penetração dos FS no interior celular pela ação sobre membranas apresentada pelo peptídeo. Uma vez que o efeito sinérgico foi de fato comprovado, partimos a investigar se o mesmo teria se dado pelo motivo inicialmente pensado. Para isso, foi realizado um ensaio de internalização de FS na cepa *E. faecalis* em presença e ausência de aureína monômero. Esse ensaio foi realizado no escuro, ou seja, sem a irradiação de luz, dado que a penetração dos FS no interior celular deveria ser mensurada pela emissão de fluorescência dos mesmos. A irradiação de luz poderia provocar um fotobranqueamento das moléculas e prejudicar a leitura, além da possibilidade de gerar resultados falsos-negativos.

Os resultados obtidos nesse ensaio estão apresentados na Figura 9. Fica claro que a hipótese foi comprovada para o azul de metileno. Com a adição de aureína ao meio (AM+AU, Fig. 10A) há cerca de duas vezes mais AM dentro das células bacterianas em comparação à incubação com AM sozinho, o que, muito provavelmente, é a razão da melhora no efeito de morte celular observado para essa combinação. Por outro lado, a presença de AU reduz a internalização de Ce6 (Fig. 10B), revelando não somente que a hipótese não se mostrou verdadeira para Ce6-PDT, mas também que o efeito sinérgico pode ocorrer apesar da entrada do FS na célula bacteriana.

Embora a análise estatística não tenha revelado diferença significativa entre os dois grupos, há uma tendência de haver mais CUR (Fig. 10C) no interior da bactéria na presença de AU. Entretanto, a combinação de AU com a CUR-PDT não resultou em efeito sinérgico. Esse resultado reforça que o efeito sinérgico pode se dar por mais de um mecanismo e é dependente da estrutura química do FS, que impactam em suas possíveis interações moleculares com a AU. Dessa forma, foram estabelecidos protocolos de ensaios biofísicos para avaliar se tais interações de fato estavam ocorrendo e como.

**FIGURA 10 – Internalização de fotossensibilizadores**



Suspensões padronizadas de *Enterococcus faecalis* foram incubadas azul de metileno (156  $\mu\text{M}$ ), clorina-e6 (84  $\mu\text{M}$ ) ou curcumina (68  $\mu\text{M}$ ) com ou sem o peptídeo aureína 1.2 (16  $\mu\text{M}$ ) por 5 minutos no escuro. A linha dentro da caixa representa a mediana. O limite superior da caixa indica o percentil de 75% e o limite inferior da caixa indica o percentil de 25% dos dados. Os extremos em cada caixa indicam os valores mínimo e máximo. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística entre os grupos. Teste de Mann-Whitney. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

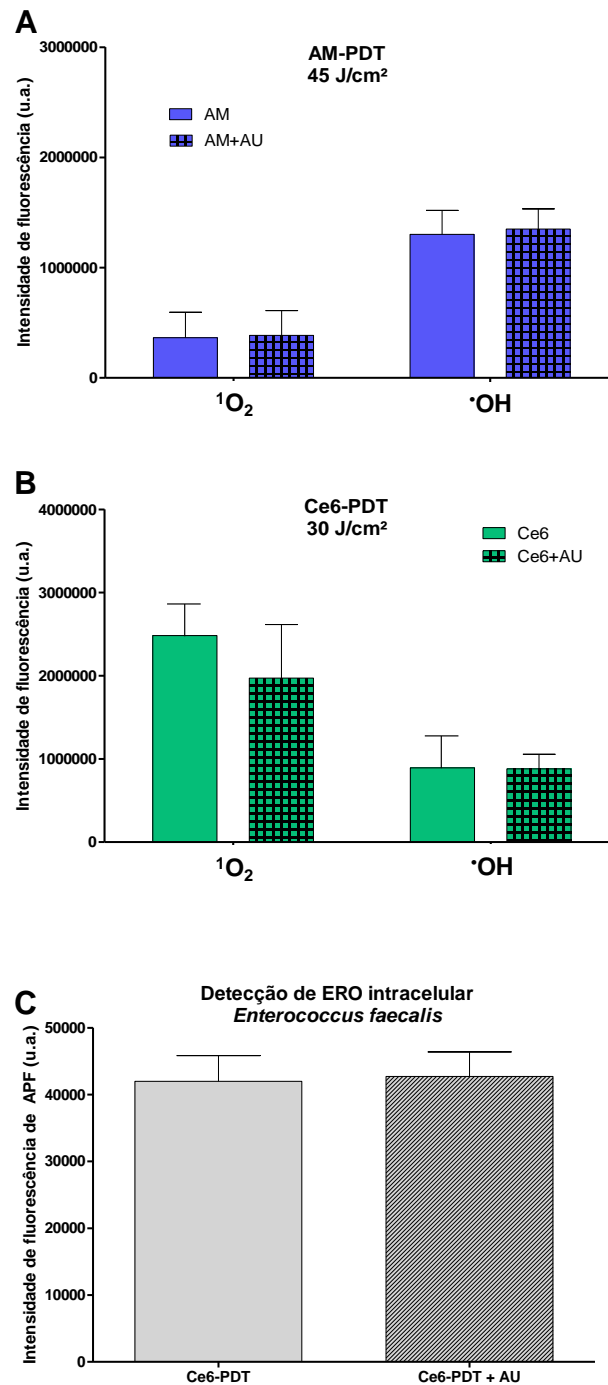
#### 4.1.3.3. Geração de espécies reativas de oxigênio

Para as duas combinações que resultaram em efeito sinérgico, foram conduzidos ensaios de geração de ERO em solução (sem a presença da bactéria) para avaliar se AU afeta a reação fotodinâmica. Soluções de AM ou Ce6 foram combinadas com sondas que detectam a geração de ERO, em presença e ausência de AU, e irradiadas com 45 (MB) ou 30 (Ce6) J/cm<sup>2</sup>. A geração de radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) foi mensurada por fluorescência e os resultados estão sumarizados na Figura 11.

O azul de metileno é conhecido por gerar maiores quantidades de espécies radicalares (reação tipo I) que oxigênio singlete (reação tipo II) quando empregado em altas concentrações, como a utilizada para este ensaio, 156  $\mu\text{M}$  (CIEPLIK et al., 2015; NUÑEZ et al., 2014; TARDIVO et al., 2005a). Dessa forma, o perfil de ERO visto na figura 11A é condizente com a literatura. Ainda, ficou evidente que a presença de AU não afetou as propriedades fotodinâmica do AM, indicando mais uma vez que o efeito sinérgico observado na terapia combinada é devido a uma maior internalização do FS em presença do peptídeo, elevando a concentração interna de ERO e, com isso, o efeito deletério da reação.

A clorina-e6, por outro lado, tipicamente gera maiores quantidades de oxigênio singlete que espécies radicalares, como observado na figura 11B e descrito na literatura (GARCIA-DIAZ; HUANG; HAMBLIN, 2016). Da mesma forma que o observado para o AM, o peptídeo não afetou a reação fotodinâmica de forma significativa. Sendo assim, o efeito sinérgico não é devido a um aumento global da geração de ERO. No entanto, uma vez que os resultados de clorina-e6 não foram uma consequência da maior internalização do FS, investigamos se o protocolo combinado poderia aumentar a geração de ERO dentro da bactéria, e assim justificar o sinergismo. A Figura 11C mostra, no entanto, que a presença do peptídeo também não interfere de qualquer forma com a reação fotodinâmica, apontando para um mecanismo sinérgico baseado em interações moleculares diretas.

Figura 11 – Geração de espécies reativas de oxigênio



Soluções de azul de metileno (156 µM; **A**) ou clorina-e6 (84 µM; **B**) foram combinadas ou não com aureína 1.2 (16 µM) e incubadas com sondas para detecção da geração de ERO, as quais emitem fluorescência ao reagirem com radicais hidroxila (·OH; APF) ou oxigênio singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>; SOSG). **C**: Suspensões padronizadas de *Enterococcus faecalis* foram incubadas com APF, lavadas e depois tratadas com Ce6-PDT ou Ce6-PDT + AU. A análise estatística (test *t*) não revelou diferenças significativas entre os grupos (*p*>0,05 para todos os testes). AM: azul de metileno; Ce6: clorina-e6; AU: aureína 1.2; u.a.: unidades arbitrárias.

#### 4.1.3.4. Espectros de absorção e fotobranqueamento dos fotossensibilizadores

O fotobranqueamento de um fotossensibilizador se refere à alteração fotoquímica da molécula de maneira que modifica suas propriedades de absorção e emissão de luz. De forma geral, isso resulta em redução da atividade fotodinâmica e intensidade da emissão de fluorescência do FS (MANG, 2008). A fotoestabilidade de um FS normalmente garante que a dose de luz necessária para ativá-lo seja menor, com conseqüente menor tempo de irradiação, o que traz mais conforto ao paciente ao mesmo tempo em que limita danos aos tecidos saudáveis adjacentes (MANG, 2008; MOAN; CHRISTENSEN; JACOBSEN, 1984).

Assim sendo, a proposição de uma terapia combinada deve levar em consideração o maior ou menor fotobranqueamento do FS nesse contexto. As taxas de fotobranqueamento dos FS, bem como seus espectros de absorção UV-visível foram determinados em ausência e presença do peptídeo, e os resultados são apresentados na Figura 12. As concentrações utilizadas de cada FS e de AU foram as mesmas para as quais se obteve redução bacteriana total ou a maior concentração testada, no caso da CUR (vide legenda da figura).

Os espectros de absorção do azul de metileno em ausência e presença de aureína 1.2 (Fig. 12A) comprovam que o peptídeo não afeta as propriedades ópticas desse FS, o que indica que as moléculas não interagem física ou quimicamente e AU não altera o padrão de solubilidade ou agregação do AM. Da mesma forma, a taxa de fotobranqueamento do AM não sofreu alterações quando o peptídeo estava presente (Fig. 12B). Sendo assim, o efeito sinérgico obtido quando da combinação da AU com a AM-PDT (Fig. 8A) deve se dar essencialmente pelo aumento da penetração do FS na célula bacteriana (Fig. 10A), como inicialmente imaginado.

Quando observamos os espectros da clorina-e6 fica evidente que a presença da AU afetou as propriedades ópticas desse FS. No espectro UV-visível (Fig. 12C) há nítida alteração do padrão de absorção: redução da intensidade da banda de Soret (~400 nm) com alargamento do pico, e aumento da intensidade com deslocamento de 13 nm à direita (652 → 665 nm, deslocamento batocrômico) da banda Q2. Esses resultados indicam que a adição de AU induz a formação de agregados Ce6-Ce6 e/ou complexos Ce6-AU sem afetar as propriedades de geração de ERO do FS. Ce6 é protegida contra fotodegradação quando AU está presente (Fig. 12D), o que poderia ajudar a prolongar a meia vida do PS, favorecendo assim o efeito fotodinâmico global. Além disso, os complexos/agregados parecem dificultar a internalização da molécula de FS, provavelmente fazendo com que eles se acumulem na membrana plasmática, levando a uma maior instabilidade dessa estrutura e facilitando a sua quebra na ativação da luz.

Essa inferência é baseada no princípio de que a ligação de moléculas a uma bicamada lipídica altera suas propriedades físicas, alterando sua espessura e elasticidade (SUN et al., 2008), e está de acordo com os dados obtidos por Vermathen e colaboradores (VERMATHEN et al., 2010), cujo estudo demonstra que quanto maior o grau de agregação de Ce6, menor sua internalização, e os dados de Fuchs e colaboradores (FUCHS et al., 2007), que demonstram que uma maior instabilidade de membrana torna as células mais suscetíveis a aPDT. Além disso, a Ce6 não é ionizada significativamente em pH neutro (pKa de seus grupos carboxílicos varia entre 7 e 8; (VERMATHEN et al., 2010)) e, portanto, não está apta para uma interação iônica com o peptídeo catiônico: a interação entre as duas moléculas é mais provavelmente de natureza hidrofóbica, como demonstrado em estudos anteriores envolvendo a interação de peptídeos com porfirinas (HUFFMAN; SUSLICK, 2000; LECLERC et al., 1993), mas interações dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio também são possíveis. Finalmente, sendo Ce6 um FS neutro, as cargas positivas do peptídeo presentes nos complexos Ce6-AU favorecem a ligação da Ce6 à parede celular bacteriana.

Em resumo, a hipótese de que a eficiência da Ce6-PDT seria aumentada em presença de AU por uma maior concentração do FS no interior celular não foi comprovada, sendo o efeito sinérgico não fruto de maior permeabilidade da membrana celular, mas sim de sua maior instabilidade. Como a atividade fotodinâmica desses complexos não foi afetada de forma significativa, a geração de ERO quando da ativação do FS se dá de forma concentrada na membrana, o que, aliado à instabilidade provocada pelo peptídeo, potencializa o efeito deletério e leva à completa eliminação da carga bacteriana, conforme demonstrado.

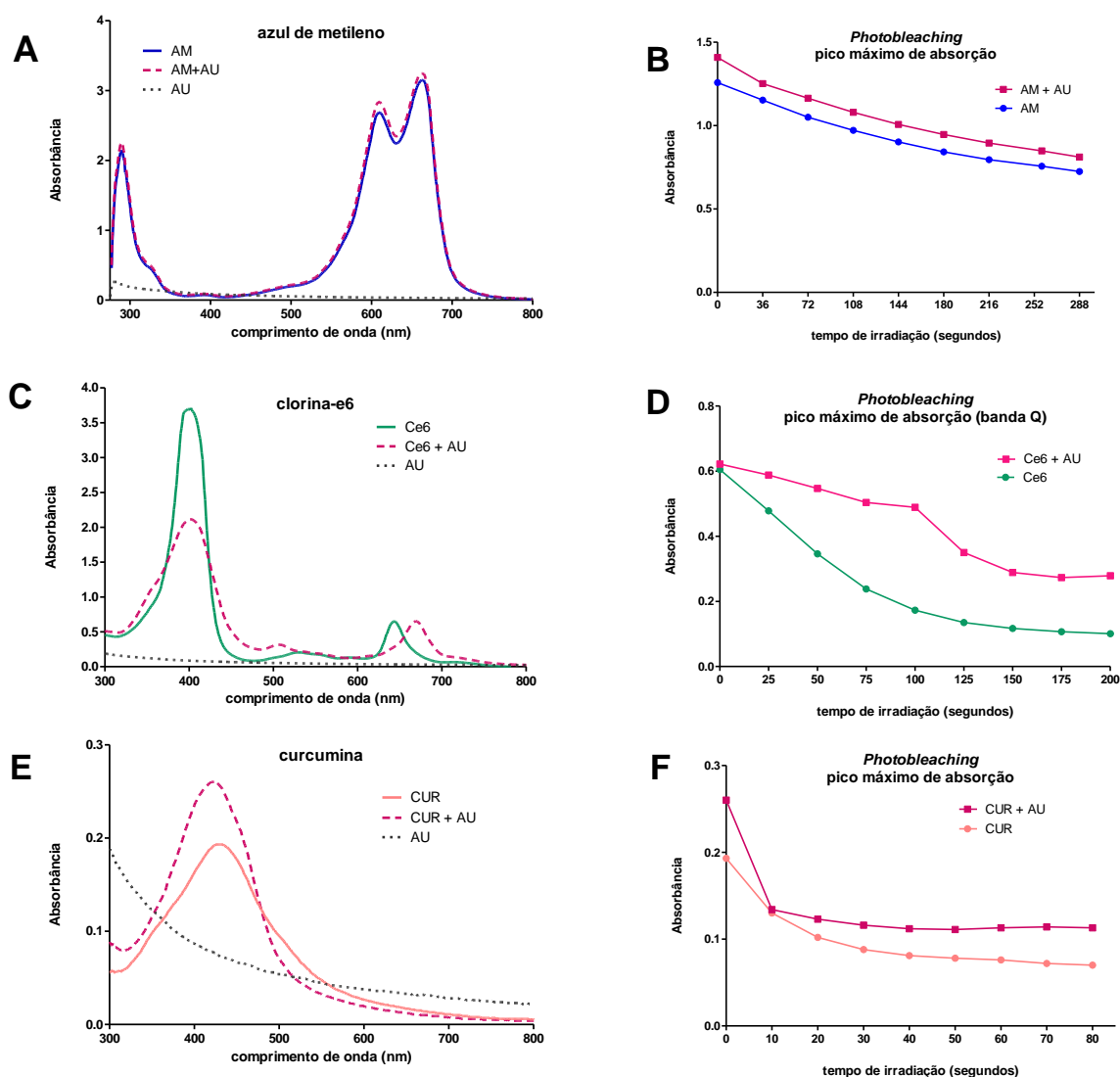
Na figura 12E temos os espectros de absorção da curcumina. Há também nítida alteração das propriedades ópticas da curcumina na presença do peptídeo. As alterações dos espectros, entretanto, são opostas àquelas observadas para a clorina-e6: há aumento da intensidade do pico máximo, além de seu estreitamento, e um deslocamento de 10 nm à esquerda do espectro de absorção (428 → 418 nm; deslocamento hipsocrômico). Analisando os espectros de absorção da curcumina com e sem AU, a razão para o efeito sinérgico ausente parece ser a formação de um complexo solúvel e estável, protegendo a CUR do fotobranqueamento. Conjugados de curcumina face-a-face causam dispersão da luz, diminuindo a intensidade de absorção (HAZRA; ROY; BAGCHI, 2014); a natureza anfipática da AU pode ter atuado na desmontagem desses conjugados, justificando o pico de absorção mais estreito e mais intenso após a adição do peptídeo.

