



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Análise Comparativa de Dois Peptídeos Antibacterianos
Bioinspirados em Mastoparano-L**

Karen Garcia Nogueira Oshiro

Campo Grande – MS
Março de 2018



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Análise Comparativa de Dois Peptídeos Antibacterianos
Bioinspirados em Mastoparano-L**

Autora: Karen Garcia Nogueira Oshiro
Orientador: Octávio Luiz Franco

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde"

Campo Grande – MS
Março de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

O82a Oshiro, Karen Garcia Nogueira
Análise comparativa de dois peptídeos antibacterianos bioinspirados em mastoparano-I. / Karen Garcia Nogueira Oshiro; orientador Octávio Luiz Franco -- 2018
75 f. + anexos.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Peptídeos 2. Biotecnologia 3. Bactérias 4. Mastoparano I. Franco, Octávio Luiz II. Título.

CDD: 579.3



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

Análise Comparativa de Dois Peptídeos Antibacterianos Bioinspirados em Mastoparano-L

Autora: Karen Garcia Nogueira Oshiro

Orientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 09 de março de 2018.

Prof. Dr. Octavio Luiz Franco - UCDB

Prof. Dr. Osmar Nascimento Silva - UCDB

Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira - UFMS

*“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é
justificativa suficiente para nossa busca contínua”*

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, pela oportunidade, orientação e ensinamentos; por abrir as portas da ciência em novas áreas de conhecimento das quais não possuía experiência e por acreditar que isso daria certo. Pela disponibilidade de recursos para o desenvolvimento deste trabalho, por investir seu tempo em reuniões e correções, pela confiança depositada e por incentivar minha capacidade de realizar esse mestrado.

Ao meu co-orientador, parceiro de bancada e amigo, Marlon Henrique Cardoso, pela orientação e paciência em ensinar bioinformática, desde os primeiros passos no Linux aos desafios do “procura no Google”. Pelos ensinamentos e parceria no laboratório de microbiologia, pela dedicação e conselhos de como lidar com as correções. Pela preocupação dentro e fora da vida acadêmica, tornando os dias difíceis de laboratório mais divertidos. Obrigada por tudo e por todo seu apoio!

Agradeço pela parceria de bancada e amizade, Elizabete de Souza Cândido, Silvia Gomes Rodrigues, Leonardo Tonet, Esther Vilas Boas de Carvalho, Samilla Beatriz de Rezende e Elizangela Barros. Com vocês foi bem-humorado e fácil de lidar com os imprevistos dos experimentos, com as horas esperando as bactérias crescerem, com a correria de quando elas crescem demais. Obrigada pela paciência e companheirismo de quando os experimentos não davam certo. Sem dúvida as conversas descontraídas e risadas tornavam nossas rotinas de laboratório melhores.

Aos amigos do *S-Inova Biotech*, Beatriz Meneguetti, Ingrid Baptista, Rosângela dos Santos e Suzana Meira, pela ajuda no dia-a-dia, pelas discussões e colaborações nos trabalhos, pelas sugestões nas apresentações e pelos momentos de diversão nas confraternizações. Agradeço a técnica de laboratório Dayane dos Santos, por todo auxílio e atenção com nossos materiais de experimento.

A minha aluna de Iniciação Científica, Bruna Monges, pela oportunidade de aprender a orientar e aprender junto sobre novos desafios.

A secretária do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Silvia da Cruz, por ajudar a resolver nossos problemas burocráticos e pela paciência em lidar com nossas ansiedades. A secretária do professor Octávio, Mayra Ventrelha, pela disponibilidade em marcar nossas reuniões.

A todas as instituições dos colaboradores deste trabalho, *S-Inova Biotech* da Universidade Católica Dom Bosco, Universidade de Brasília (UnB), ao Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas (CAPB) da Universidade Católica de Brasília. Aos colaboradores César de la Fuente-Nuñez, Marcelo Torres e Timothy Lu do *Massachusetts Institute of Technology (MIT)*, aos colaboradores Lai Yue Chan (Angeline) e David Craik do *Institute for Molecular Bioscience (IMB)*, University of Queensland.

Aos membros da minha banca de qualificação, Maria Ligia Macedo e Ruy Caldas, por todas as sugestões e correções. Aos participantes da banca de defesa, Caio Oliveira e Osmar Silva por aceitarem o convite e dedicação à leitura dessa dissertação. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia que de alguma forma ajudaram em minha formação.

A CAPES, por financiar minha bolsa de estudos e as instituições de fomento CNPq e FUNDECT.

Aos meus pais, Almir Oshiro e Eni L. G. Nogueira e aos meus irmãos Kleiton e Murilo, pelo incentivo e paciência. Aos familiares e amigos que sempre me incentivaram, obrigada pelos momentos de descontração e companheirismo.

A todos aqueles que contribuíram e fizeram parte desse projeto, muito obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
INFECÇÕES BACTERIANAS	16
RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	17
BIOFILMES BACTERIANOS.....	18
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	21
MECANISMOS DE AÇÃO DE PAMs	23
MASTOPARANOS	26
SELEÇÃO DE PAMS.....	31
JUSTIFICATIVA	35
OBJETIVO GERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
SELEÇÃO DOS ANÁLOGOS DE MASTOPARANO E SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	37
ENSAIOS ANTIMICROBIANOS E HEMOLÍTICOS	37
SÍNTESE QUÍMICA E ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE R1 E R539	
ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	39
ENSAIO DE ERRADICAÇÃO DE BIOFILMES PRÉ-FORMADOS	40
ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	40
DICROÍSMO CIRCULAR	42
MODELAGEM MOLECULAR.....	42
DINÂMICA MOLECULAR.....	43
RESULTADOS	44
ANÁLOGOS DE MASTOPARANO E SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .	44
SÍNTESE QUÍMICA E ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MASTOPARANO-L, -R1 E -R5	47
ENSAIOS IN VITRO	49
ANÁLISES ESTRUTURAIS.....	53
DISCUSSÃO	61

CONCLUSÕES	66
PERSPECTIVAS.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS	77

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Relação de mastoparanos apresentados pelo nome, sequência, alvo e mecanismo de ação. 30

Tabela 2. Comparação entre as sequências de mastoparano-L (Hori et al., 2001), R1 e R5, destacando em vermelho o padrão mantido nas sequências; propriedades físico-químicas e predição das probabilidades para antimicrobianos através das análises: máquina de vetores de suporte (SVM), *random forest* (RF), análise discriminante (DA) e rede neural artificial (ANN), usando o servidor *Collection of Anti-Microbial Peptides* (CAMP_{R3}) (Waghu et al., 2015)..... 46

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) para os peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 contra cepas bacterianas Gram-positivas e -negativas, susceptível e resistentes. 50

Tabela 4. Atividade citotóxica (IC₅₀) de mastoparano-L, R1 e R5 contra adipócitos de camundongos (3T3-L1) e células endoteliais de humanos (HUVEC), bem como suas propriedades hemolíticas frente a eritrócitos humanos. 51

Tabela 5. Conteúdo de hélice dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5. O teor de hélice para todos os peptídeos foi calculado a partir da elipticidade média residual em 222 nm ($[\theta]_{222}$) de acordo com a seguinte equação: %hélice = $100 ([\theta]_{222}/(-39,500(1-2.57/n)))$ onde n constitui o número total de ligações peptídicas. 55

