



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Evaluating the ototoxicity of an anti-MRSA peptide KR-12-a2[☆]



Chung Man Sung^a, Hong Chan Kim^a, Yong Beom Cho^a, Song Yub Shin^{b,*} e Chul Ho Jang^{a,*}

^a Chonnam National University Medical School, Department of Otolaryngology, Gwangju, Coreia do Sul

^b Chosun University, School of Medicine, Graduate School and Department of Cellular & Molecular Medicine, Gwangju, Coreia do Sul

Recebido em 24 de setembro de 2016; aceito em 4 de maio de 2017

Disponível na Internet em 6 de outubro de 2017

KEYWORDS

KR-12-a2;
Anti-MRSA peptide;
Topical application;
Ototoxicity

Abstract

Introduction: Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* is an emerging problem for the treatment of chronic suppurative otitis media, and also for pediatric tympanostomy tube otorrhea. To date, there are no effective topical antibiotic drugs to treat methicillin-resistant *staphylococcus aureus* otorrhea.

Objective: In this study, we evaluated the ototoxicity of topical KR-12-a2 solution on the cochlea when it is applied topically in the middle ear of guinea pigs.

Methods: The antimicrobial activity of KR-12-a2 against methicillin-resistant *staphylococcus aureus* strains was examined by using the inhibition zone test. Topical application of KR-12-a2 solution, gentamicin and phosphate buffered saline were applied in the middle ear of the guinea pigs after inserting ventilation tubes. Ototoxicity was assessed by auditory brainstem evoked response and scanning electron microscope examination.

Results: KR-12-a2 produced an inhibition zone against methicillin-resistant *staphylococcus aureus* from 6.25 µg. Hearing threshold in the KR-12-a2 and PBS groups were similar to that before ventilation tube insertion. However, the gentamicin group showed elevation of the hearing threshold and there were statistically significant differences compared to the phosphate buffered saline or the KR-12-a2 group. In the scanning electron microscope findings, the KR-12-a2 group showed intact outer hair cells. However, the gentamicin group showed total loss of outer hair cells. In our experiment, topically applied KR-12-a2 solution did not cause hearing loss or cochlear damage in guinea pigs.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2017.05.002>

[☆] Como citar este artigo: Sung CM, Kim HC, Cho YB, Shin SY, Jang CH. Evaluating the ototoxicity of an anti-MRSA peptide KR-12-a2. Braz J Otorhinolaryngol. 2018;84:441–7.

* Autores para correspondência.

E-mails: syshin@chosun.ac.kr (S.Y. Shin), chulsavio@hanmail.net (C.H. Jang).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

PALAVRAS-CHAVE

KR-12-a2;
Peptídeo Anti-MRSA;
Aplicação tópica;
Ototoxicidade

Conclusion: In our experiment, topically applied KR-12-a2 solution did not cause hearing loss or cochlear damage in guinea pigs. The KR-12-a2 solution can be used as ototopical drops for treating methicillin-resistant *staphylococcus aureus* otorrhea; however, further evaluations, such as the definition of optimal concentration and combination, are necessary.

© 2017 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Avaliando a ototoxicidade de um peptídeo anti-MRSA KR-12-a2

Resumo

Introdução: O *staphylococcus aureus* resistente à metilina é um problema emergente não só para a otite média suprativa crônica, mas também para casos de otorreia crônica em crianças com tubo de ventilação. Até o momento, não há antibióticos tópicos efetivos para a otorreia causada por *staphylococcus aureus* resistente à metilina.

Objetivo: Nesse estudo, avaliamos a ototoxicidade da solução tópica de KR-12-a2 na cóclea quando aplicada topicamente na orelha média de cobaias.

Método: A atividade antimicrobiana de KR-12-a2 contra cepas de *staphylococcus aureus* resistente à metilina foi avaliada utilizando-se o teste de zona de inibição de crescimento. Foram aplicados na orelhas médias de 3 grupos de cobaias, ou solução tópica de KR-12-a2, ou gentamicina ou solução salina tamponada com fosfato após timpanostomia. A ototoxicidade foi avaliada através do exame auditivo de potencial evocado auditivo de tronco encefálico e por microscopia eletrônica de varredura.

Resultados: O KR-12-a2 produziu uma zona de inibição contra o *staphylococcus aureus* resistente à metilina a partir de 6,25 µg. Alterações do limiar de audição no grupo KR-12-a2 e no grupo com solução salina foram semelhantes aos observados antes da inserção do tubo de ventilação. No entanto, o grupo gentamicina apresentou um limiar auditivo mais elevado, estatisticamente significativo em comparação ao grupo solução salina ou ao grupo KR-12-a2. Nos achados da microscopia eletrônica, o grupo KR-12-a2 apresentou células ciliadas externas intactas. No entanto, o grupo gentamicina apresentou perda total das células ciliadas externas. Em nosso experimento, a solução de KR-12-a2 aplicada topicamente não causou perda auditiva ou dano coclear em cobaias.