A melhor solubilidade da curcumina deve-se, provavelmente, à formação de pontes de hidrogênio intermoleculares, como observado na interação de CUR e surfactantes catiônicos

(HAZRA; ROY; BAGCHI, 2014; PRIYADARSINI, 2009). Esperava-se que este efeito melhorasse a atividade da CUR como fotossensibilizador, uma vez que se tornaria mais disponível em solução; no entanto, a interação parece ocorrer de tal forma que prejudica o efeito fotodinâmico, provavelmente diminuindo a reatividade CUR em solução. Além disso, o fato de a reação fotodinâmica ter sido determinada como o fator limitante para o efeito sinérgico, e a CUR ter o menor rendimento de geração de ERO dos três FS, ajuda a entender por que molécula não teve ação sinérgica com o peptídeo.

Diante do exposto, fica evidente por esses ensaios que a interação da AU com os FS se dá de forma mais complexa que inicialmente imaginado. Ainda, esses resultados mostram a importância de se avaliar diversas combinações quando da busca por um efeito sinérgico, deixando claro que a escolha do FS faz toda a diferença no processo.

**FIGURA 12 – Espectros de absorção e taxa de fotobranqueamento dos fotossensibilizadores**



**A:** Espectros UV-VIS normalizados de AM (156  $\mu\text{M}$ ), AU (16  $\mu\text{M}$ ) e AM+AU. **B:** cinética de fotobranqueamento de AM sozinho e em presença de AU, irradiado com um total de 45  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Análise estatística não revelou diferenças significativas entre as curvas (teste  $t$ ,  $p=0,2581$ ). **C:** Espectros UV-VIS normalizados de Ce6 (84  $\mu\text{M}$ ), AU (16  $\mu\text{M}$ ) e Ce6 + AU. **D:** cinética de fotobranqueamento de Ce6 sozinho e em presença de AU irradiada com um total de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Análise estatística revelou que há diferenças significativas entre as curvas (teste  $t$ ,  $p<0.0001$ ). **E:** Espectros UV-VIS normalizados de CUR (68  $\mu\text{M}$ ), AU (16  $\mu\text{M}$ ) e CUR + AU. **F:** cinética de fotobranqueamento de CUR sozinho e em presença de AU irradiada com um total de 12,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ . A análise estatística revelou que há diferenças significativas entre as duas curvas (teste  $t$ ,  $p=0,0244$ ). Todos os ensaios foram realizados em solução aquosa utilizando o leitor Synergy H1M (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, VT, USA). AM: azul de metileno; AU: aureína 1.2; Ce6: clorina-e6; CUR: curcumina.

#### 4.1.3.5. Dicroísmo circular

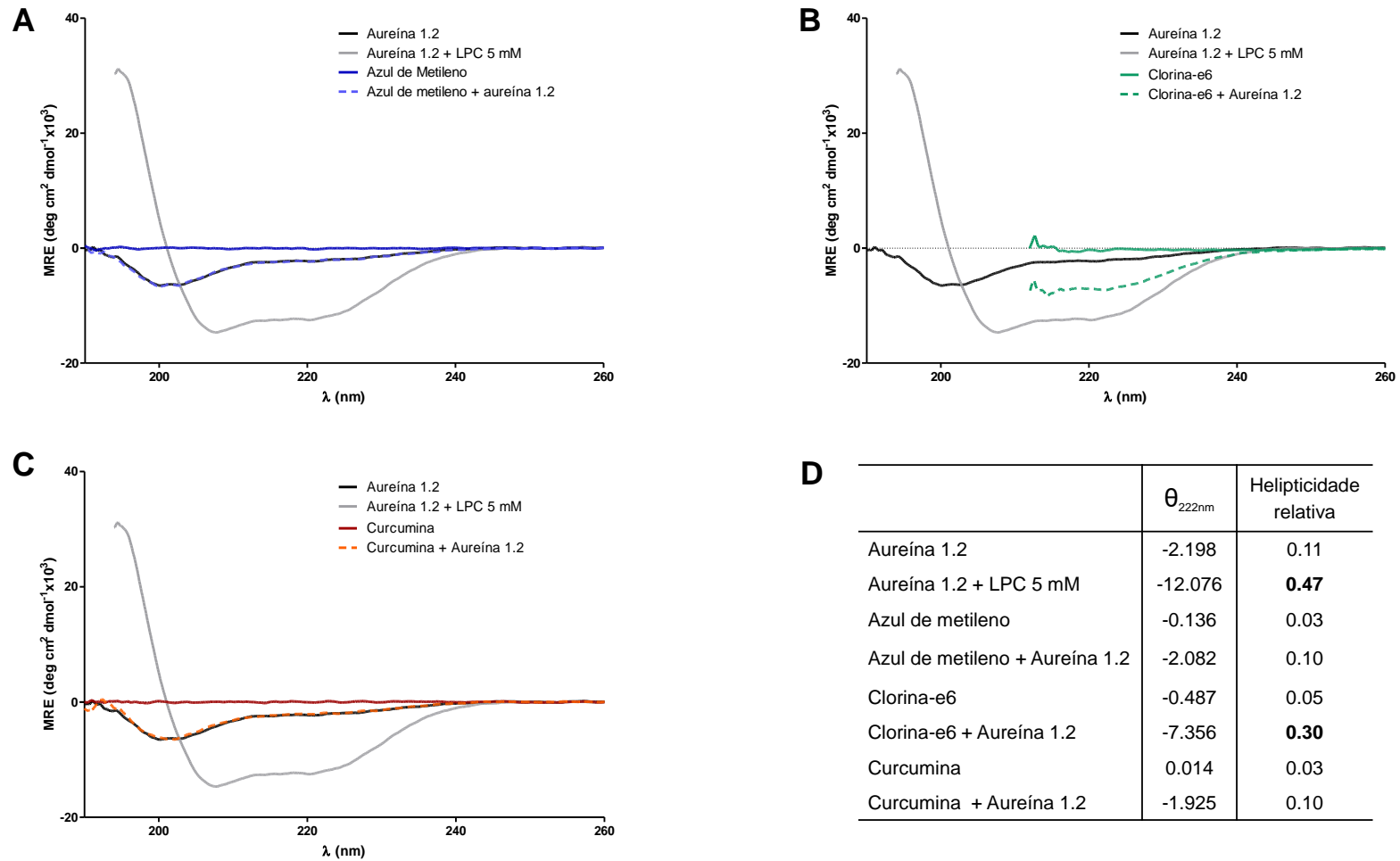
Após investigar os efeitos da AU sobre as propriedades ópticas dos FS, o efeito dos FS sobre a conformação do peptídeo foi avaliado através do ensaio de dicroísmo circular (DC). O DC é uma técnica espectroscópica que permite classificar e quantificar os tipos de estruturas secundárias de moléculas opticamente ativas, como proteínas e peptídeos (AVITABILE et al, 2014).

A aureína 1.2 em solução aquosa não apresenta estrutura secundária definida, o que é registrado no espectro como um pequeno vale em 200 nm (Fig. 13A). Após a adição de micelas de lipofosfatidilcolina (LPC), há a estruturação do peptídeo em  $\alpha$ -hélices, evidenciada pelas duas bandas negativas em 208 e 222 nm, conforme descrito previamente (LORENZÓN et al., 2013).

A adição de soluções de AM ou CUR não interferiu com a conformação de AU, resultando em leituras similares àquela obtida para o peptídeo sozinho em solução (Fig. 13A e 13C). Por outro lado, em presença de Ce6, há uma clara estruturação de AU em  $\alpha$ -hélices, registrado como um pico negativo em 222 nm, mostrando que a hidrofobicidade da Ce6 é suficiente para induzir a alteração conformacional de AU, em proporção muito próxima à obtida pela adição de LPC (Fig. 13B e 13D). O pico em 208 nm não pôde ser registrado para esse grupo experimental porque a solução de clorina-e6 faz elevar muito a voltagem da fotomultiplicadora em comprimentos de onda menores que 210 nm, o que não apenas diminui a sensibilidade da leitura como também pode danificar o equipamento. Entretanto, diversos trabalhos demonstram que o registro do pico em 222 nm já é suficiente para assegurar a presença de  $\alpha$ -hélices no meio (CHIN et al., 2002; HIRST; BROOKS, 1994).

Estudos anteriores demonstraram que a indução prematura (*i.e.*, anterior ao encontro do peptídeo com a membrana) de  $\alpha$ -hélices pode aumentar a capacidade do peptídeo de permeabilizar membranas citoplasmáticas, especialmente de espécies Gram-positivas (HOUSTON et al., 1998; ZELEZETSKY et al., 2005). A indução da formação de  $\alpha$ -hélices em AU causada por Ce6 de forma prematura pode ter favorecido em termos cinéticos a atividade do peptídeo.

Figura 13 – Espectros de dicroísmo circular do peptídeo aureína 1.2



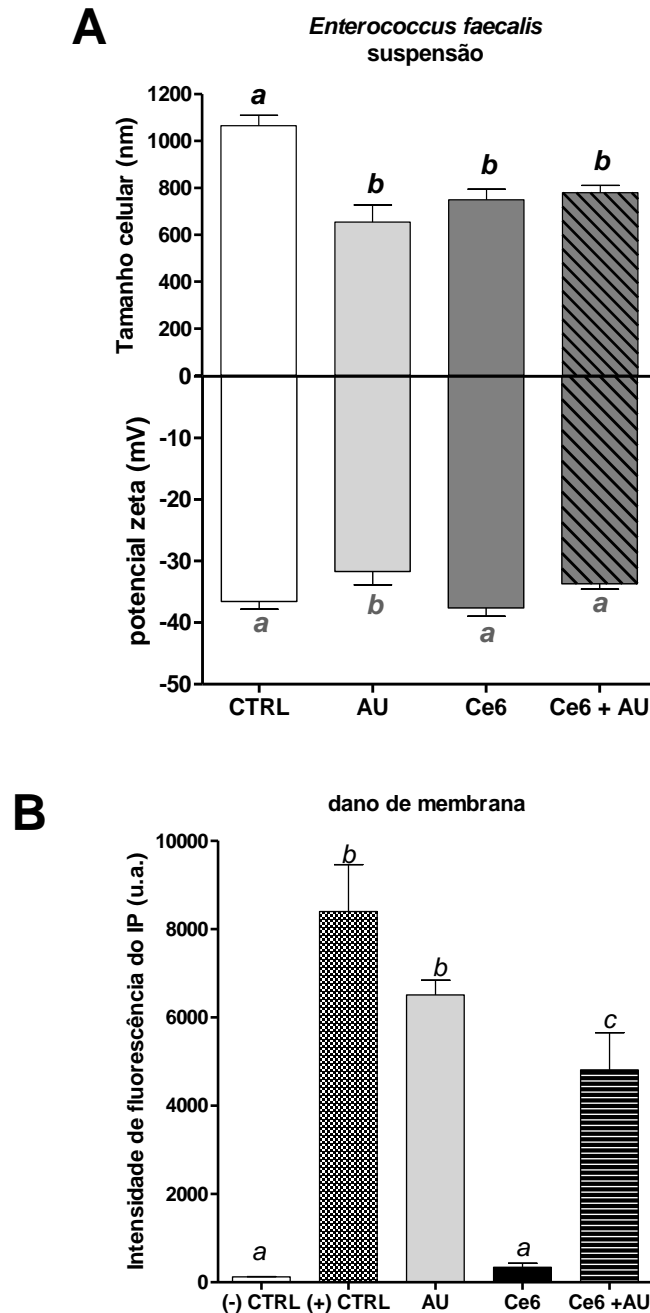
**A-C:** Espectros de dicroísmo circular de AU (16  $\mu\text{M}$ ) foram registrados em solução aquosa (tampão fosfato 0.1 M, pH 7,2) antes e depois da adição de LPC (5 mM), AM (156  $\mu\text{M}$ ), Ce6 (84  $\mu\text{M}$ ), ou CUR (68  $\mu\text{M}$ ). Os espectros são a média de 10 leituras convertidas a helicidade molar  $[\theta]$  (in  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \times 10^3$ ) para cada amostra. **D:** helicidade molar a 222 nm e helicidade relativa da aureína 1.2 nos diferentes ambientes. LPC: lipofosfatidilcolina.

#### 4.1.3.6. Potencial zeta e dano de membrana

À luz dos resultados apresentados até o momento, foi levantada a hipótese de que o mecanismo do efeito sinérgico entre Ce6-PDT e AU poderia ser baseado em um aumento da instabilidade da membrana bacteriana devido ao acúmulo de agregados de Ce6-Ce6 e/ou complexos Ce6-AU. Essa hipótese foi investigada por meio da análise do potencial zeta e da internalização de iodeto de propídeo (IP). O potencial zeta é uma propriedade física exibida por todas as partículas em suspensão, resultado do acúmulo de contra-íons na região interfacial partícula-líquido, com o objetivo de neutralizar a partícula (FERNANDES; CESAR; BARJAS-CASTRO, 2011), e a alteração do potencial zeta está relacionada a um aumento da permeabilidade da membrana celular (HALDER et al., 2015). O IP, por sua vez, é uma molécula ligante de DNA que é impermeável à membrana celular intacta, sendo capaz de ser internalizado quando há danos na membrana (STAN-LOTTER et al., 2006).

A Figura 14A mostra que AU induziu tanto uma alteração no tamanho celular como no potencial zeta de *E. faecalis*. A alteração no potencial se deve à neutralização de parte das cargas negativas das bactérias pelas cargas positivas do peptídeo; já o tamanho reduzido das células é provavelmente devido à permeabilização das mesmas, como visto na Fig. 14B: o tratamento com AU aumenta a captação de IP. O tratamento com Ce6, por outro lado, não afetou o potencial zeta, pois é uma molécula neutra em pH fisiológico, mas também teve efeito sobre o tamanho da célula bacteriana (Fig. 14A), embora a permeabilização celular não tenha sido significativamente alterada (Fig. 14B). Ao combinar as duas moléculas, no entanto, observamos a mesma redução no tamanho da partícula, nenhuma alteração significativa no potencial zeta (Fig. 14A) e permeabilização celular 26% menor do que a permeabilização causada apenas pela AU (Fig. 14B), significando que AU não estava totalmente disponível para se ligar à membrana. Tomados em conjunto, os resultados confirmam a formação de complexos Ce6-AU. Além disso, mesmo que a permeabilização celular seja reduzida na presença dos complexos, a morte celular é aumentada, apontando para uma maior instabilidade de membrana devido ao acúmulo desses complexos.