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento de biofilmes bacterianos destacando os estágios de adesão, crescimento sésil, maturação e dispersão. Figura adaptada (Vlamakis et al., 2013).20

Figura 2. Estruturas tridimensionais de peptídeos antimicrobianos. Em (a) conformação de α -hélice, magainina-2 (PDB 2MAG); (b) conformação em folha- β , tachiplisina-I (PDB 1WO1); (c) estrutura estendida ou *coil*, indolicidina (PDB 1G89); (d) mistura de α -hélice e folha- β , defensina-A de inseto (PDB 1ICA). Ligações dissulfeto destacadas em *sticks* amarelo, átomos de nitrogênio em azul e átomos de oxigênio em vermelho.22

Figura 3. Mecanismos de ação em membranas, destacando a formação de poro toroidal ordenado ou desordenado, modelo carpete, modelo barril, afinamento ou espessamento da membrana, bem como o agrupamento de lipídeos carregados, a formação de intermediários de não bicamada, a interação com alvos de lipídeos oxidados, o carregamento aniônico, a despolarização da membrana e, por fim, a eletroporação da membrana bacteriana. Figura adaptada de Nguyen e colaboradores (2011).24

Figura 4. Mecanismos de ação intracelular propostos para os PAMs em células bacterianas, podendo atuar: (a) na inibição da replicação de DNA, (b) na inibição da transcrição do DNA, (c) no bloqueio da síntese de RNA, (d) na inibição das funções ribossomais e síntese proteica, (e) no bloqueio de proteínas chaperonas necessárias para dobramento adequado de proteínas e (f) na modificação do sítio de enzimas. 26

Figura 5. Estrutura tridimensional de mastoparano-L (PDB: 1D7N) resolvido por ressonância magnética nuclear. Representação da disposição dos resíduos de aminoácidos ao longo da cadeia principal (Hori et al., 2001); em ciano, resíduos apolares; em amarelo resíduos polares e em verde resíduos polares não carregados. Átomos de nitrogênio e oxigênio estão destacados em azul e vermelho, respectivamente.28

Figura 6. As sequências de mastoparano-L (PDB 1D7N) (a) e seus análogos R1 (b) e R5 (c) apresentadas como diagrama em hélice, mostrando a distribuição de resíduos de aminoácidos por posição ao longo de uma estrutura helicoidal. Os resíduos hidrofílicos estão representados como círculos, resíduos hidrofóbicos em formato de diamantes, carregados negativamente como triângulos, e carregados positivamente como pentágonos. Os gradientes de hidrofobicidade estão codificados por cores sendo o resíduo mais hidrofóbico, verde, e menos hidrofóbicos (zero) representados em amarelo.....46

Figura 7. Análises por espectrometria de massas (MALDI-ToF) de (a) mastoparano-L revelando um íon m/z de 1479,89, (b) R1 revelando um íon m/z de 1636,14 Da, e (c) R5 revelando um íon m/z de 1636,39 Da.48

Figura 8. Análise de erradicação de biofilmes de *P. aeruginosa* (PAO1) na ausência (controle) e presença dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 a 16 µM. (a) Biofilme pré-formado de *P. aeruginosa* antes do tratamento (controle) e (b) tratado com mastoparano-L, (c) -R1 e (d) e -R5.51

Figura 9. Ensaio de citotoxicidade contra (a) adipócitos de camundongos (3T3-L1) e (b) células endoteliais humanas (HUVEC) apresentando no eixo x as concentrações dos peptídeos em µM, eixo y a porcentagem de viabilidade celular, as linhas pontilhadas representam 50% da viabilidade celular em relação à concentração de peptídeo testado. Em escalas de cinza as linhas representam: preto, mastoparano-L; cinza escuro, mastoparano-R1 e cinza claro, mastoparano-R5.....52

Figura 10. Percentual de hemólise dos peptídeos mastoparano-L (barra cor preta), R1 (barra cinza claro) e R5 (barra cinza escuro) nas concentrações de 100 µM frente a eritrócitos humanos. Melitina (barra cinza claro) testada até 20 µM foi utilizado com um dos controles positivos para este ensaio. Eixo y representa a porcentagem de hemólise e a linha pontilhada representa 50% da viabilidade celular em relação à concentração de peptídeo testado.....53

Figura 11. Análise de dicroísmo circular dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5. Espectros de DC em (a) água ultrapura, (b) tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,4), (c) TFE 30% em água (v/v) e (d) SDS 50 mM.....54

Figura 12. Modelos tridimensionais teóricos e superfícies eletrostáticas para (a) mastoparano-L (1D7N), (b) R1 (c) R5. Em ciano, resíduos apolares; em amarelo, resíduos polares e em verde resíduos polares não carregados. O potencial eletrostático dos modelos foi calculado através do Adaptive Poisson-Boltzmann solver (APBS), com potenciais variando de -5 kT/e (vermelho) a +5 kT/e (azul).58

Figura 13. Estruturas teóricas tridimensionais (a) mastoparanos-L, (b) R1 e (c) R5 em água; (d) mastoparanos-L, (e) R1 e (f) R5 em TFE 30%; (g) mastoparano-L, (h) R1 e (i) R5 em micelas de SDS.59

Figura 14. Representação dos parâmetros resultantes de simulações de dinâmica molecular onde foram analisados: desvio médio quadrático (RMSD), flutuação média quadrática (RMSF) e raio de giro. Em (a), (b) e (c) análises em água; (d), (e) e (f) análises em TFE 30%; (g), (h) e (i) em micelas de SDS. As cores representam os peptídeos mastoparano-L (preto); R1 (vermelho); R5 (verde)..... 60

RESUMO

Diversos peptídeos vêm sendo avaliados acerca de suas atividades contra microrganismos patogênicos. Dentre estes, os mastoparanos demonstram potencial biotecnológico devido às suas propriedades multifuncionais, incluindo sinalização celular, degranulação de mastócitos, ação hemolítica e atividades antimicrobianas. Mastoparanos-R1 e -R5 foram bioinspirados através do algoritmo *Joker* e selecionados visando o aumento do potencial antimicrobiano de mastoparano-L e redução das propriedades hemolíticas. Os peptídeos foram sintetizados por *F-moc* e analisados por *MALDI-ToF*, revelando íons *m/z* de 1636,14Da (R1) e 1636,39Da (R5). As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) mostraram que os peptídeos R1 e R5 foram capazes de inibir, em menores concentrações, cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Além disso, R1 e R5 foram capazes de erradicar os biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa*. Os ensaios de citotoxicidade contra células 3T3-L1 e células HUVEC indicam que o peptídeo mastoparano-L apresenta atividade citotóxica a 12,5 e 50 μ M (IC50), respectivamente. Nas concentrações máximas (100 μ M) testadas, não foram observadas atividades citotóxicas para os peptídeos R1 e R5. A avaliação do potencial hemolítico mostrou que a 100 μ M, mastoparano-L induziu mais de 45% de hemólise, enquanto que R1 e R5 causaram menos de 10%. Análises de dicroísmo circular (DC) revelaram que o peptídeo mastoparano-L mostrou maior conteúdo de hélice em água e tampão em relação a R1 e R5. Em TFE 30%, foi possível observar características de α -hélice para o peptídeo mastoparano-L, e em menor intensidade para R1 e R5. Em SDS (50mM), todos os peptídeos apresentaram bandas bem definidas e intensas com alto conteúdo helicoidal. Simulações de dinâmica molecular foram realizadas durante 100ns a fim de se determinar a trajetória dos peptídeos em condições similares às utilizadas no DC. Foi observado que estas moléculas apresentam instabilidade em ambiente hidrofílico. Em TFE e SDS os peptídeos apresentaram formação de α -hélice. Assim, R1 e R5 foram aqui caracterizados como peptídeos helicoidais ambiente-dependente, possuindo atividades antibacterianas promissoras contra cepas susceptíveis e resistentes, bem como potencial de erradicar biofilmes pré-formados, sem apresentar atividades hemolíticas ou citotóxicas.

