

ELAINE MARIA GUARÁ LÔBO

ANÁLISE ANTIMICROBIANA, IMUNOMODULATÓRIA E SINÉRGICA *IN VITRO*
PARA TERAPIA PERIODONTAL DE INTERESSE HOSPITALAR

BRASÍLIA, 2017

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ELAINE MARIA GUARÁ LÔBO

**ANÁLISE ANTIMICROBIANA, IMUNOMODULADORA E SINÉRGICA *IN VITRO*
PARA TERAPIA PERIODONTAL DE INTERESSE HOSPITALAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Taia Maria Berto Rezende

Coorientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Brasília

2017

Dedico este trabalho ao meu amado pai (in memoriam), que me encorajou e abençoou nesta caminhada. Onde quer que esteja, obrigada por perpetuar o seu amor.

AGRADECIMENTOS

À orientadora **Prof^a. Dr^a. Taia Maria Berto Rezende**, pelo exemplo que é pra mim, como ser humano e profissional, por ter acreditado desde o primeiro instante neste projeto e pelos ensinamentos que carregarei por toda a vida.

Ao coorientador **Prof. Dr. Octávio Luiz Franco**, por todo apoio e pelo exemplo de transformação de tantas vidas por meio da ciência.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Eric Jacomino Franco**, **Prof. Dr. Robert Pogue** e **Prof^a. Dr^a. Anne Carolina Eleutério Leite**, pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

À **Profa. MSc. Stella Maris de Freitas Lima** e amiga, pela ajuda incondicional, amizade e carinho em me estender a mão em todos os momentos dessa jornada. E especialmente, por dividir comigo o seu brilhantismo em cada ensinamento

À **MSc. Ingrid Aquino Amorim** pela preciosa ajuda, amizade e carinho em contribuir com este trabalho de forma brilhante. Pelo seu precioso tempo e conhecimento.

À **MSc. Ana Paula de Castro Cantuária** pela grandiosa ajuda, acolhimento, amizade e esmero em tudo o que ensina.

Aos colegas de laboratório, que sempre estiveram dispostos em ajudar e acrescentar ao meu trabalho **Camila, Mirna, Patrícia, Poliana, Maurício, Tarsila, Danilo, Daniel, Jade, Bianca, Cláudia e Arthur**.

Ao aluno de iniciação científica **Tássio Fernandes**, pela colaboração e disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Ao **Jeeser Alves de Almeida**, pelas contribuições na análise estatística;

À técnica **Kênia Chaves**, pela ajuda de sempre e por fazer do laboratório um ambiente de alegria.

À minha filha, **Marina Lôbo Dantas**, por ser a minha inspiração para levantar a cada dia uma pessoa melhor e pelo seu amor incondicional.

Ao meu esposo, **José Marcos Ribeiro Dantas**, pelo companheirismo, compreensão, paciência e amor. Sem a sua ajuda, nada disso seria possível.

À minha mãe, **Maria Marlene Léda Guará Lôbo**, meu maior exemplo de educadora e mulher perseverante.

Ao meu pai, **Sebastião Ferreira Lôbo** (*in memoriam*), pelo amor incondicional que criou seus filhos e por acreditar em todos os meus sonhos.

À minha irmã e melhor amiga, **Irene Maria Guará Lôbo Santana**, pela ajuda e amor ao longo de toda essa caminhada.

Às minhas amigas de toda a vida, **Kenia, Fernanda, Júlia, Anne, Larissa, Luciana, Daniele, Andréia, Alessandra e Patrícia**, por entenderem a minha distância e sempre me apoiarem, à vocês, todo o meu amor.

Meus sinceros agradecimentos.

“Para tornar-se o melhor de si mesmo é preciso focar nas próprias potencialidades e não nos próprios limites!”

(Salvo Noé)

RESUMO

As doenças periodontais apresentam-se como as doenças infecciosas mais comuns da cavidade oral. Quando associadas ao biofilme dento-bacteriano, podem resultar na destruição dos tecidos de suporte dentário e até mesmo, perda de dente. A clorexidina, por sua vez, apresenta-se como um anti-séptico catiônico de amplo espectro utilizado como principal agente para controle do biofilme oral. No entanto, apresenta efeitos adversos quando utilizada por períodos prolongados, como ardência bucal, manchamento de dentes, aumento do cálculo e perda do paladar. A este respeito, os peptídeos antimicrobianos foram propostos como uma abordagem alternativa ao tratamento de infecções e ao controle do biofilme dental, a fim de evitar a resistência microbiana e conseqüentemente os efeitos colaterais da clorexidina. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a capacidade antimicrobiana, imunomoduladora e citotóxica do peptídeo synoeca-MP e clorexidina isolados e em sinergismo contra *Pseudomonas aeruginosa*, além de avaliar a inibição da formação do biofilme e de bactérias planctônicas. De acordo com os resultados, a synoeca-MP combinada com clorexidina demonstrou eficácia antimicrobiana em comparação com o uso isolado, além da atividade imunomoduladora (aumentando a produção de MPC-1 e TNF- α e diminuindo a produção de óxido nítrico e IL-10). Neste contexto, espera-se que os agentes, em conjunto, possam controlar a infecção e sua disseminação, além de potencializar a resposta imune de macrófagos contra o microrganismo estudado. Além disso, reduzir a concentração de clorexidina pela adição do peptídeo synoeca-MP pode minimizar os efeitos indesejáveis de ambos em ambiente clínico.

Palavras-chave: Sinergismo; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilme; peptídeo; clorexidina.

ABSTRACT

The periodontal diseases are the most common oral cavity's infectious diseases. When associated with the dento-bacterial biofilm, may result in destruction of tooth support tissues and even, tooth loss. Chlorhexidine is a wide-spectrum cationic antiseptic used as main agent to control oral biofilm. However, it has side effects by long-term use such as oral burning, teeth staining, increased calculus and loss of taste. In this regard, antimicrobial peptides have been proposed as an alternative approach to infections treatment and control of dental biofilm, in order to avoid microbial resistance and consequently, chlorhexidine side effects. The aim of the present study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial and immunomodulatory capacity and cytotoxicity of synoeca-MP peptide and chlorhexidine isolated and both in synergism against *Pseudomonas aeruginosa*, besides evaluating the inhibition of biofilm formation and planktonic bacteria. According to the results, synoeca-MP combined with chlorhexidine demonstrated antimicrobial effectiveness compared to its isolated use besides and immunomodulatory activity (up-regulating MPC-1 and TNF- α and down-regulating nitric oxide and IL-10). In this context, it is expected that the agents, together, could be able to control the infection and its dissemination, besides potentiating the immune response of macrophages against the studied microorganism. In addition, reducing the concentration of chlorhexidine by the addition of synoeca-MP peptide may minimize the undesirable effects of both in a clinical setting.

Keywords: Synergism; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; peptide; chlorhexidine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Progressão da doença periodontal do estado de saúde à inflamação severa e perda óssea. (A) Periodonto saudável. Sem presença de inflamação e/ou perda óssea. (B) Gengivite. Presença de inflamação sem a perda das estruturas de suporte. (C) Doença periodontal. Presença de destruição dos tecidos periodontais de suporte.....23

Figura 2. Algumas citocinas participantes do processo da resposta imunológica na doença periodontal. Presentes no quadro vermelho as citocinas que ativam e no quadro amarelo a citocina que inibe o processo de reabsorção óssea..... 27

Figura 3. Ciclo da *Pseudomonas aeruginosa*. Demonstrando a fase no ambiente originário (solo), sua participação na colonização no biofilme bucal em pacientes imunossuprimidos e hospitalizados em UTI, até sua chegada ao pulmão, culminando na pneumonia nosocomial..... 30

Figura 4. Grupos experimentais *Heat-Killed Pseudomonas aeruginosa* (HK *P. aeruginosa*), synoeca-MP (SYN) e a clorexidina (CHX) com estímulos à célula RAW 264.7..... 51

Figura 5. Avaliação da inibição de células planctônicas de *P. aeruginosa*, a partir do peptídeo synoeca-MP e da clorexidina, após 6 h de incubação. O controle positivo gentamicina demonstrou atividade a partir de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O ensaio foi representado em média e erro padrão da absorbância a 600 nm a partir de triplicata técnica e biológica. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. SYN representa os resultados de synoeca-MP e CHX representa os resultados de clorexidina..... 55

Figura 6. Avaliação da inibição de biofilmes formados por *P. aeruginosa*, a partir do peptídeo synoeca-MP e da clorexidina, após 6 h de incubação. O controle positivo gentamicina demonstrou atividade a partir de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O ensaio foi representado

em média e erro padrão da absorbância a 595 nm a partir de triplicata técnica e biológica. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. SYN representa os resultados de synoeca-MP e CHX representa os resultados de clorexidina..... 56

Figura 7. Avaliação da viabilidade celular e produção de NO por células RAW 264.7 na presença de diferentes concentrações de antígenos HK, após 72 h de incubação. (A) representa a viabilidade celular com os grupos estimulados com antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. As barras representam média e erro padrão da absorbância, a partir de triplicata técnica e biológica. (B) representa a produção de nitrito com os grupos estimulados com antígenos e/ou IFN- γ . As barras representam média e erro padrão da concentração de nitrito, a partir de triplicata técnica e IFN- γ biológica. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*.....58

Figura 8. Avaliação da viabilidade em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 6 h de incubação. A viabilidade foi representada em média e erro padrão da absorbância a 595 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ59

Figura 9. Avaliação da viabilidade em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 24 h de incubação. A viabilidade foi representada em média e erro padrão da

absorbância a 595 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (B) representa os grupos contendo peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*..... 61

Figura 10. Avaliação da viabilidade em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 72 h de incubação. A viabilidade foi representada em média e erro padrão da absorbância a 595 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*.....62

Figura 11. Avaliação da produção da quimiocina MCP-1 em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 6 h de incubação. A produção da quimiocina foi representada em média e erro padrão da absorbância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle. ANOVA *One way* e pós-teste de *Bonferroni*. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA *One way* e pós-teste de *Bonferroni*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ64

Figura 12. Avaliação da produção da citocina IL-1 α em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 24 h de incubação. A produção da citocina foi representada em média e erro padrão da absorbância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle. ANOVA *One way* e pós-teste de *Bonferroni*. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA *One way* e pós-teste de *Bonferroni*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ66

Figura 13. Avaliação da produção da citocina TNF- α em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P.*

aeruginosa com e sem IFN- γ , após 24 h de incubação. A produção da citocina foi representada em média e erro padrão da absorvância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni.....67

Figura 14. Avaliação da produção da citocina IL-10 em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 72 h de incubação. A produção da citocina foi representada em média e erro padrão da absorvância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni.....69

Figura 15. Avaliação da produção da citocina GM-CSF em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 72 h de incubação. A produção da citocina foi

representada em média e erro padrão da absorvância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ71

Figura 16. Avaliação da produção de nitrito em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 72 h de incubação. A produção de nitrito foi representado em média e erro padrão da absorvância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*.....73

Figura 17. Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao peptídeo synoeca-MP (1594.8 Da), com pureza superior a 95%.....105

Figura 18. Curva representativa de crescimento da bactéria *P. aeruginosa*, através da média de três réplicas biológicas para determinação de fase logarítmica. (A) representa a determinação do número de células totais a partir da relação D. O. versus tempo de incubação, medido a cada 30 minutos. (B) representa a linha de tendência com equação e r^2 e a determinação do número de células viáveis a partir da relação D. O. versus UFC.mL⁻¹.....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais antissépticos bucais utilizados na odontologia.....	32
Tabela 2 – Relação de alguns dos principais peptídeos encontrados na cavidade bucal.....	39
Tabela 3 – Massa molecular e sequência dos peptídeos synoeca-MP (SYN) e LL-37 (LL).....	46
Tabela 4 – Determinação do MIC e MBC dos peptídeos LL-37 e synoeca-MP e da clorexidina contra a bactéria <i>P. aeruginosa in vitro</i> . O controle positivo gentamicina demonstrou atividade de 0,25 µg.mL ⁻¹ (MIC) e 1 µg.mL ⁻¹ (MBC). ND – MIC e MBC não detectados até 128 µg.mL ⁻¹	54
Tabela 5 – Resultados sinérgicos do ensaio de interação do peptídeo synoeca-MP e da clorexidina, a partir dos respectivos valores de MIC (µg.mL ⁻¹) contra <i>P. aeruginosa</i> , após 18 h com leitura em 600 nm. SYN representa os resultados de synoeca-MP, CHX representa os resultados de clorexidina, CIF representa a concentração inibitória fracional e ICIF o índice da concentração inibitória fracional.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – *American type culture collection*
CHX – clorexidina
CIF – concentração inibitória fracional
DO – densidade ótica
DP – Doença Periodontal
GM-CSF – fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos
HK – antígenos mortos pelo calor
ICIF – índice de concentração inibitória fracional
IFN – interferon
IL – interleucina
INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial Brasileiro
IT – índice terapêutico
LPS – lipopolissacarídeo
MALDI-ToF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*
MBC – concentração bactericida mínima
MCP – *Monocyte Chemoattractant Protein* proteína
MHA – Mueller Hinton Ágar
MHB – Mueller Hinton Broth
MIC – concentração inibitória mínima
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
NO – óxido nítrico
OPG – osteoprotegerina
Pag – periodontite agressiva
PAM – peptídeo antimicrobiano
PC – periodontite crônica
PGE – prostaglandina
RANK - receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RANKL – ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RAR – raspagem e alisamento radicular

ROS – espécie reativa de oxigênio

STAT – *Signal transducer and activator of transcription*

SYN – synoeca-MP

Th – célula T *helper*

TNF – fator de necrose tumoral

TRAcP – fosfatase ácida resistente ao tartarato

UFC – unidade formadora de colônia

USPTO – *United States Patent and Trademark Office*

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	CAVIDADE ORAL	22
2.2	DOENÇAS PERIODONTAIS	23
2.3	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	30
2.4	TRATAMENTO PERIODONTAL	32
2.5	DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA (CHX)	33
2.5.1	Clorexidina e sua Utilização na Doença Periodontal	35
2.6	PNEUMONIA NOSOCOMIAL E DOENÇA PERIODONTAL	36
2.7	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	37
2.7.1	Synoeca-MP (SYN)	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MÉTODOS	45
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
4.2	OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO SYNOECA-MP	45
4.3	OBTENÇÃO DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E GENTAMICINA	46
4.4	MICROORGANISMOS E PREPARO DOS ANTÍGENOS MICROBIANOS MORTOS PELO CALOR	46
4.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO SYNOECA-MP E DA CLOREXIDINA	47
4.6	ENSAIO DE INIBIÇÃO DE BIOFILME	48
4.7	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO SINÉRGICA DO PEPTÍDEO SYNOECA-MP E DA CLOREXIDINA	49
4.8	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA SYNOECA-MP, CLOREXIDINA E DA INTERAÇÃO SINÉRGICA DO PEPTÍDEO SYNOECA-MP COM A CLOREXIDINA	50
4.8.1	Cultura Celular e Grupos Experimentais	50
4.8.2	Avaliação da Citotoxicidade do Peptídeo Synoeca-MP, da Clorexidina e da Associação Sinérgica de Synoeca-MP e Clorexidina	51
4.8.3	Avaliação da Atividade Imunomodulatória do Peptídeo Synoeca-MP, Clorexidina e Sinergismo (Synoeca-MP e Clorexidina)	52
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5	RESULTADOS	54
5.1	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS E DA CLOREXIDINA E DA INTERAÇÃO ENTRE AMBOS	54
5.2	ANÁLISES DA PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM CULTURAS DE CÉLULAS RAW 264.7	57
5.2.1	ESTUDO PILOTO – DEFINIÇÃO DA MENOR CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO MICROBIANO CAPAZ DE ESTIMULAR AS CULTURAS CELULARES	57
5.3	VIABILIDADE CELULAR EM CULTURA DE RAW 264.7	58
5.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA QUIMIOCINA MCP-1 EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7	63
5.5	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-1 α e TNF- α EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7	65

5.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7	68
5.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO FATOR ESTIMULADOR DE MACRÓFAGOS (GM-CSF) EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7	70
5.8	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITO EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7	72
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXOS	105
	Anexo A – espectro de massa dos peptídeos antimicrobianos	105
	Anexo B – curvas de crescimento para determinação de fase logarítmica da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	106

1 INTRODUÇÃO

A periodontite consiste em uma das doenças infecciosas mais comuns da cavidade oral, associada ao biofilme dento-bacteriano, podendo resultar na destruição dos tecidos de suporte dos dentes e perda dentária (1). A alteração da microbiota bucal ocasionada pelo desequilíbrio da resposta imunoinflamatória pode levar ao aparecimento de espécies microbianas oportunistas (2).

Ademais, as doenças periodontais apresentam fatores de risco para doenças sistêmicas por apresentarem grande diversidade bacteriana e depósitos de periodontopatógenos, podendo ocasionar a disseminação sistêmica desses microrganismos (3, 4), representados principalmente por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* (5, 6).

Evidências demonstram a importância da remoção do biofilme oral para a prevenção das infecções do trato respiratório inferior (5, 7-10), sendo, as principais formas as intervenções mecânicas e químicas, incluindo a escovação e o uso de antissépticos orais (5, 9). Com relação a remoção química, a clorexidina (CHX) apresenta-se como um antisséptico consolidado e coadjuvante à terapia periodontal mecânica (11). Contudo, a CHX apresenta efeitos colaterais quando associada ao uso prolongado, tais como: ardência bucal, manchamento de dentes, aumento da quantidade de cálculo dentário e perda do paladar (12, 13).

Diante das principais doenças multidrogas-resistentes em pacientes imunocomprometidos, a *P. aeruginosa* pode estar relacionada à pneumonia nosocomial, que por sua vez, pode ser considerada uma importante doença infecciosa no contexto hospitalar e estar diretamente correlacionada ao aumento da mortalidade e custos hospitalares, apresentando relação direta com os microrganismos orais e com as doenças periodontais (14-16).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido propostos como uma abordagem alternativa ao tratamento de infecções e controle do biofilme dental, com o intuito de evitar a resistência microbiana (17) e neste contexto, os efeitos adversos do uso da clorexidina.

A formulação da CHX com outras substâncias já foi testada como o monofluorofosfato de sódio e o lauril sulfato de sódio que além de reduzirem a ação

da CHX, em razão da atração iônica por ânions e cátions, não colaboram para a redução da sua capacidade citotóxica (18). Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* a capacidade antimicrobiana, citotóxica e imunomodulatória do peptídeo synoeca-MP (SYN) e da CHX isolados e em sinergismo contra a bactéria *P. aeruginosa*, além da capacidade inibitória sobre células planctônicas e biofilmes formados por *P. aeruginosa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAVIDADE ORAL

A cavidade oral é composta pelas estruturas dentárias envoltas por tecido epitelial de recobrimento e suporte dos dentes, formados pelo periodonto de proteção, composto pela gengiva e mucosa alveolar (de revestimento), e periodonto de sustentação, tais como: cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. O cimento consiste em parte integrante do complexo dentinário de sustentação por estar envolto à raiz dentária e participar juntamente com o osso de suporte da inserção das fibras do ligamento periodontal (19, 20). Neste contexto, o periodonto pode sofrer alterações morfológicas e funcionais ao longo da vida, tanto com relação à idade, quanto no que diz respeito às doenças causadas por microrganismos da cavidade bucal, mais especificamente, os periodontopatógenos no contexto das doenças periodontais (DPs) (21).

A mucosa oral pode ser classificada de acordo com a sua área de recobrimento, sendo dividida em mucosa mastigatória (gengiva e mucosa de revestimento do palato duro), mucosa especializada (dorso da língua) e mucosa oral que reveste o restante da cavidade oral (22). Frente ao exposto, para o entendimento das DPs faz-se necessário o conhecimento do estado de saúde das principais estruturas do periodonto (Figura 1), bem como o reconhecimento do estado de saúde dos tecidos de proteção e sustentação dentários.

O epitélio oral íntegro apresenta estruturas associadas à resposta imunológica do organismo, como células inflamatórias, células de *Langerhans* e ainda células do tecido queratinizado, responsáveis pela manutenção da integridade tecidual, corroborando para a estabilidade e proteção dos tecidos periodontais (23). Durante o processo da doença periodontal (DP), onde há perda do tecido conjuntivo e osso de suporte no que tange à periodontite, tais células apresentam um menor controle da resposta imunológica, ou seja, há falha no controle da doença, e emergem dessa forma episódios cíclicos de destruição (23, 24). Na gengivite, apesar das mudanças fenotípicas sutis, como inflamação e sangramento gengival, não há perda dos

tecidos de suporte, ainda que possam ser encontradas acentuadas alterações histopatológicas na rede de vasos sanguíneos, capilares e circulação linfática (24).

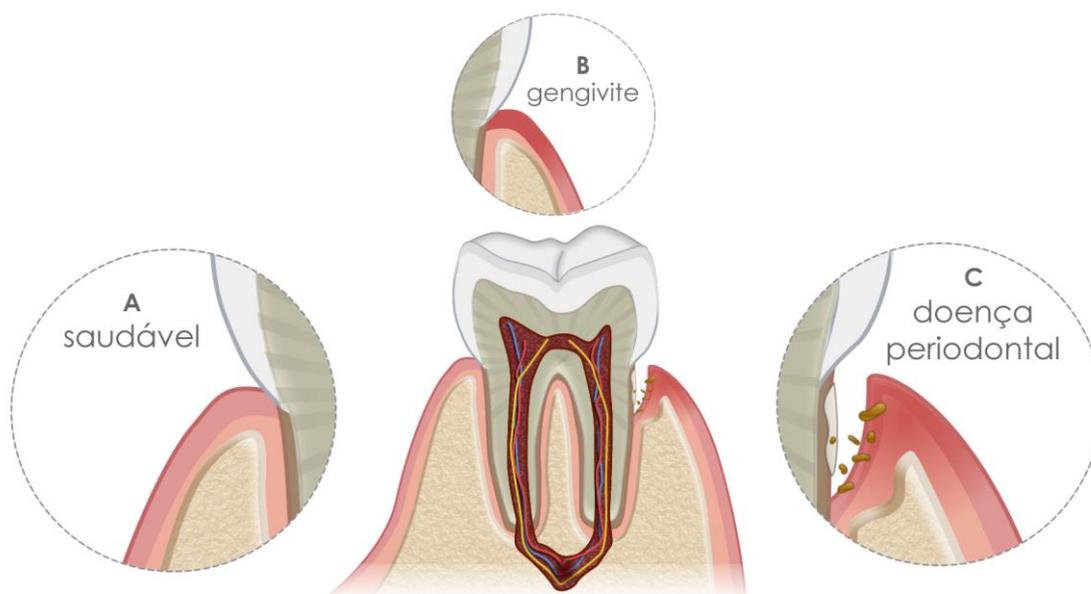


Figura 1. Progressão da doença periodontal do estado de saúde à inflamação severa e perda óssea (25). (A) Periodonto saudável. Sem presença de inflamação e/ou perda óssea. (B) Gingivite. Presença de inflamação sem a perda das estruturas de suporte. (C) Doença periodontal. Presença de destruição dos tecidos periodontais de suporte.

2.2 DOENÇAS PERIODONTAIS

A DP apresenta um conjunto de condições inflamatórias e multifatoriais que quando grave e avançada afeta diretamente os tecidos de sustentação do dente. Apresenta-se como uma das condições patológicas mais comuns da cavidade oral associada ao biofilme dento-bacteriano, sendo a principal causa da perda de dentes. Além disso, a DP também ocupa o sexto lugar no *Ranking* das doenças globais, afetando 11% da população mundial (1, 26).

O processo que envolve a interação multifatorial entre hospedeiro, microrganismo e moderadores ambientais representa um novo modelo de patogênese para os mais recentes avanços no campo da pesquisa das (DPs). Sabe-se que a DP tem início com a colonização por uma microbiota comensal que pode tornar-se disbiótica, e não por um complexo bacteriano seletivo (27).

Atualmente, dois importantes tipos de periodontite são reconhecidos: periodontite crônica (PC) e periodontite agressiva (Pag), terminologias empregadas

pela Classificação Atual das DPs (Academia Americana de Periodontia, AAP, 1999) (28, 29). A PC com maior prevalência em adultos (29), podendo apresentar compatibilidade entre gravidade da destruição óssea e quantidade do biofilme bacteriano dentário e cálculo subgingival, além de taxa de progressão moderada na maioria dos casos. De outra forma, a Pag se caracteriza pela perda rápida de inserção clínica e osso alveolar. Sendo as suas principais características a não contribuição de história médica, perda de inserção rápida e destruição óssea e agregação familiar. Outros aspectos podem estar presentes, como a elevada proporção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). De acordo com a AAP, o diagnóstico baseia-se em dados clínicos, radiográficos e histórico do paciente (30).

Diante da combinação de fatores que corroboram para o desenvolvimento da doença, uma correta identificação da microbiota também se faz necessária. Neste sentido, pode-se destacar como principais microrganismos contribuintes nesse processo, a *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Também, foi sugerido que quantidades elevadas de Aa e *Porphyromonas gingivalis* (Pg) podem ser sugestivas de DP generalizada e grave (31, 32). De acordo com estudos preliminares, as bactérias Gram-positivas facultativas representam os tipos de microrganismos comumente relacionados à saúde periodontal e podem ser representadas principalmente pelos gêneros *Streptococcus* e *Actinomyces* (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii* (33, 34). A microbiota da gengivite compõe-se por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a primeira representada por bactérias, tais como: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Peptostreptococcus micros* e os Gram-negativos, com predominância de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Haemofilos* e *Compilobacter spp* (35, 36). No caso da periodontite, as bactérias mais encontradas têm sido principalmente *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* (35, 36).