Conclusão: Em nosso experimento, a solução de KR-12-a2 aplicada topicamente não causou perda auditiva ou dano coclear em cobaias. A solução de KR-12-a2 pode ser utilizada como gotas otológicas para o tratamento da otorreia causada por *staphylococcus aureus* resistente à metilina; no entanto, são necessárias outras avaliações, para a definição da concentração e das associações ideais.

© 2017 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A resistência aos antibióticos está rapidamente se tornando um problema clinicamente significativo para o sistema de saúde. O tratamento da otite média crônica causada por bactérias resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos, surgiu como um dos maiores desafios enfrentados pelos profissionais médicos. Consequentemente, as infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) não conseguem ser tratadas com gotas otológicas de ciprofloxacina comercialmente disponíveis.^{1,2} Sabe-se que a prevalência de MRSA na otite média suprativa crônica (OMSC) é maior do que ~ 60% a 70% entre *S. aureus* isolados em hospitais Coreanos.³ Além da OMSC, MRSA é também um problema emergente relacionado à otorreia crônica pediátrica pós colocação de tubos de ventilação. Até a presente data, protocolos de tratamento padrão não foram desenvolvidos, e há um variado espectro de tratamentos

clínicos relatados. O uso adicional de antibióticos orais tais como linezolida,⁴ sulfametoxazol-trimetoprima,⁵ ácido fusídico,⁶ ou rifampicina para tratar otorreia causada por MRSA pode ser útil, mas após a administração sistêmica, a concentração biodisponível eficaz na orelha média para erradicar a infecção não pode ser precisamente medida ou descrita. A utilização de fármacos ototópicos representa uma alternativa altamente promissora aos antibióticos orais na terapêutica das doenças infecciosas da orelha média.

O uso de vancomicina para o tratamento de infecções por MRSA tem aumentado.⁷ Um dos autores desse trabalho utilizou vancomicina tópica para tratar pacientes com OMSC causada por MRSA e obteve bons resultados.⁸ Entretanto, a preocupação com o uso da vancomicina é a possível emergência de cepas resistentes ao fármaco, como o *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) e o *Enterococcus* resistente à Vancomicina (ERV). Em contextos clínicos, a sua utilização menos frequente pode facilitar a

diminuição do aparecimento de cepas resistentes. Portanto, é necessário desenvolver novos compostos antimicrobianos contra o MRSA. Recentemente, os Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) foram considerados novos antibióticos contra microrganismos resistentes, tais como MRSA, e alguns deles estão sendo avaliados em testes clínicos.⁹ PAMs são componentes fundamentais da imunidade inata dos mamíferos que controlam as infecções microbianas e representam a primeira linha de defesa contra diferentes patógenos nas superfícies epiteliais epidérmicas e mucosas. PAMs desempenham um papel significativo de defesa da imunidade inata do hospedeiro na prevenção de infecções primárias¹⁰ e são produzidos por macrófagos, células sanguíneas e células epiteliais em mamíferos. Os PAMs identificados em seres humanos incluem membros das famílias da catelicidina, defensina, trombicidina e histatina.¹¹

A expressão de um PAM na pele do canal auditivo externo e na orelha média já foi relatada anteriormente.¹²⁻¹⁴ A catelicidina LL-37 humana é um peptídeo antimicrobiano α -helicoidal anfipático catiônico com 37 resíduos de comprimento.¹⁵ Além da sua ação bactericida direta, sabe-se que a LL-37 possui uma potente atividade neutralizadora de lipopolissacarídeo (LPS) em vários tipos de células.¹⁶⁻¹⁸ O KR-12 (resíduos 18-29 de LL-37) é o menor peptídeo da catelicidina humana LL-37 que possui atividade antimicrobiana.¹⁹ Recentemente, desenvolvemos novos análogos de KR-12, desenhados com base na análise estrutura-atividade do KR-12 (KRIVQRIKDFLR-NH₂),²⁰ que mostrou potente atividade antimicrobiana e anti-endotóxica.

A otorreia purulenta é uma manifestação comum em pacientes que apresentam OMSC. Pacientes com OMSC e infecção por MRSA geralmente têm uma inflamação crônica na orelha média e mastoide, com uma perfuração persistente da membrana timpânica, geralmente associada a otorreia recorrente. Medicamentos ototópicos provavelmente utilizam doses mais baixas de antibióticos em comparação às medicações sistêmicas. Além disso, a eficácia de antibióticos sistêmicos para o tratamento de implantes infectados na orelha média não está bem elucidada. Entretanto, o uso de gotas ototópicas contra MRSA não estão comercialmente disponíveis ainda. Nesse estudo, avaliou-se o efeito ototóxico coclear de uma solução tópica de KR-12-a2 (KRIVQRIKKWLR-NH₂), um análogo de KR-12, após aplicação tópica do medicamento na orelha média de cobaias.