Palavras-chave: mastoparano, PAMs, resistência bacteriana, biofísica.

ABSTRACT

Several peptides have been evaluated regarding their activities against pathogenic microorganisms. Among these, mastoparans demonstrate biotechnological potential due to their multifunctional properties, including cell signaling, mast cell degranulation, hemolytic activity and antimicrobial activities. Mastoparans-R1 and -R5 were bioinspired through the Joker algorithm, and further selected aiming to increase the antimicrobial potential of mastoparan-L and to reduce the hemolytic properties. The peptides were synthesized by F-moc and analyzed by MALDI-ToF, revealing m/z ions of 1636.14 Da (R1) and 1636.39 Da (R5). Minimal inhibitory concentrations (MICs) showed that R1 and R5 peptides were able to inhibit, at lower concentrations, *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains. In addition, R1 and R5 were able to eradicate *P. aeruginosa* preformed biofilms. The cytotoxicity assays against 3T3-L1 cells and HUVEC cells showed that mastoparan-L exhibits cytotoxic activity at 12.5 and 50 μM (IC₅₀), respectively. At the maximum concentrations (100 μM) tested, no cytotoxic activities were observed for the peptides R1 and R5. The evaluation of the hemolytic potential showed that, at 100 μM , mastoparan-L induced more than 45% hemolysis, whereas R1 and R5 caused less than 10%. Circular dichroism (CD) analysis revealed that mastoparan-L showed higher helical content in water and buffer compared to R1 and R5. In 30% TFE, it could be observed α -helical characteristics for mastoparan-L, and in lower intensities for R1 and R5. In SDS (50 mM), all the peptides obtained well defined and intense bands with high α -helical content. Molecular dynamics simulations were performed during 100 ns to determine the trajectory of the peptides under conditions similar to those used in the CD. It was observed that these molecules presented instability in hydrophilic environment. In TFE and SDS the peptides presented α -helix formation. Thus, R1 and R5 were here characterized as environment-dependent α -helical peptides, showing promising antibacterial activities against susceptible and resistant strains, as well as having the potential to eradicate preformed biofilms, without presenting hemolytic or cytotoxic activities.

Keywords: mastoparan, AMPs, bacterial resistance, biophysics

INTRODUÇÃO

INFECÇÕES BACTERIANAS

As infecções bacterianas e infecções persistentes estão entre as maiores ameaças para a saúde humana, impactando diretamente altos níveis de morbidade e mortalidade (Fisher *et al.*, 2017). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2001) pacientes com infecções causadas por bactérias resistentes possuem um maior risco de desfechos clínicos não efetivos e falecimento, além de consumirem mais recursos públicos quando comparados àqueles pacientes infectados por cepas não resistentes. Somado a isso, a OMS estima ainda que 13 milhões de mortes possam ser atribuídas a eventos de infecções bacterianas em 2050 (Organization, 2015). Sendo assim, podemos levar em conta alguns fatores que favorecem o surgimento e o ressurgimento de doenças infecciosas, como por exemplo, a adaptação e a mudança microbiana, susceptibilidade humana à infecção, mudanças de ecossistemas, desigualdade social, globalização e o uso indiscriminado de antibióticos (Who, 2001; Lederberg *et al.*, 2003; Morens *et al.*, 2004).

Estima-se que os antibióticos têm sido fabricados em uma escala de aproximadamente 100.000 toneladas anualmente (Who, 2001), sendo seu uso de profundo impacto na pressão seletiva de cepas bacterianas patogênicas. Bactérias do grupo *ESKAPE*, por exemplo, vem sendo frequentemente associadas a estes eventos de resistência (Rice, 2008). O grupo *ESKAPE* caracteriza-se por ser composto pelos patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter spp.*; e atualmente constituem grande parte das infecções hospitalares (Lederberg *et al.*, 2003; Rice, 2008). Dentre as cepas citadas, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram recentemente listadas pela OMS (Who, 2017) como parte de uma lista global prioritária de bactérias resistentes a antibióticos carbapenêmicos, tornando importante maiores estudos relacionados a essas bactérias.

RESISTÊNCIA BACTERIANA

Mecanismos de resistência resultaram no desenvolvimento simultâneo de bactérias resistentes a várias classes de antibióticos, sendo assim, essas cepas ficaram conhecidas também como “superbactérias” (Alanis, 2005). Bactérias podem ser altamente eficientes na síntese e compartilhamento de genes levando ao desenvolvimento e propagação de mecanismos de resistência aos antibióticos (Peleg e Hooper, 2010). Estes microrganismos podem ser intrinsecamente resistentes a determinados antibióticos, podendo também adquirir resistência através de mutações em seus genes cromossômicos e por transferência horizontal de genes (Blair *et al.*, 2015).

A resistência intrínseca de uma bactéria a um antibiótico específico pode ser explicada pela sua capacidade de resistir à ação deste fármaco como resultado de características estruturais ou funcionais inerentes, como por exemplo, a ausência de um alvo susceptível de um antibiótico específico (Blair *et al.*, 2015). Estudos levaram à identificação de diversos genes responsáveis pela resistência intrínseca a diferentes classes de antibióticos, incluindo β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Nikaido, 2009; Blair *et al.*, 2015). Estudos com bactérias Gram-negativas têm mostrado mecanismos que visam a forma como os medicamentos são transportados, incluindo a atividade seletiva de porinas, bloqueio de penetração de drogas e bombas de efluxo (Nikaido, 2009; Llarrull *et al.*, 2010). Mecanismos como o de permeabilização de membrana acontecem onde possa haver a redução da permeabilidade da membrana externa e limitar a entrada de antibiótico na célula bacteriana, isto pode ser possível pela regulação negativa da porinas ou pela substituição de porinas por canais mais seletivos (Fernández e Hancock, 2012). A regulação de efluxo acontece onde as bombas de efluxo bacterianas transportam ativamente diversos antibióticos para fora da célula e podem ser os principais contribuintes para a resistência intrínseca de bactérias (Fernández e Hancock, 2012). Podemos citar também as alterações em alvos dos antibióticos por mutação, onde as alterações na estrutura alvo impedem a ligação eficiente do antibiótico, porém ainda permitindo o alvo de realizar a sua função (Wright, 2011).