Como anteriormente citado, a DP relaciona-se aos fatores genéticos (polimorfismos genéticos e fenótipo hiper-inflamatório), comportamentais, ambientais, uso de medicamentos, todos favorecendo o estabelecimento da lesão periodontal (2). Além dos fatores genéticos associados ao paciente, os aspectos locais, como a variação da anatomia dental, também podem ser considerados fatores de risco para o início do desenvolvimento da doença. Sabe-se que o

acúmulo do biofilme pode ser considerado o fator etiológico da DP que, quando não removido, se desenvolve junto a um sistema bacteriano tridimensional e simbiótico em uma matriz de exopolissacarídeos aderidos à superfície do esmalte (37, 38). Essa organização estrutural dificulta a resposta ao tratamento por antibióticos, o que se explica pelo fato de apresentarem aumento da resistência adaptativa de bactérias do biofilme maduro aos agentes antimicrobianos (39). Evidências científicas demonstram que a concentração necessária para que o antibiótico sensibilize uma bactéria no biofilme seria duzentos e cinquenta vezes maior do que as cepas desenvolvidas de maneira planctônica (40).

Essa interação entre os diferentes tipos bacterianos com células e tecidos do hospedeiro induz à liberação de citocinas e quimiocinas, tais como: interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF)- α e interferon (IFN)- γ , que exercem papel importante na patogênese da DP. A partir da ação de neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e B e fibroblastos, temos como resultante o dano progressivo aos tecidos periodontais de suporte e consequente formação da bolsa periodontal (41, 42). Neste processo, onde diversos fatores e microrganismos conspiram para a progressão da doença, o epitélio oral forma a barreira física, composta principalmente pelos queratinócitos, responsáveis pela proteção contra microrganismos invasores. Ao mesmo tempo, os macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias após estímulo de proteínas bacterianas, como exemplo, IL-1 α e TNF- α , secretadas quando expostos aos antígenos, auxiliando na destruição dos tecidos periodontais, sendo também responsáveis pela manutenção da saúde do tecido periodontal (2, 43, 44). A IL-1, encontrada nos tecidos gengivais inflamados, estimula a produção de protoglicano fibroblástico e secreção de prostaglandina E₂ (PGE₂) (45), tendo o seu papel confirmado na reabsorção óssea em estudos que comprovam a diminuição nos níveis desta citocina no fluido crevicular, em pacientes com DP pós-tratamento (46). Ainda com relação ao processo de reabsorção, esta atua de forma indireta, como estímulo à produção de prostaglandina e secreção de metaloproteinases, cuja função consiste em dissolver a matriz orgânica secretada por osteoblastos, levando à perda óssea (47). Evidências demonstram a ação sinérgica da IL-1 com o TNF- α , auxiliando este último também na capacidade de adesão dos leucócitos às células endoteliais (47-50).

Neste contexto, as células fagocíticas, como os macrófagos, possuem receptores de superfície que reconhecem a parede bacteriana e unem-se a ela (51).

Tais células distinguem as células bacterianas e após identificá-las, secretam quimiocinas sinalizadoras responsáveis por atrair fagócitos (52). Apresentam propriedades como a mobilidade e produção de citotoxicidade, promovendo a comunicação entre as células, e atuando sobre a diferenciação e crescimento das mesmas (53). Os macrófagos podem ser do tipo M1, se ativados pela via imunológica clássica, com funções bactericidas e inflamatórias, levando à produção de citocinas como, IL-1, TNF- α e óxido nítrico (NO) (53, 54).

Já os macrófagos do tipo M2 podem ser ativados pela via imunológica alternativa, que ocorre quando o macrófago está exposto às citocinas, tais como IL-10, agindo como contribuinte para a supressão da inflamação, e tendo como principal característica o fato de serem imunomodulatórios, os quais contribuem especialmente para a expulsão do patógeno do local da agressão (55). Também estão envolvidas no processo da patogênese da DP outras citocinas relacionadas à resposta imunológica mediada por linfócitos do tipo Th2, como a IL-10, que participa como citocina anti-inflamatória neste processo (56). Estudo pregresso com a IL-10 demonstrou que esta citocina pode estar relacionada com a proteção do periodonto, quando camundongos apresentaram maior susceptibilidade à reabsorção óssea na ausência da molécula *signal transducer and activator of transcription* (STAT3), diretamente envolvida na sinalização desta citocina (57). Do mesmo modo, a resposta imunológica exacerbada, baseada na interação bactéria-hospedeiro, pode ser explicada como a razão para a destruição dos tecidos periodontais na tentativa do controle da infecção (58).

No contexto da destruição dos tecidos ósseos, o fator estimulante de macrófagos (GM-CSF) se apresenta como uma das citocinas protagonistas do sistema receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANK), presente na superfície dos osteoclastos, seu ligante (RANKL), expresso na superfície dos osteoblastos, linfócitos B e T e entre outras células, e da osteoprotegerina (OPG), que antagoniza os efeitos do RANKL, prevenindo a destruição óssea, expressa como citocina efetora final no processo de regulação da formação osteoclástica e na reabsorção óssea (Figura 2) (59, 60). Através da indução da expressão do RANKL pelos microrganismos, as células T ativam os osteoclastos através da ligação com o receptor RANK, o que induz a diferenciação e ativação de precursores de osteoclastos em células maduras (61). Por meio deste processo, as células B também podem produzir RANKL, além de outras citocinas, como TNF- α ,

aumentando a atuação dos osteoclastos no processo de reabsorção óssea na DP (62). Em contrapartida, a OPG, considerada protetora óssea, apresenta a mesma conformação do RANKL, se ligando ao RANK e, desta forma, impedindo a destruição óssea através da inibição dos osteoclastos (61) e indução da apoptose em células osteoclásticas (63). Deste modo, estudos têm demonstrado que há um aumento da expressão do RANKL e diminuição da OPG em pacientes com periodontite, independentemente do tipo de DP (64).

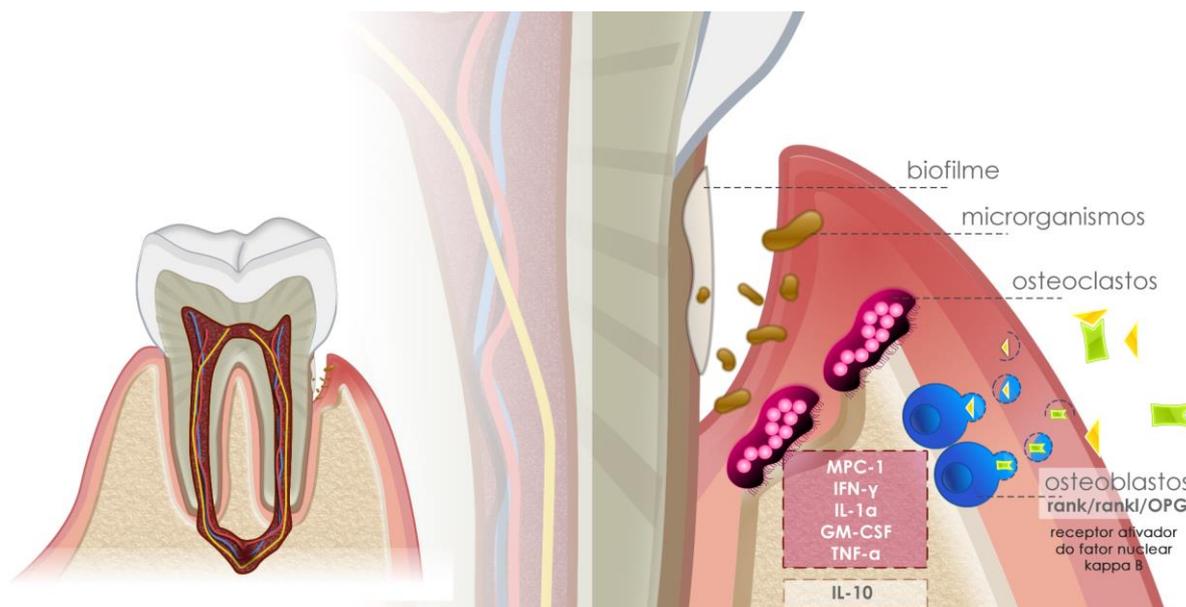


Figura 2. Algumas citocinas participantes do processo da resposta imunológica na doença periodontal (25). Presentes no quadro vermelho as citocinas que ativam e no quadro amarelo a citocina que inibe o processo de reabsorção óssea.

Dentre as citocinas envolvidas no processo de saúde e DP, a proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) pode desempenhar papel importante na sinalização e migração de neutrófilos e monócitos para a área de inflamação. Estudos anteriores sugeriram que a MCP-1 pode estar relacionada ao grau de inflamação, tendo uma maior expressão no fluido gengival em doenças agressivas quando comparados aos indivíduos saudáveis (65). Com relação ao IFN- γ , embora se mostre como uma citocina pró-inflamatória, demonstrou atividade imunomodulatória multidirecional com função de ativação ou inibição da reabsorção óssea na DP (66). O IFN- γ pode ser produzido pelas células Th1 na lesão inflamatória inicial, desempenhando importante papel na limitação da infecção, aumento da atividade de fagocitose dos macrófagos e dos neutrófilos (67).

Com relação ao NO, os estímulos inflamatórios da DP tornam-se capazes de induzir a formação de NO, havendo indícios de que o mesmo tem papel fundamental na progressão da DP, sendo um importante biomarcador para a periodontite e um contribuinte para o diagnóstico inicial da doença, tal descoberta possibilita a prevenção precoce dos danos ainda em período inicial da doença (68). O NO participa do grupo de radicais livres envolvidos em diversas funções no organismo, como homeostasia, resposta imunológica, neurotransmissão e a vasodilatação como a sua principal função (69). Também pode ser estimulado por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. Ressalta-se que foi observado um aumento de sua concentração em pacientes com DP, sendo efetivamente maior quando comparado a pacientes saudáveis ou com gengivite (70).

Com relação ao aspecto clínico de saúde periodontal, este pode ser caracterizado pela coloração rosa pálido da gengiva, anatomia gengival com aspecto de normalidade e ausência de sangramento (44), aspectos estes relevantes para a identificação do processo saúde-doença. Após a alteração do estado de saúde, tem-se início o estabelecimento da inflamação com o quadro clínico de gengivite. Este caracteriza-se por uma inflamação dos tecidos periodontais de proteção, sem contudo apresentar perda de tecido ósseo, caracterizada pelo sangramento, edema, rubor e alteração do fenótipo gengival. A evolução do quadro de gengivite, ocorre com o estabelecimento da periodontite. Neste quadro, observa-se a perda gradual das estruturas que sustentam o dente no alvéolo, como osso alveolar e perda de inserção de fibras do tecido conjuntivo gengival e ligamento periodontal (44).

Sabe-se que na condição de imunossupressão do hospedeiro, a *P. aeruginosa* está envolvida (71). Esta bactéria pode ser oriunda do solo, comumente encontrada em ambientes hospitalares, em superfície de alimentos, banheiros, equipamentos de suporte respiratório, diálise e ainda em líquidos desinfetantes e água (71, 72). A *P. aeruginosa* possivelmente apresenta íntima relação com o microbioma do biofilme dental, tendo em vista que como supracitado em condições de imunossupressão do hospedeiro, coloniza a cavidade oral e passa a integrar a comunidade do biofilme oral (73).

Neste caso, se o paciente apresentar comprometimento da função respiratória com importante redução da frequência, recursos como a entubação orotraqueal fazem-se necessária (74). Nesta condição, o tubo para ventilação mecânica torna-se um aparato susceptível ao crescimento e colonização de bactérias com formação de

biofilme, o que agrava o risco de broncoaspiração de patógenos para o trato respiratório inferior (74, 75). Nesses termos, diante do quadro de colonização de periodontopatógenos, essa circunstância pode debilitar ainda mais a condição sistêmica do paciente e influenciar nas infecções respiratórias como a pneumonia nosocomial (76).

Nesse sentido, estudos anteriores de identificação molecular da secreção brônquica dos tubos orotraqueais, verificaram que a colonização precoce ocorre com diversas espécies bacterianas em até 3 dias de vida nas vias aéreas de recém-nascidos (77). Correlato a esses, outra pesquisa avaliou as secreções advindas do tubo orotraqueal de pacientes críticos em 48 h até 7 dias com achados bacterianos semelhantes, estabelecendo em ambos uma forte evidência da relação dos microrganismos do biofilme do tubo orotraqueal com as pneumonias do trato respiratório inferior (78). No que diz respeito a essas evidências, as bactérias e fungos das culturas de secreção brônquica mais encontrados, além da *P. aeruginosa*, foram: *Candida albicans*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida tropicalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus warneri*, *Escherichia coli*, entre outras (77, 78).

Evidências indicam que o tubo orotraqueal por si só pode representar uma superfície propícia para adesão e colonização bacteriana, possibilitando uma broncoaspiração desses microrganismos posteriormente, sendo as bactérias da cavidade bucal as mais encontradas nos equipamentos de ventilação (6). Do mesmo modo, pacientes traqueostomizados podem apresentar alterações nas condições bucais, tais como: xerostomia, disfagia, inflamação gengival e lingual, sialorréia, aumento da saburra lingual, aumento do cálculo dentário, candidíase, dentre outros (79). Além das alterações bucais, pacientes críticos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) podem ser mais vulneráveis às infecções hospitalares por estarem sujeitos a procedimentos invasivos, como cirurgias complexas, administração de drogas imunossupressoras e antibióticos de amplo espectro de rotina, apresentando-se portanto, como porta de entrada para bactérias resistentes (80).

As bactérias mais comumente encontradas na cavidade oral de pacientes hospitalizados podem ser a *P. aeruginosa*, *Klebsiella*, *S. aureus* e *Acinetobacter*, sendo responsáveis pela rápida colonização do microbioma oral durante o uso da ventilação mecânica e podem disseminar-se subsequentemente para o pulmão (74,

81, 82). Dentre estas, a *P. aeruginosa* está entre os patógenos do trato respiratório mais frequentemente encontrados no biofilme da cavidade bucal, responsável pela colonização das estruturas dentárias, tecidos bucais e também equipamentos para ventilação orotraqueal (83), sendo, por esta razão, objeto do presente estudo.

2.3 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

A *P. aeruginosa* consiste em um bacilo Gram-negativo, aeróbico, não formador de esporos, pertencente a classe das gammaproteobactérias, da família das *Pseudomonadaceae*, sendo móvel devido à presença de flagelos. Esta bactéria pode ser originária do solo e se apresenta como patógeno oportunista em situações de comprometimento imunológico do hospedeiro (84). Pode ser encontrada com facilidade em superfícies inanimadas, sendo uma importante via de transmissão por contato (Figura 3) (83, 85).

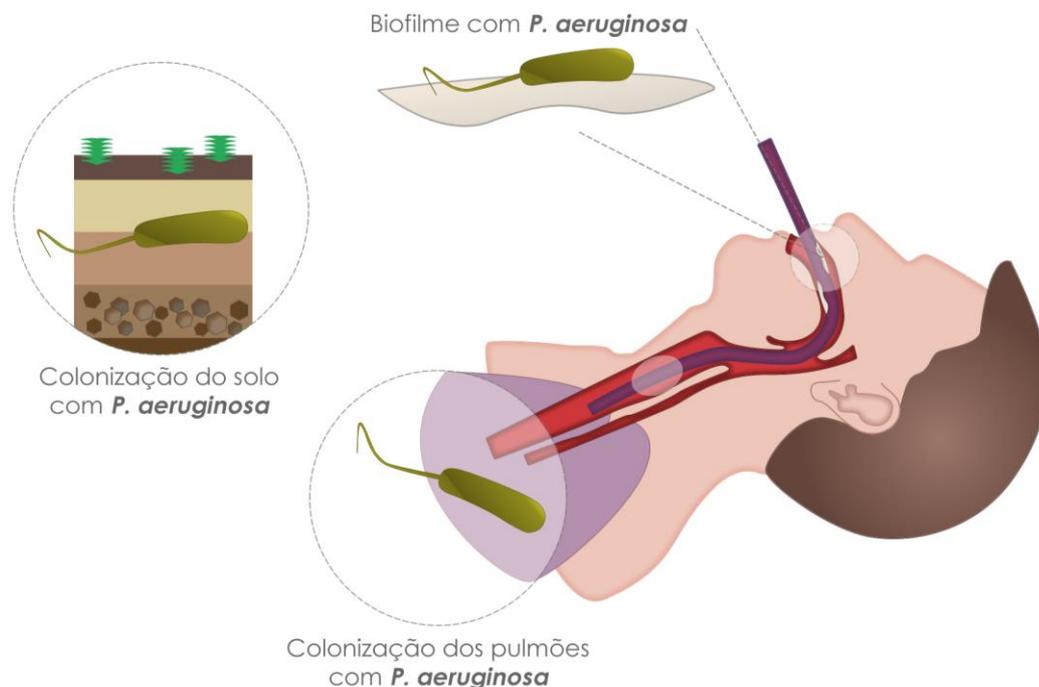


Figura 3. Ciclo da *Pseudomonas aeruginosa*. Demonstrando a fase no ambiente originário (solo), sua participação na colonização no biofilme bucal em pacientes imunossuprimidos e hospitalizados em UTI, até sua chegada ao pulmão, culminando na pneumonia nosocomial.

A adesão e colonização do biofilme pode ocorrer nas superfícies inanimadas através de moléculas ligantes presentes nas fímbrias (lecitinas ligadoras de maltose e lecitinas ligadoras de galactose), localizadas na superfície bacteriana. Essas moléculas se ligam a receptores presentes, principalmente, nas células mucocutâneas do hospedeiro, desencadeando o processo infeccioso em casos de comprometimento da imunidade (86). A *P. aeruginosa* também produz pigmentos fluorescentes e solúveis em água como a piocianina e a pioverdina, sendo a piocianina produzida por mais da metade dos isolados clínicos, de cor azul ou verde em pH neutro ou alcalino, dando a origem ao nome aeruginosa (87).

Os fatores de virulência estão associados à adesão, colonização, invasão local e disseminação sistêmica da doença. Dentre esses, podemos citar os estruturais, tais como as fímbrias, responsáveis pela aderência bacteriana à célula epitelial do hospedeiro. Ressalta-se, também, a produção de neuraminidase, responsável por fatores que impedem a adesão, por exemplo, do ácido siálico (88). O alginato promove a inibição da ligação a anticorpos, a fagocitose bacteriana e a apoptose em leucócitos polimorfonucleares; além da *P. aeruginosa*, também produz toxinas e enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, classe de antimicrobianos utilizados no combate à infecções graves, (6-fosfotransferase, 3-fosfotransferase, 2-adeniltransferase) e as β -lactamases das classes A e C. A toxina A, secretada pela *P. aeruginosa*, promove a necrose tecidual ocasionada pela interrupção da síntese proteica celular (89).

As principais bactérias vinculadas à pneumonia nosocomial também podem apresentar elevado grau de resistência aos antibióticos, em especial os carbapenêmicos, com a *P. aeruginosa* apresentando 41% de resistência, *E. Coli* de 11,9%, e *Enterobacter spp* de 21%, fato que relaciona a *P. aeruginosa* com 40% de óbitos em UTI (90, 91).

Em relação à resistência bacteriana, esta refere-se a uma resposta natural dos microrganismos a uma pressão seletiva, ou seja, uma condição desfavorável que elimina as cepas sensíveis até que restem apenas as cepas resistentes, que se multiplicam e se tornam a maioria (92, 93). Evidências científicas demonstraram que o volume da droga pode ser um fator de influência para essa pressão seletiva, tendo em vista que para ser eficaz, o antibiótico deve atingir a sua concentração inibitória mínima (MIC), o que implica em penetrar nas regiões mais profundas do biofilme. Caso isso não ocorra, o antimicrobiano apresenta sua efetividade reduzida contra o

biofilme, com resistência 1000 a 1500 vezes maior do que em microrganismos isolados, favorecendo o desenvolvimento de cepas resistentes (92, 94).

2.4 TRATAMENTO PERIODONTAL

O tratamento periodontal mecânico ou terapia periodontal básica preconizado como padrão ouro na periodontia baseia-se na remoção mecânica dos depósitos calcificados (cálculos e biofilme dentário), implicando na remoção manual ou ultrassônica do cálculo, com o intuito de desorganizar o biofilme dento-bacteriano a fim de remover os periodontopatógenos da superfície dentária, promovendo assim, a remoção do fator etiológico principal da DP (95). Evidências demonstraram a correlação da terapia mecânica e química para o tratamento da DP, utilizando para esse fim a CHX como principal veículo para a remoção química do biofilme bucal (96, 97).

Outros antissépticos bucais também podem ser utilizados com o propósito de auxiliarem na higiene bucal, como o cloreto de cetilpiridíneo, triclosan e óleos essenciais, sem contudo apresentarem eficácia superior à CHX (98) (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais antissépticos bucais utilizados na odontologia

Antisséptico	Função	Mecanismo de ação	Referências
Clorexidina	Antimicrobiano	Alteração da estrutura da membrana celular com consequente desequilíbrio osmótico da célula.	(81, 99, 100)
Cloreto de cetilpiridíneo	Antimicrobiano	Ligações catiônicas. Aumento da permeabilidade da parede celular, favorecendo a lise e diminuindo a habilidade da bactéria em se aderir à superfície dentária.	(101-103)
Triclosan	Antimicrobiano/ antifúngico	Desorganização da membrana celular e inibição inespecífica de enzimas da membrana.	(104-106)
Óleos essenciais	Antimicrobiano	Alteração da parede celular bacteriana.	(104, 107, 108)

Para pacientes hospitalizados e em condições precárias de higiene bucal, com imunossupressão, utiliza-se como procedimento padrão a CHX a 0,12% para o controle do biofilme bucal. Em relação aos demais colutórios bucais utilizados para

este fim (Tabela 1), a CHX também pode ser utilizada para a remoção dos microrganismos responsáveis pela colonização dos equipamentos de ventilação mecânica (109, 110). O controle químico da higienização bucal costuma ser realizado quando existe a impossibilidade de higienização mecânica tradicional, ocasionada pela presença de equipamentos de ventilação, dificuldade motora, ou, por vezes, pelo estado inconsciente do paciente sob sedação (111).

O controle do biofilme dento-bacteriano auxilia na prevenção de infecções do trato respiratório baixo, prevenindo a aspiração dos microrganismos aderidos ao biofilme, evitando assim que bactérias oriundas sejam aspiradas e causem infecções (74). Estudos progressos demonstram o sucesso no controle do biofilme dentário com o uso da CHX, bem como a diminuição da ocorrência da pneumonia nosocomial em ambientes hospitalares em até 40% (112, 113). Além disso, a literatura demonstra que o uso da ventilação mecânica em pacientes em UTI prolonga, em média, de 5 a 9 dias o tempo de internação (114) e, conseqüentemente, leva ao aumento dos custos hospitalares diretos com a infecção nosocomial nos Estados Unidos de US\$ 4,5 bilhões por ano (115). Também apresentam um acréscimo da colonização de patógenos respiratórios no biofilme, levando à uma maior resistência desses microrganismos quando comparados às bactérias planctônicas (8, 82).

Em razão da necessidade do uso prolongado da CHX, diversos efeitos colaterais podem ser observados, dentre eles, o aumento do cálculo supragengival, perda do paladar, escurecimento dos dentes, xerostomia, queimaduras em tecido mole e tumefações em lábios e glândulas (116-118), reações estas que interferem diretamente na qualidade de vida do paciente.

2.5 DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA (CHX)

No que concerne ao controle do biofilme dental, fator etiológico das doenças periodontais, a CHX tem sido o antisséptico consolidado e largamente utilizado para este fim (99, 100). Desde a sua descoberta por cientistas que buscavam um agente antimalária na década de 40, apenas começou a ser utilizado na área médica em 1954, como antisséptico de largo espectro, e seu uso consolidado na odontologia no ano de 1976 (119).

Bisbiguanida catiônica, de base forte, a CHX apresenta-se como um antisséptico oral, de amplo espectro, ação antimicrobiana e inibidor da formação de biofilme dentário, sendo considerado o padrão-ouro na sua geração dos antissépticos locais (81). Possui efetividade como agente bacteriostático, estimulando a liberação de substâncias de baixo peso molecular, e bactericida, causando a coagulação do conteúdo citoplasmático (99, 100).

Também pode apresentar ação inespecífica, afetando igualmente células sadias do hospedeiro. Além de acometer diretamente a atividade dos macrófagos, afeta a membrana plasmática eucariótica por ligação eletrostática não específica às porções negativas dos componentes de proteína e fosfolípido, suscitando na alteração da estrutura da membrana celular e no consequente desequilíbrio osmótico da célula (120). Além disso, também pode ser observada consequente liberação de citocinas, radicais inorgânicos reativos, intermediários reativos de oxigênio, intermediários reativos de nitrogênio, além de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o NO, importantes na sinalização celular. Essas substâncias agem como moléculas efetoras para a resposta microbicida e citotóxica dos macrófagos (120, 121). Evidências demonstram que a CHX, utilizada em uma concentração 100 vezes inferior à utilizada clinicamente, se mostrou tóxica para os macrófagos *in vitro* (122).

Nesse sentido, admite-se que a molécula catiônica da CHX seja rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, alterando as estruturas da superfície e, com isso, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas através de ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio (123).

A substantividade da CHX consiste na sua capacidade de permanecer aderida à superfície dentária por aproximadamente 12 h, e refere-se a capacidade de ligação aos grupos carboxílicos da mucina presente na saliva, sendo constantemente liberada (41). Apresenta assim, capacidade bactericida inicial logo após o uso em combinação com a ação bacteriostática prolongada (124).

Mesmo apresentando diversos benefícios, associam-se à CHX importantes efeitos adversos sobre a sua utilização, especialmente relacionados ao uso prolongado (116, 118, 125). Em raras ocorrências, também é possível observar ulceração na mucosa, tumefações reversíveis em lábios e glândulas parótidas, urticária, lesões descamativas e choque anafilático (117, 126, 127).