Figura 14 – Efeitos da clorina-e6 e aureína 1.2 sobre a membrana de *E. faecalis*



**(A) potencial zeta:** Suspensões padronizadas de *E. faecalis* foram incubadas com AU (16  $\mu\text{M}$ ), Ce6 (84  $\mu\text{M}$ ) ou Ce6 + AU durante 5 minutos no escuro. O tamanho e o potencial zeta das células bacterianas foram determinados para cada tratamento e comparados com o controle (sem tratamento). As colunas representam a média de 30 leituras de três ensaios independentes, as barras representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os grupos. ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey. Tamanho da célula:  $p < 0,0001$ ; potencial zeta:  $p = 0,0282$ . **(B) internalização de iodeto de propídeo (IP):** *E. faecalis* foi incubado com isopropanol 70%, AU (16  $\mu\text{M}$ ), Ce6 (84  $\mu\text{M}$ ) ou Ce6+AU por 5 minutos. As bactérias foram lavadas para remover o tratamento e incubadas com IP por 5 min. Removido o excesso de IP, a fluorescência foi lida a 535/617 nm. Colunas representam a média de três triplicatas independentes, as barras representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os grupos. ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey,  $p < 0,0001$ . (-) CTRL: controle negativo (sem tratamento); (+) CTRL: controle positivo (isopropanol 70%); Ce6: clorina-e6; AU: aurein 1.2.

#### 4.1.3.7. Atividade da terapia combinada contra outras espécies

Uma vez que o efeito sinérgico foi estabelecido, e usando os mesmos parâmetros que eliminaram a totalidade de *E. faecalis*, o tratamento combinado foi testado contra outras espécies clinicamente relevantes comumente identificadas como causas de infecções nosocomiais com risco de vida, relacionadas a altos níveis de resistência a antibióticos: *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo), *Acinetobacter baumannii* (Gram-negativo), *Escherichia coli* (Gram-negativo) e *Enterococcus faecium* VRE (*vanA*; Gram-positivo).

Como pode ser visto na Figura 15, todas as quatro cepas apresentaram sensibilidades semelhantes ao peptídeo, o que não foi estatisticamente diferente dos controles. A AM-PDT combinada com AU na concentração mais alta (16 µM) reduziu a carga bacteriana de *S. aureus* e *A. baumannii* em 6 e 5 log<sub>10</sub> (99,9999 e 99,999%), respectivamente, mas reduziu a viabilidade do *E. faecium* em apenas 2,5 log<sub>10</sub> (~99%) e não resultou em melhora significativa na redução de *E. coli* em comparação com AM-PDT sozinha. Isso porque a *E. coli* é particularmente menos sensível à aureína 1.2, como demonstrado em estudos anteriores (LAADHARI et al., 2016; SANI et al., 2017), e, portanto, a presença de AU não poderia aumentar a penetração do AM. Dessa forma, o efeito sinérgico não é observado nessa espécie.

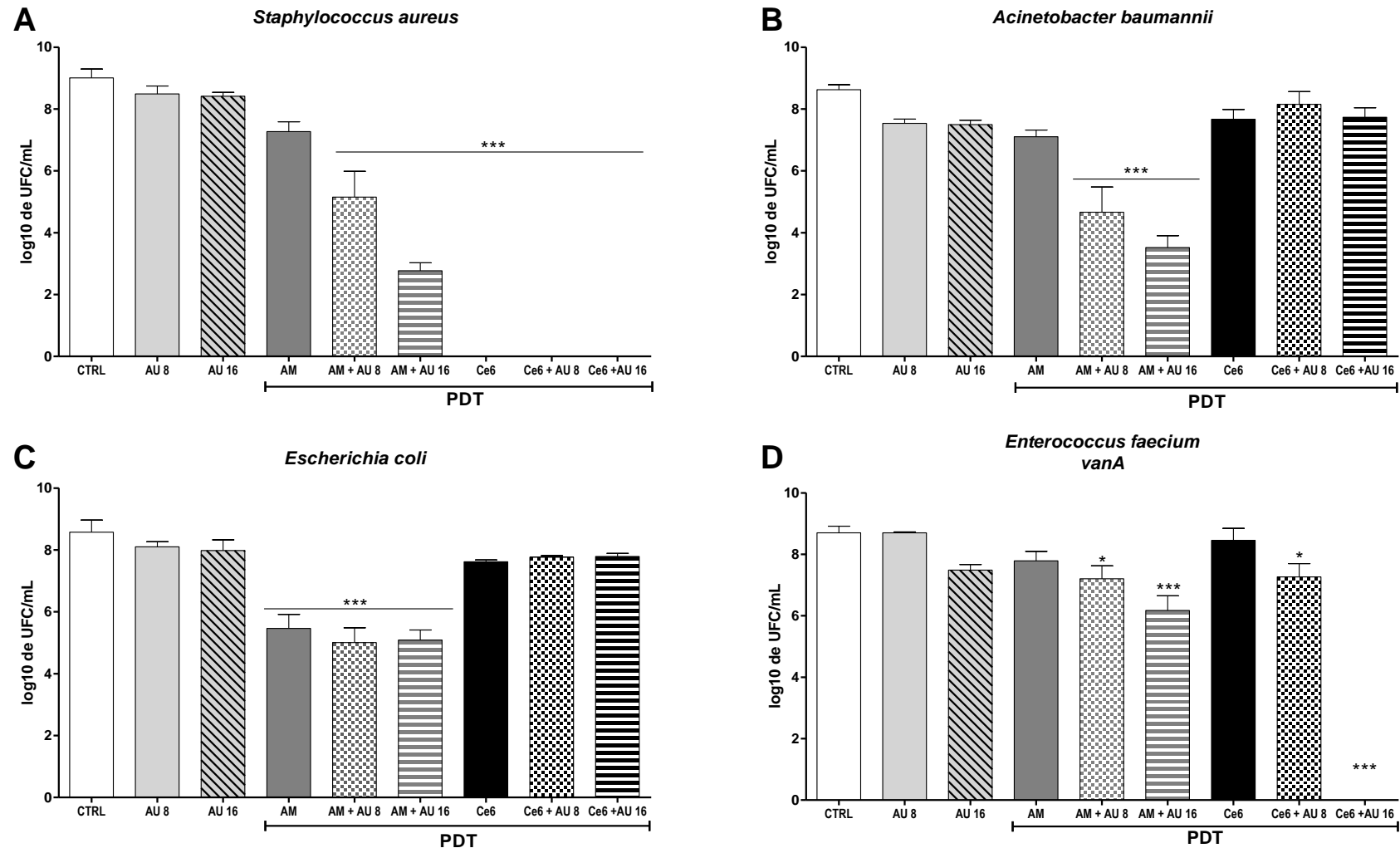
As duas cepas gram-negativas foram refratárias ao tratamento com Ce6-PDT. Isso está relacionado à sua estrutura de parede celular: as espécies Gram-negativas são menos suscetíveis aos fotossensibilizadores neutros (como Ce6) e aniônicos, mas suscetíveis aos catiônicos, como o AM (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009). Finalmente, o *S. aureus* apresentou grande sensibilidade à Ce6-PDT, mesmo sem AU, como relatado anteriormente (ULIANA et al., 2014), e o *E. faecium* VRE foi eliminado com sucesso pelo protocolo de combinação, uma conquista sem precedentes.

Em resumo, a AM-PDT combinada com AU mostrou um espectro mais amplo de atividade contra patógenos clinicamente importantes, mas a Ce6-PDT+AU teve um efeito mais dramático sobre a eliminação total das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, altamente tolerantes a tratamentos antimicrobianos (GILMORE et al., 2014). A cepa *E. faecium* VRE, em particular, é uma das mais desafiadoras na prática clínica.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos nesta primeira etapa do estudo revelam que a combinação de aPDT com um PAM pode melhorar a morte bacteriana com concentrações menores de FS e PAM e baixas doses de luz, o que, por sua vez, minimizaria os efeitos adversos no tecido do hospedeiro. Como afirmado anteriormente, a resistência a aPDT tem se mostrado improvável; a resistência ao PAM, embora possível, seria praticamente abolida empregando o peptídeo em baixas concentrações no protocolo de

combinação. Essa abordagem sinérgica tem o potencial de eliminar infecções localizadas e, ao mesmo tempo, minimizar o uso de antimicrobianos sistêmicos e impedir o desenvolvimento de novos perfis de resistência.

Figura 15 – Atividade da terapia combinada contra espécies de importância clínica



Suspensões padronizadas de *Staphylococcus aureus* (A), *Acinetobacter baumannii* (B), *Escherichia coli* (C) ou *Enterococcus faecium* VRE (D) foram submetidas à terapia fotodinâmica combinada ou não ao peptídeo aureína 1.2. AM-PDT: 156  $\mu$ M de AM + 45 J/cm<sup>2</sup>; Ce6-PDT: 84  $\mu$ M de Ce6 + 30 J/cm<sup>2</sup>. As colunas representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicatas, e as barras representam o desvio padrão. Os asteriscos indicam onde há uma diferença significativa em comparação com o controle (sem tratamento). ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). AM: azul de metileno; Ce6: clorina-e6; AU: aurein 1.2; VRE: enterococo resistente à vancomicina.

## 4.2. Fase biofilme

### 4.2.1. Inibição da formação de biofilme

Peptídeos antimicrobianos podem ser ativos contra biofilmes, assim como são contra bactérias planctônicas. No entanto, alguns PAM não são bons agentes anti-biofilme, sendo incapazes de matar e dispersar biofilmes maduros e, embora os pesquisadores ainda não tenham uma explicação clara do porquê, um estudo identificou uma sequência consenso de aminoácidos entre os peptídeos que exibem boa atividade de biofilme, o que poderia explicar essa diferença de efeito (STREMPER; STREHMEL; OVERHAGE, 2015). A AU não apresenta essa sequência e se enquadra no grupo de PAMs que não apresentam atividade contra biofilmes maduros; o mesmo é observado para o seu dímero, (AU)<sub>2</sub>K.

Por outro lado, vários estudos demonstraram que os PAMs podem prevenir a formação de biofilme em estágios iniciais por inibir a adesão bacteriana a uma superfície (STREMPER; STREHMEL; OVERHAGE, 2015). Portanto, foi levantada a hipótese de que tanto o monômero quanto o dímero da AU poderiam atuar como inibidores da formação de biofilme e que tal característica poderia ser melhorada combinando-os com aPDT. Embora a eliminação total das bactérias planctônicas com a terapia combinada tenha sido alcançada *in vitro*, muitas células bacterianas poderiam sobreviver ao tratamento *in vivo*, seja porque não foram atingidas pelas concentrações apropriadas de FS ou PAM, ou não receberam a dose de luz apropriada. Nesse sentido, determinar se o tratamento combinado é capaz de prevenir a formação de biofilme e, portanto, prevenir uma recorrência e cronificação da infecção, é de grande importância quando se estudam novas abordagens antimicrobianas. Dessa forma, avaliamos a capacidade de combinações sub letais de aPDT e AU ou (AU)<sub>2</sub>K em prevenir a formação de biofilmes de *E. faecalis*.

O primeiro passo para avaliar a capacidade de cada tratamento em inibir a formação de biofilme foi avaliar a viabilidade das bactérias que foram capazes de aderir ao fundo do poço e assim permaneceram. *E. faecalis* foi tratado em fase planctônica com combinações sub letais de AU e aPDT, a saber: 42 µM de Ce6 + 30 J/cm<sup>2</sup>, e 78 µM de MB + 45 J/cm<sup>2</sup>, combinados ou não com AU a 16 µM ou (AU)<sub>2</sub>K a 25 µM. Após o tratamento, a bactéria foi incubada sem agitação por 24 ou 48 horas para permitir o desenvolvimento do biofilme, e este protocolo foi realizado para todos os experimentos detalhados abaixo.

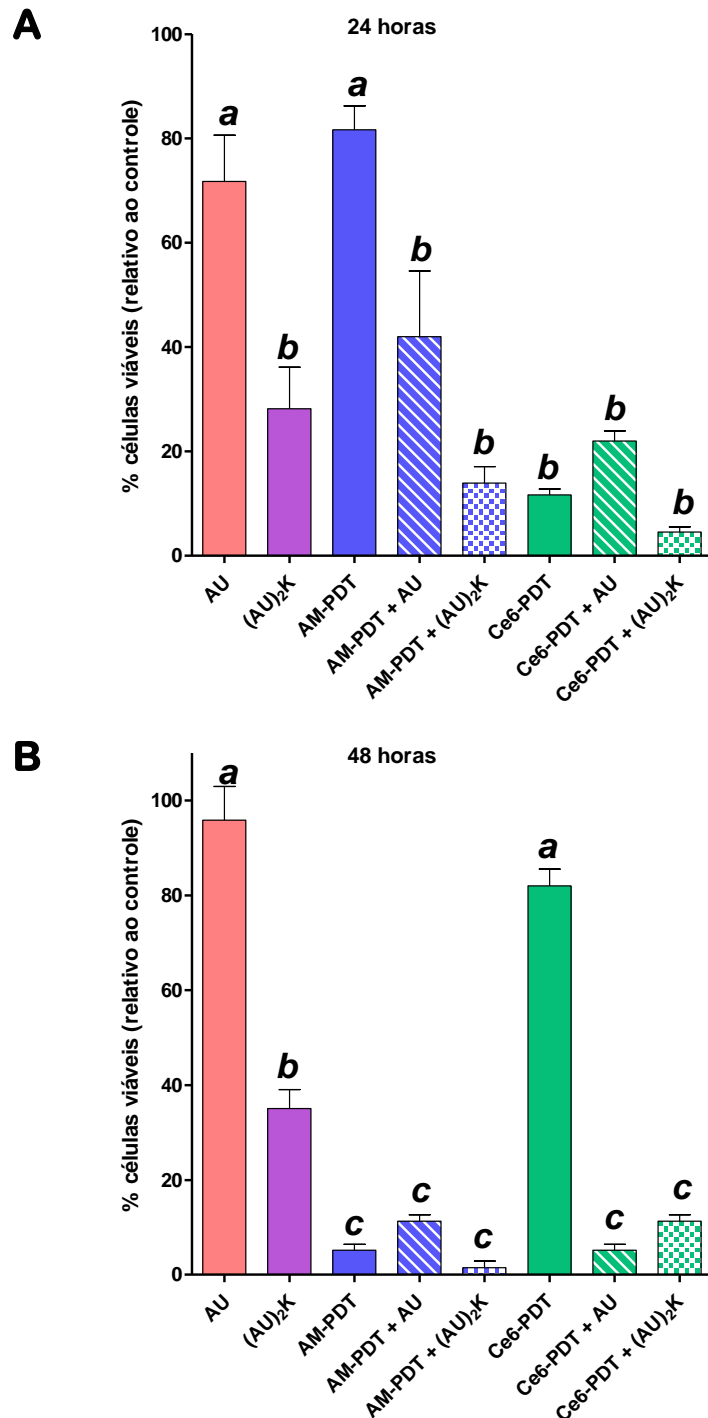
É notável na Figura 16A que todos os tratamentos com Ce6-PDT foram realmente eficientes na redução do estágio inicial do biofilme, resultando em reduções de viabilidade que variaram entre 95,5 (Ce6-PDT + (AU)<sub>2</sub>K) e 78% (Ce6-PDT) em relação ao controle. AM-PDT reduziu a viabilidade em apenas 20%, e AU em 30%, mas a combinação de ambos os

tratamentos foi capaz de abolir quase 60% do biofilme. O dímero (AU)<sub>2</sub>K induziu uma expressiva redução de mais de 70% da viabilidade celular sozinho, quase abolindo por completo a formação dos biofilmes quando combinado com AM-PDT ou Ce6-PDT.

Os biofilmes foram novamente avaliados após 48 horas de incubação, e o que se observa na figura 16B é que as bactérias tratadas com AU ou Ce6-PDT tiveram uma recuperação expressiva, superando os efeitos do tratamento e dando continuidade ao processo de formação do biofilme. O grupo tratado com (AU)<sub>2</sub>K apresentou uma ligeira recuperação, de 7%. Por outro lado, todos os grupos tratados com AM-PDT apresentaram inibição ainda mais pronunciada dos biofilmes após 48h, provavelmente devido ao desprendimento das células antes aderidas ao substrato. Ce6-PDT + AU também foi mais eficiente na inibição após 48h, enquanto o grupo Ce6-PDT + (AU)<sub>2</sub>K mostrou uma pequena recuperação.