A resistência adquirida pode ocorrer por meio de mutações pontuais ou através da aquisição de outro material genético (Hollenbeck e Rice, 2012). O tipo mais frequente de resistência adquirida pode ser transmitido horizontalmente através da

conjugação de plasmídeos (Alanis, 2005) ou através do movimento de transposons (Hollenbeck e Rice, 2012). Um exemplo de resistência mutacional consiste no desenvolvimento de resistência a rifamicina (RIF). A RIF bloqueia a transcrição bacteriana por inibição da polimerase de ácido ribonucleico (RNA) dependente do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Munita e Arias, 2016). Essas mutações resultam na diminuição da afinidade do fármaco por seu alvo, o qual geralmente poupa a atividade catalítica da polimerase, permitindo a transcrição (Floss e Yu, 2005). Hooper (2002) mostrou outro exemplo bem caracterizado de resistência mutacional envolvendo fluoroquinolonas (FQ). O mecanismo de resistência FQ ocorre através do desenvolvimento de mutações cromossômicas nos genes que codificam as subunidades de enzimas ligadas ao DNA, as quais alteram a replicação do DNA (DNA-girase e topoisomerase). O nível de resistência adquirido por alterações em desenvolvimento em uma das enzimas dependerá da potência com a qual o agente antimicrobiano inibe ou inativa o alvo (Hooper, 2002). Além disso, foi relatada a existência de regiões multirresistentes compostas por elementos móveis, como integrons e transposons, os quais uma vez combinados, podem contribuir ativamente para a resistência bacteriana (Osborn e Böltner, 2002; Wellington *et al.*, 2013). Além destes mecanismos citados, uma das formas das bactérias tornarem-se resistentes tanto física quanto quimicamente pode ser através da formação de biofilmes (O'toole *et al.*, 2000)

BIOFILMES BACTERIANOS

Estudos indicam que os mecanismos de resistência podem estar ligados à virulência das cepas e mecanismos de adaptação para sobreviver sob condições de estresse (Martínez e Baquero, 2002). Em casos de exposição constante, por exemplo, a agentes antimicrobianos, limitação de nutrientes e alteração de temperatura, cepas bacterianas podem vir a se desenvolver e formar comunidades multicelulares aderentes a superfícies bióticas e/ou abióticas, denominadas biofilmes (Costerton *et al.*, 1999; De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013). Biofilmes podem ser definidos como um consórcio estruturado uni ou polimicrobiano, possuindo uma matriz extracelular de polissacarídeo(s), proteínas e DNA (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013). O desenvolvimento de biofilmes inicia-se a partir de células bacterianas planctônicas (livre-nadantes) que se aderem às superfícies formando colônias que,

com o tempo, passam a secretar uma matriz extracelular e, assim, criam uma barreira física (Kostakioti *et al.*, 2013) (Figura 1). Outro mecanismo utilizado pelas bactérias para desencadear a formação de biofilmes, bem como mediar sua maturação, denomina-se *quorum sensing*, sendo este definido como a regulação da expressão gênica em resposta às flutuações da densidade populacional celular (Miller e Bassler, 2001). Ademais, uma vez desenvolvido o biofilme, células maduras dentro da população começam a se dispersar, sendo esta uma fase essencial para o fechamento do ciclo dos biofilmes, permitindo que as células se espalhem e colonizem novas superfícies (O'toole *et al.*, 2000; Miller e Bassler, 2001; De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013).

Alguns autores afirmam que as infecções hospitalares podem ser, em sua maioria, causadas por biofilmes bacterianos (Costerton *et al.*, 1999; Weiss e Mcmichael, 2004; Römling e Balsalobre, 2012), representando 65% a 80% das infecções bacterianas em humanos (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013). A formação de biofilmes caracteriza-se, portanto, como um processo de desenvolvimento orientado ambientalmente que aumenta a resistência ao estresse exógeno, permitindo a sobrevivência de microrganismos em condições desfavoráveis (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013).

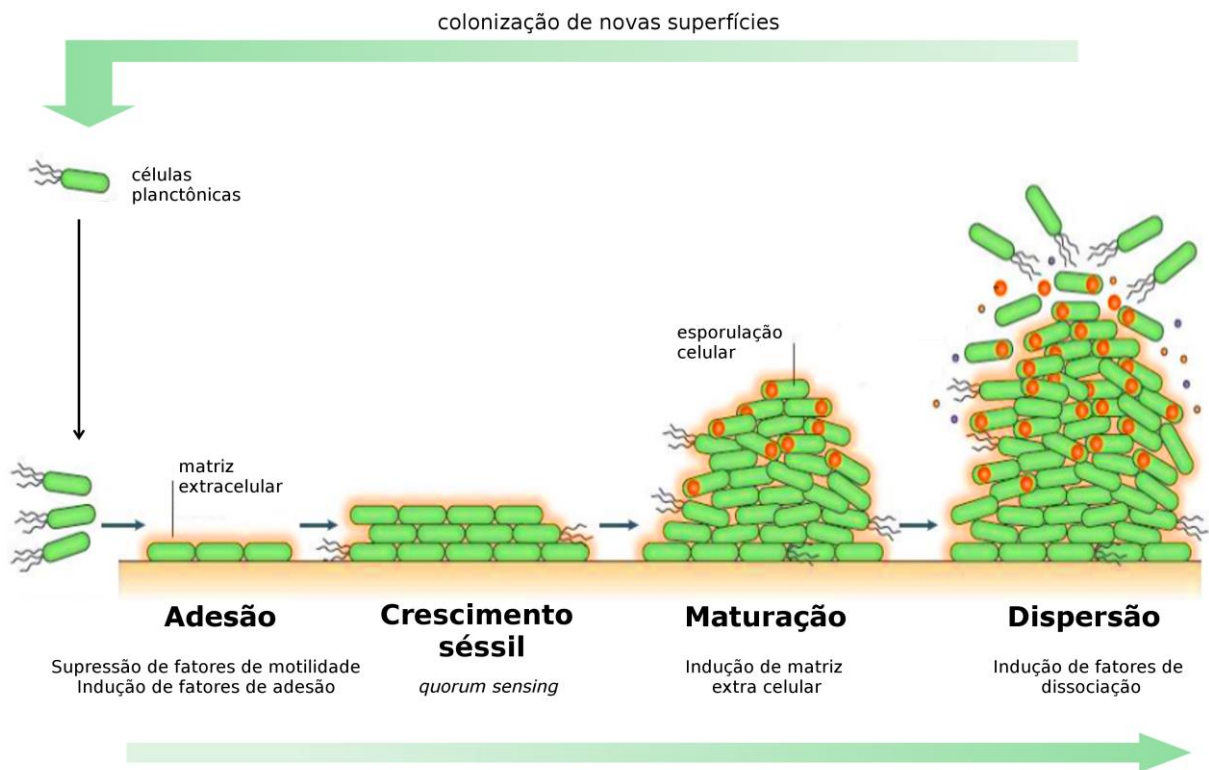


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento de biofilmes bacterianos destacando os estágios de adesão, crescimento sésil, maturação e dispersão. Figura adaptada (Vlamakis et al., 2013).

Devido à seleção de microrganismos resistentes a antibióticos, aliado a decrescente taxa de descoberta/desenvolvimento destes, bem como visando novas estratégias para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra bactérias em sua forma planctônica e biofilmes, pesquisadores vem buscando o desenvolvimento de novos compostos bioativos eficazes no combate a estes microrganismos (Gallo *et al.*, 2002; De La Fuente-Núñez *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2016). Dentro deste cenário, peptídeos catiônicos têm sido considerados como uma alternativa aos tratamentos antibacterianos e antibiofilmes convencionais (Marr *et al.*, 2006; Lai e Gallo, 2009).