Método

Síntese do peptídeo

KR-12-a2 foi preparado como descrito anteriormente pelos autores.¹⁹ Resumidamente, a preparação do KR-12-a2 envolve a técnica de síntese padrão em fase sólida baseada em 9-fluorenil-metoxycarbonil (Fmoc) em resina 4-metil benzidril amina (0,54 mmol/g). Foram utilizados diclohexilcarbodiimida (DCC) e N-hidroxibenzotriazole (HOBt) como reagentes de acoplamento, e foi adicionado um excesso de 10 vezes de aminoácidos Fmoc durante cada ciclo de acoplamento. Após clivagem e desproteção com uma mistura de ácido trifluoroacético/água/tioanisole/fenol/etanoditiol/triisopropilsilano

(3,26 mL/0,2 mL/0,2 mL/0,2 mL/0,1 mL/0,04 mL) por 2 h à temperatura ambiente, o peptídeo bruto foi repetidamente extraído com éter dietílico e purificado através de cromatografia líquida de alto rendimento de fase inversa (RP-HPLC) em uma coluna preparativa Vydac C₁₈ (20 mm × 250 mm, 300 Å, tamanho de partícula de 15 mm) utilizando uma solução apropriada a 0-90% de água/acetonitrilo na presença de ácido trifluoroacético a 0,05%. A pureza final dos peptídeos (> 95%) foi determinada por RP-HPLC em uma coluna Vydac C18 analítica (4,6 × 250 mm, 300 Å, tamanho de partícula 5 mm). O sucesso da síntese do peptídeo foi confirmado através de análise utilizando espectrometria de massa com ionização e desorção a laser assistida por matriz, tempo de voo (MALDI-TOF) (Shimadzu, Japão). Como mostrado na sua projeção de roda α -helicoidal (fig. 1A), o KR-12-a2 foi projetado para ser anfipático quando dobrado em uma estrutura α -helicoidal, através da convergência dos resíduos hidrofóbicos (Val, Leu, Ile e Trp) para um lado e os resíduos hidrofílicos (Lys e Arg) para o outro lado do eixo helicoidal. Além disso, o KR-12-a2 apresentou um espectro

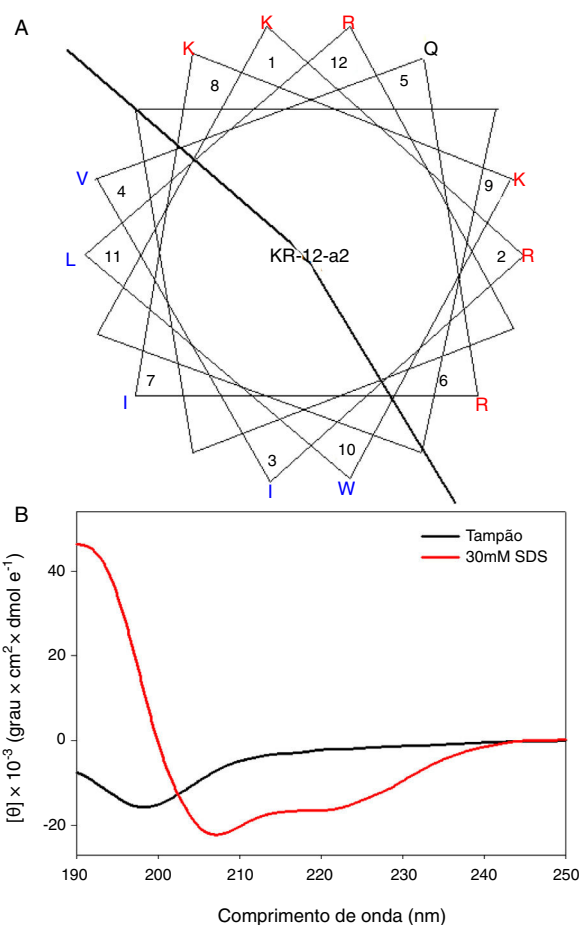


Figura 1 (A) Diagramas em roda α -helicoidal para KR-12-a2. Os aminoácidos carregados positivamente e hidrofóbicos são representados usando as cores vermelha e azul, respectivamente. A linha indica a interface entre a face hidrofóbica e a face positivamente carregada. (B) Espectros de Dicroísmo Circular (DC) dos peptídeos em solução-tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2, e micelas de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS), 30 mM.

de DC a-helicoidal característico com dois valores mínimos dicróicos a 208 e 222 nm e uma banda positiva perto de 192 nm em micelas de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) 30 mM (ambientes que imitam a membrana) (fig. 1B).

