

XVI REUNIÃO CIENTÍFICA SÃO LUCAS

De 30 de outubro à 1º de novembro

AUDITÓRIO UNIDADE II



AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DE TOXINAS DE SERPENTES COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

LIMA, Ana Clara; TELES, Carolina B. G.; DINIZ-SOUSA, Rafaela

Laboratório da Plataforma de Bioensaios de Malária e Leishmaniose - PBML - FIOCRUZ - RO. Centro Universitário São Lucas Afya - UniSL

A *Acinetobacter baumannii* é uma bactéria Gram-negativa e encontra-se entre as principais causas de infecções nosocomiais oportunistas, devido sua grande resistência a inúmeras famílias de antibióticos. Esse patógeno pode ser adquirido de forma expressiva em indivíduos submetidos a procedimentos hospitalares invasivos, pois a necessidade de permanência nos leitos, a ventilação mecânica e o uso prolongado de dispositivos são grandes fatores de riscos. Ao desencadear a infecção, a *A. baumannii* pode comprometer gravemente diversos tecidos e sistemas do corpo. A escassez de opções terapêuticas eficazes dificulta o controle desse patógeno. Nesse contexto, peptídeos derivados da sequência primária de LmutTX (PLA₂ Lys49), toxina isolada do veneno da serpente *Lachesis muta muta*, têm mostrado eficácia contra cepas de *Staphylococcus aureus* e do patógeno em questão. Com isso, o objetivo do projeto é avaliar os efeitos citotóxicos de peptídeos derivados de LmutTX com atividade antimicrobiana sobre *Acinetobacter baumannii*. Os peptídeos sintéticos foram obtidos da Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento a partir de estudos anteriores. A atividade antimicrobiana será realizada conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) com adaptações. A concentração mínima inibitória em 50% (MIC₅₀) será determinada pelo teste de suscetibilidade de microdiluição, utilizando cepas de *A. baumannii* ATCC e/ou isolados clínicos. As bactérias serão cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) por 24 horas, e posteriormente ajustadas para 1,5 x 10⁶ UFC/mL e incubadas com os peptídeos (125 e 3,9 µg/mL) por 24 horas a 37°C. O crescimento bacteriano será obtido por espectrofotometria a 630 nm. O ensaio de antibiofilme será de acordo com Hong, Kim e Park (2021). Após incubação dos peptídeos com as cepas de *A. baumannii* em placas de 96 poços por 24 horas a 37°C, o meio de cultura será removido e os biofilmes fixados (metanol 100%) e corados (cristal violeta 0,1%) por 1 hora. Depois de serem lavados com água destilada e secos em temperatura ambiente, a massa de biofilme será dissolvida em etanol 95% e a leitura mensurada em 595 nm. Para avaliar a citotoxicidade dos

peptídeos, estes serão submetidos a ensaios *in vitro*, como atividade hemolítica (Stark; Liu; Deber, 2002) e de viabilidade celular em linhagens celulares (Riss et al., 2004). As células HepG2, J774, L929 e HaCat serão incubadas em diferentes concentrações de peptídeos (125 e 3,9 µg/mL) por 24 a 72 horas. A viabilidade celular será verificada pela técnica de fluorescência usando resazurina e a leitura realizada em leitor de Microplacas Multimodal Varioskan LUX com excitação de 530/25 e emissão de 590/35; o estado citotóxico das amostras será definido com base no seu Índice de Seletividade ($IS = CC_{50}/IC_{50}$). Dosagem de óxido nítrico (NO), quantificação da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e integridade da membrana celular de macrófagos J774 serão analisados, a fim de determinar os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos. A dosagem de NO em macrófagos J774 tratados com peptídeos será mensurada no sobrenadante após incubação de 72 horas. O NO será quantificado como nitrito (NO₂) usando a reação de Griess e a absorbância medida a 550 nm. Para quantificação de EROS, as células serão centrifugadas e lavadas com PBS 1X, e em seguida expostas ao composto 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H2DCFH-DA), que se converte em diclorodidrofluoreceína (DCF) no meio intracelular. A oxidação de DCF por EROS gera subprodutos fluorescentes, os quais podem ser mensurados em espectrofluorímetro com excitação a 450 nm e emissão a 525 nm, dessa forma determinando a concentração de EROS. No teste de integridade da membrana, os macrófagos J774 serão tratados a diferentes concentrações de peptídeos (com base no MIC₅₀) por 3 horas a 37°C. A integridade da membrana será verificada utilizando iodeto de propídio (PI) e os resultados de fluorescência plotados no Prisma para análise dos dados. As análises estatísticas serão realizadas pelo GraphyPad Prism, considerando as diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$. A resistência aos antibióticos é um sério problema de saúde pública global, e a busca por novos agentes antimicrobianos faz-se necessária e urgente. Peptídeos sintéticos derivados de toxinas mostram-se fontes promissoras de antimicrobianos. Portanto, espera-se que os peptídeos identificados no presente trabalho apresentem atividade antimicrobiana em baixas concentrações, bem como não sejam hemolíticos, nem citotóxicos sobre as linhagens celulares testadas.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; peptídeos sintéticos; *Lachesis muta muta*.