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos podem ser produzidos como parte do sistema de defesa (sistema imune inato) do hospedeiro durante um processo de infecção (Zaslouff *et al.*, 1988; Hancock e Diamond, 2000). Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgiram como uma nova proposta para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que estes podem atuar no combate a patógenos humanos como bactérias, vírus, fungos e protozoários (Reddy *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2011). PAMs pertencem a um grupo diverso de moléculas produzidas por diversos tecidos e tipos celulares em uma variedade de organismos, incluindo plantas, animais invertebrados, vertebrados, fungos e bactérias (Brogden, 2005). Essas moléculas podem ser responsáveis por possuir reconhecimento molecular e por diversas atividades biológicas, incluindo sua atuação como neurotransmissores, hormônios, toxinas e antibióticos (Izadpanah e Gallo, 2005).

PAMs consistem em moléculas relativamente pequenas (<10 kDa), catiônicas e anfipáticas (organização de uma face hidrofóbica e outra hidrofílica) (Brogden, 2005), sendo em sua maioria constituídas de 6 a 50 resíduos de aminoácidos e possuindo carga líquida positiva (Scott *et al.*, 1999; Hancock e Patrzykat, 2002; Bradshaw, 2003). A presença de resíduos como arginina, lisina e histidina influenciam diretamente no caráter catiônico dos PAMs (Hancock e Scott, 2000). Alguns estudos mostram ainda que a carga líquida destes peptídeos está relacionada às suas atividades antimicrobiana, hemolítica e citotóxica (Lorin *et al.*, 2005).

Baseados em suas características físico-químicas, peptídeos catiônicos podem possuir diversas conformações estruturais (Dennison *et al.*, 2005). Pesquisadores vêm relatando que os PAMs podem ser agrupados com base em quatro classes principais: α -hélice (Figura 2a), folha- β (Figura 2b), peptídeos lineares ou em *coil* (Figura 2c), incluindo a mistura de α -hélice e folha- β (Figura 2d) (Giuliani *et al.*, 2007). Entretanto, existe uma gama de estruturas que estes peptídeos podem adotar, como por exemplo, estruturas em *loop* e peptídeos estendidos, estruturas em grampos (β -*hairpin*) (Blanco *et al.*, 1994; Hancock e Lehrer, 1998), peptídeos cíclicos (Joo, 2012), além de peptídeos com composições de aminoácidos únicos (Epanand e Vogel, 1999), bem como peptídeos L- e D-enantiômeros, diastereoisômeros e retro-

inversos (Petsko, 1992). Estruturas helicoidais dependem de fatores como a disposição dos resíduos de aminoácidos ao longo da sequência, a cadeia lateral destes resíduos, sua carga (positiva ou negativa), isomeria dos resíduos (L- ou D-aminoácidos) e o ambiente em que estão inseridos (Papo e Shai, 2003). Já as estruturas em folha- β podem se organizar nos sentidos paralelo e antiparalelo. Para isto geralmente os peptídeos se formam a partir de cadeias polipeptídicas determinadas, geralmente, pela presença de resíduos de cisteína responsáveis pela formação de ligações dissulfeto, conferindo maior estabilidade estrutural ao peptídeo (Broekaert *et al.*, 1997; Braff e Gallo, 2006).

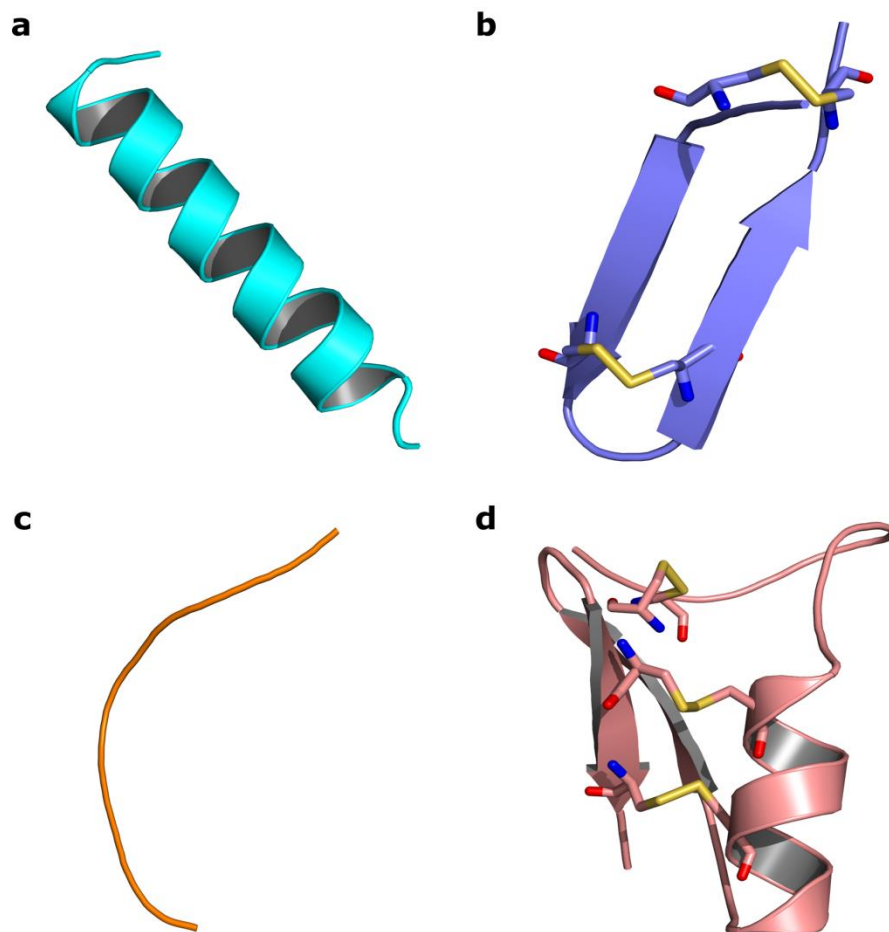


Figura 2. Estruturas tridimensionais de peptídeos antimicrobianos. Em (a) conformação de α -hélice, magainina-2 (PDB 2MAG); (b) conformação em folha- β , tachiplisina-I (PDB 1WO1); (c) estrutura estendida ou *coil*, indolicidina (PDB 1G89); (d) mistura de α -hélice e folha- β , defensina-A de inseto (PDB 1ICA). Ligações dissulfeto destacadas em *sticks* amarelo, átomos de nitrogênio em azul e átomos de oxigênio em vermelho.