Teste de zona de inibição

MRSA foi cultivado de um dia para o outro, por 18 h, a 37 °C em 10 mL de caldo LB e então 10 µL dessa cultura foram inoculados em 10 mL de LB fresco e incubados durante 3 h adicionais a 37 °C para obter organismos de fase logarítmica média. A suspensão bacteriana (2×10^5 UFC/mL em LB) foi misturada com 0,7% de agarose e colocada em uma placa de Petri de 10 cm. Colocaram-se alíquotas de dez microlitros de uma diluição seriada de KR-12-a2 em cada círculo de papel ($\approx$ 6 mm de diâmetro) que foram colocados nas placas de agarose e depois incubadas a 37 °C durante a noite. Mediram-se os diâmetros das zonas de *clearance* bacteriano em torno do círculo de papel para a quantificação de atividades inibitórias.

Miringotomia e inserção de tubo de ventilação e aplicação tópica

Os experimentos foram realizados em 15 cobaias machos jovens (pesando 250-300 g cada) com membranas timpânicas normais. Todos os experimentos com animais seguiram um protocolo aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal (CNU IACUC-H-2014-36). As cobaias foram anestesiadas utilizando uma injeção intraperitoneal de zoletil e cloridrato de xilazina. Os meatos acústicos externos e as membranas timpânicas das cobaias foram examinados sob um microscópio cirúrgico, excluindo-se a possibilidade de processos infecciosos. Após avaliação basal pré-operatória da audição, realizou-se a miringotomia e a inserção de um tubo de ventilação Mini Shah (diâmetro interno 0,76, JEDMED Co, St. Louis, EUA) na porção anterior da membrana timpânica. Foi realizada a aplicação tópica de 50 µL de solução de KR-12-a2 (g/mL de PBS diluído) (Grupo I, n = 5) utilizando-se uma seringa de calibre 30 com agulha longa, na orelha média, através do tubo de ventilação. Foi aplicada topicamente solução salina tamponada com fosfato (PBS) 50 µL (Grupo II, n = 5) e gentamicina 50 µL (40 mg/mL) (Grupo III, n = 5). As administrações intra-timpânicas foram realizadas duas vezes ao dia durante 7 dias e um adesivo de papel foi aplicado localmente após a remoção do tubo de ventilação.

Medida do potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE) antes e depois da aplicação tópica

As cobaias foram anestesiadas através de uma injeção intraperitoneal de zoletil e cloridrato de xilazina. Os PEATEs foram registrados utilizando-se um sistema de potencial evocado (Tucker-Davis Technologies, Flórida, EUA) e um computador Samsung. Os estímulos foram sintetizados digitalmente utilizando-se o software Siggen® e foram apresentados através de um fone de inserção (ER-2, Etymotic Research, Inc. Illinois, EUA). Os estímulos acústicos, compreendendo um clique e *tone bursts* de 4, 8 e 16 kHz,

foram então produzidos. A intensidade dos estímulos acústicos foi expressa em decibéis (dB). Os animais receberam uma série de intensidade de estímulos, que foi iniciada a 90 Db NPS e atingiu um mínimo de 10 dB NPS. A intensidade do estímulo foi progressivamente reduzida em decréscimos de 10 dB. Cada média consistiu em 500 apresentações de estímulos, com um tempo de análise de 10 ms. A atividade elétrica foi registrada através de um eletrodo de agulha de platina inserido no couro cabeludo no vértice e referenciado a outro eletrodo de agulha em um músculo profundo do pescoço. Um terceiro eletrodo de agulha na pina serviu como fio-terra. As intensidades que pareciam estar próximas do limiar foram repetidas. O limiar foi definido como a menor intensidade capaz de produzir uma resposta de PEATE visivelmente detectável e reprodutível; os valores foram extrapolados para os 5 dB mais próximos, assumindo uma queda log-linear com intensidade decrescente. No limiar, a amplitude basal-ao-pico do maior componente do PEATE foi reduzida para < 10% daquela evocada pelos estímulos de 90 dB. Os PEATEs foram avaliados no pré-operatório e no oitavo dia após a aplicação tópica do fármaco. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas para avaliar as diferenças entre os grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Avaliação da cóclea por microscopia eletrônica de varredura

Após os registros finais do PEATE, os animais anestesiados foram perfundidos intracardialmente com paraformaldeído a 4% sob anestesia geral. Os ossos temporais foram isolados e os espaços peri-linfáticos da cóclea foram cuidadosamente injetados com 2,5% de glutaraldeído em PBS 0,1 M, realizando-se cocleostomias nas janelas redondas e ovais. As cápsulas ósseas foram removidas para expor o órgão de Corti, e então os espécimes foram pós-fixados em 2,5% de glutaraldeído por uma noite a 4 °C. Os espécimes foram lavados três vezes em PBS e depois fixados em tetróxido de ósmio a 1% durante 1 h a 4 °C. As amostras do órgão de Corti foram então desidratadas através de uma série graduada de soluções de etanol e foram desidratadas até o ponto crítico utilizando dióxido de carbono líquido. Essas amostras do órgão de Corti foram montadas em placas de SEM com tinta de alumínio e, em seguida, revestidas com ouro-paládio. As células ciliadas exteriores (CCE) do órgão de Corti foram examinadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura. A quantificação das células ciliadas que sobreviveram em todos os giros foi realizada.