Esta avaliação inicial mostrou que, mesmo em condições sub letais, o tratamento combinado de PDT com os peptídeos tem um impacto importante na dinâmica da formação de biofilme, com algumas combinações chegando próximo da totalidade de inibição. Considerando a importância clínica da espécie *Enterococcus faecalis*, muito associada a infecções nosocomiais e infecções endodônticas, altamente tolerante e resistente a fármacos antimicrobianos, e que prontamente forma biofilmes em uma diversidade de superfícies, incluindo cateteres, próteses e válvulas cardíacas danificadas (DALE et al., 2017), esse resultado mostra todo o potencial do protocolo de combinação de terapias abordado neste trabalho para melhorar o tratamento de infecções em âmbito hospitalar e odontológico.

Figura 16 – Inibição da formação de biofilme de *E. faecalis*: viabilidade metabólica



*E. faecalis* foi tratado em fase planctônica e depois incubado por 24 ou 48h em placas de 96 poços para iniciar a formação de biofilme. Após os tempos de incubação, os biofilmes foram lavados e incubados com resazurina, para determinação de suas atividades metabólicas. As colunas representam a média de três ensaios independentes (n = 9) e as barras representam o desvio padrão. Todos os grupos foram normalizados em relação ao grupo não tratado. Letras diferentes indicam que os grupos diferem entre si. ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey (p<0,0001).

#### 4.2.2. Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

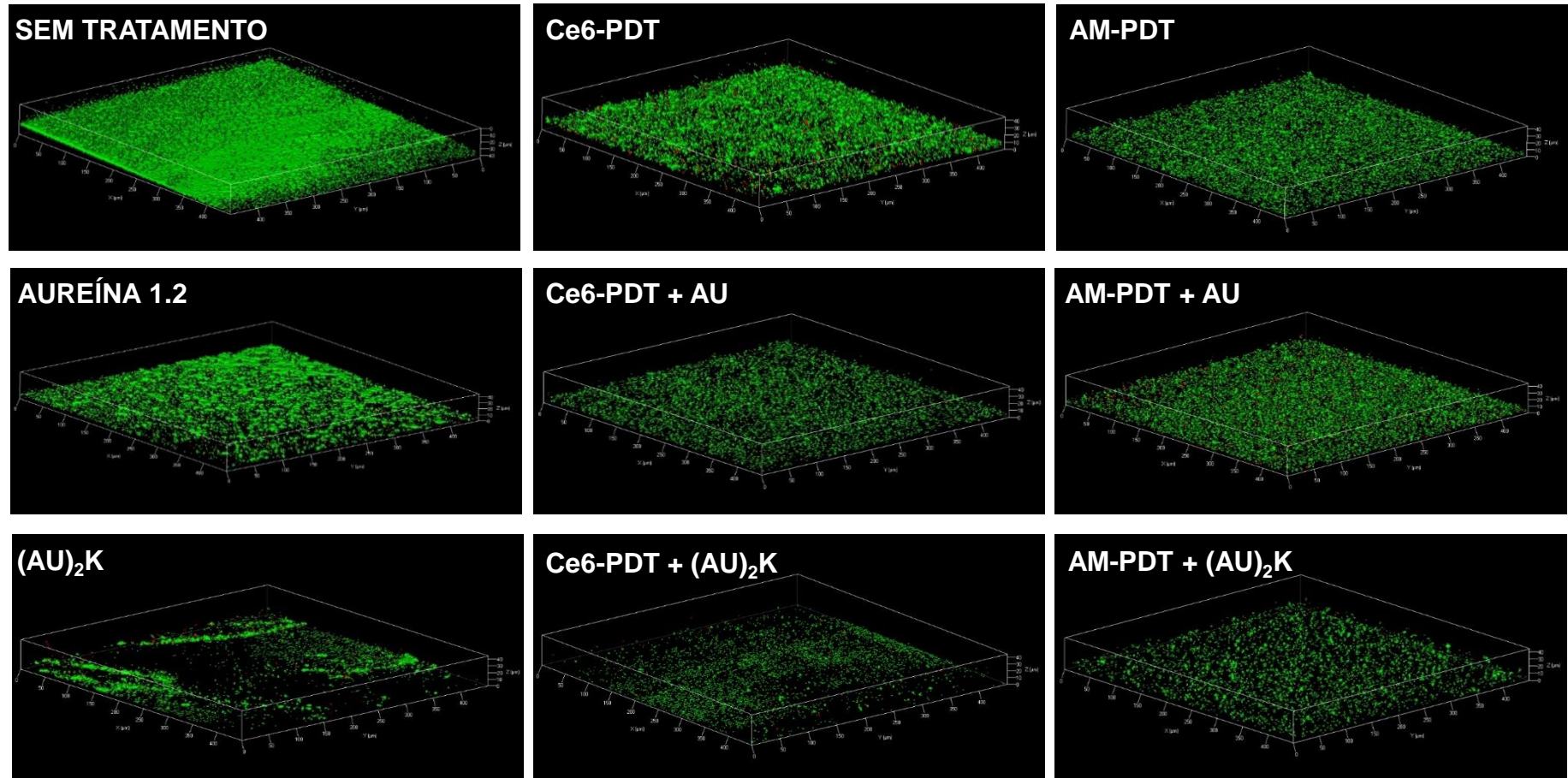
A microscopia confocal (MC) é uma técnica particularmente adequada para o estudo de biofilmes, pois permite a análise tridimensional de biofilmes vivos hidratados com preparações mínimas, mantendo a estrutura e organização do espécime (MIQUEL GUENNOG et al., 2017). Estas características da MC garantem que a espessura do biofilme possa ser determinada com precisão.

A Figura 17 mostra imagens representativas de cada biofilme corado com o kit LIVE/DEAD (verde para vivas e vermelho para bactérias mortas) e analisado através de MC. A coloração verde predominou em todos os biofilmes, indicando que as células que foram capazes de aderir ao substrato continuaram viáveis. No entanto, é claro que a estrutura do biofilme foi afetada por todos os tratamentos, reduzindo a espessura e a homogeneidade dos mesmos. Mesmo com a grande maioria das bactérias viáveis, elas não foram capazes de produzir uma camada de células tão espessa quanto aquela formada pelas células não tratadas. Em resumo, as imagens confocais combinadas com os dados de viabilidade deixam claro que a redução na espessura do biofilme não é resultado apenas de um número menor de células viáveis em geral.

Em particular, (AU)<sub>2</sub>K deu origem às estruturas mais perturbadas. É evidente que as células tratadas com o peptídeo dimérico, isoladamente ou em combinação com aPDT, não aderiram adequadamente ao substrato, o que foi confirmado pela quantificação da adesão e da espessura utilizando o plugin *Comstat2* para *ImageJ* (Fig. 18). Para determinar a adesão (Fig. 18A), o software leva em conta o volume de células conectadas ao substrato em uma determinada área ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ), e todos os grupos de tratamento envolvendo o dímero tiveram uma redução substancial nesse parâmetro em comparação com o controle não tratado. Os grupos Ce6-PDT e Ce6-PDT + AU também tiveram redução expressiva na adesão.

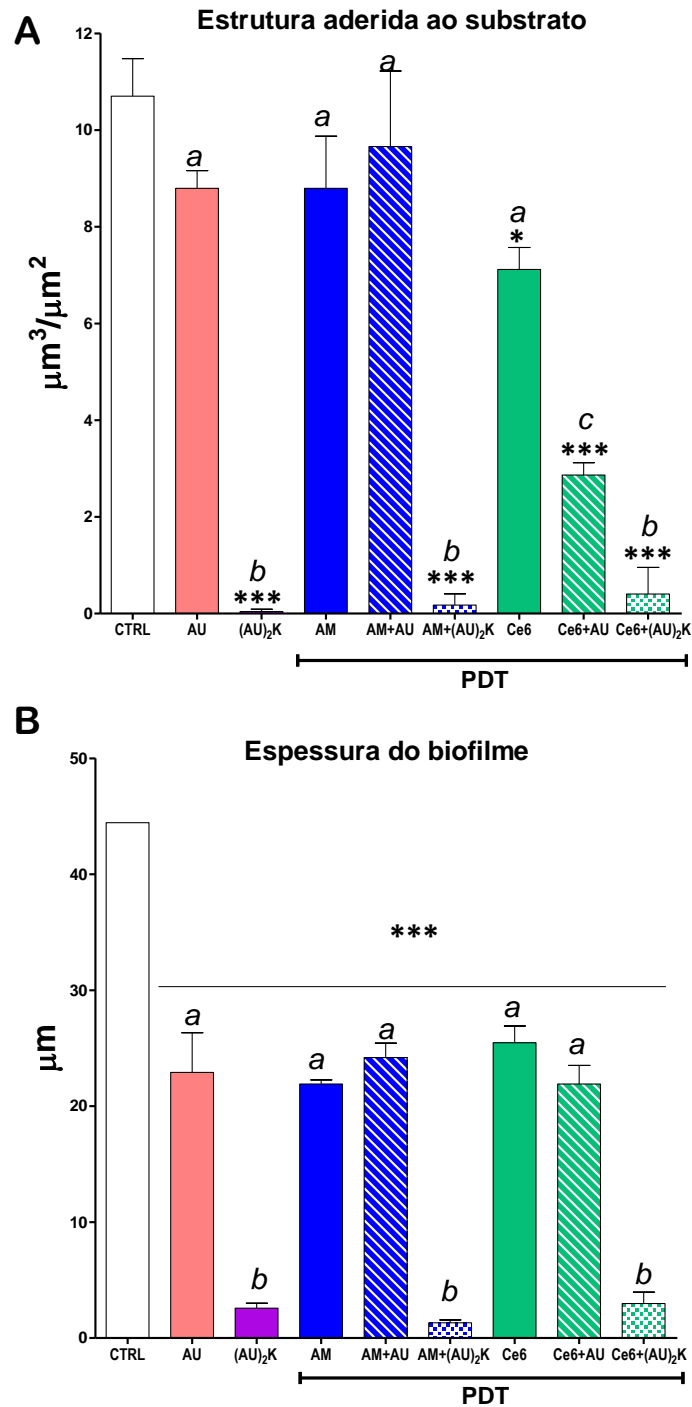
Quanto à espessura (Fig. 18B), os tratamentos dos grupos contendo AU produziram biofilmes com metade da espessura do controle ( $\approx 20 \mu\text{m}$ ); o mesmo foi observado para os grupos tratados somente PDT. Os grupos PDT+AU tiveram resultados similares aos das monoterapias. Já os biofilmes tratados com (AU)<sub>2</sub>K foram incapazes de atingir 5  $\mu\text{m}$  de espessura, revelando mais uma vez a forte interferência deste peptídeo na formação dos biofilmes.

Figura 17 – Biofilmes analisados por microscopia confocal



Imagens tridimensionais representativas dos biofilmes formados após cada tratamento. “Sem tratamento” mostra uma estrutura densa, grossa e homogênea; todos os tratamentos com aPDT (sozinha) reduziram a espessura e homogeneidade do biofilme. A aureína 1.2 induziu a formação de uma estrutura menos densa e menos espessa, intensificada quando combinada com a aPDT. O tratamento do dímero mal dá uma estrutura, com muitos espaços vazios e células flutuantes, evidenciando a reduzida adesão das células ao substrato. O experimento foi realizado em duplicatas e repetido em duas ocasiões diferentes com resultados consistentes e reproduzíveis. As bactérias foram coradas com o kit LIVE (verde)/DEAD (vermelho).

Figura 18 – Adesão ao substrato e espessura dos biofilmes



Adesão ao substrato (A) e espessura máxima de biofilmes (B) de *E. faecalis* determinadas a partir das imagens de microscopia confocal. Os parâmetros foram analisados pelo aplicativo Comstat2, um plugin do software livre ImageJ. As colunas representam as médias de pelo menos 3 experimentos independentes, e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle; as letras indicam diferença entre os grupos. ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey. (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 4.2.3. Espectroscopia de infravermelho com múltiplas reflexões internas atenuadas (MAIR-IR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) é de particular interesse no estudo de biofilmes, pois fornece informações sobre a constituição química das amostras, indicando a presença de proteínas, lipídios, polissacarídeos e ácidos nucleicos (BEEKES; LASCH; NAUMANN, 2007), e permite a comparação de componentes estruturais entre os grupos, por exemplo, substâncias poliméricas extracelulares (EPS). A técnica MAIR-IR, em particular, é um modo de amostragem que permite a obtenção de um espectro médio de todo o biofilme devido a sua característica múltiplas passadas do feixe de IV dentro do prisma onde o biofilme foi cultivado.

A análise e interpretação dos espectros de IV podem ser um desafio. Portanto, o espectro é geralmente dividido em quatro janelas espectrais, de acordo com os principais componentes celulares, como segue: (i) 3400 - 2800  $\text{cm}^{-1}$ , que é influenciado por grupos funcionais de ácidos graxos da membrana; (ii) 1800 - 1500  $\text{cm}^{-1}$ , relativa aos grupos amida I e amida II pertencentes a proteínas e peptídeos; (iii) 1500 - 1200  $\text{cm}^{-1}$ , região mista influenciada por proteínas, ácidos graxos e compostos com grupamentos fosfato; (iv) 1200 - 900  $\text{cm}^{-1}$ , que é informativo principalmente para os carboidratos e polissacarídeos da parede celular (BAPTISTA et al., 2017). Vale ressaltar que esses grupamentos químicos não são os únicos passíveis de serem identificados nas respectivas regiões dos espectros: a análise da espectroscopia de IV deve ser sempre analisada no contexto adequado e com o respaldo de outras técnicas para que se possa chegar a uma conclusão coerente.

Nas Figuras 19 e 20, os espectros MAIR-IR de cada grupo de tratamento são apresentados como a diferença em relação ao grupo controle não tratado, para facilitar a análise quanto ao aumento ou diminuição da ocorrência dos grupamentos químicos como consequência dos tratamentos.

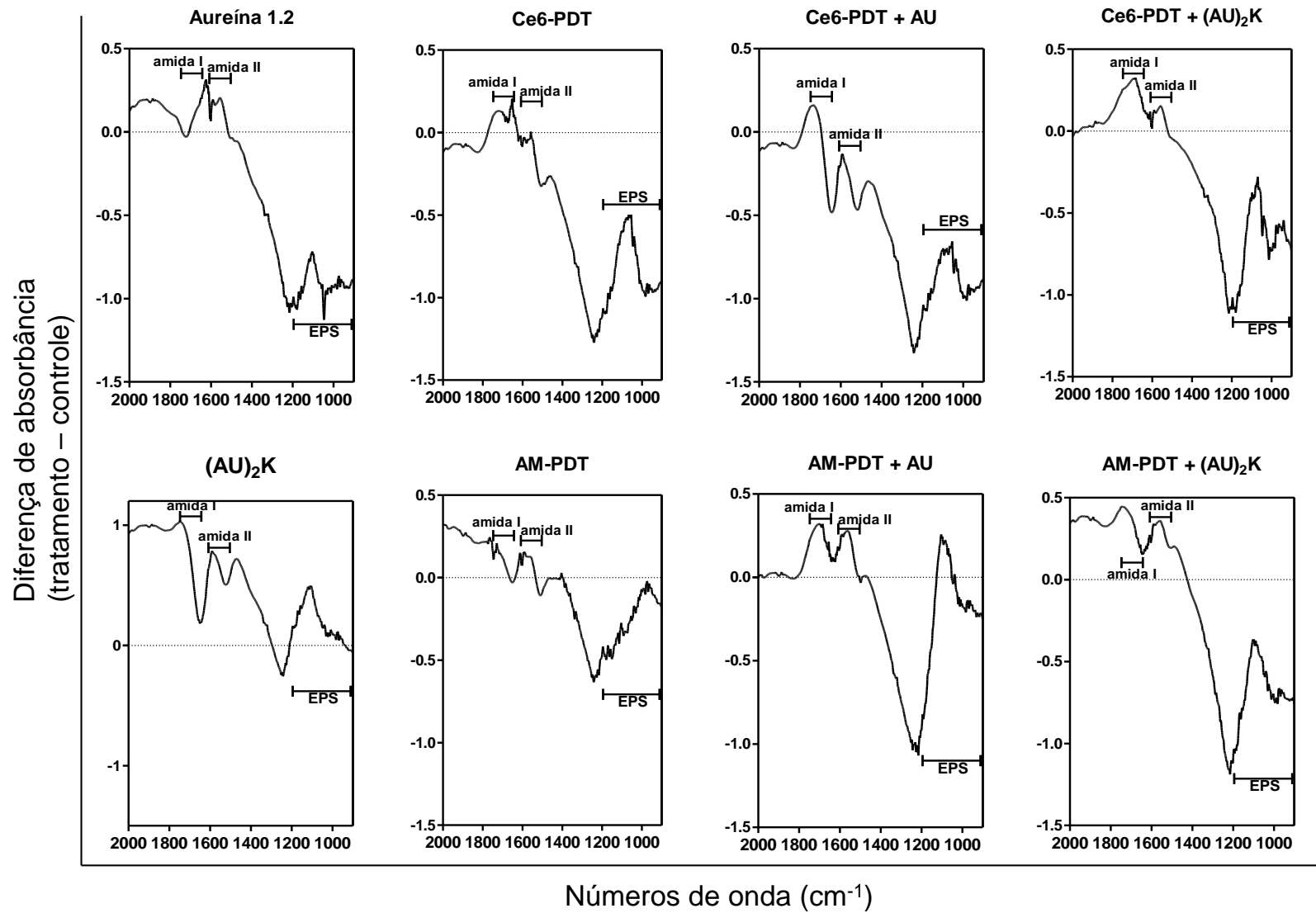
Analisando a região **iv** (Fig. 19), podemos ver que todos os tratamentos tiveram impacto na produção da matriz do biofilme, com reduções significativas nas intensidades de absorção para os picos entre 1200 - 900  $\text{cm}^{-1}$ , especialmente para os biofilmes pré-tratados com Ce6-PDT, isolado ou combinado com os peptídeos. Esses dados se correlacionam com os dados de viabilidade e análise confocal: embora as células estejam vivas, elas perderam sua capacidade de formar uma estrutura de biofilme adequada após serem expostas aos tratamentos. Biofilmes pré-tratados com AM-PDT e AMPDT + AU, no entanto, exibiram picos nesta região mais semelhantes ao controle, evidenciando que esses tratamentos não afetaram significativamente a capacidade da bactéria em produzir EPS, que também está de acordo com os resultados da microscopia confocal.