MECANISMOS DE AÇÃO DE PAMs

PAMs possuem diversos mecanismos de ação (Epsand e Vogel, 1999). Estudos indicam que a interação de PAMs com membranas tende a se dividir em duas classes de mecanismos: (i) ruptura de membranas e (ii) alvos intracelulares (Powers e Hancock, 2003). Ainda que não exista um consenso universal relacionado aos mecanismos de ação dessas moléculas, os modelos de permeabilização de membrana têm sido propostos no meio acadêmico e aceitos com base em diversas investigações (Nguyen *et al.*, 2011). Interações peptídeo-membrana tornam-se de fundamental importância na compreensão dos mecanismos de ação destas moléculas, uma vez que os PAMs possuem como característica sua capacidade de interagir com membranas bacterianas (Hancock e Rozek, 2002). Este mecanismo molecular e a via de permeabilização de membranas podem variar de acordo com o peptídeo. Além disso, alterações na sequência de aminoácidos, composição lipídica da membrana e concentração de peptídeo também podem interferir no mecanismo de ação (Shai, 2002). Durante o evento de permeabilização de membranas pode-se observar a liberação de íons e metabólitos intracelulares, interrupção de processos respiratórios, despolarização da membrana e, por fim, a morte celular (Pelegrini *et al.*, 2011). Estas interações podem ser realizadas de diversas formas, onde na maioria das vezes apresentam-se descritas como formação de poros, sendo divididos em modelos toroidal e barril; e modelo tapete (ou tapete) (Figura 3). A formação de poros geralmente pode ser coordenada pelos grupos lipídicos com a parte polar e os feixes da hélice que se orientam de forma vertical no interior da membrana. O modelo toroidal, por exemplo, constitui poros toroidais nas bicamadas lipídicas, agregando-se às camadas de forma intercalada. Já no modelo barril as hélices peptídicas formam um feixe na membrana com um lúmen central, muito semelhante a um barril composto de peptídeos helicoidais. O mecanismo de formação em tapete refere-se à desorganização da membrana por ação colaborativa dos peptídeos, onde os PAMs se ligam a superfície de forma paralela ao grupamento fosfato, causando uma ruptura mais severa da bicamada lipídica (Yang *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2004; Brogden, 2005).

Os três modelos citados acima podem ser os mais bem descritos, entretanto, autores como Nguyen e colaboradores (2011) citam ainda outros mecanismos, como por exemplo, o poro toroidal desordenado, onde a formação de poros após a

inserção na membrana pode ser mais estocástica e necessita de uma concentração menor de peptídeos. Este processo de afinamento e espessamento de membrana pode ocorrer na presença de peptídeos ou na reestruturação da membrana, podendo formar domínios ricos em lipídeos carregados que rodeiam os peptídeos. Há ainda a indução de intermediários não-bicamada, a qual pode ocorrer de acordo com a inserção do peptídeos na bicamada lipídica, onde a adsorção de peptídeos acontece visando fosfolipídios ou carreadores aniônicos através da bicamada e resultando no efluxo de conteúdo intracelular. Outra forma de causar danos à membrana pode ser através da eletroporação, onde a acumulação de peptídeos sobre a camada lipídica externa aumenta o potencial da membrana, tornando-a permeável e favorecendo a transição de moléculas (Figura 3).

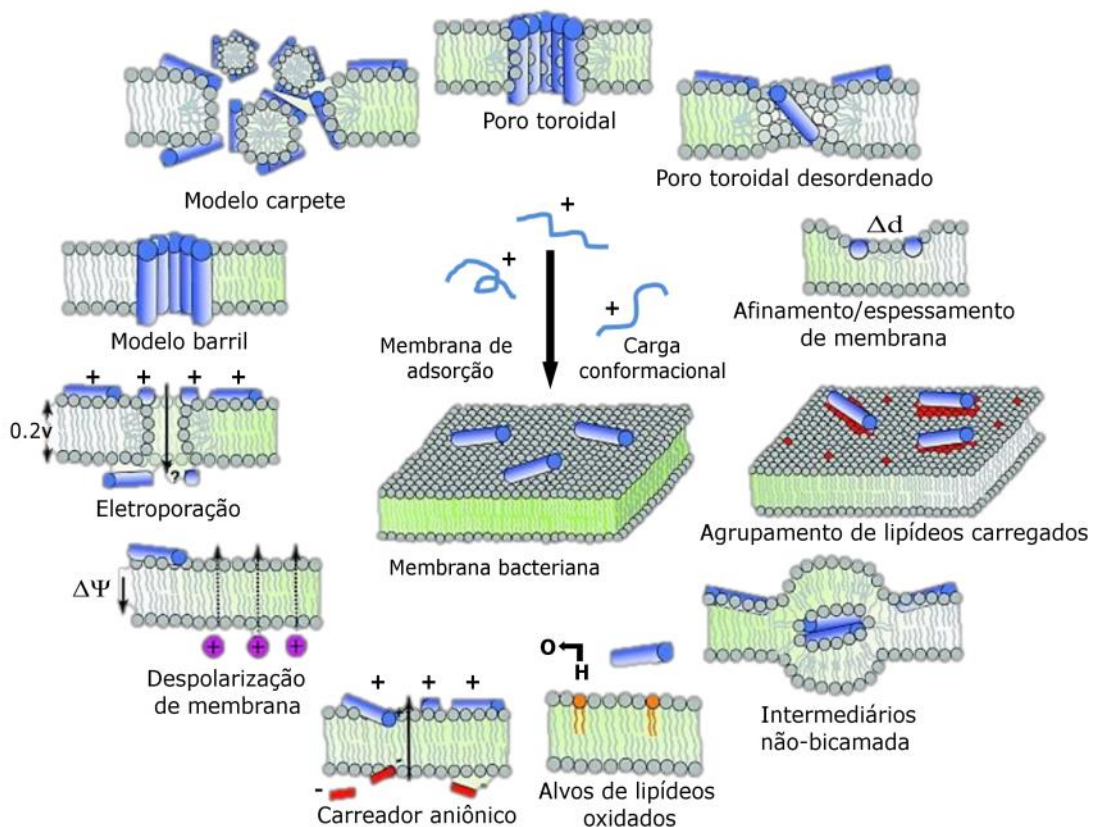


Figura 3. Mecanismos de ação em membranas, destacando a formação de poro toroidal ordenado ou desordenado, modelo carpete, modelo barril, afinamento ou espessamento da membrana, bem como o agrupamento de lipídeos carregados, a formação de intermediários de não bicamada, a interação com alvos de lipídeos oxidados, o carregamento aniônico, a despolarização da membrana e, por fim, a eletroporação da membrana bacteriana. Figura adaptada de Nguyen e colaboradores (2011).

Sabe-se que regiões hidrofílicas (podendo ser carregadas positivamente) facilitam a interação dos peptídeos com as superfícies microbianas carregadas negativamente e grupos da bicamada de fosfolipídios que levam a penetração da membrana celular (Shai, 2002). Sendo assim podemos mencionar ainda que, além dos mecanismos de ação envolvendo membranas celulares, PAMs podem exibir ação intracelular, incluindo a inibição da replicação e transcrição de DNA, inibição de síntese de RNA e proteínas. Os PAMs podem ainda inativar proteínas chaperonas necessárias para dobramento adequado de proteínas, podendo causar modificações no sítio de enzimas, como por exemplo, enzimas de inativação de aminoglicosídeos, impedindo a ação enzimática e ocasionando a perturbação de alvos intracelulares, bem como podendo modular diferentes cascatas do sistema imunológico (imunomoduladores) (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*, 2006) (Figura 4). Diante desta promiscuidade funcional e diversidade estrutural (Franco, 2011), podemos observar a razão pela qual PAMs têm se tornado tão atraentes como futuras moléculas terapêuticas.