Por exemplo, as alterações que promovem a mudança de cor do elemento dentário justificam-se pela capacidade da CHX em desnaturar proteínas, formar

sulfito férrico e estanhoso e ainda à associação de corantes da dieta que reagem com a CHX, formando elementos corados (128).

O digluconato de CHX representa um antisséptico versátil no que diz respeito a sua utilização, principalmente nas áreas de cirurgia, endodontia, prótese e periodontia. O controle da infecção cruzada e da biossegurança torna-se imprescindível na conduta da prática clínica odontológica. A CHX deve ser usada como complementar aos procedimentos cirúrgicos e laboratoriais, de maneira que possa ser uma alternativa na prevenção da colonização do biofilme bucal, no que se refere ao tratamento de infecções bucais e também na redução de microrganismos contidos no biofilme e em aerossóis nos tratamentos periodontais (123, 129).

Nos procedimentos cirúrgicos e periodontia, a utilização da CHX tem o propósito de diminuir a bacteremia local, inibir o crescimento bacteriano pós-cirúrgico e minimizar complicações pós-operatórias (130, 131). Na confecção das próteses dentárias, o grande viés consiste nas infecções cruzadas de bactérias incorporadas aos hidrocolóides irreversíveis, sendo indicada a utilização da CHX para redução do biofilme e manutenção da condição de saúde da mucosa oral (132, 133). Também possui indicações para a utilização na endodontia, como medicação intracanal ou para irrigação química do sistema de canais radiculares como antimicrobiano de largo espectro (134, 135).

2.5.1 Clorexidina e sua Utilização nas Doenças Periodontais

Em referência à remoção e controle do biofilme bacteriano, a terapia de primeira escolha para o tratamento periodontal dá-se pela instrumentação mecânica por meio da raspagem e alisamento radicular (RAR). No entanto, o alcance do instrumento utilizado para a RAR em bolsas periodontais profundas ou áreas com defeitos de furca se torna prejudicado onde a remoção completa de depósitos de cálculos e biofilme encontra-se dificultada (136).

Muitas vezes o alcance do sucesso na terapia mecânica periodontal ou terapia ativa pode não ser visto em uma única sessão e sessões de reinstrumentação, procedimentos cirúrgicos, associações de terapias coadjuvantes como o controle químico da formação do biofilme dentário podem ser necessários.

Além disso, a CHX pode ser utilizada antes de procedimentos cirúrgicos periodontais e após essas intervenções para prevenção de bacteremia pós-cirúrgica em pacientes que apresentam dificuldade de higienização. No entanto, concentrações de 0,12% podem ser utilizadas para tratamento de uso diário por tempo determinado (110).

Mediante o exposto, as evidências demonstraram que os enxaguatórios bucais apresentam-se como uma opção adjuvante para a RAR na terapia mecânica e também como complementares à remoção de microrganismos da DP em língua, mucosa jugal, tonsilas e epitélio oral (137, 138) (139). No entanto, sabe-se que a eficácia do tratamento periodontal está bem estabelecida com relação ao controle da inflamação e cicatrização dos tecidos periodontais por meio do restabelecimento da homeostasia e recolonização de bactérias comensais, contudo, terapias para o controle da perda óssea ainda não são elucidativas para os períodos episódicos de destruição tecidual da DP (140).

2.6 PNEUMONIA NOSOCOMIAL E AS DOENÇAS PERIODONTAIS

Sabe-se que pacientes internados em UTI, sujeitos à baixa imunidade, podem apresentar infecções do trato respiratório baixo, na maioria das vezes causadas por pneumonia nosocomial, responsável por até 50% das mortes em ambiente de UTI, e por isso um problema mundial de saúde pública (141-143). A pneumonia associada à ventilação, um subtipo da pneumonia nosocomial, define-se como uma infecção do trato respiratório inferior, diagnosticada 48 h após a instalação do tubo orotraqueal (144, 145). A este respeito, entende-se que a fisiopatologia da pneumonia nosocomial se inicia com a migração das bactérias orais para o trato respiratório inferior. Neste sentido, o controle com enxaguatórios bucais, tais como a CHX, apresenta-se como medida preventiva às infecções desta região (74).

Do mesmo modo, a remoção e o controle do biofilme bacteriano bucal da cavidade oral e dos equipamentos de suporte respiratório auxiliam no controle de infecções por pneumonia nosocomial em ambientes hospitalares (146). Diante da exigência de um ambiente de bacteremia controlado em UTI's, e, portanto, do controle de microrganismos bucais que colonizam o biofilme e que concomitantemente podem ser aspirados, a utilização de antissépticos como

auxiliares à higiene bucal faz-se necessário para o controle químico do biofilme (129).

Embora alguns estudos tenham demonstrado não haver diferença do controle químico sobre o mecânico, a remoção química pode ser realizada como adjuvante na remoção do biofilme aderido às superfícies dos equipamentos de suporte respiratório, a fim de reduzir o tempo de ventilação mecânica e a incidência de pneumonia nosocomial, com conseqüente redução do tempo de internação em UTI (97, 147).

Nesta perspectiva, a CHX estabelece-se como o antisséptico que oferece maior eficácia na atualidade, por apresentar maior ação bactericida e retenção da substância ativa (substantividade) por até 12 h na superfície dentária (124), sendo o tratamento de eleição para o controle do biofilme bucal. Ainda que estipulado como padrão ouro no que concerne aos enxaguatórios bucais, a CHX deve ser utilizada com cautela por apresentar efeitos colaterais quando em uso prolongado, como desconforto e reações adversas aos componentes da fórmula (117).

Neste contexto, há consenso em que a relação entre DPs e doenças e condições sistêmicas, demonstra a relação positiva entre o controle satisfatório da higiene oral e a prevenção dos casos de pneumonia nosocomial (148). Adicionalmente, intervenções para a remoção do biofilme bucal, incluindo cuidados profissionais e aplicação de antissépticos tópicos ou antimicrobianos reduziram em até 83% a incidência de pneumonia nosocomial em pacientes hospitalizados (149, 150).

Nesta mesma perspectiva, evidências demonstraram que o uso da CHX a 2% reduziu substancialmente o risco para a pneumonia associada à ventilação orotraqueal ao passo que concentrações inferiores não foram significativas para a prevenção de qualquer tipo de pneumonia (110).

2.7 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam-se como biomoléculas de baixo peso e integrantes do sistema de defesa do hospedeiro com extensa capacidade imunomodulatória e inibitória contra bactérias, vírus e fungos (118).

A utilização de PAMs pode contribuir de forma significativa para a ampliação das possibilidades do tratamento das doenças periodontais. Suas propriedades e mecanismos de ação promovem uma relação reduzida no estabelecimento de resistência bacteriana, visto que atuam mediante mecanismos de destruição da membrana celular, agindo principalmente sobre estruturas lipídicas (17). Podem ser encontrados mais de 1000 tipos de peptídeos que ocorrem como produto da resposta imunológica inata do organismo e classificam-se em α hélice, folha- β e estendidos (151).

Na cavidade oral, identifica-se pelo menos 45 peptídeos antimicrobianos (Tabela 2), incluindo na saliva e fluido gengival, agrupados nas três classificações: histatinas, defensinas e catelecidinas (152). Parte desses peptídeos está presente na saliva, fluido crevicular, mucosa e glândulas. Estes também podem ser reforçados pelas ações inflamatórias da mucosa, tornando-se uma eficiente rede de defesa do hospedeiro quando sensibilizados por estímulos bacterianos (153). Estes estímulos iniciais acontecem quando a carga positiva do peptídeo interage com a carga negativa da parede bacteriana (154). Neste sentido, os peptídeos catiônicos adsorvem através de forças eletrostáticas na membrana celular bacteriana carregada negativamente, levando a sua agregação à bicamada lipídica e, conseqüentemente, à formação de canais iônicos, poros, vazamentos e rupturas nas membranas (155).

Tabela 2 – Relação de alguns dos principais peptídeos encontrados na cavidade bucal

Peptídeo	Local encontrado	Função	Referência
Defensinas α e β (hBD1, hBD2, hBD3, hBD4)	Saliva: granulócitos de neutrófilos, fluido crevicular gengival e células da mucosa.	Atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e imunomoduladora. Indução de citocinas e quimiocinas para células T e dendríticas imaturas e células de memória.	(153, 154, 156)
Histatinas (1 a 12)	Saliva: secretadas pelas glândulas parótida, sublingual e submandibular.	Atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e imunomoduladora.	(153, 154, 157-159)
Lactoferrina	Saliva: granulócitos de neutrófilos e células epiteliais mucosas.	Atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, imunomoduladora e anticancerígena. Sequestra o ferro dos microrganismos, fundamental para o crescimento bacteriano. Inibe a adesão epitelial bacteriana através da ligação às adesinas bacterianas fimbriais.	(153, 154, 160)
Catelecidinas (LL-37)	Neutrófilos e fluido crevicular.	Atividades antibacteriana, ativador e modulador imunológico. Ruptura da membrana bacteriana, neutralização de LPS bacteriano. Exerce papel na re-epitelização de feridas e úlceras.	(153-155, 161, 162)
Inibidor secretor de protease de leucócitos (ISPL)	Saliva: queratinócitos da mucosa oral e granulócitos de neutrófilos.	Atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral. Ruptura da membrana bacteriana.	(153, 154, 163-165)
Adrenomedulina	Saliva e fluido crevicular.	Atividades antibacteriana. Ruptura da membrana bacteriana. Formação anormal de septo durante a divisão celular, inibindo o crescimento bacteriano. Clivagem proteolítica.	(153, 166-168)

A LL-37 consiste na principal representante das catelecidinas humanas, com a capacidade de neutralização do LPS. Isto ocorre quando o peptídeo adota uma formação α -helicoidal anfipática orientada paralelamente à membrana, após o contato inicial com a bactéria, com o lado catiônico da hélice ligado eletrostaticamente aos grupos de cabeça negativamente carregados de fosfolipídios

(169, 170). Estudo também aponta para o seu envolvimento no processo de reabsorção óssea *in vitro*, evidenciado através da inibição da formação de células multinucleares e mononucleares positivas para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAcP), biomarcador do metabolismo ósseo, inibindo a diferenciação de monócitos em osteoclastos, células ósseas responsáveis pela reabsorção (171).

Em virtude do importante efeito dos PAMs neste contexto, a hipótese de sua utilização pode contribuir de forma significativa para a ampliação das possibilidades com relação ao tratamento das doenças periodontais. No entanto, até o presente estudo, nenhuma patente contendo PAMs para esta finalidade foi encontrada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial Brasileiro (INPI) ou no Banco de Patentes Americano, *United States Patent and Trademark Office* (USPTO). Apesar dos avanços realizados no desenvolvimento dos medicamentos utilizados para a tentativa de tratamento da DP, observou-se pouco progresso na elaboração de novos fármacos e testes *in vitro* demonstram efeitos colaterais (172).

As propriedades e mecanismos de ação dos PAMs promovem uma relação reduzida no estabelecimento de resistência bacteriana, visto que atuam mediante mecanismos de destruição da membrana celular, agindo principalmente sobre estruturas lipídicas (17). Os mecanismos de ação dos PAMs descritos compreendem a participação dessas moléculas na resposta imunológica inata e adquirida (ação imunomodulatória, como a modulação das citocinas inflamatórias e quimiocinas, tais como atividades de: macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, apoptose, quimiotaxia de células inflamatórias com proliferação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos B, como também a ativação e diferenciação de células dendríticas (60). Com relação a sua atividade antimicrobiana, sabe-se que estes podem atuar no rompimento da membrana celular de várias formas, como: ação de carpete, poro toroidal, poro barril e detergente (173). Os peptídeos também limitam o desenvolvimento de resistência, através da mudança de carga e espessura bacteriana (174). Ademais, alguns peptídeos também podem se translocar para o centro através da membrana bacteriana por meio do mecanismo de liberação de fibras extracelulares de DNA, reagindo com elementos intracelulares e efetuando a inibição da síntese de DNA/RNA e de proteínas (175, 176). Paralelamente, outros peptídeos induzem apoptose através do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e disfunção mitocondrial (177).

Neste sentido, os PAMs já foram anteriormente testados em busca de um efeito sinérgico (178, 179). O sinergismo pode ser testado através da formulação da combinação de diferentes substâncias, no intuito de potencializar a ação das mesmas, com diminuição das respectivas concentrações. Além do sinergismo, podem ser interpretados resultados aditivos, indiferentes e até antagônicos, de acordo com os dados avaliados em cada experimento (180). O peptídeo LL-37 demonstrou sinergismo com os antibióticos tigeciclina, meropenem, moxifloxacina e piperacilina em associação com tazobactam (178). A combinação de tratamentos apresenta potencial na redução de cepas resistentes, redução da concentração efetiva dos fármacos e seus efeitos colaterais (181, 182). Em adição, o contexto da administração medicamentosa deve ser estudado, de forma a direcionar a atividade dos agentes antimicrobianos a cepas especificamente sensíveis (182). Em vista disto, os peptídeos antimicrobianos, em especial a *synoeca*-MP, surgem como potenciais antimicrobianos frente ao surgimento de novas cepas bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais. Por esta razão, e por seu potencial antimicrobiano anteriormente avaliado, foi eleito como o peptídeo de escolha para os nossos estudos.

2.7.1 *Synoeca*-MP (SYN)

A necessidade de defesa dos artrópodes propiciou o desenvolvimento das glândulas de peçonha, item que possui em sua composição uma variedade de compostos, incluindo aminoácidos, neurotoxinas, peptídeos e enzimas (183, 184). Estudos previamente realizados foram capazes de isolar, a partir da peçonha de vespas, diversos peptídeos bioativos, os quais vêm sendo classificados por meio de suas estruturas químicas e atividades biológicas, em especial, as ações antimicrobianas (185, 186). A peçonha de vespas apresenta uma variedade de peptídeos de baixo peso molecular e proteínas com ações diversas, apresentando potencial contra bactérias resistentes a antibióticos convencionais (172, 187). A efetividade se deve principalmente por apresentarem ampla ação antimicrobiana, além de grau variável de indução de hemólise em um dos peptídeos testado, *Polybia*-CP, com 78% de produção de hemolisina em uma concentração de 10^{-4} M (188).

Originário da família dos mastoparanos, a SYN apresenta mecanismos de ação que pode envolver a desestabilização da membrana através da lise ou interação com a proteína G, ocasionando prejuízo à sinalização celular e causando a morte por necrose ou apoptose das células tumorais (189). Outro peptídeo da mesma classe, o mastoparano-1, também apresentou atividade bactericida ao minimizar a resposta imunológica dos macrófagos através da neutralização dos lipopolissacarídeos das membranas de bactérias (190). Derivado da peçonha da vespa *Synoeca surinama*, um PAM que exibe bioatividade ligada à sua estrutura química e biológica, apresentando ação contra cepas Gram-positivas e negativas (191). Este peptídeo, oriundo do Campus da Universidade de Brasília (UnB), possui 14 resíduos de aminoácidos e demonstrou efetividade principalmente em bactérias resistentes à antibioticoterapia, como *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*, entre outras, com concentração inibitória mínima (MIC) de 1,24 μM a 17,8 μM (191). Tal peptídeo apresenta resíduos básicos e hidrofóbicos que influenciam a viabilidade celular através da permeabilidade mitocondrial por meio de sua estrutura em hélice, capaz de formar poros em membranas. Da mesma forma, os mastoparanos podem contribuir para a liberação de histaminas por mastócitos, serotoninas de plaquetas, catecolaminas de células de cromafinas e prolactina da glândula pituitária anterior (192).

Outro estudo testou com dados prévios, ainda não publicados, a atividade antimicrobiana da SYN contra as bactérias *C. albicans* (ATCC 10231), *E. faecalis* (ATCC 19433) e *S. aureus* (ATCC 25923), apresentando MIC's de 32, 8 e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O mesmo demonstrou citotoxicidade a partir de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, além de não interferência na produção de NO por células RAW 264.7. A SYN também apresentou índice terapêutico, risco baseado na razão entre dose efetiva e dose letal, acima do sêxtuplo da sua dosagem efetiva (IT 5,8) (193). Portanto, por se tratar de um peptídeo de cadeia curta, com 14 resíduos de aminoácidos, e por apresentar efetividade significativa em sua atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade em estudos prévios, a SYN foi eleita o peptídeo de escolha para este estudo. Ainda que existam poucos trabalhos na literatura a seu respeito, até o presente momento nenhum destes relacionou a SYN à *Pseudomonas aeruginosa*, no contexto periodontal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade antimicrobiana, citotóxica e imunomodulatória do peptídeo SYN e da CHX isolados e em sinergismo contra a bactéria *P. aeruginosa*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) do peptídeo SYN, da CHX e da gentamicina contra a bactéria *P. aeruginosa*.
- Avaliar a inibição do biofilme e bactérias planctônicas de *P. aeruginosa*, em diferentes concentrações do peptídeo SYN e da CHX.
- Avaliar a concentração inibitória mínima da combinação do peptídeo SYN e da CHX contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.
- Avaliar a viabilidade celular em linhagens de macrófagos (RAW 264.7), utilizando as concentrações inibitórias mínimas dos peptídeos e da CHX e das menores concentrações sinérgicas do peptídeo SYN com a CHX.
- Avaliar a produção da quimiocina MCP-1 em linhagens de macrófagos (RAW 264.7) utilizando as concentrações inibitórias mínimas do peptídeo e da CHX isolados e das menores concentrações sinérgicas do peptídeo SYN com a CHX.
- Avaliar a produção do fator estimulador de macrófagos GM-CSF em linhagens de macrófagos (RAW 264.7) utilizando as concentrações inibitórias mínimas do peptídeo e da CHX isolados e das menores concentrações sinérgicas do peptídeo SYN com a CHX.
- Avaliar a produção dos mediadores inflamatórios IL-1 α , TNF- α e NO, em linhagens de macrófagos (RAW 264.7) utilizando as concentrações inibitórias mínimas do peptídeo e da CHX isolados e das menores concentrações sinérgicas do peptídeo SYN com a CHX.

- Avaliar a produção do mediador anti-inflamatório IL-10 em linhagens de macrófagos (RAW 264.7) utilizando as concentrações inibitórias mínimas dos peptídeos e da CHX isolados e das menores concentrações sinérgicas do peptídeo SYN com a CHX.

4 MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho consistiu em um estudo experimental *in vitro* do potencial do peptídeo antimicrobiano (PAM) SYN frente à *Pseudomonas aeruginosa* no contexto de infecção e comprometimento da resposta imunológica. Os peptídeos foram avaliados quanto à capacidade imunomodulatória, antimicrobiana e antibiofilme em associação com a CHX, no intuito de reduzir as concentrações necessárias de uso da CHX para a inibição do crescimento microbiano, de maneira a minimizar os efeitos colaterais ocasionados pelo seu uso frequente.

4.2 OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO SYNOECA-MP

Os peptídeos utilizados foram a SYN, utilizado em ensaios antimicrobianos, citotóxicos e imunomodulatórios e a LL-37, usado como controle para a comparação do peptídeo SYN nos ensaios antimicrobianos (Tabela 3). Estes peptídeos foram sintetizados pela técnica FMoc, purificados (>95%), liofilizados e armazenados pela AminoTech (SP). Para confirmar a massa molecular e a pureza, foi utilizada espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization at Time of Flight* (MALDI-ToF). Para a utilização dos peptídeos nos experimentos, os mesmos foram pesados e o peso ajustado conforme seu grau de pureza (194). Para realização dos experimentos, os peptídeos foram diluídos em água ultrapura autoclavada e armazenados em uma temperatura de - 20°C até o seu uso.

Tabela 3 – Massa molecular e sequência dos peptídeos synoeca-MP (SYN) e LL-37 (LL)

Peptídeo	Sequência	Massa molecular (Da)	Referência
synoeca-MP	INWLKLGKKIIASL-HN2	1594.8	(191)
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFRLNLVPRTE	4493.33	(195)

4.3 OBTENÇÃO DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA E GENTAMICINA

A clorexidina (digluconato de clorexidina 20%) foi manipulada na concentração de 20% (Via Magistral, Brasília, DF, Brasil). O veículo utilizado para a diluição foi a água destilada estéril. A gentamicina (utilizada para controle laboratorial nos ensaios antimicrobianos) foi obtida do laboratório Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), sendo esta diluída em água destilada estéril na concentração de 10 mg.mL⁻¹ (196).

4.4 MICRORGANISMOS E PREPARO DOS ANTÍGENOS MICROBIANOS MORTOS PELO CALOR

Durante os ensaios antimicrobianos foram utilizados o microrganismo *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Para os ensaios de resposta imunológica as culturas foram estimuladas com antígenos de *P. aeruginosa* mortos pelo calor (*HK-P. aeruginosa*). Os antígenos foram preparados a partir da *P. aeruginosa*, mesmo microrganismo utilizado nos ensaios antimicrobianos. A preparação envolveu a coleta de colônias recém repicadas que foram ressuspensas em tampão PBS (separadamente) e quantificadas por contagem em câmara de Neubauer (densidade 1x10⁴ UFC.mL⁻¹), por D.O. Posteriormente, estes foram aquecidos a 120 °C, durante 50 min e armazenados a - 20 °C (197). A morte destes microrganismos foi confirmada a partir de inoculação de uma alíquota de cada, em meio líquido e incubação por mais de 24 h. Os antígenos foram testados em concentrações de (10⁵ a 10⁸ UFCs) previamente à execução dos ensaios de citotoxicidade e imunomodulação. Este teste verificou a concentração de antígenos suficiente para

estimular a linhagem de macrófagos RAW 264.7 por meio da produção de nitrito. Em adição, também foi avaliada a viabilidade celular na presença dessas diferentes concentrações de antígenos. Nesta situação, os antígenos foram capazes de estimular a resposta das culturas na concentração de 1×10^6 UFC por poço.

4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO SYNOECA-MP E DA CLOREXIDINA

A concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) do peptídeo SYN, da CHX e da combinação da SYN com a CHX foram determinadas através do método de microdiluição e macrodiluição em caldo, de acordo com a M7-A6 do *National Comitee for clinical Laboratory Standards* (198). Os ensaios *in vitro* foram realizados contra a bactéria *P. aeruginosa*. Os experimentos foram desenvolvidos com base no protocolo realizado de acordo com a concentração bacteriana previamente determinada (194). As cepas bacterianas foram plaqueadas em meio Mueller Hinton Ágar (MHA, Sigma aldrich, EUA) a 37 °C, por 18 h a 24 h. Foram selecionadas 3 colônias bacterianas (réplica biológica) e inoculadas em 5mL de MH *broth* (MHB) sob agitação (200 rpm) a 37°, por 12 h. As leituras da D. O. foram realizadas a cada 30 minutos até se alcançar a absorbância de 0,3 a 600 nm. Nesta absorbância, foi considerada uma concentração de $5,02 \times 10^{11}$ UFC.mL⁻¹ para *P. aeruginosa*. Seguindo este modelo, os pré-inóculos em fase logarítmica foram diluídos em uma concentração de $2-5 \times 10^6$ UFCs.mL⁻¹, sendo esta concentração já calculada para o volume total a ser utilizado nas microplacas de 96 poços. Os intervalos das concentrações testadas foram de 0,625 a 32 µg.mL⁻¹ para a SYN e as interações de CHX e SYN nas concentrações de 4 até 0,125 µg.mL⁻¹ e 8 até 0,25 µg.mL⁻¹, respectivamente. Foram utilizados também três controles neste bioensaio: A) bactéria e meio de cultura (100% de crescimento bacteriano), B) bactéria com gentamicina a 10 µg.mL⁻¹ para *P. aeruginosa* e meio MHB (100% de inibição do crescimento bacteriano) e C) meio de cultura sem amostras e sem bactéria (branco). Os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas em placas de 96 poços (TPP, EUA). Após, as placas foram incubadas a 37°C em uma agitação média em leitor de microplacas (Bio-Tek Power Wave HT, EUA) de 200 rpm, com leitura a cada 30 minutos, a 600 nm, durante 18

horas. Para o MBC, foram plaqueados 10 μL de todas as concentrações das amostras testadas e inoculadas por microgota 10 μL em meio *Mueller-Hinton* ágar (MHA) para a confirmação da atividade bactericida ou bacteriostática. Tanto o MIC, quanto MBC foram analisados a partir da observação ou não do crescimento bacteriano.

4.6 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE BIOFILME

A avaliação das bactérias planctônicas e do biofilme foi baseada nas concentrações inibitórias mínimas, com o acréscimo de concentrações até duas vezes acima do valor encontrado no MIC do peptídeo SYN ($32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (199), ou seja, concentrações entre 128 a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Essas mesmas concentrações também foram utilizadas para os controles gentamicina e CHX. As cepas bacterianas foram plaqueadas em meio Mueller Hinton Ágar (MHA, Sigma aldrich, EUA) a 37°C , por 18 h a 24 h. Inicialmente, foi selecionada 1 colônia bacteriana isolada e inoculada em 3 mL de MH *broth* (MHB) (HiMedia, Pennsylvania, EUA), sob agitação (200 rpm) a 37° por uma noite. O inóculo foi diluído em meio mínimo BM2 [fosfato de potássio 62 mM (VETEC, Duque de Caxias-RJ, Brasil), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 mM (VETEC, Duque de Caxias-RJ, Brasil), MgSO_4 2 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), FeSO_4 10 μM (VETEC, Duque de Caxias-RJ, Brasil) e glicose 0,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)] (199) de modo que a concentração final alcançada fosse de 1/100 por poço. Os controles utilizados foram a gentamicina (198), a bactéria (1/100) como controle positivo e meio BM2 para controle negativo. O presente ensaio foi realizado em triplicata técnica e biológica. Após 24 h de incubação a 37°C em estufa foi realizada a leitura das bactérias planctônicas em leitor de microplaca (Bio-Tek Power Wave HT, EUA). Em seguida, o meio contendo bactérias planctônicas foi descartado e as placas foram lavadas com água destilada, por duas vezes. O sobrenadante foi removido e o excesso de água retirado vertendo vigorosamente as placas sobre papel absorvente. Adicionou-se 100 μL de cristal violeta 0,1% (VETEC, Duque de Caxias-RJ, Brasil) diluído em oxalato de amônia P.A. (Dinâmica, Diadema-SP, Brasil) em álcool 60% em cada poço e foram aguardados 20 minutos até o descarte do mesmo. Lavou-se novamente por duas vezes em água destilada com remoção do excesso de água. Após, foi adicionado álcool 60%, e as placas foram agitadas

imediatamente por 20 segundos em leitor de microplacas e realizada a leitura em a 595 nm. Os resultados das bactérias planctônicas e do biofilme foram avaliados quanto ao crescimento ou inibição bacteriana.