Na região **iii** (Fig. 19), região mista, notamos variações na forma e intensidade dos picos entre os grupos. No entanto, todos os tratamentos levaram a uma redução na intensidade registrada entre 1500-1200  $\text{cm}^{-1}$ , em comparação com o controle. Em conjunto, os dados obtidos nas regiões **iv** e **iii** indicam claramente uma redução na síntese de matriz em biofilmes formados após os tratamentos.

Os picos registrados na região **ii** (Fig. 19), relacionada às ligações amidas das proteínas, foram aumentados em todos os grupos de tratamento em relação ao controle, com exceção dos biofilmes pré-tratados com AM-PDT, que não tiveram alteração significativa. A maior quantidade de proteínas no biofilme das bactérias tratadas pode ser uma indicação de parada da proliferação. Este efeito foi descrito para células de mamíferos tratadas com doses sub letais de PDT (DE FREITAS et al., 2017; PIETTE et al., 2003), mas até agora não foi descrito em bactérias. Devido à importância desse achado, experimentos de proliferação celular e quantificação de biomassa foram realizados e são descritos na próxima seção.

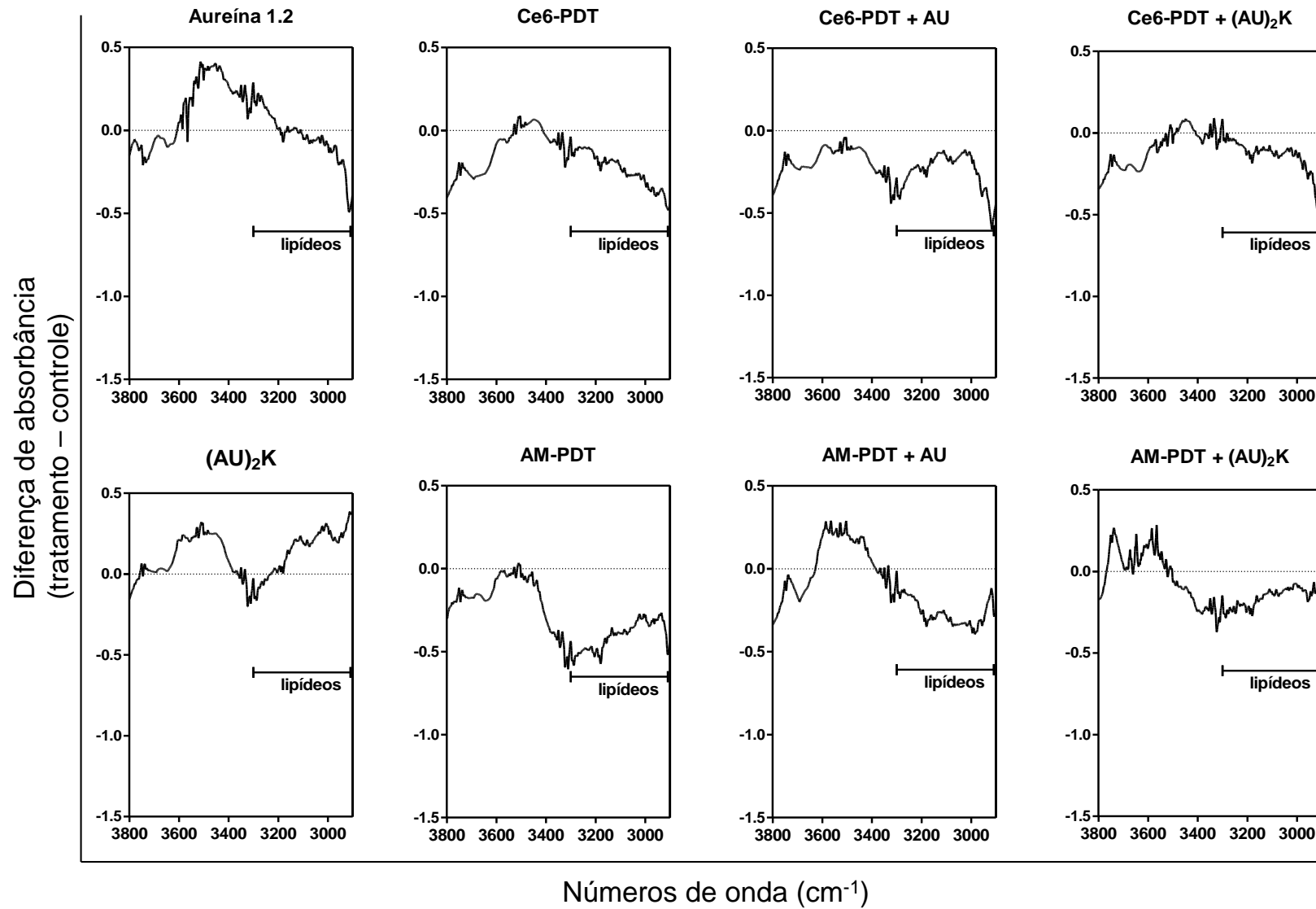
Por fim, a análise da região **i** (Fig. 20) mostra que a maior parte dos tratamentos reduziu a intensidade do sinal nessa região do espectro, indicativo de menor presença de ácidos graxos de membrana nas amostras. Esse achado pode estar relacionado à menor quantidade de células bacterianas aderidas ao substrato em relação ao controle, visto que a intensidade da redução parece proporcional à viabilidade encontrada nos ensaios anteriores. O único tratamento que levou a um pequeno aumento da intensidade de absorção de IV nessa região foi com  $(\text{AU})_2\text{K}$ . Como essa técnica identifica a vibração característica de vibrações químicas, e os ensaios anteriores claramente mostram a redução tanto da quantidade de células quanto da produção da estrutura do biofilme, pode-se inferir que a dímero causou modificações na membrana bacteriana, culminando no aumento do sinal observado nessa análise.

Figure 19 – Espectros MAIR-IR subtraídos do controle não tratado (regiões ii, iii e iv)



Diferença entre os espectros de IV normalizados de biofilmes formados após tratamento planctônico, obtidos por meio da abordagem de múltiplas reflexões internas atenuadas (MAIR-IR). Os biofilmes foram cultivados em miniprismas de germânio (10x5x1mm) e o instrumento de espectroscopia MAIR-IR foi ajustado com espectroscopia no espectro de IV variando de 4.000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , 30 x varredura e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 20 – Espectros MAIR-IR subtraídos do controle não tratado (região i)



Diferença entre os espectros de IV normalizados de biofilmes formados após tratamento planctônico, obtidos por meio da abordagem de múltiplas reflexões internas atenuadas (MAIR-IR). Os biofilmes foram cultivados em miniprismas de germânio (10x5x1mm) e o instrumento de espectroscopia MAIR-IR foi ajustado com espectroscopia no espectro de IV variando de 4.000 a 600 cm<sup>-1</sup>, 30 x varredura e resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4. Quantificação de SPE e ensaio de proliferação

A quantificação da matriz extracelular, mais especificamente das substâncias poliméricas extracelulares (SPE), é uma das medidas mais utilizadas para determinar a formação dos biofilmes e a ação de fármacos e outros agentes antimicrobianos sobre essas estruturas. Entretanto, um dos métodos mais clássicos, o ensaio de cristal violeta, apresenta falhas metodológicas que vão desde a falta de especificidade de ligação aos componentes da SPE à difícil reprodutibilidade. A especificidade de ligação de lectinas a açúcares simples da SPE em biofilmes parece ser uma maneira alternativa específica de caracterizar e quantificar a formação da matriz extracelular (BURTON et al., 2007).

Utilizando a lectina aglutinina de germe de trigo (AGT) conjugada ao fluoróforo AlexaFluor488, as SPE dos biofilmes de *E. faecalis* foram quantificadas, e os resultados são apresentados na Figura 21. Para este ensaio, o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) foi utilizado como controle positivo de inibição: essa molécula inibe a etapa de adesão das células ao substrato ao quelar íons  $\text{Ca}^{2+}$ , essenciais para que a bactéria consiga aderir, bloqueando assim a primeira etapa do processo de formação do biofilme (FINNEGAN; PERCIVAL, 2015). Os resultados mostram que todos os tratamentos reduziram a formação de SPE nos biofilmes, mas AU, AM-PDT e AM-PDT + AU não apresentaram reduções significativamente diferentes do controle.

Os resultados confirmam aqueles obtidos nas análises anteriores e reforçam que os tratamentos alteraram a dinâmica de formação dos biofilmes, impedimento a correta produção da matriz extracelular, que dá suporte ao crescimento das células.

A taxa de proliferação das bactérias após o tratamento planctônico também foi avaliada. Esse experimento foi realizado para determinar se (i) os tratamentos estavam impedindo a formação do biofilme por inibição da adesão celular ou por inibição do crescimento bacteriano, e (ii) para identificar possíveis paradas de proliferação celular, que poderiam corroborar os dados da espectroscopia de IV.

Na Figura 22 temos as taxas de proliferação normalizadas para todos os tratamentos. Novamente, o EDTA foi utilizado como controle por ser conhecido um inibidor de adesão celular. As bactérias tratadas com EDTA apresentam um perfil de crescimento similar ao controle não-tratado, porém com

uma intensidade de absorvância menor, o que indica uma redução na quantidade inicial de células viáveis, porém sem alterar seu perfil proliferativo. O tratamento com o peptídeo (AU)<sub>2</sub>K resultou em um perfil praticamente idêntico ao do EDTA, em acordo com a hipótese inicial de que esse peptídeo seria capaz de inibir a adesão das bactérias ao substrato. Esse perfil se manteve mesmo quando o dímero foi combinado à Ce6- ou AM-PDT, havendo uma maior redução da viabilidade celular quando o FS era Ce6.

Por outro lado, o monômero AU e a Ce6-PDT (Fig. 22) como monoterapias apresentaram perfis idênticos, reforçando a conclusão de que a terapia fotodinâmica com esse FS tem a membrana plasmática como alvo principal. Já a combinação Ce6-PDT + AU teve o efeito mais pronunciado de redução da taxa de crescimento dentre os tratamentos apresentados na Fig. 22A. A inibição do crescimento bacteriano provocada pelos tratamentos envolvendo Ce6-PDT são claramente mais duradouros em um primeiro momento, em comparação aos outros tratamentos, como evidenciado pela Fig. 16A; e apenas a Ce6-PDT como monoterapia dá margem para a recuperação das células (Fig. 16B), reforçando a justificativa da terapia combinada.

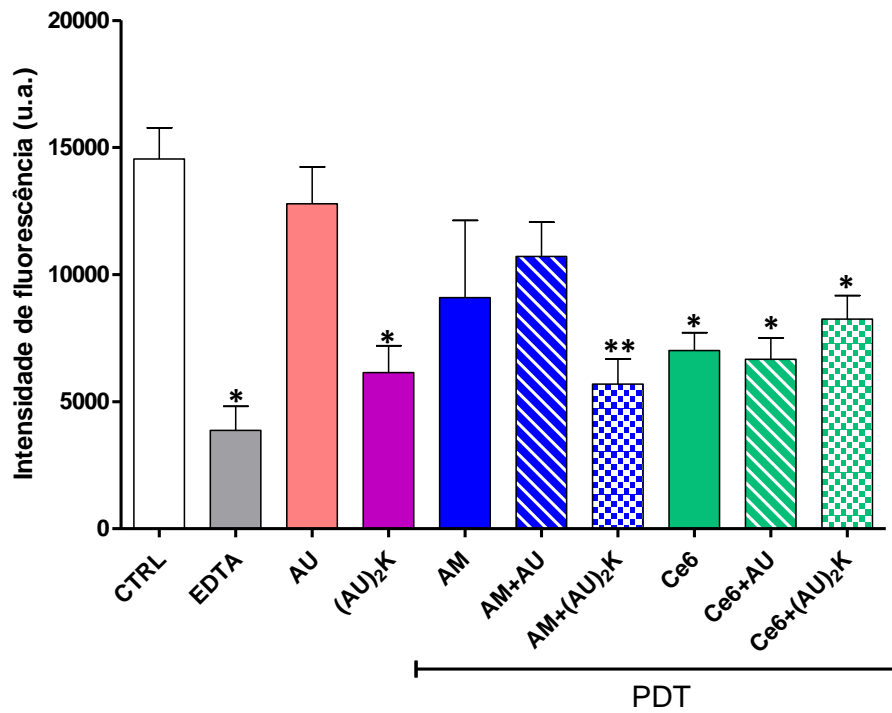
Com relação aos tratamentos envolvendo AM-PDT, observa-se uma intensa redução da taxa de crescimento celular logo após o tratamento para AM-PDT e AM-PDT + AU (Fig. 22B) com uma recuperação após 24h e nova regressão após 48h (Fig. 16A e 16B, respectivamente). Esse resultado mostra que, embora a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno não altere de forma muito expressiva a formação do biofilme em um primeiro momento, as bactérias tratadas com esse FS eventualmente perdem o contato com o substrato e se desprendem, um passo crucial na desestruturação do biofilme.

Por fim, não foram identificadas paradas de crescimento em nenhum dos tratamentos, revelando que a maior intensidade dos picos referentes à proteínas nos espectros IV são resultado de uma maior produção de fatores celulares em resposta aos tratamentos, e não de uma interrupção da divisão celular.