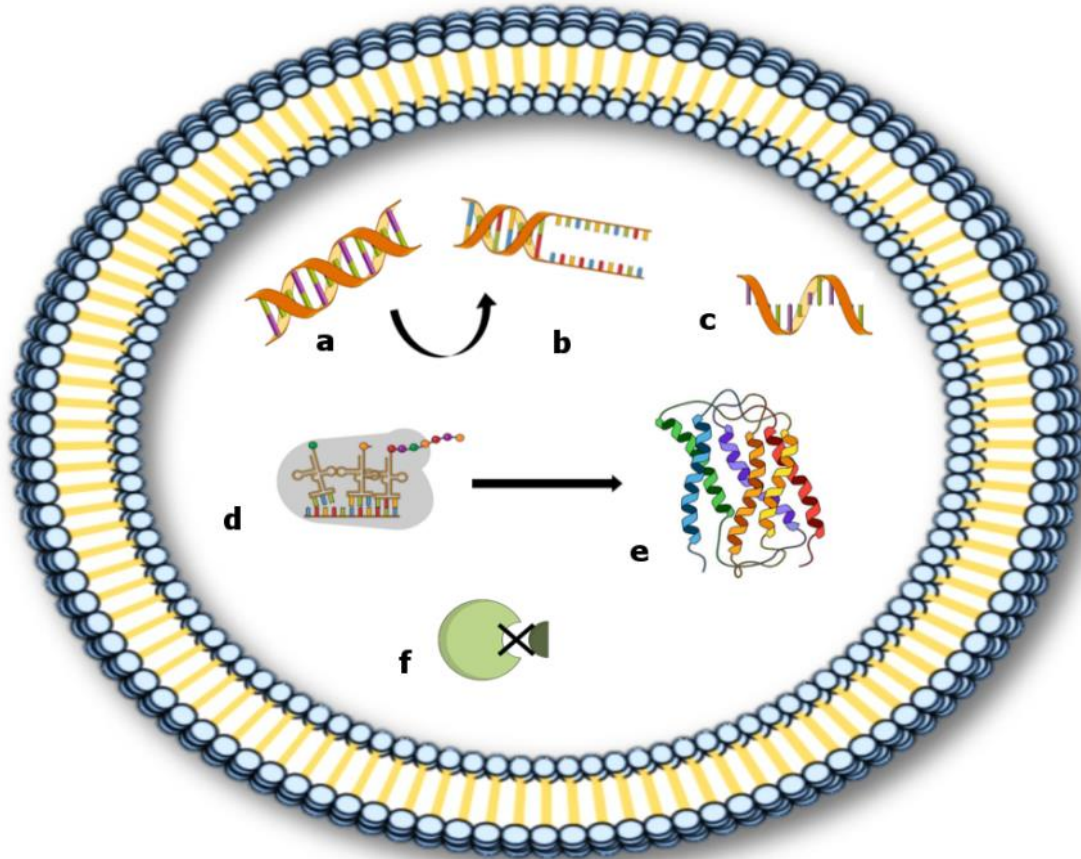


Figura 4. Mecanismos de ação intracelular propostos para os PAMs em células bacterianas, podendo atuar: (a) na inibição da replicação de DNA, (b) na inibição da transcrição do DNA, (c) no bloqueio da síntese de RNA, (d) na inibição das funções ribossomais e síntese proteica, (e) no bloqueio de proteínas chaperonas necessárias para dobramento adequado de proteínas e (f) na modificação do sítio de enzimas.

MASTOPARANOS

Toxinas de vespas podem ser constituídas por diferentes tipos de moléculas com diversas atividades biológicas. Vespas sociais ou solitárias possuem em sua toxina uma complexa mistura de compostos, podendo ser eles, (i) aminas biogênicas como, dopamina, histamina e norepinefrinas; (ii) proteínas, como fosfolipases, hialuronidases e antígenos; (iii) peptídeos, como melitinas e mastoparanos (Argiolas e Pisano, 1984; Konno *et al.*, 2001). Dentre estas atividades biológicas, podemos citar reações ligadas ao sistema nervoso, como atividades ansiolíticas, anticonvulsivantes (Piek, 1991), alergênicas, antimicrobianas, hemolíticas, entre outras (Nakajima *et al.*, 1986; Mendes *et al.*, 2004; Baptista-Saidemberg *et al.*, 2010). A maioria das atividades descritas para as toxinas de vespas estão em

função dos peptídeos, visto que essas moléculas possuem a capacidade de interagir com diversos tipos celulares e tecidos biológicos (Saidenberg *et al.*, 2010).

Podemos citar os mastoparanos como exemplo de peptídeos multifuncionais. O primeiro mastoparano descrito na literatura foi isolado a partir da toxina da vespa social *Vespula lewisii* (Hirai *et al.*, 1979). Hirai e colaboradores (1979) identificaram e caracterizaram este peptídeo composto basicamente de resíduos de lisina e aminoácidos hidrofóbicos. Este foi o primeiro exemplo de peptídeo degranulador de mastócitos isolado do veneno de vespas. Mastoparanos consistem, em sua maioria, em peptídeos catiônicos, anfipáticos, geralmente organizados em α -hélice (ambiente dependente), sendo constituídos de 10 a 14 resíduos de aminoácidos (Nakajima *et al.*, 1986). Vários autores descrevem os mastoparanos como peptídeos ricos em resíduos hidrofóbicos, incluindo leucina, isoleucina e valina, bem como possuindo C-terminal amidado (Higashijima *et al.*, 1988) (Figura 5). Ademais, a presença de resíduos de lisina e arginina ocorrentes nas sequências dos mastoparanos, além de conferir carga positiva a esses peptídeos, possuem ainda como provável função facilitar a liberação de histamina em mastócitos (Higashijima *et al.*, 1988; Konno *et al.*, 2000).

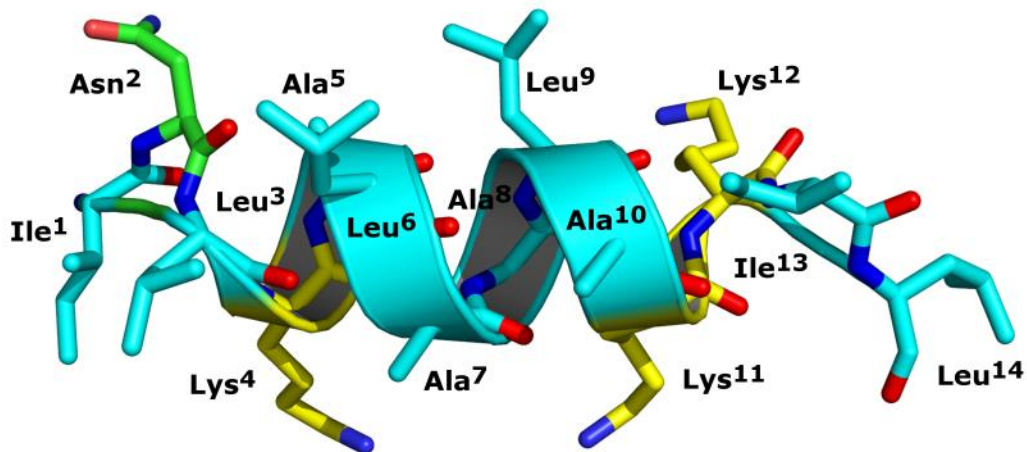


Figura 5. Estrutura tridimensional de mastoparano-L (PDB: 1D7N) resolvido por ressonância magnética nuclear. Representação da disposição dos resíduos de aminoácidos ao longo da cadeia principal (Hori *et al.*, 2001); em ciano, resíduos apolares; em amarelo resíduos polares e em verde resíduos polares não carregados. Átomos de nitrogênio e oxigênio estão destacados em azul e vermelho, respectivamente.