Resultados

Teste de atividade antimicrobiana e citotoxicidade in vitro

KR-12-a2 produziu uma zona de inibição com o maior e menor diâmetro médio contra 100 µg e 6,25 µg de MRSA, respectivamente (fig. 2).

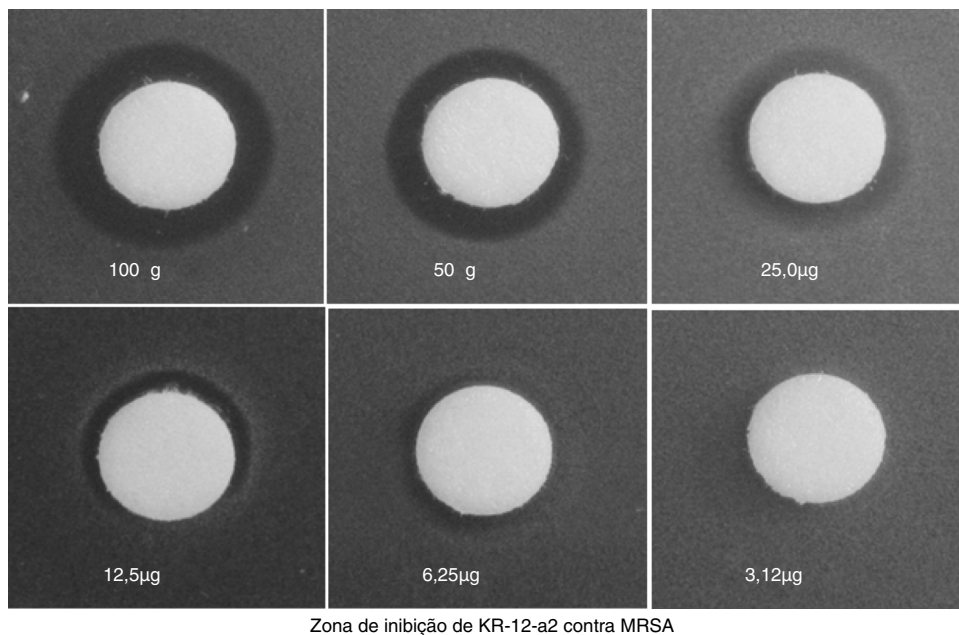


Figura 2 O teste de zona de inibição de crescimento demonstrou o efeito antibacteriano contra MRSA. O tamanho da zona de inibição foi dose-dependente.

Resultados do PEATE

Todos os animais sobreviveram sem complicações ou otite média. Não houve diferenças estatisticamente significantes nos limiares do PEATE antes e após a colocação do tubo de ventilação. Os limiares auditivos nos grupos KR-12-a2 PBS e foram semelhantes aos anteriores à inserção do tubo de ventilação. No entanto, o grupo gentamicina mostrou um limiar auditivo mais elevado e demonstrou diferenças estatisticamente significantes quando comparado com os grupos PBS ou KR-12-a2 (fig. 3).

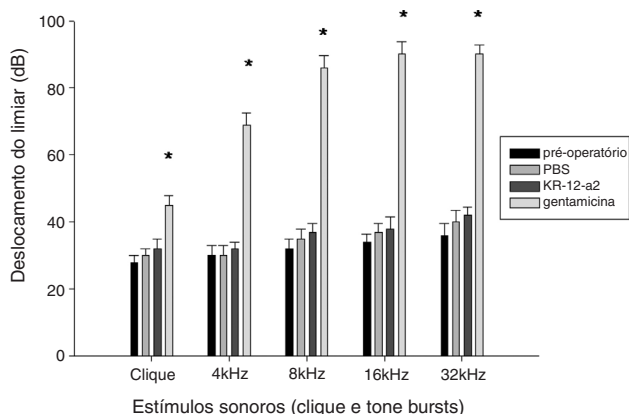


Figura 3 A audição foi preservada após aplicação tópica de KR-12-a2 bem como PBS, mas a mesma deteriorou após a aplicação de GM. O grupo GM apresentou diferenças significantes em comparação com o grupo PBS ou com o grupo KR-12-a2. Clique ($p = 0,014$), 4kHz ($p = 0,011$), 8kHz ($p = 0,009$), 16kHz ($p = 0,003$), 32 kHz ($p = 0,002$). Não houve diferenças significantes entre os grupos PBS e KR-12-a2 no pré-operatório.