Em suma, a inibição da formação de biofilme provocada pelos tratamentos se dá por mecanismos diferentes a depender do peptídeo utilizado: o dímero está claramente associado a um impedimento da adesão bacteriana ao substrato,

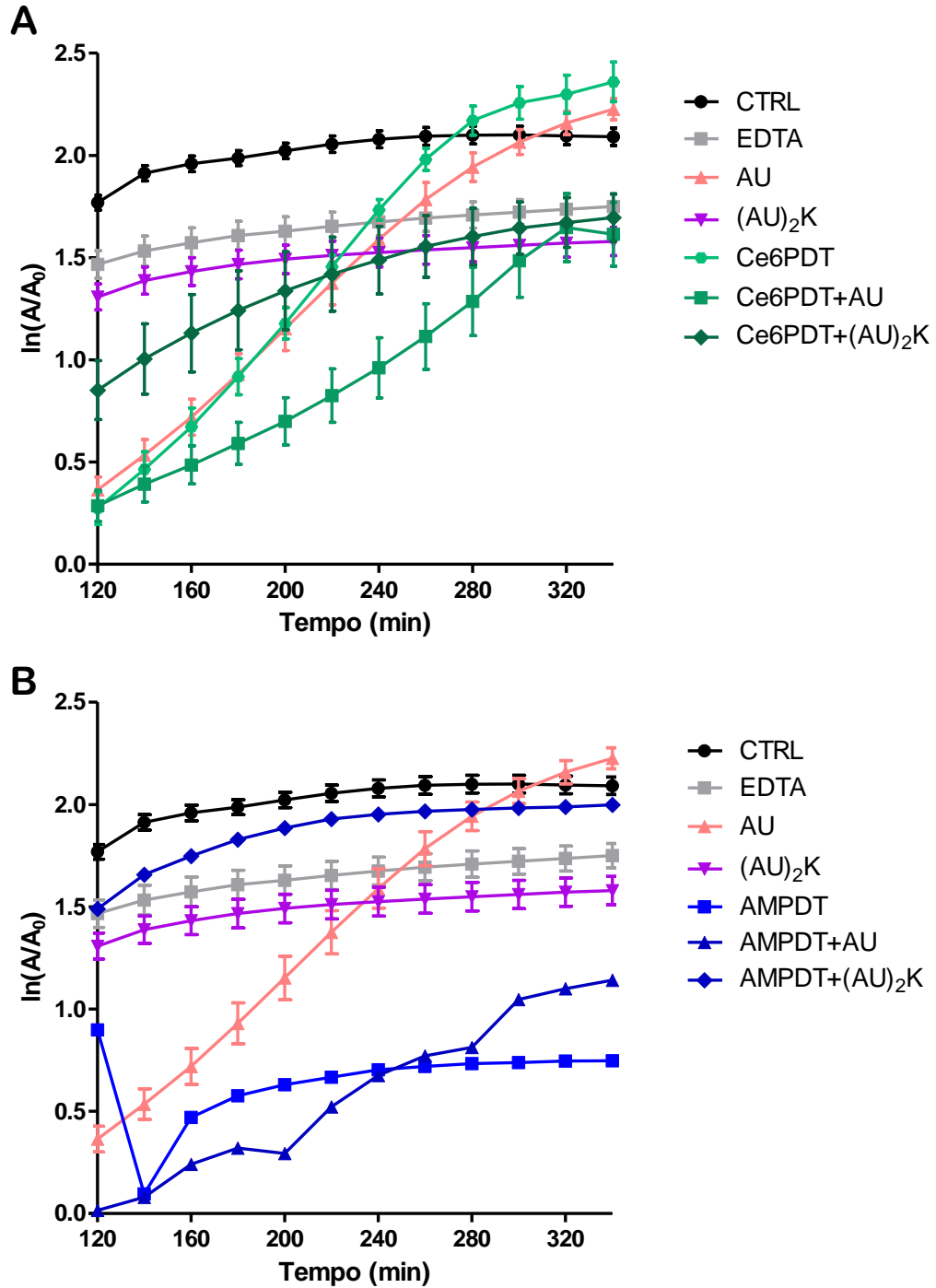
independentemente de sua associação ou não à PDT, ao passo que o monômero afeta a viabilidade celular, especialmente quando combinado à PDT.

**Figura 21 – Quantificação da matriz extracelular dos biofilmes**



A substância polimérica extracelular foi quantificada pela sua ligação específica com a aglutinina de germe de trigo conjugada com AlexaFluor488<sup>®</sup>. A ligação foi quantificada por fluorescência. As colunas representam as médias de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em quadruplicatas, e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle. ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Figura 22 – Proliferação celular após o tratamento planctônico



Após o tratamento em fase planctônica, a bactéria *E. faecalis* foi incubada por 2 horas a 37°C, para estabilização. A partir de então, sua taxa de crescimento foi acompanhada a cada 20 minutos por 4 horas. No painel A estão os grupos tratados com clorina-e6; no painel B os tratados com azul de metileno. Os grupos controle, EDTA e peptídeos são apresentados em ambos os gráficos para comparação. As absorbâncias obtidas a cada leitura (absorbância A) foram normalizadas pela absorbância no tempo zero (absorbância  $A_0$ ) e são apresentadas como o logaritmo neperiano da relação  $A/A_0$ . CTRL: controle sem tratamento.

#### 4.2.5. Interação com ácido lipoteicoico

Lorenzón e colaboradores foram os responsáveis pela idealização e síntese do peptídeo dimérico (AU)<sub>2</sub>K (LORENZÓN et al., 2013). O trabalho preliminar mostrou que o dímero era capaz de romper vesículas unilamelares *in vitro*, como seu monômero, mas não apresentava boa atividade microbica. A hipótese levantada foi que o peptídeo estaria se ligando a algum componente celular que o impedia de atingir a membrana plasmática e provocar sua ruptura (LORENZÓN; PICCOLI; CILLI, 2014b). Em estudos subsequentes, o grupo identificou que esse peptídeo promove a adesão célula-célula de *Candida albicans* por se ligar às mananas, carboidratos que são o maior componente da parede celular de fungos (LORENZÓN; PICCOLI; CILLI, 2014b), comprovando a hipótese. Entretanto, não foram investigados mecanismos de interação do peptídeo com bactérias.

Em bactérias Gram-positivas, como o *E. faecalis*, os componentes da parede celular mais similares às mananas são os ácidos lipoteicoicos (ALT), importantes reguladores de enzimas autolíticas da parede celular, além de altamente imunogênicos. Em Gram-negativas, estão presentes os lipopolissacarídeos, equivalentes funcionais dos ALT (FINNEY et al., 2012; GINSBURG, 2002). Dada a interação do dímero (AU)<sub>2</sub>K com as mananas, a interação do mesmo com os ALT seria bastante plausível. Sendo assim, a habilidade de se ligar ao ALT foi investigada, tanto para o monômero quanto para o dímero.

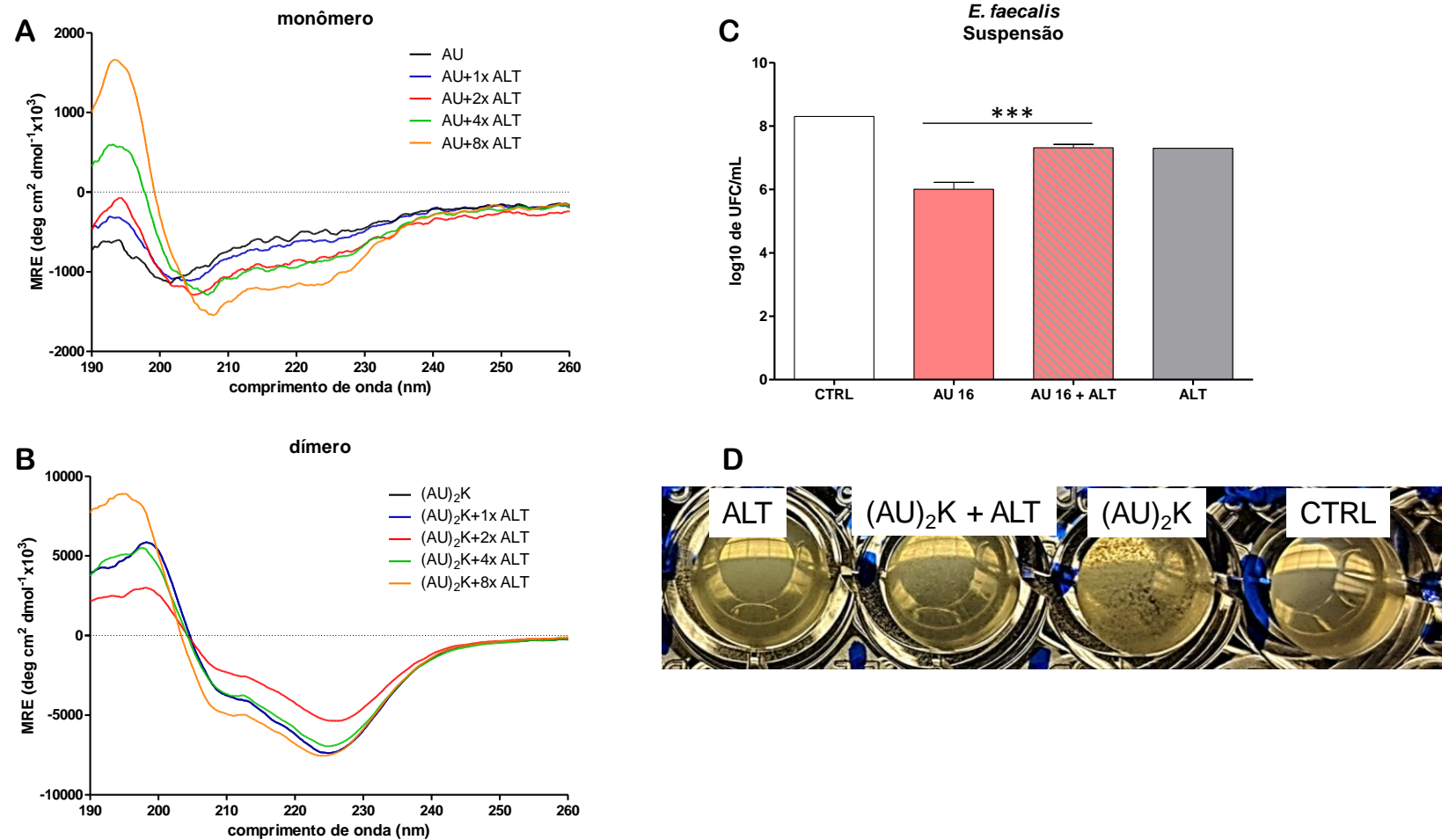
Nas Figuras 23A e 23B temos os espectros de dicroísmo circular do monômero e do dímero, respectivamente, em presença de quantidades crescentes de ALT. São evidentes as alterações da estrutura secundária de ambos os peptídeos proporcionalmente à adição de ALT ao meio, o que mostra que há uma interação física entre as moléculas. Entretanto, a concentração de ALT usada neste experimento está dentro do intervalo de concentração micelar crítica (CMC) do ácido (COURTNEY; SIMPSON; BEACHEY, 1986; WICKEN; EVANS; KNOX, 1986), e as alterações do conteúdo de alfa-hélice observadas poderiam ser apenas uma organização estrutural dos peptídeos frente à presença das micelas.

Dessa forma, foi também avaliada a atividade biológica dos peptídeos em presença do ALT, como visto nas Figuras 23C e 23D. A atividade bactericida do monômero AU foi claramente prejudicada em presença do ALT, evidenciando que o peptídeo se liga ao ALT de forma a ficar indisponível para interagir com a membrana bacteriana. Como o dímero não tem atividade bactericida, sua atividade biológica foi avaliada pela sua habilidade em induzir a formação dos agregados celulares visíveis a olho nu. Da mesma forma que o observado para AU, (AU)<sub>2</sub>K em presença de ALT também tem sua atividade claramente diminuída, com visível menor quantidade de agregados celulares em comparação ao peptídeo sozinho.

O ácido lipoteicoico é composto por um polímero de ácido teicoico, formado por grupamentos glicerolfosfato ou ribitolfosfato, ligado a um resíduo de diacilglicerol, responsável pela inserção do polímero na membrana plasmática (PERCY; GRÜNDLING, 2014). As bactérias Gram-positivas incorporam polímeros de ácido teicoico de comprimentos variáveis (15 a 50 resíduos, variando de acordo com a espécie) em seu envelope, o que diretamente influencia a densidade de cargas negativas da superfície bacteriana pela quantidade de grupos fosfato presentes (MALANOVIC; LOHNER, 2015). Os peptídeos antimicrobianos, com sua carga global positiva, são atraídos pelas cargas negativas do ALT e sua ligação a essa molécula na parede celular não afeta sua atividade bactericida, o que levou à postulação de que a ligação dos PAM ao ALT é o ponto de partida para a ação sobre a membrana: os PAM se ancoram ao ALT e o usam como uma “escada”, que os conduz até a membrana plasmática (MALANOVIC; LOHNER, 2015).

Diante dessa afirmação e dos resultados apresentados na Figura 23, fica comprovado que os peptídeos aureína 1.2 e  $(AU)_2K$  se ligam ao ALT de *E. faecalis*. O monômero deve utilizar o ALT como postulado, como ponto de ancoragem para atingir a membrana, ao passo que o dímero deve se ligar a mais de uma molécula de ALT na mesma célula e possivelmente também em células diferentes. A ligação de  $(AU)_2K$  à moléculas de ALT na mesma célula é capaz de provocar uma alteração brusca do potencial zeta das bactérias, um fenômeno sabidamente causador de aglutinação celular por reduzir a repulsão eletrostática entre as células (FERNANDES; CESAR; BARJAS-CASTRO, 2011; HALDER et al., 2015). Já a ligação do dímero a moléculas de ALT em células diferentes causaria a agregação célula-célula por mantê-las unidas, como postulado para as células de *C. albicans* no trabalho de Lorenzón e colaboradores (LORENZÓN; PICCOLI; CILLI, 2014b). Independentemente do mecanismo pelo qual o dímero se liga ao ALT, os resultados mostram que alterar a dinâmica de cargas na parede celular bacteriana pela ligação de moléculas catiônicas ao ácido pode ser a chave para prevenir a formação de biofilmes de *E. faecalis*, e potencialmente de outras espécies, incluindo Gram-negativas.

Figura 23 – Interação dos peptídeos com o ácido lipoteicoico (ALT)



A e B: os peptídeos tiveram seus espectros de dicroísmo circular registrados em presença de quantidades crescentes de ALT extraído de *Enterococcus hirae*. C e D: a atividade biológica dos peptídeos foi avaliada em presença e ausência de ALT. CTRL: controle sem tratamento. \*\*\* $p < 0,001$ , teste  $t$  de Student.

#### 4.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

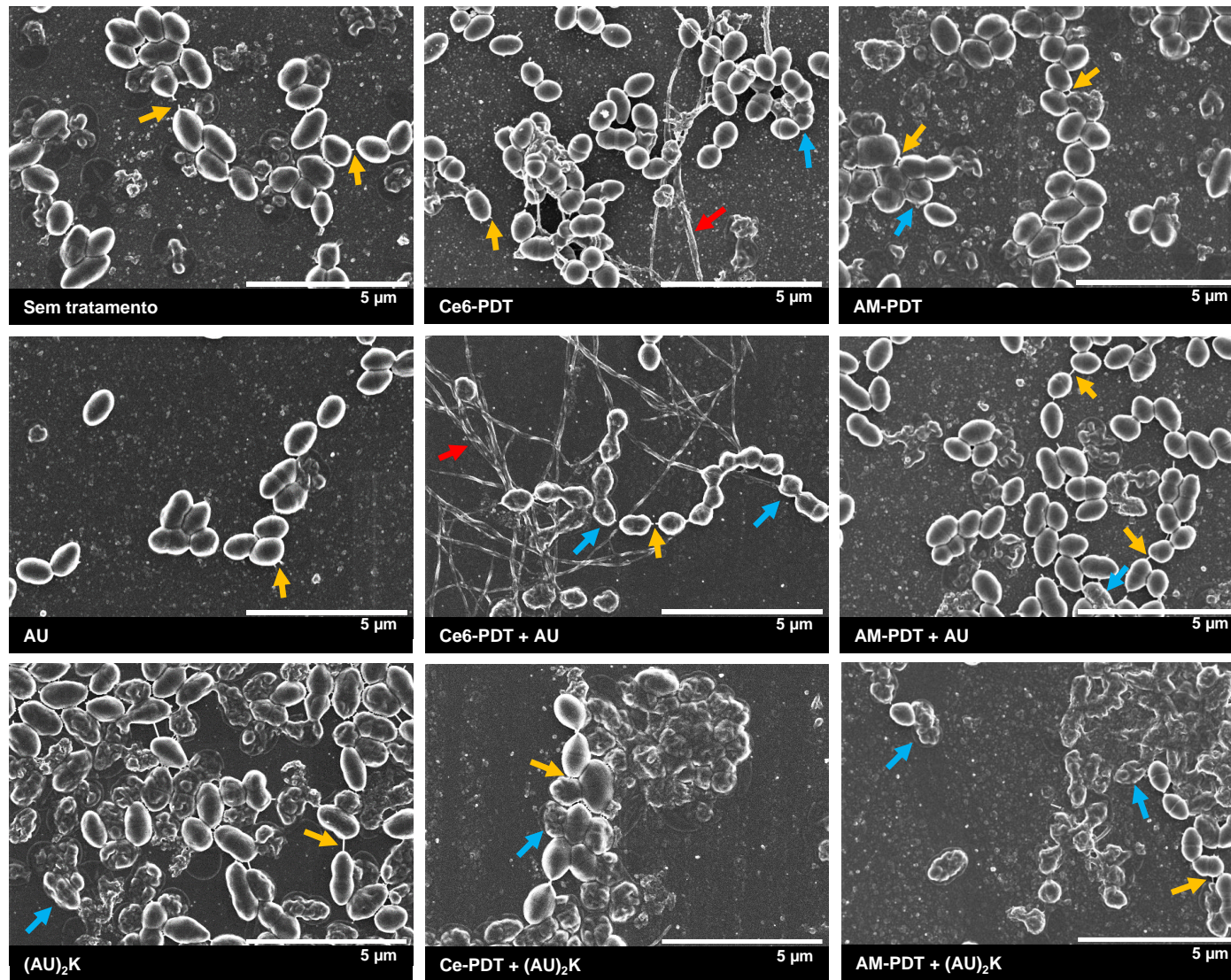
Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução foi utilizada para investigar alterações nas estruturas celulares e do biofilme induzidas por cada tratamento, e imagens representativas de cada biofilmes são apresentadas na Figura 24. Observam-se biofilmes em seus estágios iniciais de maturação, ainda sem a estrutura compacta característica. As estruturas semelhantes a biofilme vistas na fileira de baixo da Fig. 24 são na verdade agregados celulares induzidos pelo peptídeo (AU)<sub>2</sub>K, também vistos macroscopicamente na Fig. 23D.