4.7 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO SINÉRGICA DO PEPTÍDEO SYNOECA-MP E DA CLOREXIDINA

A concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) do peptídeo SYN e da CHX foram individualmente testados contra a *P. aeruginosa*, sendo avaliadas as interações de todas as concentrações, à partir dos MIC's, utilizando o método do tabuleiro de xadrez, com adaptações (180). A associação entre peptídeo e CHX foi realizada em diferentes concentrações. O ensaio de susceptibilidade foi desenvolvido pelo método de microdiluição, de acordo com as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2003) (198). As diluições do peptídeo utilizadas nestes experimentos foram baseadas nos valores de MIC do peptídeo e da CHX, isoladamente. Inicialmente foram preparadas diluições do peptídeo nas concentrações do MIC encontrado, para cada agente antimicrobiano, em água Milli-Q autoclavada. Posteriormente, 10 µL de cada concentração da série de diluição do peptídeo foi combinado com 10 µL de cada concentração de uma série de diluição da CHX. Em cada poço da microplaca foi adicionado 80 µL da suspensão bacteriana ($5,02 \times 10^{11}$ UFC.mL⁻¹) de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e em sua fase logarítmica de 0,3 nm (100). O crescimento bacteriano foi observado após a incubação por 18 h, a 37 °C, sob agitação média em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT - EUA), com leituras a cada 30 min, a 600 nm (99, 200). A partir dos valores das médias das absorbâncias, o índice da concentração inibitória fracional (ICIF) foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{ICIF} = \frac{\text{MIC (1 em combinação com 2)}}{\text{MIC de 1} + \text{MIC (2 em combinação com 1)}} \times \text{MIC de 2}.$$

O ICIF foi interpretado da seguinte forma:

- ICIF $\leq 0,5$: ação sinérgica;
- ICIF $> 0,5$ e $< 1,0$: ação aditiva;
- ICIF $> 1,0$ e ≤ 4 : indiferente;
- ICIF ≥ 4 : ação antagônica.

4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA SYNOECA-MP, CLOREXIDINA E DA INTERAÇÃO SINÉRGICA DO PEPTÍDEO SYNOECA-MP COM A CLOREXIDINA

4.8.1 Cultura Celular e Grupos Experimentais

As culturas celulares utilizadas são monócitos precursores de osteoclastos, advindos de tumores induzidos em camundongos machos BALB/c e infectados com o vírus da leucemia murina de Abelson (201). A célula em questão, utilizada em todos os experimentos, trata-se da RAW 264.7, obtida no Banco de células do Rio de Janeiro (CR 108). Essa linhagem foi utilizada para a construção do modelo simplificado *in vitro* de infecção hospitalar com o intuito de representar uma célula do sistema imunológico inato. A cultura de células RAW foi cultivada na concentração de 1×10^5 células por poço, em microplacas de cultura de 96 poços (TPP, EUA). As culturas foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, EUA), 0,5% de solução de aminoácidos MEM (Gibco, EUA) e acondicionada em estufa de CO₂ a 5% em temperatura controlada de 37°C e 95% de umidade (202). Os estímulos foram utilizados neste contexto de infecção *in vitro* com o intuito de simular a infecção pelo microrganismo através da presença do antígeno morto pelo calor e perfazendo o papel do recombinante da citocina pró-inflamatória através do IFN- γ (197) (Figura 4).

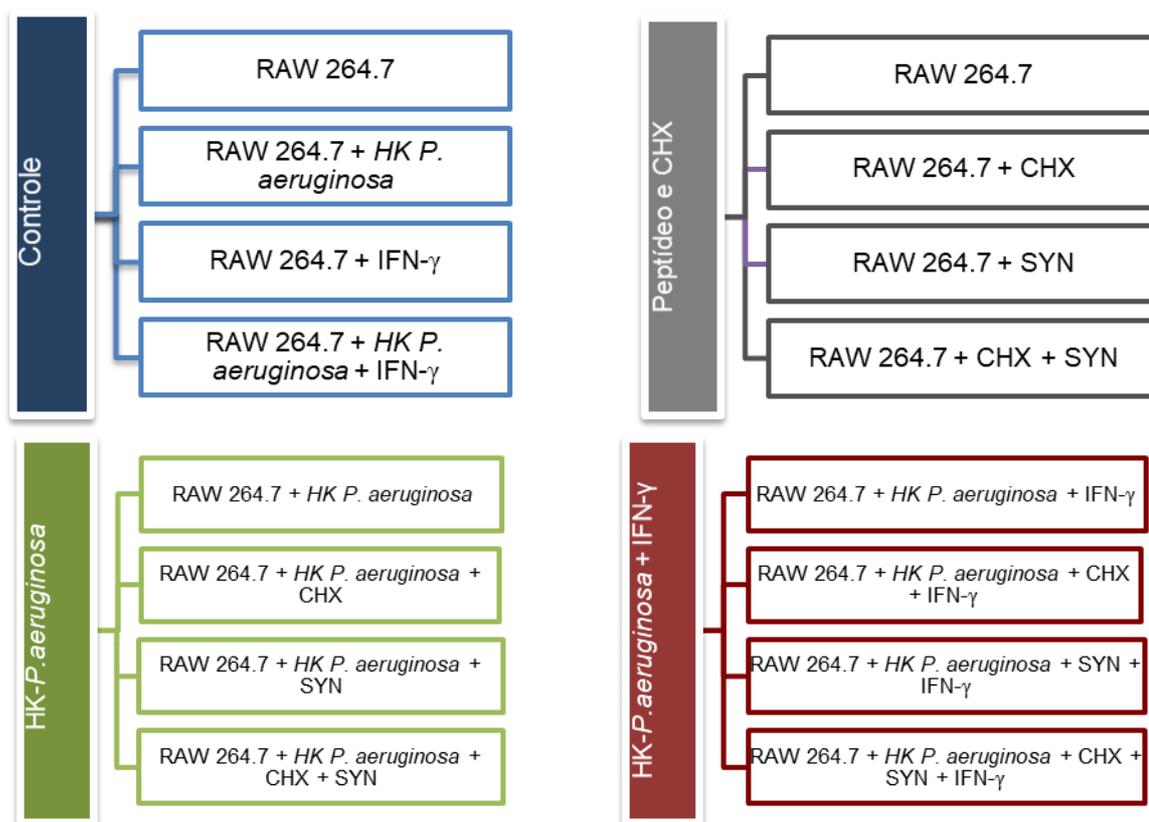


Figura 4. Grupos experimentais *Heat-Killed Pseudomonas aeruginosa* (HK *P. aeruginosa*), synoeca-MP (SYN) e a clorexidina (CHX) com estímulos à célula RAW 264.7.

4.8.2 Avaliação da Citotoxicidade do Peptídeo Synoeca-MP, da Clorexidina e da Associação Sinérgica de Synoeca-MP e Clorexidina

O ensaio de viabilidade celular para a análise citotóxica foi realizado após 6 h, 24 h e 72 h para as células RAW 264.7. As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade (203). Os grupos controles deste experimento foram representados por poços com células e meio de cultura, representando 100% de viabilidade celular; células, meio de cultura e solução de lise (10 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EDTA e 0,1% *triton X-100*) (203), representando 0% de viabilidade celular; e meio de cultura (branco). Ao final dos períodos experimentais, foram utilizados ensaios colorimétricos MTT (*Sigma Chemicals Co., St. Louis, EUA*). O MTT consiste em um método colorimétrico baseado na capacidade das células vivas de reduzirem o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo no produto formazan (204). Após o período de incubação, todo o sobrenadante foi removido e foram

adicionados 100 μL de meio DMEM por poço. Foi acrescentado 10 μL de MTT (estoque a $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e as placas de cultura (TPP, EUA) foram incubadas por 4 h, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 e 95% de umidade. A reação foi bloqueada com 60 μL por poço de dimetilsulfóxido com posterior homogeneização de cada poço para completa solubilização do produto celular. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek *PowerWave* HT, EUA), a 595 nm (204).

4.8.3 Avaliação da Atividade Imunomodulatória do Peptídeo Synoeca-MP, Clorexidina e Sinergismo (Synoeca-MP e Clorexidina)

A resposta imunológica foi avaliada através da produção de mediadores inflamatórios (quimiocinas, citocinas e óxido nítrico). Para estes ensaios, foram utilizados os mesmos grupos experimentais descritos anteriormente no item (4.7.1), nos tempos experimentais de 6 h, 24 h e 72 h através da coleta do sobrenadante das culturas com diferentes estímulos. Através dos sobrenadantes foram realizadas as dosagens do óxido nítrico em células RAW 264.7 das citocinas: IL-1 α , TNF- α , IL-10, da quimiocina MCP-1 e do fator estimulante de colônias de macrófagos GM-CSF.

4.8.3.1 Dosagem de Citocinas

O sobrenadante das culturas de célula RAW 264.7 foram analisados a partir de 6 h, 24 h e 72 h em microplacas de 96 poços e foram avaliadas a quimiocina MCP-1 e as citocinas IL-1 α e TNF- α , em 24 h (3) de cultura e a citocina IL-10 e o fator estimulante das colônias de macrófagos GM-CSF em 72 h de incubação (197, 205). A avaliação da concentração de cada citocina foi realizada através do método de *Enzyme-Liked Immunoabsorbent Assay* (Elisa) utilizando os respectivos Kits (ELISA *development* kit - Peptotech, New Jersey, EUA), seguindo-se as especificações do fabricante, nos sobrenadantes obtidos em diferentes períodos de cultura. Os níveis de citocinas foram expressos em picogramas por mililitro ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$), após comparação com curva padrão proposta pelo kit de ELISA utilizado de acordo com as especificações do fabricante (206).

4.8.3.2 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico foi realizada utilizando os sobrenadantes das culturas contendo concentrações variadas das amostras, em 72 h de incubação. A produção de nitrito foi avaliada através do método de reação de *Griess*, com adaptações (207). Foram transferidos 100 μ L dos sobrenadantes de cultura para placas de 96 poços (TPP, EUA), acrescidos de 100 μ L de DMEM (Gibco, EUA) suplementado nos poços da curva padrão de nitrito de sódio. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de uma solução de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico 2,5% e naftiletilenodiamina 1% em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, foi realizada leitura em leitor de microplacas (*Bio-Tek PowerWave HT*, EUA), a 490 nm. A quantidade de nitrito foi calculada a partir da equação da curva padrão de nitrito de sódio (1,5625 μ M a 200 μ M) (208).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas réplicas técnicas e biológicas para todas as amostras. Os resultados foram calculados através da média e desvio padrão para cada réplica biológica e então, realizado o cálculo da média e erro padrão das médias, como um indicativo de reprodutibilidade das réplicas. Posteriormente, foi realizada a verificação de normalidade das amostras (teste de Kolmogorov Smirnov) e em seguida a estatística paramétrica, através da análise de variância (*one-way ANOVA*), seguido do pós-teste de Bonferroni. O intervalo de segurança utilizado para as análises foi de 95%, com o valor de $p < 0,05$. Nos ensaios de atividade antimicrobiana e sinergismo, os grupos foram comparados aos controles referentes a 100% e 0% de crescimento microbiano. O peptídeo LL-37 foi utilizado como controle para a comparação do peptídeo SYN, por ser conhecidamente descrito na literatura como peptídeo com ação imunomoduladora (195). A análise estatística foi realizada no software GraphPadPrism 7 (La Jolla, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS E DA CLOREXIDINA E DA INTERAÇÃO ENTRE AMBOS

A avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos LL-37 e SYN e da CHX foi realizada em 3 diferentes etapas envolvendo o microrganismo *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Na primeira etapa, realizou-se a determinação do MIC e MBC, demonstrados na Tabela 4. Posteriormente, foram realizados ensaios de inibição da mesma bactéria em estado planctônico (Figura 5) e no biofilme (Figura 6). Em relação aos ensaios para determinação dos valores de MIC e MBC, foi possível observar que a CHX demonstrou-se mais eficaz, em relação aos peptídeos, seguida do peptídeo SYN. Em adição, a LL-37 não foi capaz de inibir o microrganismo até $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 4). Por essa razão, a LL-37 não foi selecionada para os experimentos subsequentes do presente estudo.

Tabela 4 – Determinação do MIC e MBC dos peptídeos LL-37 e synoeca-MP e da clorexidina contra a bactéria *P. aeruginosa in vitro*. O controle positivo gentamicina demonstrou atividade de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MIC) e $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MBC). ND – MIC e MBC não detectados até $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Agente antimicrobiano	MIC	MBC
LL-37	ND	ND
synoeca-MP	$32 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$>128 \mu\text{g.mL}^{-1}$
clorexidina	$16 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$64 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Em relação à análise da atividade antimicrobiana da SYN e da CHX sobre células planctônicas da mesma cepa bacteriana, foi possível observar que a CHX só demonstrou atividade na concentração de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5) ($p < 0,001$). No entanto, a SYN demonstrou inibição em $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5) ($p < 0,001$). É importante salientar que esse ensaio foi baseado na cultura de células planctônicas desprendidas de biofilmes e, portanto, podem motivar a diferença entre os resultados dos ensaios de microdiluição em caldo, anteriormente mencionados.

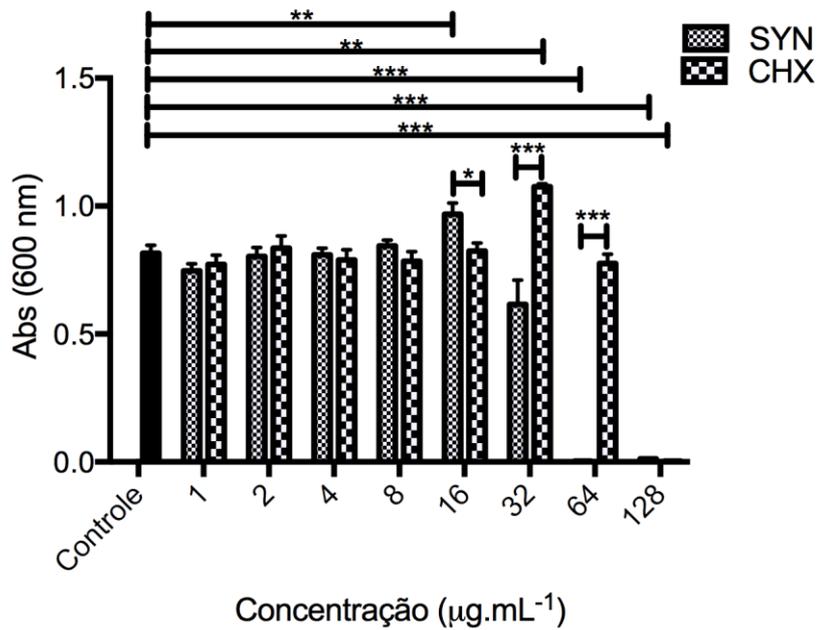


Figura 5. Avaliação da inibição de células planctônicas de *P. aeruginosa*, a partir do peptídeo synoeca-MP e da clorexidina, após 6 h de incubação. O controle positivo gentamicina demonstrou atividade a partir de 1 µg.mL⁻¹. O ensaio foi representado em média e erro padrão da absorbância a 600 nm a partir de triplicata técnica e biológica. *p≤0,05, **p≤0,01 e ***p≤0,001 em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. SYN representa os resultados de synoeca-MP e CHX representa os resultados de clorexidina.

A SYN e a CHX também foram avaliadas quanto à sua capacidade inibitória sobre biofilmes formados por *P. aeruginosa*. Nessa condição, é possível observar que a SYN demonstrou inibição a partir da concentração de 64 µg.mL⁻¹ (Figura 6) (p<0,001). Por outro lado, a CHX só demonstrou atividade inibitória na maior concentração testada, correspondendo a 128 µg.mL⁻¹ (Figura 6) (p<0,001).

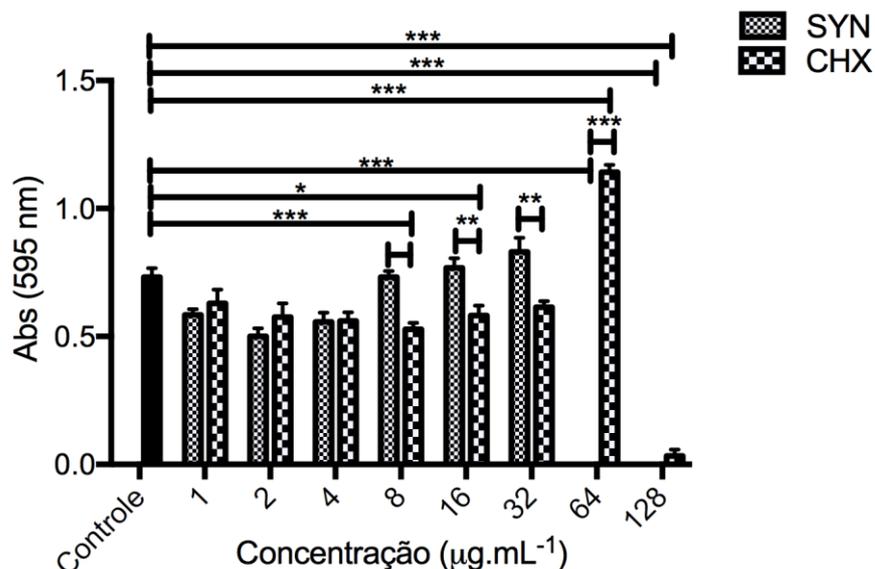


Figura 6. Avaliação da inibição de biofilmes formados por *P. aeruginosa*, a partir do peptídeo synoeca-MP e da clorexidina, após 6 h de incubação. O controle positivo gentamicina demonstrou atividade a partir de 4 µg.mL⁻¹. O ensaio foi representado em média e erro padrão da absorvância a 595 nm a partir de triplicata técnica e biológica. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. SYN representa os resultados de synoeca-MP e CHX representa os resultados de clorexidina.

Dessa forma, de acordo com os dados de atividade antimicrobiana do peptídeo SYN e da CHX, é possível observar o potencial antimicrobiano da SYN. Na intenção de reduzir a concentração efetiva dos agentes testados, optou-se por avaliar possíveis interações entre a SYN e a CHX. De acordo com o ensaio de interação, foi possível observar diversas combinações de concentrações dos agentes testados que determinaram uma interação sinérgica. A tabela 5 demonstra os valores das associações sinérgicas encontradas, além dos valores de concentração inibitória fracional (CIF), do índice da concentração inibitória fracional (ICIF), e do percentual de redução do MIC proporcionado pela interação entre os agentes. Assim, a interação entre SYN e CHX demonstrou-se eficaz, apresentando efeito sinérgico, reduzindo 99% do valor de MIC de ambas, necessitando somente das concentrações de 0,125 e 0,25 µg.mL⁻¹ de CHX e SYN, respectivamente para atividade contra *P. aeruginosa in vitro*. A interação das diferentes concentrações testadas de CHX e SYN também apresentou dez pontos relacionados a ação aditiva entre estes dois compostos.

Tabela 5 – Resultados sinérgicos do ensaio de interação do peptídeo synoeca-MP e da clorexidina, a partir dos respectivos valores de MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra *P. aeruginosa*, após 18 h com leitura em 600 nm. SYN representa os resultados de synoeca-MP, CHX representa os resultados de clorexidina, CIF representa a concentração inibitória fracional e ICIF o índice da concentração inibitória fracional

Associação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIF individual (%/ $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ICIF	Redução do MIC (%)
CHX 4 + SYN 8	0,25/0,25	0,500	75/75
CHX 0,125 + SYN 8	0,007/0,25	0,257	99/75
CHX 0,125 + SYN 4	0,007/0,125	0,132	99/87
CHX 0,125 + SYN 2	0,007/0,062	0,069	99/93
CHX 0,125 + SYN 1	0,007/0,031	0,038	99/96
CHX 0,125 + SYN 0,5	0,007/0,015	0,022	99/98
CHX 0,125 + SYN 0,25	0,007/0,007	0,014	99/99

5.2 ANÁLISES DA PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM CULTURAS DE CÉLULAS RAW 264.7

5.2.1 ESTUDO PILOTO – DEFINIÇÃO DA MENOR CONCENTRAÇÃO DE ANTÍGENO MICROBIANO CAPAZ DE ESTIMULAR AS CULTURAS CELULARES

Após as análises antimicrobianas, o peptídeo SYN e a CHX foram analisados em cultura de macrófagos RAW 264.7, a partir da menor concentração sinérgica encontrada (CHX 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ associada à SYN 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nesta ocasião, foram analisados parâmetros de viabilidade celular, produção de NO e citocinas (MCP-1, IL-1 α , TNF- α e IL-10). Para tanto, as culturas foram estimuladas com antígenos mortos pelo calor de *P. aeruginosa* (HK). Tal modelo pode simular uma situação *in vitro*, no qual os macrófagos são ativados pela presença de IFN- γ e antígeno. Anteriormente à realização dos ensaios em cultura, os antígenos de *P. aeruginosa* foram testados em diversas concentrações, para definição da menor concentração capaz de estimular a produção de nitrito por células RAW (Figura 7B). A viabilidade celular das culturas submetidas às diversas concentrações de antígenos também foi avaliada (Figura 7A).

Dessa forma, foi possível observar que as concentrações testadas de antígenos 10^5 , 10^6 e 10^7 UFC por poço não interferiram na viabilidade celular (Figura 7A). Foi observado também que a concentração de 10^6 UFC por poço estimulou a

produção de nitrito isoladamente e combinado com IFN- γ (Figura 7B) ($p < 0,001$). Esta produção foi ainda maior que a observada na presença de 10^7 e 10^5 UFC por poço do mesmo HK, quando comparados ao grupo de células na ausência de estímulo ($p < 0,01$). Portanto, tal concentração foi eleita para a realização dos experimentos subsequentes, no qual as culturas também serão estimuladas com SYN ou CHX.

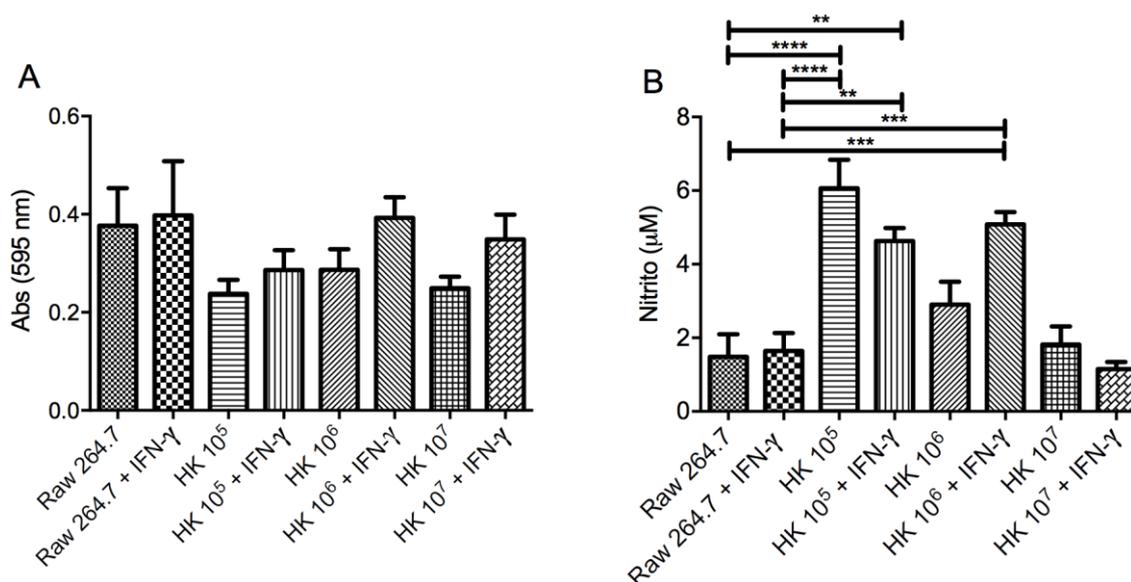


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular e produção de NO por células RAW 264.7 na presença de diferentes concentrações de antígenos HK, após 72 h de incubação. (A) representa a viabilidade celular com os grupos estimulados com antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. As barras representam média e erro padrão da absorbância, a partir de triplicata técnica e biológica. (B) representa a produção de nitrito com os grupos estimulados com antígenos e/ou IFN- γ . As barras representam média e erro padrão da concentração de nitrito, a partir de triplicata técnica e IFN- γ biológica. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni.

5.3 VIABILIDADE CELULAR EM CULTURA DE RAW 264.7

As culturas de células RAW foram analisadas quanto à viabilidade celular nos tempos de 6, 24 e 72 h, na presença de antígenos microbianos, IFN- γ , SYN e CHX. A viabilidade celular foi analisada nos mesmos tempos experimentais referentes às dosagens dos mediadores analisados. Dessa forma, em relação à viabilidade celular analisada em 6 h de cultura (Figura 8), a redução da viabilidade só foi observada no grupo contendo SYN e CHX, em cultura estimulada com antígenos de *P. aeruginosa* ($p < 0,05$), apresentando 57,73% de células vivas (Figura 8C).