Achados da microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Em relação aos achados da SEM, os grupos KR-12-a2 e PBS apresentaram Células Ciliadas Internas (CCI) e CCE bem preservadas em todos os giros. Os resultados mostraram CCI e CCE intactas como no grupo PBS. No entanto, o grupo gentamicina mostrou perda total de CCE no giro basal e a quase total nos giros medial e apical (fig. 4A-B).

Discussão

O MRSA deve ser considerado nos casos de otorreia persistente nos quais a terapia padrão antibiótica com gotas otológicas/ou sistêmica falha. As taxas de isolados de MRSA entre as infecções de orelha por *S. aureus* aumentaram consistentemente em até 60,9%.³

Fishman et al. relataram que em uma grande revisão de pacientes com otorreia persistente e tubo de ventilação e cultura positiva, o *S. aureus* era responsável por 52% dos organismos cultivados, dos quais 57% eram MRSA.²⁰ Atualmente, o antibiótico mais comumente utilizado contra o MRSA é a vancomicina. Tanto as experiências laboratoriais como os estudos clínicos não demonstraram ototoxicidade significativa após o tratamento com vancomicina.²¹⁻²⁴ Embora não haja surgimento de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) na OMSC, novos peptídeos anti-MRSA precisam ser estudados para a prevenção de VRSA ou VISA. Mandal et al. relataram que aproximadamente 15% das cepas de MRSA também eram resistentes à vancomicina (VRSA).²⁵ Recentemente, a aplicação tópica de daptomicina, um antibiótico lipopeptídico que ocorre naturalmente em *Streptomyces roseosporus*, um saprófito do solo e que é útil no tratamento de infecções por MRSA, não revelou qualquer ototoxicidade em cobaias.²⁶ No entanto, o surgimento

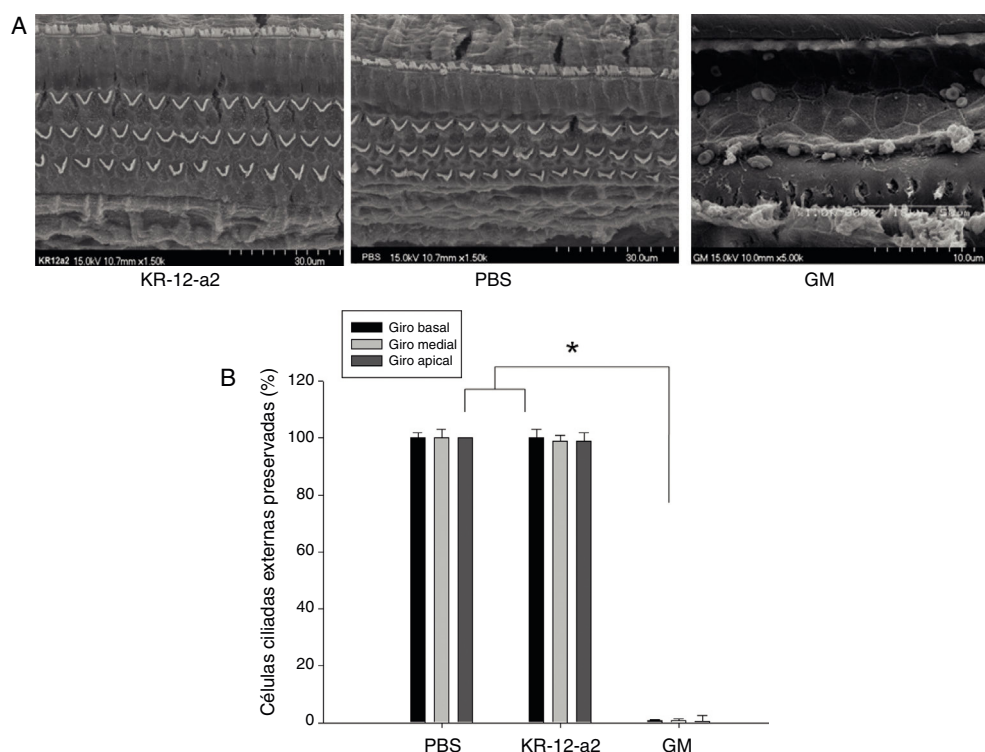


Figura 4 (A) Achados de microscopia eletrônica de varredura mostraram células ciliadas bem preservadas no grupo KR-12-a2; contudo, perda total de células ciliadas foi observada no grupo GM. (B) Não há diferenças entre os grupos PBS e KR-12-a2, exceto em relação aos resultados da gentamicina.