Na Figura 25 é apresentada uma ampliação maior das mesmas micrografias. *E. faecalis* é visto em sua apresentação típica de diplococos, com pouca alteração na morfologia celular. Os pré-tratamentos com (AU)<sub>2</sub>K, sozinhos ou com aPDT, e Ce6PDT+ AU, entretanto, induziram alterações morfológicas significativas na membrana bacteriana, com a maioria das células exibindo alterações (indicadas pelas setas azuis). Ao contrário do que é observado para o monômero AU, a combinação da aPDT com o dímero não teve muita influência na ação do peptídeo, pois a agregação que o mesmo induz é o efeito predominante observado. Também é observada uma redução do tamanho das células bacterianas naquelas pré-tratadas com AU, Ce6-PDT, Ce6-PDT + AU, AM-PDT + AU e AM-PDT + (AU)<sub>2</sub>K, indicativo de extravasamento de conteúdo celular causado pelos tratamentos.

O tratamento com Ce6-PDT e Ce6-PDT+AU induziu a formação de filamentos longos por *E. faecalis*, o que nunca foi relatado na literatura e é visto com mais detalhes na Figura 26. Este efeito foi específico para a clorina-e6 e muito reprodutível, sendo encontrado em três experimentos independentes. As células produzem os filamentos mesmo no escuro (painel superior esquerdo da Fig. 26), mas a ativação da luz aumenta a produção em grande quantidade (painel superior direito). O efeito ainda está presente quando Ce6-PDT é combinado com AU (painel inferior esquerdo), mas desaparece ou não pode ser visualizado na presença do dímero (painel inferior direito).

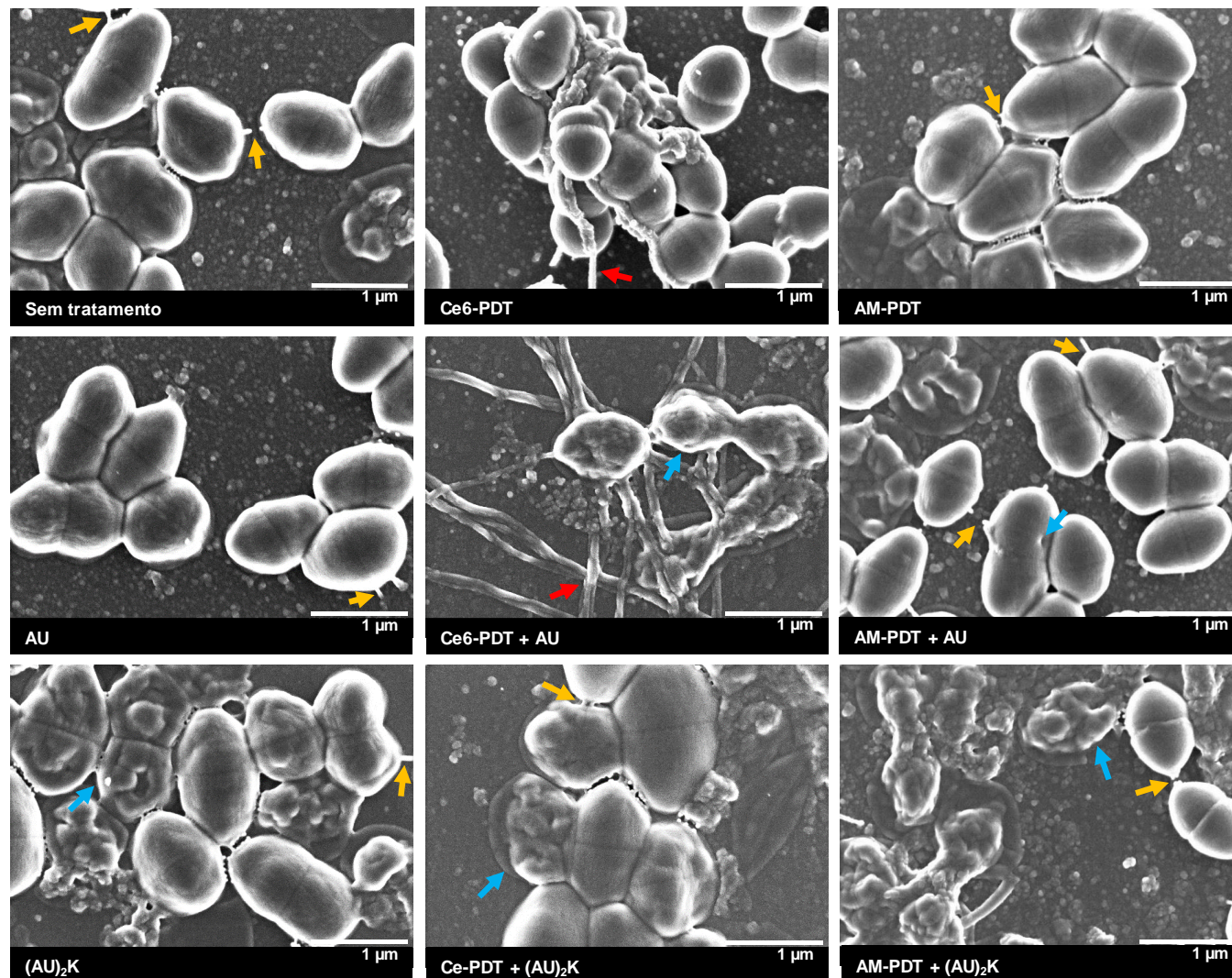
Como esse fenômeno nunca foi descrito antes, a natureza desses filamentos ainda é desconhecida. No entanto, uma vez que sua presença foi prejudicada na presença de (AU)<sub>2</sub>K, é razoável inferir que eles podem ser uma resposta ao estresse causado por Ce6 na parede celular: com a agregação celular induzida pelo peptídeo, a parede celular pode ter ficado menos disponível para ligação da Ce6, impedindo a sua ação e, portanto, a formação dos filamentos.

Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (x10k)



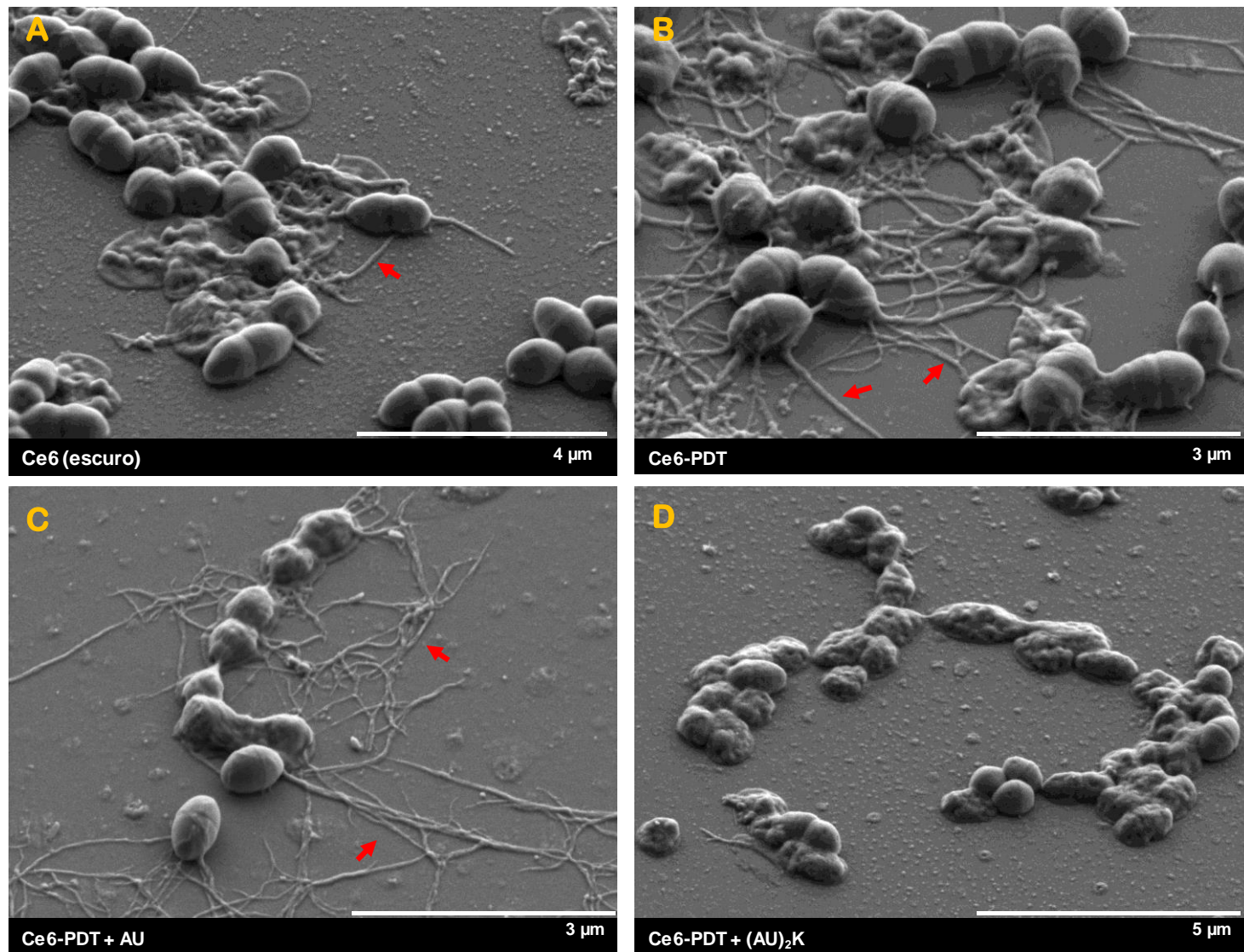
Imagens representativas de biofilmes formados após 48h do tratamento de *E. faecalis* em fase planctônica. Setas amarelas apontam conexões representativas de células; setas azuis apontam anomalias representativas da membrana; setas vermelhas apontam filamentos. Emissão do campo analítico Hitachi SU-70 SEM, 2 kV, SE (U).

Figura 25 – Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (x30k)



Imagens representativas de biofilmes formados após 48h do tratamento de *E. faecalis* em fase planctônica. Setas amarelas apontam conexões representativas de células; setas azuis apontam anomalias representativas da membrana; setas vermelhas apontam filamentos. Emissão do campo analítico Hitachi SU-70 SEM, 2 kV, SE (U).

Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura dos filamentos induzidos por clorina-e6 (x15k)



Imagens representativas de biofilmes formados após 48h do tratamento de *E. faecalis* em fase planctônica. Setas vermelhas apontam filamentos representativos. Emissão do campo analítico Hitachi SU-70 SEM, 2 kV, SE (L), 42° de inclinação. Ce6 (dark): tratamento sem ativação por luz.

#### 4.2.7. Atividade de inibição de biofilme sobre outras espécies

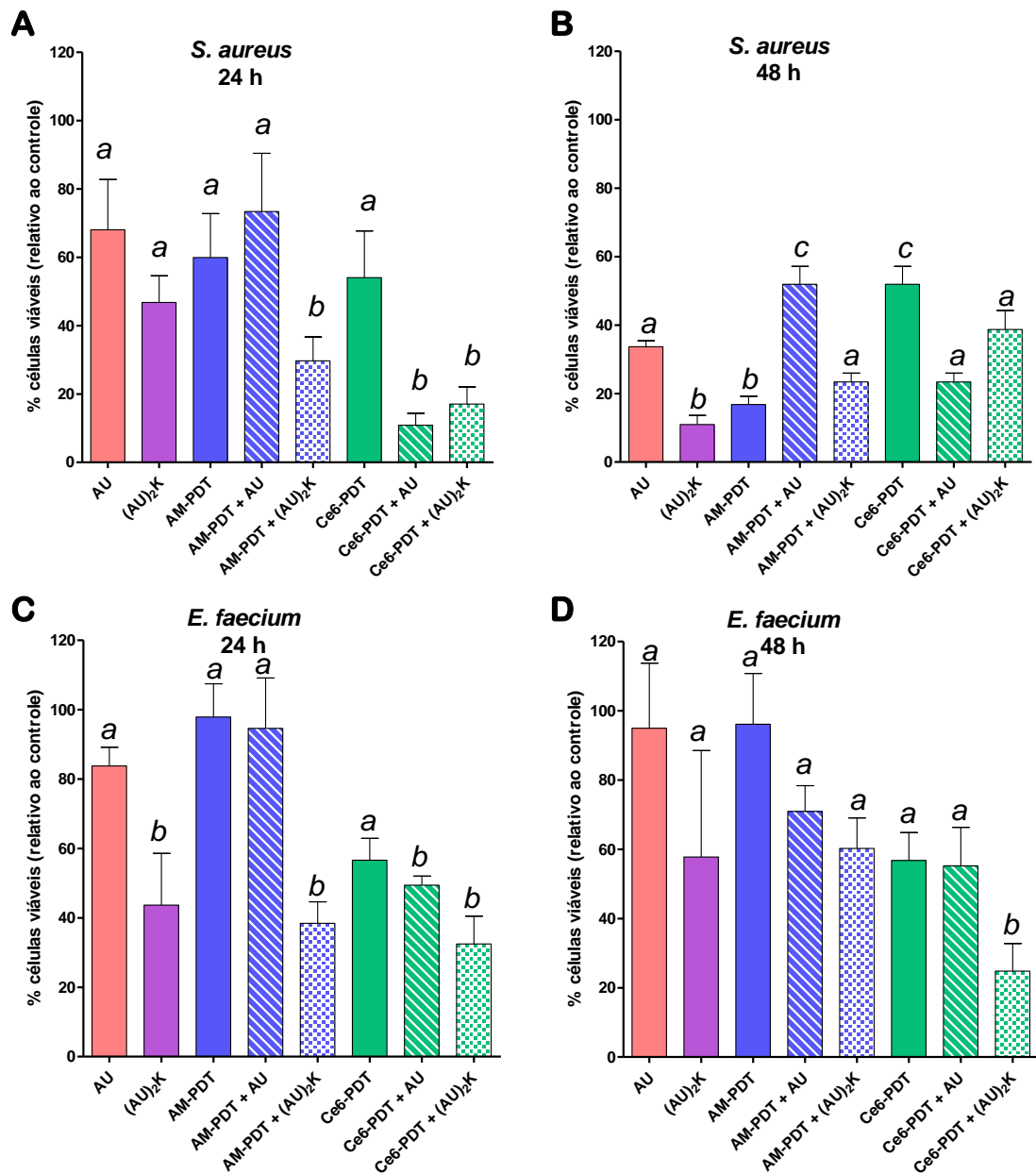
Novamente, uma vez que o efeito inibitório sobre a formação de biofilmes foi confirmado, o tratamento combinado foi testado contra outras espécies clinicamente relevantes, desta vez as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* VRE. Os tratamentos em fase planctônica foram administrados nos mesmos parâmetros empregados para *E. faecalis*.