Estudos pilotos anteriores do grupo demonstraram a viabilidade celular da

CHX em concentrações maiores, variando de 32 a 0,125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde observou-se que estas concentrações demonstraram ausência de viabilidade celular até a concentração de 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a redução de até 18,61% da viabilidade nas concentrações de 0,125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

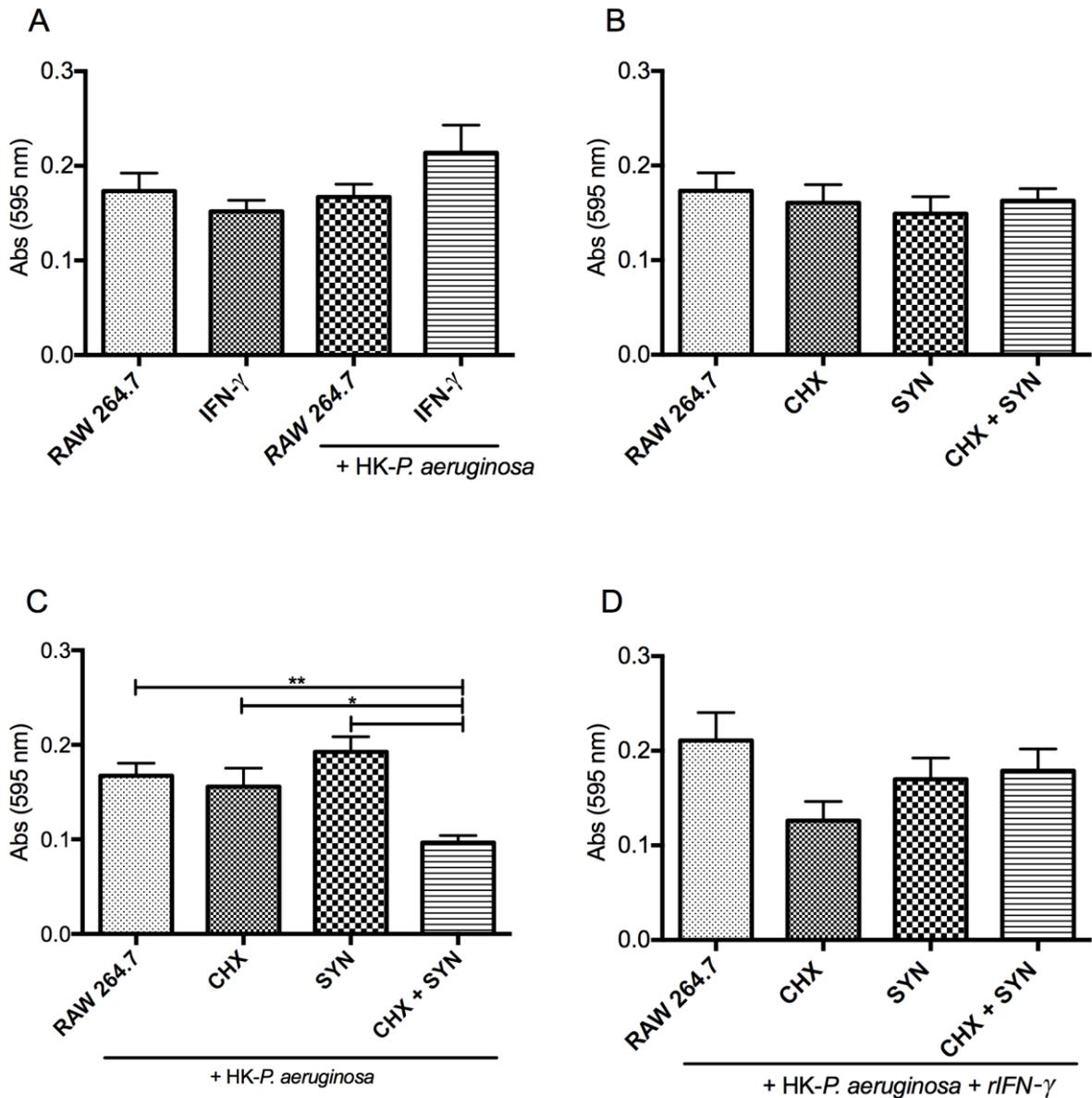


Figura 8. Avaliação da viabilidade em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 6 h de incubação. A viabilidade foi representada em média e erro padrão da absorvância a 595 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ .

Em relação à análise da viabilidade celular no tempo de 24 h de cultura, grupos estimulados com IFN- γ e antígenos (Figura 9A) e grupos estimulados com CHX e SYN, isolados ($p < 0,0001$) e combinados ($p < 0,01$) (Figura 9B), demonstraram redução na viabilidade celular em relação ao controle. Em relação aos grupos estimulados com antígeno e antígeno com IFN- γ , os grupos com CHX isolado e combinado com SYN demonstraram redução na viabilidade celular ($p < 0,0001$), abaixando a viabilidade celular para 55,36%. (Figura 9C e D).

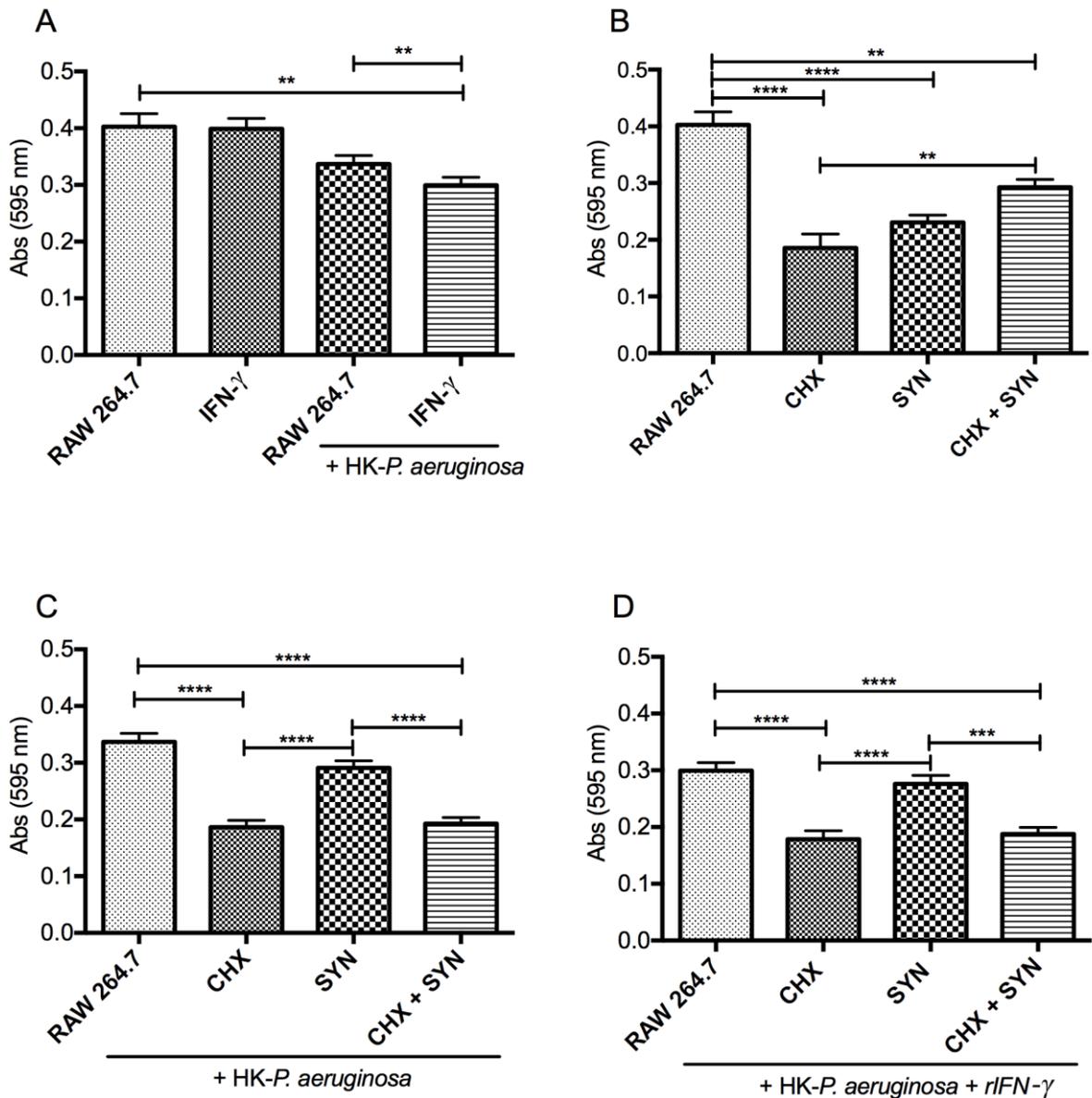


Figura 9. Avaliação da viabilidade em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 24 h de incubação. A viabilidade foi representada em média e erro padrão da absorbância a 595 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (B) representa os grupos contendo peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni.

Por fim, em relação à viabilidade celular analisada em 72 h (Figura 10), os

grupos que apresentaram redução da viabilidade celular foram: os grupos na presença de antígeno com IFN- γ (Figura 10A) ($p < 0,01$) e de antígeno com CHX (Figura 10C) ($p < 0,001$), apresentando 65,40% de células viáveis. No entanto, o grupo estimulado com SYN, na presença de antígeno e IFN- γ demonstrou provável aumento na viabilidade celular (Figura 10D) ($p < 0,0001$).

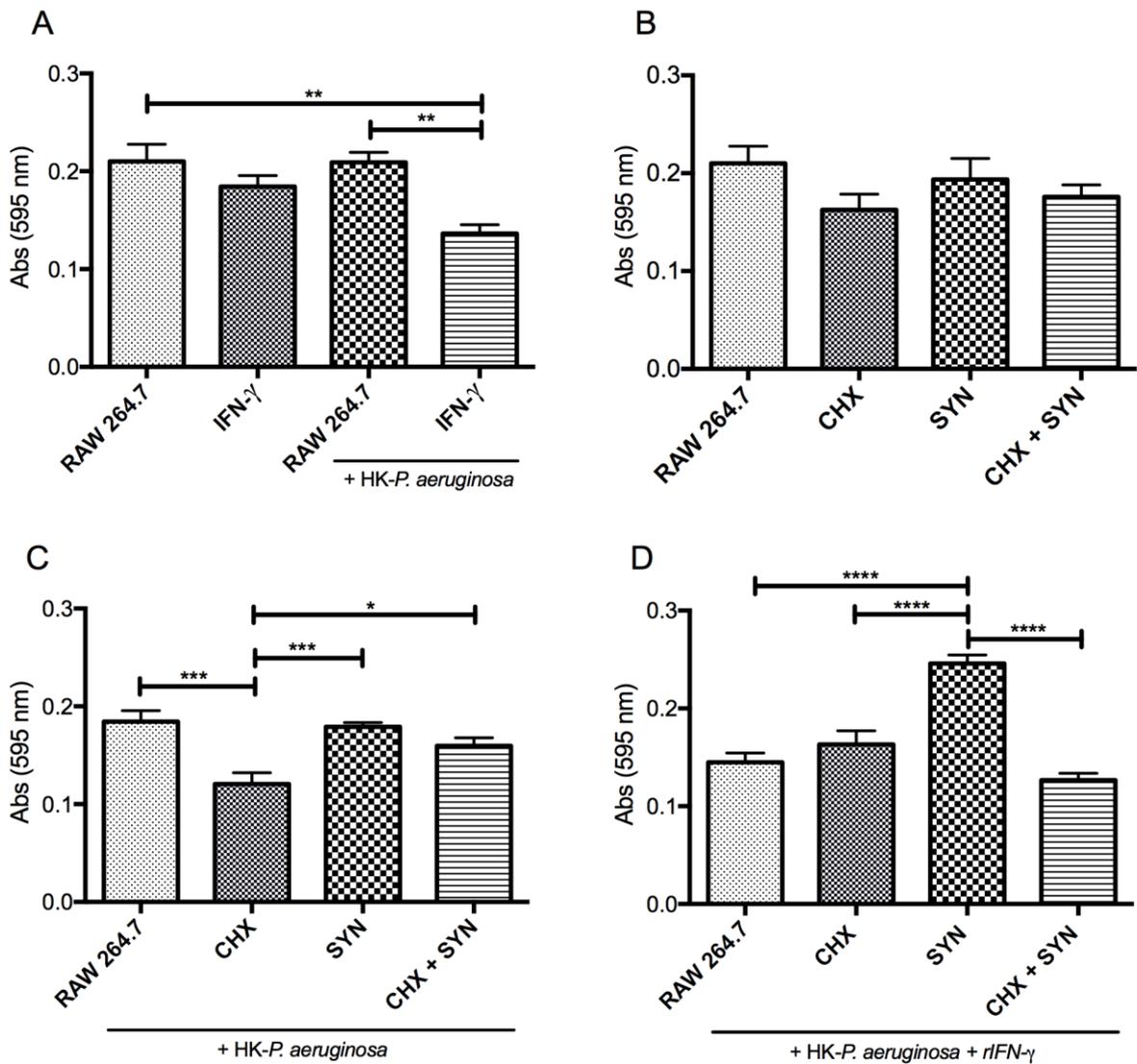


Figura 10. Avaliação da viabilidade em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 72 h de incubação. A viabilidade foi representada em média e erro padrão da absorbância a 595 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, em relação ao controle, ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni.

5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA QUIMIOCINA MCP-1 EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7

Dentre os diversos mediadores inflamatórios avaliados no presente estudo, a produção da quimiocina MCP-1 foi avaliada no tempo experimental de 6 h (Figura 11). Foi possível observar uma redução da produção de MCP-1 no grupo estimulado com IFN- γ (Figura 11A) ($p < 0,01$). No entanto, o aumento dessa produção foi observado nos grupos estimulados com CHX isolada e combinada com SYN, em células estimuladas com antígenos (Figura 11C) ($p < 0,01$). O grupo estimulado com a combinação CHX e SYN, na presença de antígeno, apresentou aumento na produção de MCP-1 ($p < 0,05$) ainda com a viabilidade reduzida (Figura 11C).

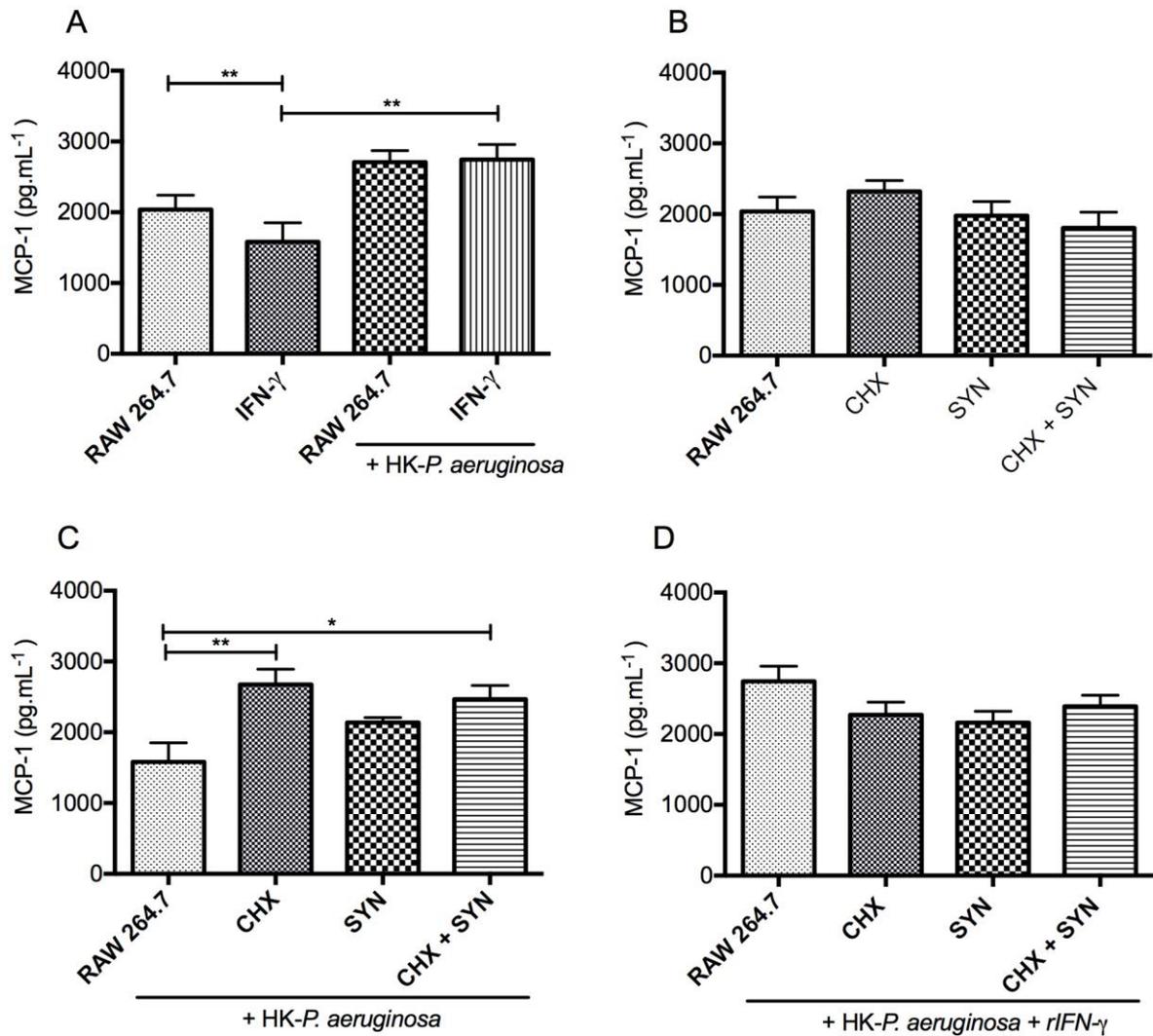


Figura 11. Avaliação da produção da quimiocina MCP-1 em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 6 h de incubação. A produção da quimiocina foi representada em média e erro padrão da absorbância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ .

5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-1 α e TNF- α EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e TNF- α foram analisadas no tempo experimental de 24 h. Em relação à produção de IL-1 α (Figura 12), foi possível observar que somente o grupo estimulado com antígeno associado ao IFN- γ foi capaz de aumentar a produção dessa citocina (Figura 12A) ($p < 0,05$). Tal condição foi observada mesmo com a redução da viabilidade celular desse grupo apresentada na Figura 12A.

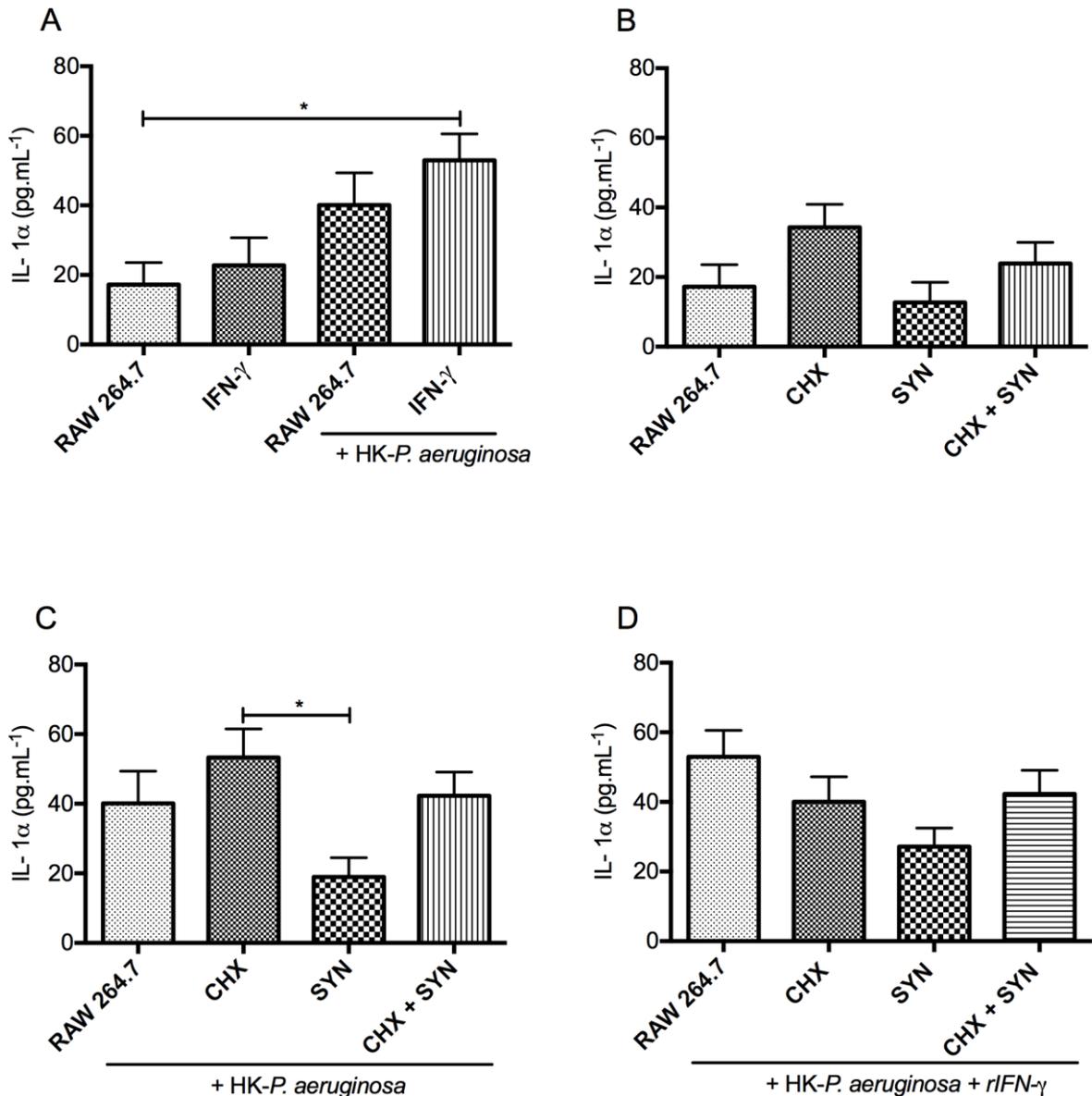


Figura 12. Avaliação da produção da citocina IL-1 α em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 24 h de incubação. A produção da citocina foi representada em média e erro padrão da absorbância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ .

Em relação à produção de TNF- α (Figura 13), observou-se um aumento da produção desta citocina em grupos estimulados com antígeno com e sem IFN- γ

(Figura 13A) ($p < 0,001$) e ($**p < 0,01$), respectivamente. No entanto, em grupos estimulados com antígeno e IFN- γ , a SYN isolada reduziu a produção de TNF- α ($p < 0,05$), enquanto a associação CHX e SYN aumentou essa produção (Figura 13D) ($p < 0,05$). Salienta-se que ainda com a redução da viabilidade celular (Figura 13A e D), foi observado aumento na produção de TNF- α pelo grupo estimulado com antígenos e IFN- γ com e sem a associação CHX e SYN ($p < 0,05$).

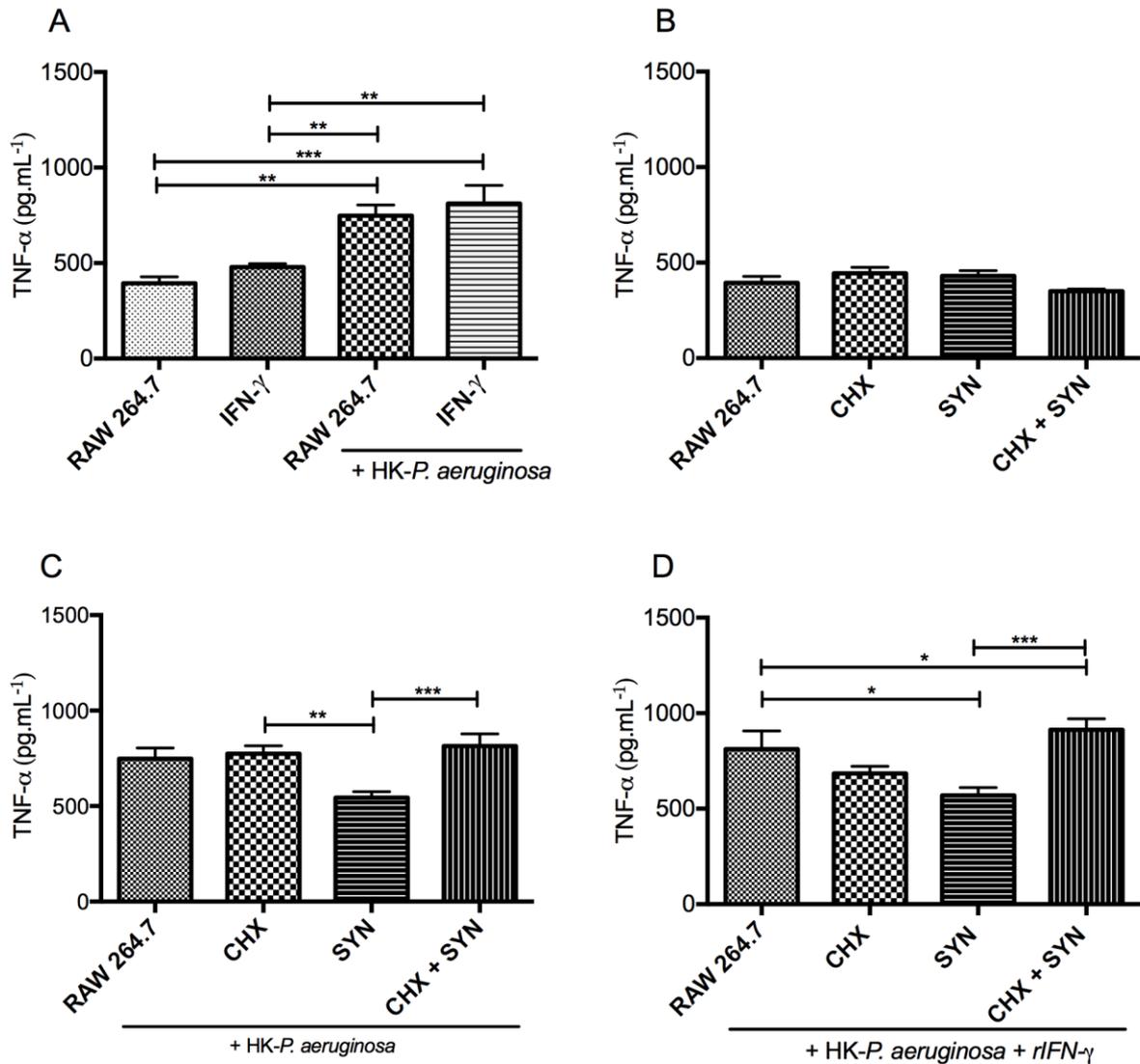


Figura 13. Avaliação da produção da citocina TNF- α em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 24 h de incubação. A produção da citocina foi representada em média e erro padrão da absorbância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e

synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA *One way* e pós-teste de *Bonferroni*.