de MRSA resistente à daptomicina já foi relatado em outras doenças,²⁷ além da resistência à vancomicina.²⁸ Portanto, novos PAMs devem ser desenvolvidos para a otorreia por MRSA. O único peptídeo da família da catelicidina que é encontrado no corpo humano é o LL-37, que tem demonstrado ter amplos efeitos antibacterianos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.²⁹ Considera-se que o LL-37 desempenha um papel importante na primeira linha de defesa contra a infecção local e sistêmica e na invasão sistêmica de agentes patogênicos em locais de inflamação e feridas.³⁰ Recentemente, Hou et al.³¹ relataram que o peptídeo antimicrobiano LL-37 e o peptídeo regulador de defesa inato IDR-1 poderiam melhorar a pneumonia induzida por MRSA, exercendo uma propriedade anti-inflamatória e atenuando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, proporcionando assim suporte à hipótese de que ambos os peptídeos inatos e sintéticos podem desempenhar um papel de proteção contra MRSA *in vivo*.

No presente estudo, observamos a atividade antimicrobiana de KR-12-a2 contra MRSA, demonstrada pelos testes de zona de inibição e tempo de morte. Investigamos ainda a ototoxicidade por aplicação tópica de KR-12-a2, GM, e PBS duas vezes por dia durante 7 dias. O dano às células ciliadas foi avaliado através de PEATE e SEM. Não houve diferença significativa do limiar auditivo e na preservação das células ciliares entre os grupos PBS e KR-12-a2. No entanto, o grupo GM apresentou perda total de células ciliadas externas. As lesões na orelha interna ocorrem predominantemente no giro basal, seguido pelo giro apical com maior comprometimento da primeira fileira das CCE, com posterior extensão para as CCI, estria vascular, ligamento

espiral e membrana de Reissner.³² Nesse estudo, avaliamos apenas as células ciliadas. No grupo GM, observou-se a perda das CCE no giro basal ao invés do apical. A gentamicina é altamente solúvel em água e tem uma natureza polar que impede que ela atravesse facilmente uma membrana. Uma taxa de absorção mais elevada resultaria em giro basal da cóclea com um nível mais elevado de aminoglicosídeo antes do seu equilíbrio na perilinfa.³³ Até hoje, a ototoxicidade induzida pela gentamicina depende da suscetibilidade, da predisposição genética e da morte celular apoptótica dependente de caspase.³⁴ A toxicidade pode ser um fenômeno dose-dependente na orelha interna, com níveis mais altos resultando em perda auditiva acentuada.³⁵ Nesse estudo, utilizamos maior quantidade de GM do que a dosagem utilizada por Kimura et al. Uma vez que a limitação do presente estudo é a não-demonstração dos efeitos terapêuticos de KR-12-a2 em modelos animais, estudos de seguimento *in vivo* são considerados necessários. Assim, pesquisas futuras serão focadas na avaliação dos efeitos do uso tópico de KR-12-a2 utilizando um modelo animal de otite causada por MRSA.