Na Figura 27 fica evidente que todos os tratamentos foram capazes de inibir a formação de biofilmes de ambas as bactérias em alguma proporção. Para *S. aureus*, a maioria dos tratamentos apresentou inibição significativa após 24h (Fig. 27A), porém as maiores taxas de inibição foram observadas após 48 horas (Fig. 27B), com exceção das combinações Ce6-PDT + AU e Ce6-PDT + (AU)<sub>2</sub>K, das quais a bactéria conseguiu se recuperar.

Já para *E. faecium*, apenas os tratamentos AU, AM-PDT e AM-PDT + AU não foram capazes de prevenir a formação de biofilme de forma significativa (Fig. 27C); o melhor resultado foi obtido com o tratamento Ce6-PDT + (AU)<sub>2</sub>K, que manteve o perfil inibitório mesmo após 48 horas (Fig. 27D).

Como comprovado para as análises em fase planctônica, as terapias combinadas são capazes de inibir outras espécies bacterianas, mesmo quando utilizando os parâmetros ideais para *E. faecalis*. O conjunto de resultados obtidos neste trabalho mostra que a combinação da terapia fotodinâmica aos peptídeos antimicrobianos aureína 1.2 e seu dímero (AU)<sub>2</sub>K pode ser a chave para a eliminação de bactérias de relevância clínica, incluindo variantes resistentes, bem como para a prevenção de formação de biofilmes, um dos maiores desafios da medicina.

Figura 27 – Inibição da formação de biofilme de outras espécies bacterianas



As bactérias foram tratadas em fase planctônica e depois incubadas por 24 ou 48h em placas de 96 poços para iniciar a formação de biofilme. Após os tempos de incubação, os biofilmes foram lavados e incubados com resazurina, para determinação de suas atividades metabólicas. As colunas representam a média de três ensaios independentes ( $n = 9$ ) e as barras representam o desvio padrão. Todos os grupos foram normalizados em relação ao grupo não tratado. Letras diferentes indicam que os grupos diferem entre si. ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

## 5. CONCLUSÕES

A combinação da terapia fotodinâmica antimicrobiana com o peptídeo aureína 1.2 se mostrou uma alternativa viável para o tratamento antimicrobiano, com potencial para superar a resistência bacteriana, capaz de eliminar duas das cepas mais resistentes responsáveis por infecções comunitárias e nosocomiais, *E. faecalis* e *E. faecium VRE*, além de reduzir significativamente a viabilidade de *S. aureus*, *A. baumannii* e *E. coli*. Dentro das condições testadas, a aureína 1.2 é capaz de potencializar a aPDT mediada pelo azul de metileno ou clorina-e6, mas não pela curcumina, evidenciando um efeito sinérgico dependente do fotossensibilizador. Os mecanismos do sinergismo, de fato, parecem estar relacionados com a molécula de FS: embora seja observado um efeito sinérgico semelhante usando AM ou Ce6 na presença do peptídeo, o AM acumula no interior celular, enquanto a Ce6 acumula no exterior da célula bacteriana, não apenas revelando diferentes mecanismos de ação, mas também evidenciando a natureza múltiplo-alvo do efeito fotodinâmico. Ainda, a terapia combinada foi capaz de inibir o processo de formação de biofilme de *E. faecalis*, particularmente com a combinação da aPDT ao dímero da aureína, (AU)<sub>2</sub>K. Os mesmos parâmetros também foram capazes de reduzir a formação de biofilmes pelas espécies *S. aureus* e *E. faecium VRE*. Ficou evidente que o ácido lipoteicoico é o ponto de ancoragem dos peptídeos na célula de *E. faecalis*, um achado que revela que alterar a dinâmica de cargas na parede celular bacteriana pela ligação de moléculas ao ALT, pode ser o ponto-chave para o sucesso de terapias antimicrobianas contra a formação de biofilmes.

Os resultados ressaltam a importância da avaliação de várias combinações quando se busca um efeito sinérgico e sugerem que essa abordagem tem o potencial de eliminar infecções localizadas e, ao mesmo tempo, minimizar o uso de antimicrobianos sistêmicos, impedir o desenvolvimento de novos perfis de resistência, e inibir o processo crônico de infecção ao prevenir a formação de biofilmes.

## 6. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.

AKILOV, O. E. et al. Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. **Medical Laser Application**, v. 21, n. 4, p. 251–260, 2006.

ALVES, E. et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. **BMC microbiology**, v. 9, p. 70, 2009.

AMMOR, M. S. et al. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 14, n. 1–3, p. 6–15, 2008.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 465–78, 2014.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 12, p. 1543–75, 2013.

BAPTISTA, A. et al. Photodynamic damage predominates on different targets depending on cell growth phase of *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 177, n. April, p. 76–84, 2017.

BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 305–319, 2007.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. Review The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment Photodynamic therapy. **The Lancet - Oncology**, v. 5, p. 497–508, 2004.

BURTON, E. et al. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 1–4, 2007.

CASAS, A. et al. Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 2486–2515, 2011.

CASSIR, N.; ROLAIN, J.-M.; BROUQUI, P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. October, p. 1–15, 2014.

CHIN, D.-H. et al. Circular dichroism spectra of short, fixed-nucleus alanine helices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15416–15421, 2002.

CHOI, H.; LEE, D. G. Antimicrobial peptide pleurocidin synergizes with antibiotics through hydroxyl radical formation and membrane damage, and exerts antibiofilm activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 12, p. 1831–1838, 2012.

CIEPLIK, F. et al. The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUN, 2015.

COURTNEY, H. S.; SIMPSON, W. A.; BEACHEY, E. H. Relationship of critical micelle

---

<sup>1</sup> Baseadas nas normas NBR 6023 e 10520, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

concentrations of bacterial lipoteichoic acids to biological activities. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 2, p. 414–418, 1986.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42 Suppl 1, p. S25-34, 2006.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International journal of medical microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 287–92, 2013.

DA SILVA, B. R. et al. Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci. **Peptides**, v. 42, p. 78–83, 2013.

DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 617, p. 170–188, 2009.

DALE, J. L. et al. Restructuring of *Enterococcus faecalis* biofilm architecture in response to antibiotic-induced stress. **Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2017.

DE FREITAS, L. M. et al. Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 123, 2017.

DEWAELE, M. et al. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 15, n. 6, p. 1402–14, 2011.

DI POTO, A. et al. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Biomaterials**, v. 30, n. 18, p. 3158–3166, 2009.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 375–80, 2003.

DOSELLI, R. et al. Synthesis, characterization, and photoinduced antibacterial activity of porphyrin-type photosensitizers conjugated to the antimicrobial peptide apidaecin 1b. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 1052–1063, 2013.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 25–64, 2014.

FERNANDES, H. P.; CESAR, C. L.; BARJAS-CASTRO, M. DE L. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 4, p. 297–301, 2011.

FINNEGAN, S.; PERCIVAL, S. L. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 7, p. 415–421, 2015.

FINNEY, S. J. et al. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. **Intensive Care Medicine**, v. 38, n. 2, p. 324–332, 2012.

FUCHS, B. B. et al. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2929–2936, 2007.

GARCIA-DIAZ, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. **Methods**, v. 109, p. 158–166, 2016.

GIACOMETTI, A. et al. In Vitro Activity of Aurein 1.2 Alone and in Combination with Antibiotics against Gram-Positive Nosocomial Cocci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1494–1496, 2007.

GILMORE, M. S. et al. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**, 2014.

GINSBURG, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 171–179, 2002.

GIULIANI, F. et al. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 637–42, fev. 2010.

GURSOY, H. et al. Photodynamic therapy in dentistry: A literature review. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 4, p. 1113–1125, 2013.

HALDER, S. et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2015.

HAZRA, M. K.; ROY, S.; BAGCHI, B. Hydrophobic hydration driven self-assembly of curcumin in water: Similarities to nucleation and growth under large metastability, and an analysis of water dynamics at heterogeneous surfaces. **Journal of Chemical Physics**, v. 141, n. 18, 2014.

HIRST, J. D.; BROOKS, C. L. Helicity, Circular-Dichroism and Molecular-Dynamics of Proteins. **Journal of Molecular Biology**, 1994.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–26, 2013.

HOUSTON, M. E. et al. Influence of preformed alpha-helix and alpha-helix induction on the activity of cationic antimicrobial peptides. **The Journal of Peptide Research**, v. 52, n. 2, p. 81–8, 1998.

HUFFMAN, D. L.; SUSLICK, K. S. Hydrophobic interactions in metalloporphyrin-peptide complexes. **Inorganic chemistry**, v. 39, n. 24, p. 5418–5419, 2000.

JOHNSON, G. A. et al. Photoinduced membrane damage of *E. coli* and *S. aureus* by the photosensitizer-antimicrobial peptide conjugate eosin-(KLAKLAK)<sub>2</sub>. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 7–10, 2014.

KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–767, 2011.

KLEVENS, R. M. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **The Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 15, p. 1763–1771, 2007.

KMEID, J. G. et al. Combination therapy for gram-negative bacteria: What is the evidence? **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 12, p. 1355–1362, 2013.

KOHANSKI, M. A. et al. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, 2007.

KOHANSKI, M. A.; DEPRISTO, M. A.; COLLINS, J. J. Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p.

311–320, 2010.

KÖMERIK, N.; WILSON, M.; POOLE, S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. **Photochemistry and photobiology**, v. 72, n. 5, p. 676–680, 2000.

KRELING, P. F. et al. Cytotoxicity and the effect of cationic peptide fragments against cariogenic bacteria under planktonic and biofilm conditions. **Biofouling**, v. 32, n. 9, p. 995–1006, 2016.

KUMAR, A. et al. A survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: a meta-analytic/meta-regression study. **Critical care medicine**, v. 38, n. 8, p. 1651–64, 2010.

LAADHARI, M. et al. Interaction of the antimicrobial peptides caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact bacteria by <sup>2</sup>H solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 12, p. 2959–2964, 2016.

LAURO, F. M. et al. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene – polylysine conjugates. p. 10–12, 2002.

LECLERC, E. et al. Interaction of heme with amphiphilic peptides: use of Hemin-CN to probe the interaction of calmodulin with its target peptides. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 306, n. 1, p. 158–162, 1993.

LORENZÓN, E. N. et al. Dimerization of aurein 1.2: Effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Candida albicans* cells. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1521–1528, 2013.

LORENZÓN, E. N.; PICCOLI, J. P.; CILLI, E. M. Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1 . 2 dimer and mannans. **Amino Acids**, p. 1–5, 2014a.

LORENZÓN, E. N.; PICCOLI, J. P.; CILLI, E. M. Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans. **Amino Acids**, v. 46, n. 11, p. 2627–2631, 2014b.

LUO, P.; BALDWIN, R. L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. **Biochemistry**, v. 36, n. 27, p. 8413–8421, 1997.

MACHADO, A. D. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 2015.

MANG, T. S. Dosimetric concepts for PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 5, p. 217–223, 2008.

MARIS, S. et al. Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections — Biotechnological innovation in endodontics. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 203–213, 2015.

MORET, F.; GOBBO, M.; REDDI, E. Conjugation of photosensitisers to antimicrobial peptides increases the efficiency of photodynamic therapy in cancer cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 7, p. 1238–1250, 2015.

MOUTON, J. W. Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. **Infection**, v. 27 Suppl 2, p. S24–S28, 1999.

- SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibiofilm Efficacy of Photosensitizer-functionalized nanoparticles. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 10, p. 1604-10, 2014.
- NUDING, S. et al. Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides and Antibiotics against *Clostridium difficile*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5719–5725, 2014.
- NUÑEZ, S. C. et al. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, p. 31–37, 2014.
- O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053–1074, 2009.
- OLSEN, C. E. et al. Development of resistance to photodynamic therapy (PDT) in human breast cancer cells is photosensitizer-dependent: Possible mechanisms and approaches for overcoming PDT-resistance. **Biochemical Pharmacology**, v. 15, n. 144, p. 63-77, 2017.
- PAGONIS, T. C. et al. Nanoparticle-based Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 322–328, 2010.
- PARK, H. J. et al. Agr function is upregulated by photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* and is related to resistance to photodynamic therapy. **Microbiology and immunology**, v. 57, n. 8, p. 547–52, 2013.
- PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 14, n. 1–2, p. 3–22, 1992.
- PERCY, M. G.; GRÜNDLING, A. Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 81–100, 2014.
- PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, p. 81–95, 2009.
- REINHARDT, A.; NEUNDORF, I. Design and Application of Antimicrobial Peptide Conjugates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 701, p. 1–21, 2016.
- RIBEIRO, M. S. et al. Laser em Baixa Intensidade. In: **Técnicas e Procedimentos Terapêuticos**. [s.l: s.n.]. p. 945–953.
- RONQUI, M. R. et al. Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, 2016.
- SABINO, C. P. et al. The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 72–78, 2016.
- SANI, M. A. et al. Proline-15 creates an amphipathic wedge in maculatin 1.1 peptides that drives lipid membrane disruption. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2277–2289, 2015.
- SANI, M. A. et al. One pathogen two stones: are Australian tree frog antimicrobial peptides synergistic against human pathogens? **European Biophysics Journal**, v. 46, n. 7, p. 639–646, 2017.
- SELLERA, F. P.; NASCIMENTO, C. L.; RIBEIRO, M. S. Photodynamic therapy in veterinary

medicine: From basics to clinical practice. **Springer International Publishing**, Ed 1, 228 páginas, 2016.

SENGUPTA, D. et al. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 2308–2317, 2008.

SHEPHERD, N. E. et al. Single turn peptide alpha helices with exceptional stability in water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 9, p. 2974–2983, 2005.

SOUZA, L. C. et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 292–296, 2010.

STAN-LOTTER, H. et al. 24 The Assessment of the Viability of Halophilic Microorganisms in Natural Communities. **Methods in Microbiology**, v. 35, n. 05, p. 569–584, 2006.

STREMPEL, N.; STREHMEL, J.; OVERHAGE, J. Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 1, p. 67–84, 2015.

STUART, C. H. et al. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 93–98, 2006.

SUN, Y. et al. The bound states of amphipathic drugs in lipid bilayers: study of curcumin. **Biophysical journal**, v. 95, n. 5, p. 2318–2324, 2008.

TARDIVO, J. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, set. 2005a.

TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, set. 2005b.

TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 196–203, 2006.

TUBBY, S.; WILSON, M.; NAIR, S. P. Inactivation of staphylococcal virulence factors using a light-activated antimicrobial agent. **BMC microbiology**, v. 9, p. 211, 2009.

ULIANA, M. P. et al. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Photochemical & Photobiological Sciences** :, v. 13, p. 1137–45, 2014.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

VERMATHEN, M. et al. PH-dependent distribution of chlorin e6 derivatives across phospholipid bilayers probed by NMR spectroscopy. **Langmuir**, v. 26, n. 13, p. 11085–11094, 2010.

WICHITNITHAD, W. et al. Effects of Different Carboxylic Ester Spacers on Chemical Stability , Release Characteristics , and Anticancer Activity of Mono-PEGylated Curcumin Conjugates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 12, p. 5206–5218, 2011.

WICKEN, A. J.; EVANS, J. D.; KNOX, K. W. Critical micelle concentrations of lipoteichoic acids. **Journal of Bacteriology**, v. 166, n. 1, p. 72–77, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>.

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 177–184, 2013.

ZELEZETSKY, I. et al. Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity. **The Biochemical journal**, v. 390, n. Pt 1, p. 177–188, 2005.