5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7

A produção dessa citocina foi observada com aumento em grupos estimulados com antígeno, com e sem IFN- γ (Figura 14A) ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente. Em adição, tal produção também foi aumentada na presença do IFN- γ isolado (Figura 14A) ($p < 0,05$) mesmo com a redução da viabilidade desse grupo em 72 h (Figura 14A). No entanto, em grupos estimulados com antígeno e IFN- γ , a presença de CHX e SYN, combinadas ou isoladas, foi capaz de reduzir a produção de IL-10 ($p < 0,0001$) (Figura 14D).

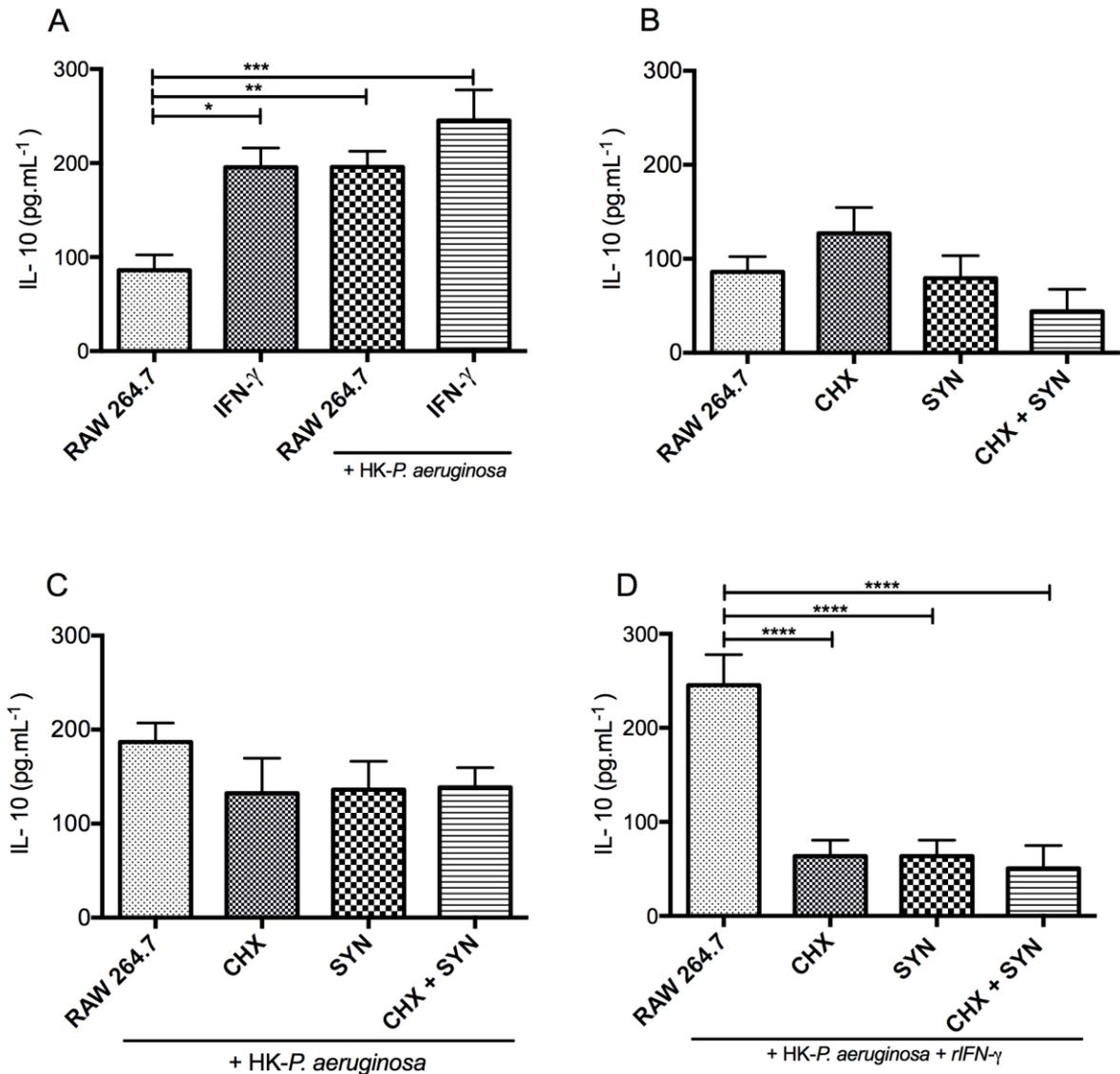


Figura 14. Avaliação da produção da citocina IL-10 em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 72 h de incubação. A produção da citocina foi representada em média e erro padrão da absorbância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de *Bonferroni*.

5.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO FATOR ESTIMULADOR DE MACRÓFAGOS (GM-CSF) EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7

A produção da citocina GM-CSF foi avaliada no tempo experimental de 72 h. No que diz respeito à produção desta citocina (figura 15), observou-se que o grupo estimulado com a SYN, sem estímulo adicional de antígeno ou IFN- γ , apresentou diminuição na produção de GM-CSF (Figura 15B) ($p < 0,001$), quando comparado ao estímulo com a CHX, podendo ser em decorrência da baixa de viabilidade celular observada tanto no grupo da SYN, quanto na CHX (Figura 15C).

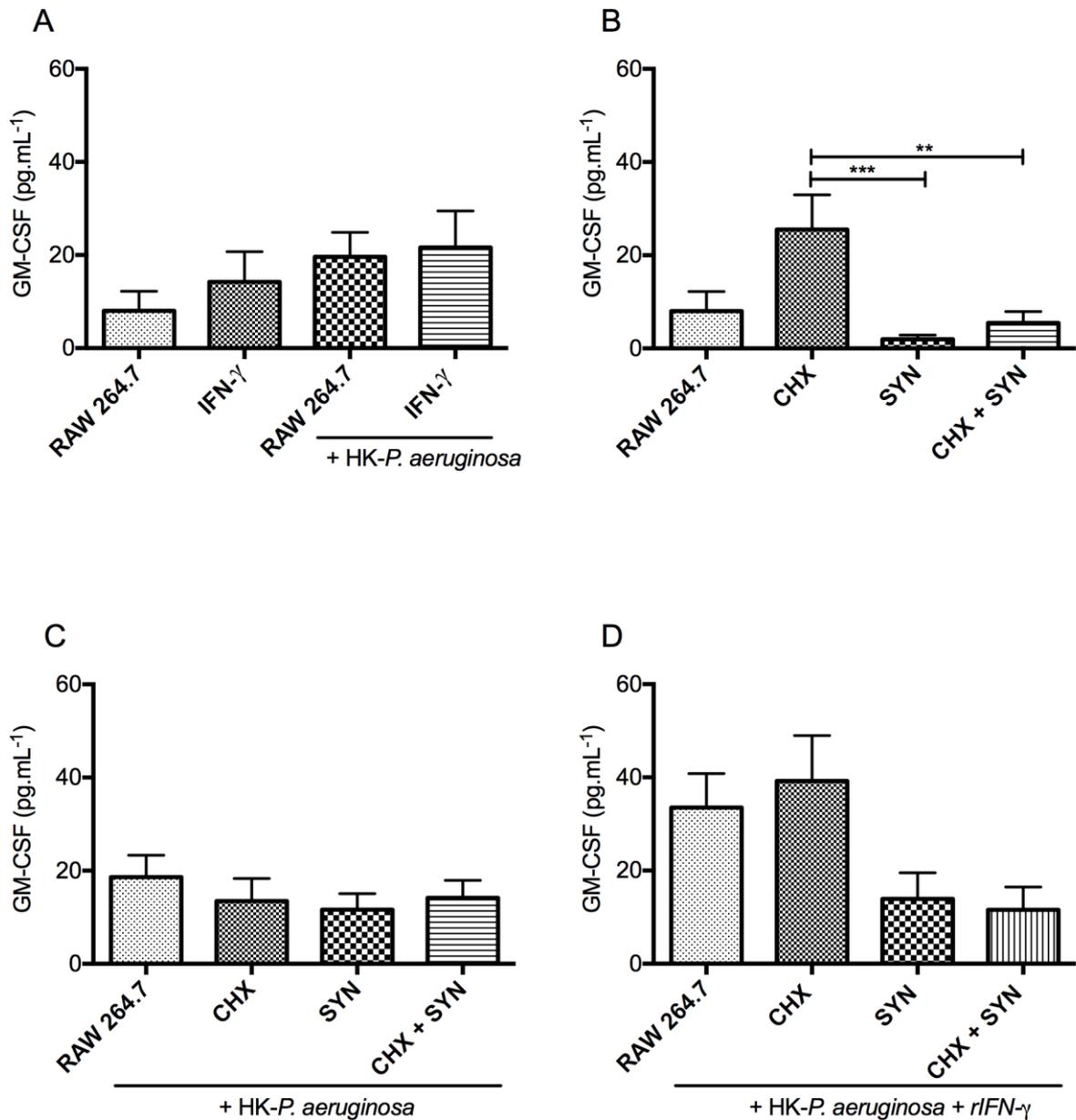


Figura 15. Avaliação da produção da citocina GM-CSF em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 72 h de incubação. A produção da citocina foi representada em média e erro padrão da absorbância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ .

5.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITO EM CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7

A produção de nitrito, dentre os parâmetros analisados da resposta imunológica produzida por macrófagos, foi aumentada nos grupos estimulados com IFN- γ e antígeno, isoladamente (Figura 16A) ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$), respectivamente. O peptídeo SYN também foi capaz de aumentar tal produção, quando isolada (Figura 16B) ($p < 0,0001$), apesar da ausência de sua produção quando a SYN foi associada a CHX ($p < 0,0001$). Os grupos estimulados com antígeno (com e sem IFN- γ) e CHX ou SYN, demonstraram aumento na produção (Figuras 16C e D) ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$). No entanto, a associação CHX e SYN levou a ausência de produção (nos grupos sem IFN- γ) ou produção basal (grupos com IFN- γ) de NO (Figuras 16C e D) ($p < 0,0001$). Importante ressaltar que o aumento da produção de nitrito pelo grupo da CHX associado ao antígeno e IFN- γ foi observado mesmo com a redução da viabilidade celular de 72 h.

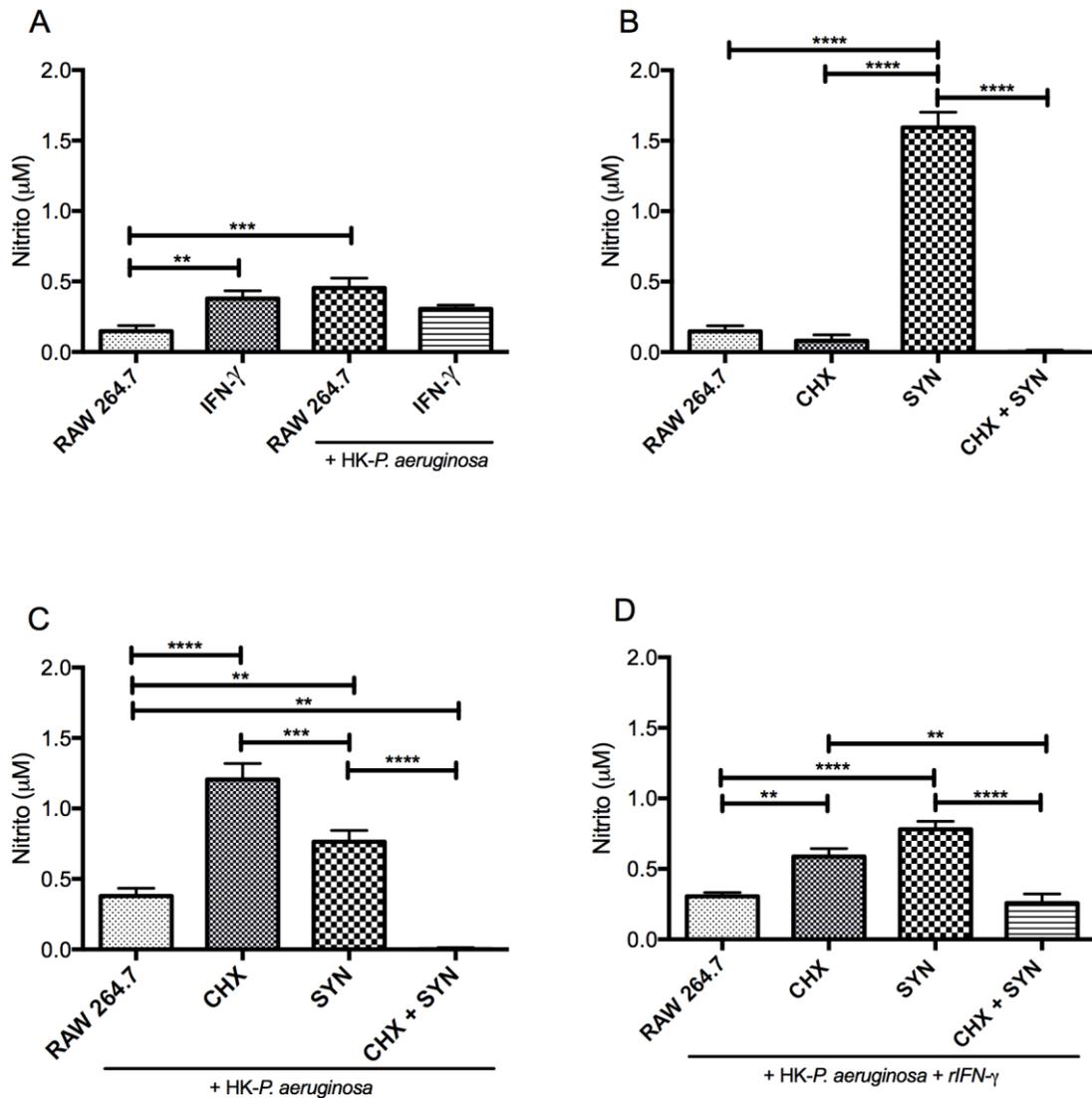


Figura 16. Avaliação da produção de nitrito em células RAW 264.7 na presença dos peptídeos e da clorexidina estimulados com antígenos de *P. aeruginosa* com e sem IFN- γ , após 72 h de incubação. A produção de nitrito foi representado em média e erro padrão da absorbância a 490 nm a partir de triplicata técnica e biológica. (A) representa os grupos sem e com estímulo de antígenos e/ou IFN- γ , tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle. ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (B) representa os grupos de peptídeo, clorexidina e combinação de ambos tendo como controle o grupo somente de células sem estímulos. **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (C) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa*, com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa*. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni. (D) representa o grupo com estímulo do antígeno de *P. aeruginosa* e IFN- γ , com e sem clorexidina e synoeca, tendo como controle o grupo de células estimuladas com *P. aeruginosa* e IFN- γ . ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$ em relação ao controle, pelo teste ANOVA One way e pós-teste de Bonferroni.

Em suma, de acordo com todos os resultados apresentados, é possível observar que a CHX demonstrou o menor valor nos ensaios de MIC/MBC contra *P. aeruginosa*, condição esta que levou a mudanças nos ensaios antimicrobianos

subsequentes. A CHX também foi capaz de reduzir a viabilidade celular de macrófagos em diversos grupos na viabilidade celular analisada dos tempos experimentais de 24 e 72 h. Em adição, esta apresentou aumento na produção de MCP-1 e NO e redução da produção de IL-10. Já o peptídeo SYN apresentou melhor atividade de inibição de células planctônicas desprendidas de biofilme e de biofilme formado por *P. aeruginosa*, em comparação à CHX. A SYN reduziu a viabilidade celular de macrófagos em um grupo em 24 h, porém aumentou a viabilidade destas em um grupo em 72 h. Esse peptídeo reduziu a produção de TNF- α , IL-10 e aumentou a produção de NO.

Já a associação CHX e SYN demonstrou uma redução de 99% do valor de MIC, sendo efetiva contra *P. aeruginosa* em baixas concentrações. No entanto, tal associação contribuiu para a redução de viabilidade celular de macrófagos nos tempos experimentais de 6 e 24 h. Ainda assim, a junção CHX e SYN foi capaz de aumentar a produção da quimiocina MCP-1 e do TNF- α , apesar de reduzir a produção de IL-10 e NO.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a capacidade antimicrobiana do peptídeo synoeca-MP em comparação com o digluconato de clorexidina para a utilização em biofilme bucal colonizado pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Neste contexto, a doença periodontal que tem como fator etiológico o biofilme dentário, que por sua vez, favorece um ambiente estruturado e simbiótico multibacteriano, aderido em matriz polimérica com íntima associação entre espécies. Essa interação pode ser determinada por diversos fatores, como nutrientes, temperatura, pH, hidrofobicidade de superfície e presença de oxigênio em conjunto com as características fenotípicas dos microrganismos. Neste sentido, as adaptações ao meio onde estão inseridas podem ser mediadas via sinalização célula a célula, com múltiplas vias para o amadurecimento do biofilme, incluindo a atuação do DNA extracelular (209, 210).

Ademais, no contexto hospitalar, bactérias do ambiente apresentam importante papel na colonização do biofilme dento-bacteriano e da superfície de equipamentos de suporte respiratório (71, 72). Esta situação pode aumentar o risco de broncoaspiração em pacientes imunocomprometidos, agravando a condição sistêmica (74-76). Este quadro pode culminar no desenvolvimento de pneumonia nosocomial (74, 75), responsável por grande parte dos óbitos em UTI (146). Por esta razão, utilizou-se para o presente estudo a *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa, própria do contexto hospitalar, oriunda do solo e oportunista em casos de comprometimento imunológico, sendo colonizadora de superfícies inanimadas e aparatos hospitalares.

Toda a colonização microbiana presente na DP em ambiente hospitalar ou fora dele pode promover o desencadear da resposta imunológica, que se inicia com a resposta imunológica inata, e segue para a resposta imunológica adaptativa (2). Neste processo, os macrófagos, células derivadas de monócitos, regulam tanto a resposta inata quanto a adquirida, além de regularem a destruição e o reparo tecidual (2, 43, 44). Estas células também responsabilizam-se pela produção de TNF- α , IL-1, IL-8, IL-6, GM-CSF, IL-12, IL-10, fatores de crescimento, IFN- α , IFN- β , metabólitos do ácido aracdônico, radicais livres, metaloproteinases, dentre outros. Além da função de fagocitose de microrganismos, os macrófagos também exibem fragmentos de moléculas derivadas de sua ação fagocitária para os linfócitos,

atuando como célula apresentadora de antígeno (211). Desta forma, em virtude do papel dos macrófagos no contexto periodontal, o modelo *in vitro* escolhido para o estudo envolve cultura de células RAW 264.7, monócitos precursores de osteoclastos (212). Este grupo celular apresenta as mesmas características dos macrófagos e comportamento similar ante a resposta imunológica, sendo de suma importância no processo inflamatório, participando principalmente do processo de reabsorção óssea (212).

Também integrantes do processo da resposta imunológica, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam-se como biomoléculas de baixa massa molecular, com capacidade imunomodulatória e inibitória contra bactérias, vírus e fungos (118). Seu mecanismo de ação está envolvido com a destruição da membrana celular, formação de poros, ação na liberação de fibras extracelulares de DNA e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, induzindo à apoptose. Ademais, também promovem mudanças na carga e espessura bacteriana, limitando o desenvolvimento de resistência (174). Na cavidade oral, encontram-se ao menos quarenta e cinco peptídeos antimicrobianos (152). Em sua maioria presentes na saliva, fluido crevicular, mucosa, sulco periodontal e glândulas. Os peptídeos podem ser oriundos também de respostas inflamatórias da mucosa, contribuindo de forma eficaz na defesa do hospedeiro (153).

O tratamento do paciente com DP está voltado para a remoção mecânica dos depósitos calcificados, por remoção manual ou mecânica do cálculo dentário e biofilme (95). Assim, esse consiste na desorganização do biofilme dento-bacteriano a fim de remover periodontopatógenos da superfície dentária, promovendo assim a remoção do fator etiológico da DP (95). Para o tratamento e controle das doenças crônicas, pode-se utilizar os agentes antimicrobianos como adjuvantes à terapia periodontal. Contudo, observou-se pouco avanço na concepção de novos fármacos no últimos anos (96, 97). A CHX, que é um colutório bucal considerado padrão-ouro na odontologia, possui potencial antimicrobiano comprovado (81). No entanto, por ser um fármaco de ação inespecífica, apresentando atividade também em tecido saudável, este produto apresenta inúmeras reações adversas, como ardência bucal, alteração na coloração dos elementos dentários, restaurações, língua e próteses, aumento do cálculo supragengival, perda do paladar, queimaduras em tecido mole, dor e xerostomia (116-118). Apesar dos efeitos colaterais supracitados, a CHX é o agente antimicrobiano mais utilizado para o controle do biofilme oral, tanto para

ambientes hospitalares quanto para uso clínico específico. Desta forma, faz-se necessária a busca por novas abordagens para o tratamento periodontal na tentativa do controle da perda óssea e progressão da doença (172).

A proposta de utilização de peptídeos antimicrobianos de forma sintética como novas formas terapêuticas para o ambiente oral já vem sendo pesquisada (17). No entanto, a síntese química dos peptídeos antimicrobianos pode ser onerosa e complexa, principalmente para peptídeos com longas sequências de aminoácidos (213). Assim, a busca por peptídeos antimicrobianos para uso no contexto oral está voltada para peptídeos com sequências curtas e que, no futuro, possam ser expressos de forma heteróloga, diminuindo o custo de sua produção, além de possibilitar a fabricação em larga escala (172).

Para o estudo comparativo foi utilizado a SYN, peptídeo da família dos mastoparanos, formado por 14 aminoácidos na sua sequência. Este peptídeo, isolado de peçonha da vespa *synoeca surinama*, encontra-se conservado em meio de cultura no campus da Universidade de Brasília (UnB) (191). A SYN demonstrou capacidade antimicrobiana e imunomodulatória previamente testadas e mostrou-se efetiva principalmente contra bactérias resistentes à antibioticoterapia, como *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*, entre outras, com concentração inibitória mínima (MIC) de 1,24 μM a 17,8 μM (191). Esses peptídeos, de forma geral, também apresentaram características versáteis frente ao contexto de resistência bacteriana, demonstrando na literatura índices menos expressivos quando comparados ao antimicrobianos de uso rotineiro em ambiente hospitalar (174). Assim, em virtude dos resultados antimicrobianos favoráveis a este peptídeo e tendo em vista a importância do papel antimicrobiano no contexto hospitalar, a SYN foi a escolha para o presente estudo. Nesta proposta, o padrão clínico comparativo escolhido foi a CHX, em virtude de ser considerada padrão-ouro na Odontologia para o controle de formação do biofilme bacteriano (81).

Deste modo, o presente estudo demonstrou importante função antimicrobiana em combinação sinérgica e em baixas concentrações, inferindo-se a efetividade da molécula sinérgica sem o prejuízo dos efeitos colaterais. Esses efeitos colaterais podem ocorrer com frequência em pacientes submetidos a tratamentos com alta concentração da CHX.

A presente análise teve início com os ensaios antimicrobianos. Nestes ensaios, a SYN apresentou valores inibitórios e bactericidas inferiores à CHX.

Contudo, em se tratando dos ensaios de inibição de bactérias planctônicas e biofilme bacteriano, a SYN demonstrou melhor atividade no ensaio de inibição de bactérias planctônicas, se comparados com a inibição da CHX, o que promoveu ausência de biofilme apenas na maior concentração testada.

Os resultados demonstram que a CHX pode não apresentar significativa atividade antibiofilme e menor atuação quando comparada ao peptídeo antimicrobiano SYN (214). Ademais, estudos prévios indicam a existência de resistência bacteriana relacionada à CHX e que esta resistência vem aumentando, o que demonstra que as bactérias nos biofilmes têm criado resistência à CHX (215). Este fator é explicado pelos mecanismos de resistência conferido às estruturas dos biofilmes (215). Ademais, doses de CHX sub-MIC (concentrações inferiores à concentração inibitória mínima) podem estimular a formação de biofilme (215, 216). Resultados anteriores avaliaram a efetividade do peptídeo SYN em bactérias resistentes à antibioticoterapia, como *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*, entre outros, com concentração inibitória mínima (MIC) de 1,24 μM a 17,8 μM (191). Estes estudos corroboram com os dados que indicam que a SYN apresenta significativa atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas resistentes (191).

Estudos prévios do grupo de pesquisa apontaram que a SYN apresentou 64% de ação hemolítica em concentrações acima de 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultando em ação citotóxica (193). Por outro lado, efeitos adversos provocados pelo uso prolongado da CHX seguem relatados na literatura (116, 118), além do fato da mesma ter apresentado citotoxicidade *in vitro*, a partir de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Todas estas informações direcionaram a pesquisa para a análise de interação entre estas moléculas, na tentativa de diminuir a concentração necessária para se atingir ação antimicrobiana, com menor efeito tóxico.