Conclusão

Em nosso experimento, a solução de KR-12-a2 aplicada topicamente não causou perda auditiva ou dano coclear em cobaias. A solução de KR-12-a2 pode ser utilizada como gotas otológicas para o tratamento de otorreia causada por MRSA; no entanto, são necessárias outras avaliações, tais como a definição da concentração e associações ideais.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Marzouk HA, Nathawad R, Hammerschlag MR, Weedon J, Bachman D, Goldstein NA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in otitis-prone children. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;137:1217–22.
- Jang CH, Park H, Cho YB, Choi CH. Effect of vancomycin-coated tympanostomy tubes on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation: in vitro study. J Laryngol Otol. 2010;124:594–8.
- Lee SK, Yeo SG, Hong SM, Sim JS, Hong CK, Lee YC, et al. Bacteriology of chronic otitis media: changing of detection rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg. 2008;51:9–15.
- Isaacson G, Aronoff SC. Linezolid for tympanostomy tube otorrhea caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multiple drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2008;72:647–51.
- Cheng J, Javia L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pediatric tympanostomy tube otorrhea. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2012;76:1795–8.
- Chang SC, Hsieh SM, Chen ML, Sheng WH, Chen YC. Oral fusidic acid fails to eradicate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and results in emergence of fusidic acid-resistant strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;36:131–6.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 1997;40:135–6.
- Jang CH, Song CH, Wang PC. Topical vancomycin for chronic suppurative otitis media with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* otorrhea. J Laryngol Otol. 2004;118:645–7.
- Moghaddam MM, Aghamollaei H, Kooshki H, Heiat M, Mirneajad R, Barzi NS. The development of antimicrobial peptides as an approach to prevention of antibiotic resistance. Rev Med Microbiol. 2015;26:98–110.
- Cheng J, Javia L. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) pediatric tympanostomy tube otorrhea. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2012;76:1795–8.
- Pence MA, Haste NM, Meharena HS, Olson J, Gallo RL, Nizet V, et al. Beta-lactamase repressor Blal modulates *Staphylococcus aureus* cathelicidin antimicrobial peptide resistance and virulence. PLOS ONE. 2015;25:e0136605.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 2006;19:491–511.
- Yoon YJ. Presence of hBD-1 and hBD-2 in human cerumen and external auditory canal skin. Acta Otolaryngol. 2008;128:871–5.
- Harris RH, Wilk D, Bevins CL, Munson RS Jr, Bakaletz LO. Identification and characterization of a mucosal antimicrobial peptide expressed by the chinchilla (*Chinchilla lanigera*) airway. J Biol Chem. 2004;279:20250–6.
- Moon SK, Lee HY, Li JD, Nagura M, Kang SH, Chun YM, et al. Activation of a Src-dependent Raf-MEK1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1alpha-induced upregulation of beta-defensin 2 in human middle ear epithelial cells. Biochim Biophys Acta. 2002;1590:41–51.
- Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. J Biol Chem. 1998;273:3718–24.
- Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. Infect Immun. 1995;63:1291–7.
- Ciornei CD, Sigurdardóttir T, Schmidtchen A, Bodelsson M. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2845–50.
- Jacob B, Park IS, Bang JK, Shin SY. Short KR-12 analogs designed from human cathelicidin LL-37 possessing both antimicrobial and antiendotoxic activities without mammalian cell toxicity. J Pept Sci. 2013;19:700–7.
- Fishman I, Sykes KJ, Horvat R, Selvarangan R, Newland J, Wei JL. Demographics and microbiology of otorrhea through patent tubes failing otological and/or oral antibiotic therapy. Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;145:1025–9.
- Lutz H, Lenzr T, Weldauer H, Federspil P, Hoth S. Ototoxicity of vancomycin: an experimental study in guinea pigs. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1991;53:273–8.
- de Hoog M, van Zanten BA, Hop WC, Overbosch E, Weisglas-Kuperus N, van den Anker JN. Newborn hearing screening: tobramycin and vancomycin are not risk factors for hearing loss. J Pediatr. 2003;142:41–6.
- Yang HC, Cho YB, Jang CH. Efficacy of tympanoplasty without mastoidectomy on MRSA-infected chronic otitis media. Otol Neurotol. 2014;35:976–80.
- Anagnostakos K, Koch K. Pharmacokinetic properties and systemic safety of vancomycin-impregnated cancellous bone grafts in the treatment of spondylodiscitis. Biomed Res Int. 2013;2013:358217.
- Mandal SM, Ghosh AK, Pati BR. Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S aureus* strains isolated from hospital effluents. Am J Infect Control. 2015;43:e87–8.
- Oshima H, Nomura K, Yamazaki M, Suzuki J, Kawase T, Kobayashi T, et al. Ototoxic effect of daptomycin applied to the guinea pig middle ear. Acta Otolaryngol. 2014;134:679–83.
- Cameron DR, Jiang JH, Abbott IJ, Spelman DW, Peleg AY. Draft genome sequences of clinical daptomycin-nonsusceptible methicillin-resistant *staphylococcus aureus* strain APS211 and its daptomycin-susceptible progenitor APS210. Genome Announc. 2015;11:3.
- Liaqat F, Sheikh AA, Nazir J, Hussain T, Rabbani M, Shaheen AY, et al. Report-isolation identification and control of vancomycin resistant *staphylococcus aureus*. Pak J Pharm Sci. 2015;28:997–1004.
- Ruan Y, Shen T, Wang Y, Hou M, Li J, Sun T. Antimicrobial peptide LL-37 attenuates LTA induced inflammatory effect in macrophages. Int Immunopharmacol. 2013;15:575–80.
- Bals R, Wilson JM. Cathelicidins – a family of multi-functional antimicrobial peptides. Cell Mol Life Sci. 2003;60:711–20.
- Hou M, Zhang N, Yang J, Meng X, Yang R, Li J, et al. Antimicrobial peptide LL-37 and IDR-1 ameliorate MRSA pneumonia in vivo. Cell Physiol Biochem. 2013;32:614–23.
- Matz GJ. Aminoglycoside cochlear ototoxicity. Otolaryngol Clin N Am. 1993;6:705–12.
- Sheppard WM, Wanamaker HH, Pack A, Yamamoto S, Slepceky N. Direct round window application of gentamicin with varying delivery vehicles: a comparison of ototoxicity. Otolaryngol Head Neck Surg. 2004;131:890–6.
- Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity of hair cell protection. Int J Otolaryngol. 2011;2011:937861. Epub.
- Kimura R, Iverson N, Sothard R. Selective lesions of the vestibular labyrinth. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1988;97:577–84.