Neste sentido, o ensaio de interação sinérgica foi realizado com o peptídeo SYN e com a CHX. As análises demonstraram redução nos valores de MICs em até 99% e as atividades antimicrobianas sinérgicas, nas menores concentrações em 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a CHX e de 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a SYN. Estes dados inferem efetiva atividade antimicrobiana ainda que em baixas concentrações. Esses achados podem ser um indício da funcionalidade sinérgica dos fármacos com provável diminuição dos efeitos adversos provocados pelo uso da CHX. Outro ponto observado no estudo foi a presença de dez interações aditivas entre as duas

moléculas, além das sete interações sinérgicas, além da mencionada acima, que poderão ser avaliadas em estudos futuros.

No ambiente oral, a interação entre os diferentes tipos microbianos com as células e os tecidos do hospedeiro induz à liberação de citocinas e quimiocinas, tais como: interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF)- α e interferon (IFN)- γ (41). Tais mediadores exercem papel importante na patogênese da DP, resultando em dano progressivo aos tecidos periodontais de suporte e consequente formação de bolsa periodontal (41, 42). Neste sentido, a alteração da microbiota bucal ocasionada pela resposta ineficiente da imunidade pode levar ao aparecimento de espécies microbianas oportunistas. Estas bactérias podem ser originalmente do contexto hospitalar, com risco de broncoaspiração em pacientes imunocomprometidos, o que tende a agravar a condição sistêmica em um quadro de pneumonia nosocomial (20, 74, 75).

Desta forma, a análise da produção de mediadores inflamatórios que indicam o curso da resposta imunológica faz-se essencial na avaliação de novas propostas terapêuticas. Este trabalho avaliou a capacidade imunomodulatória *in vitro*, através da análise da produção de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, em diversas condições experimentais, sendo estas: i. cultura em condição basal (RAW 264.7); ii. cultura estimulada com antígenos mortos pelo calor de *P. aeruginosa* (RAW 264.7 + HK-*P. aeruginosa*), mimetizando processo infeccioso; iii. cultura estimulada com antígenos mortos pelo calor de *P. aeruginosa* e IFN- γ (RAW 264.7 + HK-*P. aeruginosa* + IFN- γ), mimetizando processo infeccioso-inflamatório.

Em relação à atividade imunomodulatória do peptídeo SYN, uma das citocinas avaliadas foi a quimiocina MCP-1. Esta quimiocina relaciona-se com o recrutamento de macrófagos e com a sinalização e migração de neutrófilos e monócitos para a área de inflamação (65). Sua apresentação no contexto periodontal encontra-se aumentada em pacientes com doença agressiva quando comparada ao fluido gengival em indivíduos saudáveis (65). Neste sentido, observou-se no estudo que o peptídeo foi capaz de reduzir a produção da quimiocina MCP-1 no grupo estimulado com IFN- γ . Contudo, um aumento na expressão desse mediador foi observado nos grupos estimulados com CHX, na forma isolada e em combinação com a SYN na presença de antígenos. Fato este que pode influenciar a quimiotaxia e ativação de macrófagos através da inibição da quimiocina MCP-1 nos grupos estimulados com IFN- γ . Estudo anterior analisou a

importância da MCP-1 no recrutamento de células inflamatórias na DP, demonstrando correlação positiva com o TNF- α , acarretando aumento dos eventos inflamatórios na inflamação gengival (65). Tais dados corroboram com os resultados encontrados no que diz respeito ao papel protetor do macrófago em razão da diminuição da expressão desta citocina (217).

A expressão das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 α e TNF- α , liberadas por macrófagos quando expostos aos antígenos, auxiliam na manutenção da saúde do tecido periodontal através da inibição da propagação da infecção (2, 43, 44). No entanto, em altas concentrações estas citocinas promovem a destruição dos tecidos periodontais, por meio da reabsorção óssea (2, 43, 44). Nesses termos, a IL-1 α exerce importante papel no estímulo da reabsorção óssea, produção de protocólgeno fibroblástico e prostaglandinas (45), tendo apresentado neste estudo aumento de sua expressão somente no grupo estimulado com antígenos e IFN- γ . O interferon gama também apresentou potencial de aumentar a produção desta citocina mesmo com a redução de sua viabilidade em 24 h. Este resultado apresentou-se compatível com estudo que comprova o aumento desta citocina no fluido crevicular de pacientes com DP (45, 46). Com relação ao papel da CHX nesta produção, observou-se que na presença de antígeno microbiano, a CHX estimulou a produção de IL-1 α . Por outro lado, na presença da SYN, a produção de IL-1 α diminuiu para níveis basais. Esta mesma relação foi observada nos grupos contendo CHX e peptídeo. Os resultados indicam que a CHX, ao contrário do peptídeo, foi um estímulo para a produção dessa citocina relacionada à reabsorção óssea.

O TNF- α apresenta papel importante no contexto periodontal voltado para inibição da propagação da infecção mas que, em alta concentração, também está relacionado aos processo de reabsorção óssea (41). De acordo com os resultados da citocina pró-inflamatória TNF- α , todos os grupos estimulados com antígeno acrescidos do IFN- γ aumentaram a produção desta citocina. Tal evidência também pode ser demonstrada na literatura por meio de estudos que confirmam a atividade da citocina TNF- α no processo de reabsorção óssea, combinada com a ação da IL-1 α (47-50). Relacionado a este mediador inflamatório, o grupo contendo CHX não alterou esta produção, já o grupo estimulado com SYN reduziu a produção de TNF- α e a combinação do peptídeo com a CHX levou a um aumento na expressão desta citocina, apenas nas culturas estimuladas com antígeno e IFN- γ . Mesmo sem estudos que corroborem com este resultado, por se tratar de um peptídeo novo,

relatos com estudo dos mastoparanos da família da SYN demonstraram capacidade de modular o influxo de neutrófilos e macrófagos *in vivo*. Ademais, isto ocorre pela diminuição da secreção de TNF- α e aumento da concentração de nitrito (218). Este contexto apresenta-se de forma satisfatória para a possibilidade de um futuro uso clínico, tendo em vista a diminuição desta citocina envolvida no processo de reabsorção óssea bem como na destruição dos tecidos.

Ao analisar a produção de IL-10, estudo anterior demonstrou aumento da produção dessa na presença de IFN- γ , como contribuinte na supressão da inflamação (55, 219). Com relação a produção desta citocina foi observado um aumento nos grupos estimulados com antígenos, com e sem a presença do IFN- γ , incluindo os grupos estimulados com IFN- γ de forma isolada. Em contrapartida, os grupos estimulados com CHX e com o peptídeo SYN combinados ou isolados, na presença de antígeno e IFN- γ , foram capazes de reduzir a produção de IL-10. Em virtude do papel modulador desta citocina, este resultado implica na promoção de uma resposta pró-inflamatória, principalmente no que diz respeito à diminuição da produção desta citocina.

Outra citocina analisada foi a GM-CSF, responsável por prevenir a destruição óssea no processo de regulação osteoclástica, antagonizando o efeito do RANKL através de sua expressão na superfície dos osteoblastos e osteoprotegrina (OPG) (39, 40). No que diz respeito ao presente estudo, observou-se que tanto o grupo contendo o peptídeo isolado quanto o grupo contendo peptídeo e CHX, na presença do estímulo adicional de antígeno e IFN- γ demonstraram inibição de GM-CSF quando comparado ao grupo contendo somente CHX isolada. Tal evidência foi demonstrada em estudo que comprovou que o IFN- γ em combinação com GM-CSF pode promover danos teciduais oriundos de uma resposta anti-inflamatória reduzida, sendo esta citocina incapaz de proteger os tecidos dos efeitos deletérios da inflamação ocasionada pela inibição de GM-CSF (220). Um outro estudo envolvendo modelo *in vivo* indicou alta toxicidade da CHX em 24 h e, com isso, alteração no LPS bacteriano, resultando na redução de macrófagos viáveis (121). Contudo, tanto nos grupos estimulados com a CHX, quanto nos estimulados com o peptídeo, também foi observada baixa viabilidade, em 72 h.

Outro mediador avaliado no presente estudo foi o NO. Este mediador exerce, entre outras funções, a de promover a vasodilatação, sendo esta primordial para o funcionamento do organismo (221). Também observa-se um aumento da

concentração de nitrito na saliva em casos de doença, podendo servir como mediador importante no diagnóstico e monitoramento da DP (222). Desta forma, a produção de NO foi aumentada nos grupos estimulados com antígeno e IFN- γ , isoladamente. O peptídeo SYN foi capaz de aumentar a produção de NO quando isolado, porém, demonstrou ausência de produção ou produção basal quando em associação com a CHX. O estudo também avaliou a capacidade de peptídeos em inibirem o IFN- γ acarretando na diminuição da produção do NO (223). Outra pesquisa demonstrou que o uso de enxaguatórios antimicrobianos orais para a remoção de microrganismos atenua a formação de nitrito sistêmico, perturbando a via de nitrato-nitrito-NO, demonstrando uma importante relação da saliva com o nitrito circulante (224). Tais resultados demonstram um possível equilíbrio entre os fármacos no que diz respeito a produção de NO, e com isso, um controle da inflamação e da perda óssea secundária.

Deste modo, o presente estudo sugere a utilização de novos agentes antimicrobianos para o controle do biofilme dento-bacteriano e para o tratamento de infecções periodontais em pacientes imunodeprimidos. Ademais, a formulação de fármacos adjuvantes à CHX mostra ser de inteira relevância no contexto atual, cuja função seria diminuir os efeitos adversos provocados pelo uso prolongado da CHX. Estima-se que em função da presença de ação antimicrobiana, ainda com a diminuição da concentração de CHX em até 99%, quando na presença do peptídeo antimicrobiano SYN, os efeitos colaterais possam ser extinguidos, sem contudo, diminuir esta importante ação. Além disso, de acordo com os parâmetros analisados, o peptídeo demonstrou inibição na formação de biofilme e também ação em biofilmes maduros. Estes dados demonstram efeito superior aos parâmetros apresentados pela CHX, que não apresentou atividade sobre biofilme recém-formado ou maduro, sendo necessárias concentrações superiores para a atividade da CHX no biofilme, conforme estudos progressos (214-216). Além disso, estudos avaliaram o desenvolvimento de bactérias resistentes quando na utilização da CHX em concentrações inferiores ao MIC (214-216). Estudos posteriores se fazem necessários para melhor entendimento de como a associação entre as duas moléculas potencializa a ação isolada da CHX. Estudo prévio envolvendo associação entre peptídeo antimicrobiano a um antimicrobiano de venda usual inferiu que possivelmente o peptídeo venha a atuar no contexto bacteriano, facilitando a entrada e a ação dos antimicrobianos usuais (225, 226).

Agregado a isto, os efeitos imunomodulatórios do peptídeo testado corroboram para a indicação da utilização sinérgica dos dois fármacos, sendo melhores os resultados apresentados pela associação das duas substâncias do que quando comparado ao efeito isolado da CHX. Na presença desta associação observou-se resposta caracterizada por aumento da produção de MCP-1, citocina responsável pelo recrutamento dos macrófagos (65) e do TNF- α , citocina responsável pelo primeiro papel antimicrobiano na resposta imunológica (2, 43, 44). Também observou-se uma redução da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e do NO. Desta forma, apresentando uma resposta mais inflamatória, relacionada aos parâmetros analisados.

Portanto, infere-se do presente estudo uma comprovada ação antimicrobiana, imunomodulatória e antibiofilme do peptídeo synoeca-MP em combinação com o digluconato de clorexidina. Esses resultados também se repetem quando testados isoladamente em todos os parâmetros avaliados, respeitadas as limitações do estudo *in vitro*. No entanto, salienta-se a necessidade de estudos futuros envolvendo a avaliação das concentrações sinérgicas do peptídeo e da CHX em biofilme multi-espécie, contemplando as principais bactérias da DP. Neste contexto, também será necessário avaliar um sistema de infecção periodontal que satisfaça e se aproxime dos requisitos de uma situação clínica de gengivite e periodontite dentro e fora do contexto hospitalar. Também como perspectivas futuras para esta linha de pesquisa, contempla-se novos estudos *in vitro* com a análise de outras culturas celulares, como queratinócitos, fibroblastos e osteoclastos, além da avaliação da velocidade de degradação salivar do peptídeo.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados observados no presente estudo *in vitro*, é possível concluir:

- A CHX demonstrou melhor atividade antimicrobiana nos ensaios de MIC/MBC contra *P. aeruginosa*, no entanto, nos ensaios de inibição de células planctônicas e de biofilme, a SYN superou tal atividade.
- A interação de concentrações abaixo dos MICs da CHX e da SYN foi efetiva, determinando uma atividade sinérgica com redução de 99% do MIC.
- Isoladamente, a SYN pouco interferiu na viabilidade celular de macrófagos em 24 e 72 h de cultura. Em adição, tal peptídeo foi capaz de reduzir a produção de TNF- α e IL-10 e aumentar a produção de NO.
- Isoladamente, a CHX reduziu a viabilidade celular dos tempos experimentais de 24 e 72 h. A CHX ainda foi capaz de aumentar a produção de MCP-1 e IL-10 e reduzir a produção de IL-10 em grupos estimulados com antígeno e IFN- γ .
- A associação CHX e SYN reduziu a viabilidade celular de macrófagos em alguns grupos dos tempos experimentais de 6 e 24 h. Tais agentes, em conjunto, foram capazes de aumentar a produção de MCP-1 e TNF- α e reduzir a produção de IL-10 e NO.

Dessa forma, depreende-se que a atuação sinérgica entre CHX e SYN foi benéfica nos ensaios antimicrobianos *in vitro* envolvendo a bactéria oportunista *P. aeruginosa*. Nesta ocasião, estes agentes em conjunto, também foram capazes de controlar a infecção e sua disseminação, por potencializar a resposta imunológica de macrófagos contra a presença de microrganismos. Nesta associação, o peptídeo ativou a resposta pró inflamatória, possivelmente favorecendo o combate ao processo infeccioso. Em adição, a redução da concentração de CHX pela adição da SYN pode reduzir efeitos indesejáveis de ambos em ambiente clínico.

REFERÊNCIAS

1. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *Br Dent J.* 2013;214(9):467-71.
2. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2015;69(1):7-17.
3. Scannapieco FA. Position paper of The American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *Journal of periodontology.* 1998;69(7):841-50.
4. Cullinan MP, Seymour GJ. Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough? *Periodontol 2000.* 2013;62(1):271-86.
5. Munro CL, Grap MJ. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. *Am J Crit Care.* 2004;13(1):25-33; discussion 4.
6. Raghavendran K, Mylotte JM, Scannapieco FA. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. *Periodontol 2000.* 2007;44:164-77.
7. Grap MJ, Munro CL, Ashtiani B, Bryant S. Oral care interventions in critical care: frequency and documentation. *Am J Crit Care.* 2003;12(2):113-8; discussion 9.
8. El-Solh AA, Pietrantonio C, Bhat A, Okada M, Zambon J, Aquilina A, et al. Colonization of dental plaques: a reservoir of respiratory pathogens for hospital-acquired pneumonia in institutionalized elders. *Chest.* 2004;126(5):1575-82.
9. Chan EY, Ruest A, Meade MO, Cook DJ. Oral decontamination for prevention of pneumonia in mechanically ventilated adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2007;334(7599):889.
10. Vilela MC, Ferreira GZ, Santos PS, Rezende NP. Oral care and nosocomial pneumonia: a systematic review. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13(2):290-6.
11. Puig Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13(4):E257-60.

12. Silvestri DL, McEnery-Stonelake M. Chlorhexidine: uses and adverse reactions. *Dermatitis*. 2013;24(3):112-8.
13. Pemberton MN, Gibson J. Chlorhexidine and hypersensitivity reactions in dentistry. *Br Dent J*. 2012;213(11):547-50.
14. Branch-Elliman W, Wright SB, Howell MD. Determining the Ideal Strategy for Ventilator-associated Pneumonia Prevention. Cost-Benefit Analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(1):57-63.
15. Kollef MH. Ventilator-associated Pneumonia Prevention. Is It Worth It? *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(1):5-7.
16. Sundar KM, Nielsen D, Sperry P. Comparison of ventilator-associated pneumonia (VAP) rates between different ICUs: Implications of a zero VAP rate. *J Crit Care*. 2012;27(1):26-32.
17. Mahlapuu M, Hakansson J, Ringstad L, Bjorn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:194.
18. Kolahi J, Soolari A. Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. *Quintessence Int*. 2006;37(8):605-12.
19. Ainamo J, Loe H. Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. *Journal of periodontology*. 1966;37(1):5-13.
20. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000*. 1997;13:91-120.
21. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Molecular oral microbiology*. 2014;29(6):248-57.
22. Listgarten MA. The Ultrastructure of Human Gingival Epithelium. *Am J Anat*. 1964;114:49-69.
23. Armitage GC. Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1995;7:39-53.
24. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2001;25:8-20.
25. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):30-44.

26. Leite FR, Peres KG, Do LG, Demarco FF, Peres MA. Prediction of Periodontitis Occurrence: Influence of the Classification, Sociodemographic and General Health Information. *Journal of periodontology*. 2017;1-14.
27. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(3):329-55.
28. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):i, 1-112.
29. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
30. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc*. 2000;66(11):594-7.
31. Papapanou PN, Neiderud AM, Disick E, Lalla E, Miller GC, Dahlen G. Longitudinal stability of serum immunoglobulin G responses to periodontal bacteria. *Journal of clinical periodontology*. 2004;31(11):985-90.
32. Dye BA, Choudhary K, Shea S, Papapanou PN. Serum antibodies to periodontal pathogens and markers of systemic inflammation. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32(12):1189-99.
33. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2000;27(9):648-57.
34. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections - an update. *APMIS*. 2017;125(4):376-84.
35. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of periodontology*. 1992;63(4 Suppl):322-31.
36. Fernandez y Mostajo M, Zaura E, Crielaard W, Beertsen W. Does routine analysis of subgingival microbiota in periodontitis contribute to patient benefit? *European journal of oral sciences*. 2011;119(4):259-64.
37. Zhang T, Wang Z, Hancock RE, de la Fuente-Nunez C, Haapasalo M. Treatment of Oral Biofilms by a D-Enantiomeric Peptide. *PloS one*. 2016;11(11):e0166997.

38. Zijng V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one*. 2010;5(2):e9321.
39. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12-55.
40. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral microbiology and immunology*. 2007;22(5):333-9.
41. Nazar Majeed Z, Philip K, Alabsi AM, Pushparajan S, Swaminathan D. Identification of Gingival Crevicular Fluid Sampling, Analytical Methods, and Oral Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Dis Markers*. 2016;2016:1804727.
42. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007;8(9):942-9.
43. Drugarin D, Onisei D, Koreck A, Negru S, Drugarin M. Proinflammatory cytokines production and PMN-elastase release from activated PMN cells in the periodontal disease. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 1998;57(3-4):295-307.
44. Nedzi-Gora M, Kowalski J, Gorska R. The Immune Response in Periodontal Tissues. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017.
45. Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *Journal of periodontology*. 1993;64(5 Suppl):416-31.
46. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 2004;31(6):475-82.
47. Wang CY, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral microbiology and immunology*. 1997;12(2):65-71.
48. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral microbiology and immunology*. 1995;10(4):213-9.
49. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(3):248-66.
50. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2001;161:III-XIII, 1-151.

51. Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontol 2000*. 1999;20:239-88.
52. Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32(4):369-74.
53. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
54. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res*. 2007;67(19):9518-27.
55. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009;86(5):1065-73.
56. Nalbant A, Saygili T. IL12, IL10, IFN γ and TNF α Expression in Human Primary Monocytes Stimulated with Bacterial Heat Shock GroEL (Hsp64) Protein. *PloS one*. 2016;11(4):e0154085.
57. Sasaki H, Suzuki N, Kent R, Jr., Kawashima N, Takeda J, Stashenko P. T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in IL-10-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(9):6193-8.
58. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40 Suppl 14:S1-7.
59. MacDonald KP, Rowe V, Bofinger HM, Thomas R, Sasmono T, Hume DA, et al. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;175(3):1399-405.
60. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest*. 1993;91(1):257-63.
61. Teng YT. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):237-52.

62. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M, Jr., Kostenuik PJ, et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *Journal of periodontology*. 2007;78(7):1300-8.
63. Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JW, Ryan PF, et al. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol*. 2002;161(4):1419-27.
64. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *Journal of clinical periodontology*. 2007;34(5):370-6.
65. Kurtis B, Tuter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, et al. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Journal of periodontology*. 2005;76(11):1849-55.
66. Kelchtermans H, Billiau A, Matthys P. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol*. 2008;29(10):479-86.
67. Lehtonen A, Matikainen S, Julkunen I. Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1997;159(2):794-803.
68. Topcu Ali O, Akalin FA, Sahbazoglu KB, Yamalik N, Kilinc K, Karabulut E, et al. Nitrite and nitrate levels of gingival crevicular fluid and saliva in subjects with gingivitis and chronic periodontitis. *J Oral Maxillofac Res*. 2014;5(2):e5.
69. Kapil V, Haydar SM, Pearl V, Lundberg JO, Weitzberg E, Ahluwalia A. Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. *Free Radic Biol Med*. 2013;55:93-100.
70. Sanchez GA, Miozza VA, Delgado A, Busch L. Total salivary nitrates and nitrites in oral health and periodontal disease. *Nitric Oxide*. 2014;36:31-5.
71. Matos EC, Matos HJ, Conceicao ML, Rodrigues YC, Carneiro IC, Lima KV. Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(3):305-11.
72. Fuentesfria DB, Ferreira AE, Graf T, Corcao G. [*Pseudomonas aeruginosa*: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water]. *Rev Soc*

Bras Med Trop. 2008;41(5):470-3. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial.

73. Sands KM, Wilson MJ, Lewis MA, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, et al. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *J Crit Care*. 2017;37:30-7.

74. Heo SM, Haase EM, Lesse AJ, Gill SR, Scannapieco FA. Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. *Clin Infect Dis*. 2008;47(12):1562-70.

75. Porto AN, Borges AH, Rocatto G, Matos FZ, Borba AM, Pedro FL, et al. Periodontal and Microbiological Profile of Intensive Care Unit Inpatients. *J Contemp Dent Pract*. 2016;17(10):807-14.

76. Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo JM, Gonzalez E, Calleja I, et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Crit Care*. 2012;16(3):R93.

77. Mourani PM, Harris JK, Sontag MK, Robertson CE, Abman SH. Molecular identification of bacteria in tracheal aspirate fluid from mechanically ventilated preterm infants. *PloS one*. 2011;6(10):e25959.

78. De Souza PR, De Andrade D, Cabral DB, Watanabe E. Endotracheal tube biofilm and ventilator-associated pneumonia with mechanical ventilation. *Microsc Res Tech*. 2014;77(4):305-12.

79. Matsuo K, Watanabe R, Kanamori D, Nakagawa K, Fujii W, Urasaki Y, et al. Associations between oral complications and days to death in palliative care patients. *Support Care Cancer*. 2016;24(1):157-61.

80. Pilonetto M, Rosa EA, Brofman PR, Baggio D, Calvario F, Schelp C, et al. Hospital gowns as a vehicle for bacterial dissemination in an intensive care unit. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(3):206-10.

81. Scannapieco FA, Yu J, Raghavendran K, Vacanti A, Owens SI, Wood K, et al. A randomized trial of chlorhexidine gluconate on oral bacterial pathogens in mechanically ventilated patients. *Crit Care*. 2009;13(4):R117.

82. Scannapieco FA, Stewart EM, Mylotte JM. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med*. 1992;20(6):740-5.

83. de Bentzmann S, Plesiat P. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol*. 2011;13(7):1655-65.
84. Phee A, Bondy-Denomy J, Kishen A, Basrani B, Azarpazhooh A, Maxwell K. Efficacy of bacteriophage treatment on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Endod*. 2013;39(3):364-9.
85. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610.
86. Pollack M MG, Bernnett JE, Dolin R. . *Pseudomonas aeruginosa*. Principles and practice of infectious diseases. . 2000:2310-35.
87. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol*. 2015;10(10):1683-706.
88. Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(3):196-200.
89. Mai GT, Seow WK, Pier GB, McCormack JG, Thong YH. Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginate, and specific monoclonal antibody treatments. *Infection and immunity*. 1993;61(2):559-64.
90. Pinheiro MR, Lacerda HR, Melo RG, Maciel MA. *Pseudomonas aeruginosa* infections: factors relating to mortality with emphasis on resistance pattern and antimicrobial treatment. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(6):509-15.
91. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634-40.
92. Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(3):295-309.
93. Dar-Odeh NS, Abu-Hammad OA, Al-Omiri MK, Khraisat AS, Shehabi AA. Antibiotic prescribing practices by dentists: a review. *Ther Clin Risk Manag*. 2010;6:301-6.

94. Sweeney LC, Dave J, Chambers PA, Heritage J. Antibiotic resistance in general dental practice--a cause for concern? *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(4):567-76.
95. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:78-111.
96. Mouchrek Junior JC, Nunes LH, Arruda CS, Rizzi Cde C, Mouchrek AQ, Tavares RR, et al. Effectiveness of Oral Antiseptics on Tooth Biofilm: A Study in vivo. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(8):674-8.
97. Figuero E, Nobrega DF, Garcia-Gargallo M, Tenuta LM, Herrera D, Carvalho JC. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. *Journal of clinical periodontology.* 2017;44 Suppl 18:S116-S34.
98. Rezaei S, Rezaei K, Mahboubi M, Jarahzadeh MH, Momeni E, Bagherinasab M, et al. Comparison the efficacy of herbal mouthwash with chlorhexidine on gingival index of intubated patients in Intensive Care Unit. *J Indian Soc Periodontol.* 2016;20(4):404-8.
99. Basrani B, Lemonie C. Chlorhexidine gluconate. *Aust Endod J.* 2005;31(2):48-52.
100. Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Efficacy of two antiplaque and antigingivitis treatments in a group of young mentally retarded patients. *Med Oral.* 2002;7(2):136-43.
101. Feres M, Figueiredo LC, Faveri M, Stewart B, de Vizio W. The effectiveness of a preprocedural mouthrinse containing cetylpyridinium chloride in reducing bacteria in the dental office. *J Am Dent Assoc.* 2010;141(4):415-22.
102. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *Journal of dental research.* 1992;71(7):1431-8.
103. Teng F, He T, Huang S, Bo CP, Li Z, Chang JL, et al. Cetylpyridinium chloride mouth rinses alleviate experimental gingivitis by inhibiting dental plaque maturation. *Int J Oral Sci.* 2016;8(3):182-90.
104. Adams D, Addy M. Mouthrinses. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):291-301.
105. Ruszkiewicz JA, Li S, Rodriguez MB, Aschner M. Is Triclosan a neurotoxic agent? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2017;20(2):104-17.
106. Macri D. Worldwide Use of Triclosan: Can Dentistry Do Without this Antimicrobial? *Contemp Clin Dent.* 2017;8(1):7-8.

107. Vlachojannis C, Al-Ahmad A, Hellwig E, Chrubasik S. Listerine(R) Products: An Update on the Efficacy and Safety. *Phytother Res.* 2016;30(3):367-73.
108. Cortelli SC, Cortelli JR, Shang H, Costa R, Charles CA. Gingival health benefits of essential-oil and cetylpyridinium chloride mouthrinses: a 6-month randomized clinical study. *Am J Dent.* 2014;27(3):119-26.
109. Najafi MH, Taheri M, Mokhtari MR, Forouzanfar A, Farazi F, Mirzaee M, et al. Comparative study of 0.2% and 0.12% digluconate chlorhexidine mouth rinses on the level of dental staining and gingival indices. *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9(3):305-8.
110. Labeau SO, Van de Vyver K, Brusselaers N, Vogelaers D, Blot SI. Prevention of ventilator-associated pneumonia with oral antiseptics: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(11):845-54.
111. Zand F, Zahed L, Mansouri P, Dehghanrad F, Bahrani M, Ghorbani M. The effects of oral rinse with 0.2% and 2% chlorhexidine on oropharyngeal colonization and ventilator associated pneumonia in adults' intensive care units. *J Crit Care.* 2017.
112. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8(1):54-69.
113. Houston S, Hougland P, Anderson JJ, LaRocco M, Kennedy V, Gentry LO. Effectiveness of 0.12% chlorhexidine gluconate oral rinse in reducing prevalence of nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. *Am J Crit Care.* 2002;11(6):567-70.
114. Amaral SM, Cortes Ade Q, Pires FR. Nosocomial pneumonia: importance of the oral environment. *J Bras Pneumol.* 2009;35(11):1116-24.
115. Morrow SG. Use and Abuse of Antibiotics Cover Use and Abuse of Antibiotics. .
116. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2002;66(4):236-48.
117. Guimaraes AR, Peres MA, Vieira Rde S, Ferreira RM, Ramos-Jorge ML, Apolinario S, et al. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidine-fluoride-based preventive oral health program. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(4):291-6.
118. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52(3 Pt 1):381-90; quiz 91-2.

119. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother.* 1954;9(2):192-6.
120. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2001;15(4-5):271-6.
121. Bonacorsi C, Raddi MS, Carlos IZ. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(2):207-12.
122. Adriaanse AH. Prevention of neonatal septicaemia due to group B streptococci. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1995;9(3):545-52.
123. Hugo WB, Longworth AR. Some Aspects of the Mode of Action of Chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol.* 1964;16:655-62.
124. Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Archives of oral biology.* 1978;23(4):289-94.
125. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;3:CD008676.
126. Teixeira de Abreu AP, Ribeiro de Oliveira LR, Teixeira de Abreu AF, Ribeiro de Oliveira E, Santos de Melo Ireno M, Aarestrup FM, et al. Perioperative Anaphylaxis to Chlorhexidine during Surgery and Septoplasty. *Case Rep Otolaryngol.* 2017;2017:9605804.
127. Sharp G, Green S, Rose M. Chlorhexidine-induced anaphylaxis in surgical patients: a review of the literature. *ANZ J Surg.* 2016;86(4):237-43.
128. Addy M, Mahdavi SA, Loyn T. Dietary staining in vitro by mouthrinses as a comparative measure of antiseptic activity and predictor of staining in vivo. *J Dent.* 1995;23(2):95-9.
129. Serrano J, Escribano M, Roldan S, Martin C, Herrera D. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology.* 2015;42 Suppl 16:S106-38.
130. Zhang D, Wang XC, Yang ZX, Gan JX, Pan JB, Yin LN. Preoperative chlorhexidine versus povidone-iodine antisepsis for preventing surgical site infection:

A Meta-analysis and trial sequential analysis of randomized controlled trials. *Int J Surg*. 2017.

131. Rodriguez Sanchez F, Rodriguez Andres C, Arteagoitia Calvo I. Does Chlorhexidine Prevent Alveolar Osteitis After Third Molar Extractions? Systematic Review and Meta-Analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;75(5):901-14.

132. Budtz-Jorgensen E, Milton Knudsen A. Chlorhexidine gel and Steradent employed in cleaning dentures. *Acta Odontol Scand*. 1978;36(2):83-7.

133. Moffa EB, Izumida FE, Jorge JH, Mussi MC, Siqueira WL, Giampaolo ET. Effectiveness of chemical disinfection on biofilms of relined dentures: A randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2016;29(1):15-9.

134. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*. 2009;42(4):288-302.

135. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*. 2003;36(4):267-75.

136. da Costa L, Amaral C, Barbirato DDS, Leao ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc*. 2017;148(5):308-18.

137. van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32 Suppl 6:214-28.

138. Haerian-Ardakani A, Rezaei M, Talebi-Ardakani M, Keshavarz Valian N, Amid R, Meimandi M, et al. Comparison of Antimicrobial Effects of Three Different Mouthwashes. *Iran J Public Health*. 2015;44(7):997-1003.

139. Reddy MS, Jeffcoat MK, Geurs NC, Palcanis KG, Weatherford TW, Traxler BM, et al. Efficacy of controlled-release subgingival chlorhexidine to enhance periodontal regeneration. *Journal of periodontology*. 2003;74(4):411-9.

140. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, Michalowicz BS, John MT, Gunsolley J, et al. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc*. 2015;146(7):508-24 e5.

141. da Silva JM, Jr., Rezende E, Guimaraes T, dos Campos EV, Magno LA, Consorti L, et al. Epidemiological and microbiological analysis of ventilator-

associated pneumonia patients in a public teaching hospital. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(5):482-8.

142. Dudeck MA, Horan TC, Peterson KD, Allen-Bridson K, Morrell G, Pollock DA, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2010, device-associated module. *Am J Infect Control.* 2011;39(10):798-816.

143. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009;302(21):2323-9.

144. Scannapieco FA. Pneumonia in nonambulatory patients. The role of oral bacteria and oral hygiene. *J Am Dent Assoc.* 2006;137 Suppl:21S-5S.

145. Scannapieco FA, Rethman MP. The relationship between periodontal diseases and respiratory diseases. *Dent Today.* 2003;22(8):79-83.

146. Bellissimo-Rodrigues F, Bellissimo-Rodrigues WT. Ventilator-associated pneumonia and oral health. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(5):543-4.

147. de Lacerda Vidal CF, Vidal AK, Monteiro JG, Jr., Cavalcanti A, Henriques AP, Oliveira M, et al. Impact of oral hygiene involving toothbrushing versus chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia: a randomized study. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):112.

148. Linden GJ, Lyons A, Scannapieco FA. Periodontal systemic associations: review of the evidence. *Journal of clinical periodontology.* 2013;40 Suppl 14:S8-19.

149. Azarpazhooh A, Leake JL. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *Journal of periodontology.* 2006;77(9):1465-82.

150. Pace CC, McCullough GH. The association between oral microorganisms and aspiration pneumonia in the institutionalized elderly: review and recommendations. *Dysphagia.* 2010;25(4):307-22.

151. Bommarius B, Jenssen H, Elliott M, Kindrachuk J, Pasupuleti M, Gieren H, et al. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides.* 2010;31(11):1957-65.

152. Fabian TK, Hermann P, Beck A, Fejerdy P, Fabian G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4295-320.

153. Gorr SU. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol* 2000. 2009;51:152-80.

154. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010;1(5):440-64.
155. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(3):238-50.
156. Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Ganz T, Dale BA. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods*. 2001;256(1-2):65-76.
157. White MR, Helmerhorst EJ, Ligtenberg A, Karpel M, Teclé T, Siqueira WL, et al. Multiple components contribute to ability of saliva to inhibit influenza viruses. *Oral microbiology and immunology*. 2009;24(1):18-24.
158. Johnson DA, Yeh CK, Dodds MW. Effect of donor age on the concentrations of histatins in human parotid and submandibular/sublingual saliva. *Archives of oral biology*. 2000;45(9):731-40.
159. Oudhoff MJ, Bolscher JG, Nazmi K, Kalay H, van 't Hof W, Amerongen AV, et al. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *FASEB J*. 2008;22(11):3805-12.
160. de Oliveira IR, de Araujo AN, Bao SN, Giugliano LG. Binding of lactoferrin and free secretory component to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;203(1):29-33.
161. Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*. 2003;254(3):197-215.
162. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N, et al. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol*. 2003;120(3):379-89.
163. Moreau T, Baranger K, Dade S, Dallet-Choisy S, Guyot N, Zani ML. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie*. 2008;90(2):284-95.
164. Jana NK, Gray LR, Shugars DC. Human immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: a role for SLPI in innate mucosal immunity. *J Virol*. 2005;79(10):6432-40.

165. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(1):21-35.
166. Groschl M, Wendler O, Topf HG, Bohlender J, Kohler H. Significance of salivary adrenomedullin in the maintenance of oral health: stimulation of oral cell proliferation and antibacterial properties. *Regul Pept*. 2009;154(1-3):16-22.
167. Kapas S, Bansal A, Bhargava V, Maher R, Malli D, Hagi-Pavli E, et al. Adrenomedullin expression in pathogen-challenged oral epithelial cells. *Peptides*. 2001;22(9):1485-9.
168. Allaker RP, Grosvenor PW, McAnerney DC, Sheehan BE, Srikanta BH, Pell K, et al. Mechanisms of adrenomedullin antimicrobial action. *Peptides*. 2006;27(4):661-6.
169. Den Hertog AL, Wong Fong Sang HW, Kraayenhof R, Bolscher JG, Van't Hof W, Veerman EC, et al. Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. *The Biochemical journal*. 2004;379(Pt 3):665-72.
170. den Hertog AL, van Marle J, van Veen HA, Van't Hof W, Bolscher JG, Veerman EC, et al. Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *The Biochemical journal*. 2005;388(Pt 2):689-95.
171. Supanchart C, Thawanaphong S, Makeudom A, Bolscher JG, Nazmi K, Kornak U, et al. The antimicrobial peptide, LL-37, inhibits in vitro osteoclastogenesis. *Journal of dental research*. 2012;91(11):1071-7.
172. Lima SM, de Padua GM, Sousa MG, Freire Mde S, Franco OL, Rezende TM. Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections--biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnol Adv*. 2015;33(1):203-13.
173. Wang G, Mishra B, Epanand RF, Epanand RM. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(9):2160-72.
174. Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of dental research*. 2017;96(3):254-60.
175. Neumann A, Berends ET, Nerlich A, Molhoek EM, Gallo RL, Meerloo T, et al. The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *The Biochemical journal*. 2014;464(1):3-11.

176. Roscia G, Falciani C, Bracci L, Pini A. The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs. *Current protein & peptide science*. 2013;14(8):641-9.
177. Cho J, Hwang IS, Choi H, Hwang JH, Hwang JS, Lee DG. The novel biological action of antimicrobial peptides via apoptosis induction. *J Microbiol Biotechnol*. 2012;22(11):1457-66.
178. Nuding S, Frasch T, Schaller M, Stange EF, Zabel LT. Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(10):5719-25.
179. Chongsiriwatana NP, Wetzler M, Barron AE. Functional synergy between antimicrobial peptoids and peptides against Gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(11):5399-402.
180. PILLAI SMEGR. *Antimicrobial combinations*. 5 ed 2005. p. 889.
181. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(3):450-70.
182. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J. Combination Effects of Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(3):1717-24.
183. Konno K, Hisada M, Naoki H, Itagaki Y, Kawai N, Miwa A, et al. Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*. 2000;38(11):1505-15.
184. de Castro e Silva J, Oliveira FN, Moreira KG, Mayer AB, Freire DO, Cherobim MD, et al. Pathophysiological effects caused by the venom of the social wasp *Synoeca surinama*. *Toxicon*. 2016;113:41-8.
185. dos Santos Cabrera MP, Costa ST, de Souza BM, Palma MS, Ruggiero JR, Ruggiero Neto J. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *Eur Biophys J*. 2008;37(6):879-91.
186. Ribeiro SP, Mendes MA, Dos Santos LD, de Souza BM, Marques MR, de Azevedo WF, Jr., et al. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. 2004;25(12):2069-78.
187. Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*. 2005;80(6):717-35.

188. Souza BM, Mendes MA, Santos LD, Marques MR, Cesar LM, Almeida RN, et al. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. 2005;26(11):2157-64.
189. Rocha T, de Souza BM, Palma MS, da Cruz-Hofling MA. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. *Toxicon*. 2007;50(5):589-99.
190. Moreno M, Giralt E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins (Basel)*. 2015;7(4):1126-50.
191. Freire DO. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO NOVO PEPTÍDEO Synoeca-MP ISOLADO DA PEÇONHA DE *Synoeca surinama* FRENTE A BACTÉRIAS COM EXPRESSÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS [Mester degree]. Brasília - DF: UnB; 2014.
192. Higashijima T, Uzu S, Nakajima T, Ross EM. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem*. 1988;263(14):6491-4.
193. Lima SM, Franco OL, Rezende TM. PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO COMO ADJUVANTES NA TERAPIA ENDODÔNTICA [Doctoral]. Brasília-DF 2017.
194. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-75.
195. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(7):3883-91.
196. Chang HI, Lau YC, Yan C, Coombes AG. Controlled release of an antibiotic, gentamicin sulphate, from gravity spun polycaprolactone fibers. *J Biomed Mater Res A*. 2008;84(1):230-7.
197. Lima SM, Sousa MG, Freire Mde S, de Almeida JA, Cantuaria AP, Silva TA, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *J Endod*. 2015;41(7):1061-5.
198. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Pennsylvania, USA: NCCLS; 2003. p. 19087-1898.

199. Reffuveille F, de la Fuente-Nunez C, Mansour S, Hancock RE. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(9):5363-71.
200. Wong JH, Xia L, Ng TB. A review of defensins of diverse origins. *Current protein & peptide science*. 2007;8(5):446-59.
201. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978;15(1):261-7.
202. Zhu XM, Wang YX, Leung KC, Lee SF, Zhao F, Wang DW, et al. Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:953-64.
203. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
204. van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods*. 1991;141(1):15-22.
205. Kwon DH, Cheon JM, Choi EO, Jeong JW, Lee KW, Kim KY, et al. The Immunomodulatory Activity of Mori folium, the Leaf of Morus alba L., in RAW 264.7 Macrophages In Vitro. *J Cancer Prev*. 2016;21(3):144-51.
206. Wang Z, Ding L, Zhang S, Jiang T, Yang Y, Li R. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1beta-stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells. *Int J Mol Med*. 2014;34(6):1720-6.
207. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-8.
208. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-8. Epub 1982/10/01.
209. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998;28(3):449-61.

210. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomed J.* 2013;36(2):59-70.
211. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res.* 2012;2(4):e1.
212. Berghaus LJ, Moore JN, Hurley DJ, Vandenplas ML, Fortes BP, Wolfert MA, et al. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2010;33(5):443-54.
213. Eckert R. Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Future Microbiol.* 2011;6(6):635-51.
214. Shen Y, Stojcic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 2011;37(5):657-61.
215. Ebrahimi A, Hemati M, Habibian Dehkordi S, Bahadoran S, Khoshnood S, Khubani S, et al. Chlorhexidine digluconate effects on planktonic growth and biofilm formation in some field isolates of animal bacterial pathogens. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2014;9(2):e14298.
216. Bonez PC, Dos Santos Alves CF, Dalmolin TV, Agertt VA, Mizdal CR, Flores Vda C, et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *Am J Infect Control.* 2013;41(12):e119-22.
217. Gemmell E, Winning TA, Bird PS, Seymour GJ. Cytokine profiles of lesional and splenic T cells in *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine model. *Journal of periodontology.* 1998;69(10):1131-8.
218. Wu TM, Chou TC, Ding YA, Li ML. Stimulation of TNF-alpha, IL-1beta and nitrite release from mouse cultured spleen cells and lavaged peritoneal cells by mastoparan M. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(6):476-82.
219. Liu BS, Janssen HL, Boonstra A. Type I and III interferons enhance IL-10R expression on human monocytes and macrophages, resulting in IL-10-mediated suppression of TLR-induced IL-12. *Eur J Immunol.* 2012;42(9):2431-40.
220. Singh S, Barr H, Liu YC, Robins A, Heeb S, Williams P, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulatory factor enhances the pro-inflammatory response of interferon-gamma-treated macrophages to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *PLoS one.* 2015;10(2):e0117447.

221. Owusu BY, Stapley R, Honavar J, Patel RP. Effects of erythrocyte aging on nitric oxide and nitrite metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(11):1198-208.
222. Reher VG, Zenobio EG, Costa FO, Reher P, Soares RV. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *Journal of oral science*. 2007;49(4):271-6.
223. Vila-del Sol V, Punzon C, Fresno M. IFN-gamma-induced TNF-alpha expression is regulated by interferon regulatory factors 1 and 8 in mouse macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(7):4461-70.
224. Govoni M, Jansson EA, Weitzberg E, Lundberg JO. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide*. 2008;19(4):333-7.
225. Walkenhorst WF. Using adjuvants and environmental factors to modulate the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(5):926-35.
226. He J, Starr CG, Wimley WC. A lack of synergy between membrane-permeabilizing cationic antimicrobial peptides and conventional antibiotics. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848(1 Pt A):8-15.

ANEXOS

Anexo A – espectro de massa dos peptídeos antimicrobianos

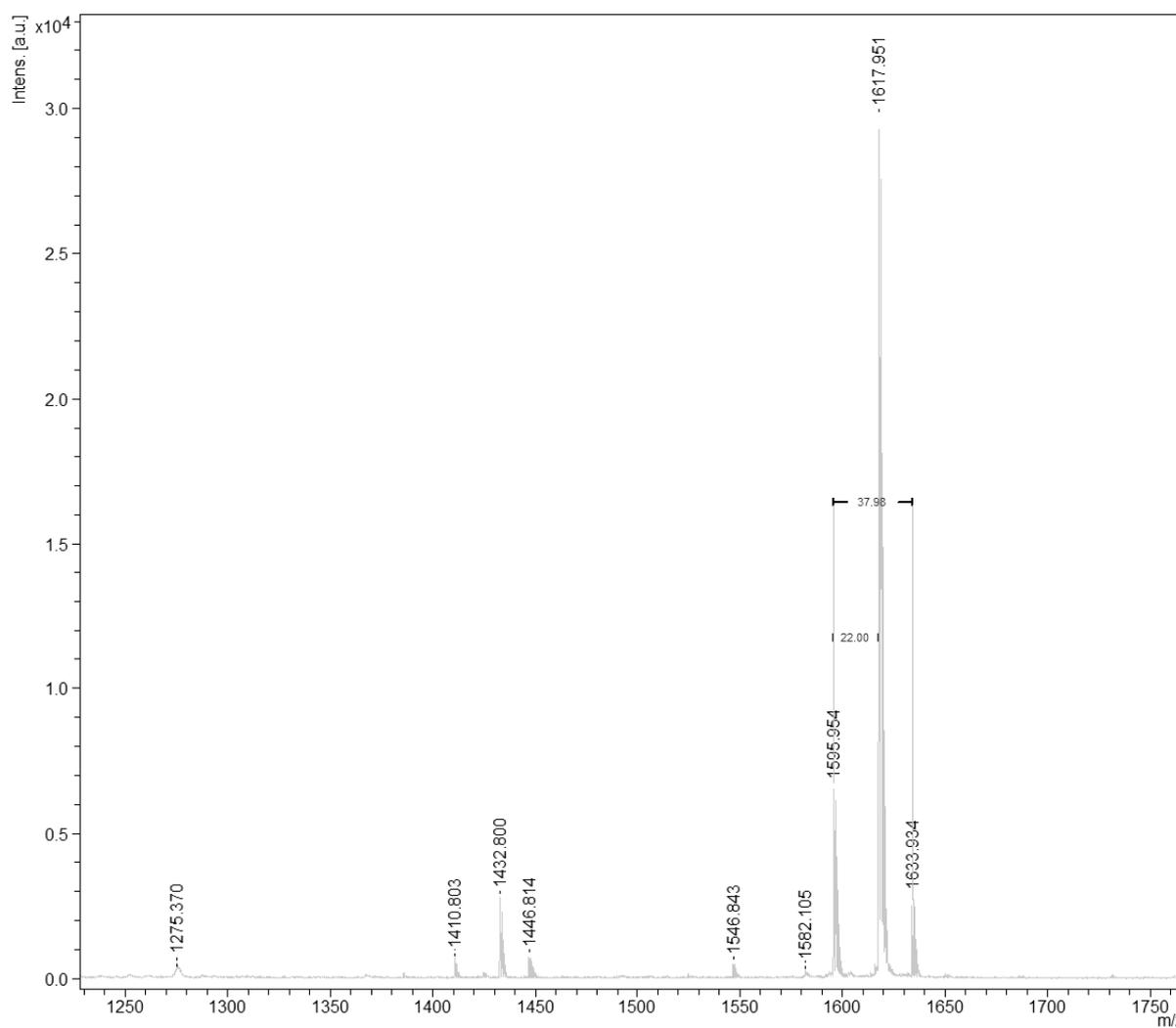


Figura 17. Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao peptídeo synoeca-MP (1594.8 Da), com pureza superior a 95%.

Anexo B – curvas de crescimento para determinação de fase logarítmica da *Pseudomonas aeruginosa*

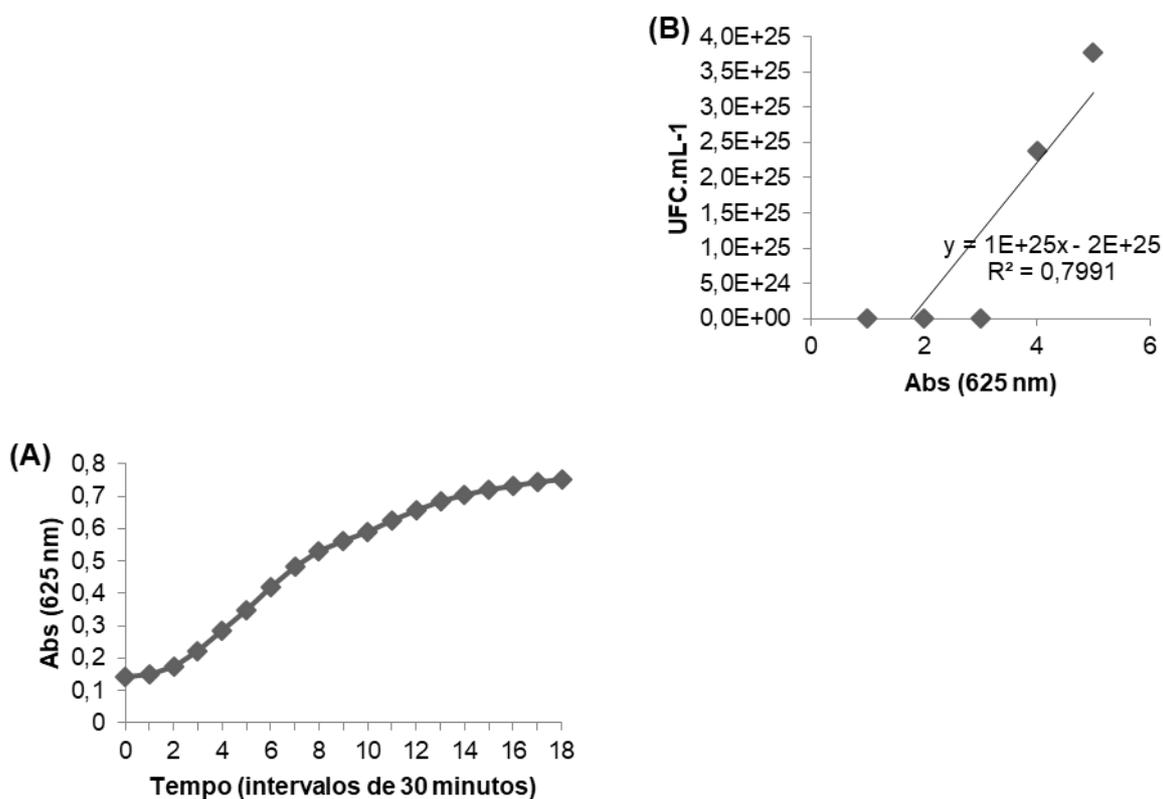


Figura 18. Curva representativa de crescimento da bactéria *P. aeruginosa*, através da média de três réplicas biológicas para determinação de fase logarítmica. (A) representa a determinação do número de células totais a partir da relação D. O. versus tempo de incubação, medido a cada 30 minutos. (B) representa a linha de tendência com equação e r^2 e a determinação do número de células viáveis a partir da relação D. O. versus UFC.mL⁻¹.