Os mastoparanos possuem diversos mecanismos de ação, os quais estão diretamente relacionados ao tipo celular com o qual interagem. Quando ligados a mastócitos, estes peptídeos causam degranulação, secreção de histamina e, conseqüentemente, vasodilatação (Konno *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2001). Em células do sistema imunológico colaboram na cascata de sinais, recrutando mais células para o local de inflamação, como por exemplo, induzindo o processo de quimiotaxia de neutrófilos e células T auxiliares (Argiolas e Pisano, 1984; Hancock e Diamond, 2000). Os mastoparanos podem causar a ativação de fosfolipases A2, as quais aumentam lesões teciduais e edemas (Argiolas e Pisano, 1984). Em células sanguíneas há relatos de que mastoparanos possuem atividade hemolítica e citotóxica (Hirai *et al.*, 1979; Tosteson *et al.*, 1985; Higashijima *et al.*, 1988; Konno *et al.*, 2001). Outra atividade importante dessas moléculas aparentemente está ligada a sua transdução de sinal via proteína G, onde ocorre estímulo à troca de nucleotídeos de guanina por proteínas reguladoras G (Higashijima *et al.*, 1988; Jones e Howl, 2006). Além de atividades reguladas a partir de células, os mastoparanos podem exibir potencial atividade anticancerígena contra carcinomas malignos hematológicos e de mama (Hilchie *et al.*, 2016). Ademais, membros dessa classe de peptídeos podem ser eficazes no combate a cepas bacterianas, revelando atividades bacteriostáticas e bactericidas (Konno *et al.*, 2000; Konno *et al.*, 2006; De

Souza *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Vila-Farres *et al.*, 2012; De Azevedo *et al.*, 2015; Irazazabal *et al.*, 2016) além de melhorar sua atividade quando em forma D-aminoácido (Manabe e Kawasaki, 2017) (Tabela 1).

Diversos autores afirmam que a estrutura pode interferir na atividade biológica de peptídeos bioativos (Hancock e Rozek, 2002). Estudos mostraram que peptídeos como os mastoparanos interagem com membranas lipídicas (Okumura *et al.*, 1981), onde perturbações nessas membranas podem causar aumento de sua permeabilidade, levando a formação de canais de íons, ocasionando lise celular ou liberação de mediadores de ativação celular (Nakajima *et al.*, 1986; Li *et al.*, 2000). Outros autores afirmam que a interação peptídeo-membrana pode facilitar a conformação de α -hélice anfipática, levando a formação de poros (Danilenko *et al.*, 1993; Schwarz e Blochmann, 1993).

Trabalhos relacionados aos mastoparanos evidenciam que, apesar de suas respostas ligadas a eritrócitos humanos, estes peptídeos podem atuar em diversos alvos, incluindo superfícies bacterianas, e tornando-os assim potenciais candidatos antibacterianos a serem estudados. Ainda que exista uma variedade de mastoparanos isolados de diversas espécies de vespas, podemos contar também com os mastoparanos sintéticos, tornando esta família de peptídeos atrativa para buscas de novas funções. Até o momento (última visualização em 23/01/2017) estão depositados no banco de dados do *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) (Wang e Wang, 2004) 21 sequências de mastoparanos, sendo que no *Protein Data Bank* (PDB) apenas 3 estruturas aparecem resolvidas por RMN. Desta forma, este estudo propõe análise de novos peptídeos derivados de mastoparano-L (1D7N), um peptídeo isolado da toxina de *Vespula lewisii* (Hori *et al.*, 2001), a fim de realizar a caracterização estrutural e funcional dos análogos gerados, visando o combate a diversas cepas e biofilmes bacterianos.

Tabela 1. Relação de mastoparanos apresentados pelo nome, sequência, alvo e mecanismo de ação.

Nome	Sequência	Alvo	Função	Referências
mastoparano-L	INLKALAALAKKIL-NH ₂			(Hirai <i>et al.</i> , 1979)
mastoparano-B EMP-AF	LKLKSIVSWAKKVL-NH ₂ INLLKIAKGIKSL-NH ₂	Mastócitos	Degranulação, secreção de histamina	(Ho <i>et al.</i> , 2001) (Konno <i>et al.</i> , 2000)
mastoparano-C	LNLKALLAVAKKIL-NH ₂	Neutrófilos e células T auxiliares	Quimiotaxia e recrutamento de leucócitos	(Argiolas e Pisano, 1984; Hancock e Diamond, 2000)
mastoparano-C cabrolina	LNLKALLAVAKKIL-NH ₂ FLPLILAKIVTAL-NH ₂	Fosfolipases A2	Aumento de lesão tecidual e edema	(Argiolas e Pisano, 1984)
mastoparano-L EMP-AF anopline	INLKALAALAKKIL-NH ₂ INLLKIAKGIKSL-NH ₂ GLLKRIKTLL-NH ₂	Eritrócitos humanos	Hemólise	(Hirai <i>et al.</i> , 1979) (Konno <i>et al.</i> , 2000) (Konno <i>et al.</i> , 2001)
mastoparano-L	INLKALAALAKKIL-NH ₂ INLKALAALAKKIL-COOH	Carcinomas malignos (hematológico) e carcinomas de mama.	Ação anticancerígena	(Hilchie <i>et al.</i> , 2016)
mastoparano-L	INLKALAALAKKIL-NH ₂			(Higashijima <i>et al.</i> , 1988)
mastoparano-x	INWKGIAAMAKKLL-NH ₂	Proteína G	Interação na via da proteína G	(Jones e Howl, 2006) (Todokoro <i>et al.</i> , 2006)
mastoparano-MP	INLKALALAKKIL-NH ₂			(Park <i>et al.</i> , 1995)
mastoparano-MPB anopline eumenitina	LKLKSIVSWAKKVL-NH ₂ GLLKRIKTLL-NH ₂ LNLKGIFKKVASLLT			(Konno <i>et al.</i> , 2001) (Konno <i>et al.</i> , 2006)
protonectarina-MP parapolybia-MP asn-2-polybia-MP MK-578	INWKALLDAAKKVL-NH ₂ INWKKMAATALKMI-NH ₂ INWKKLLDAAKQIL-NH ₂ INWLKAKKVGAMIL-NH ₂	Bactérias Gram-positivas e negativas	Atividade bactericida e bacteriostática	(De Souza <i>et al.</i> , 2011)
mastoparano-AF mastoparano-D mastoparano-V mastoparano-B mastoparano-L [I ⁵ , R ⁸]MP	INLKAIAALAKKLF-NH ₂ INLKAIAAFKLL-NH ₂ INWKGIAAMAKKLL-NH ₂ LKLKSIVSWAKKVL-NH ₂ INLKALAALAKKIL-NH ₂ INLKILARLAKKIL-NH ₂			(Lin <i>et al.</i> , 2011) (Yang <i>et al.</i> , 2013) (Vila-Farres <i>et al.</i> , 2012; De Azevedo <i>et al.</i> , 2015)
mastoparano M (L e D)	KLKLLLLLKLK-NH ₂			(Irazabal <i>et al.</i> , 2016)
				(Manabe e Kawasaki, 2017)

SELEÇÃO DE PAMS

Os ecossistemas naturais podem ser fontes de uma ampla variedade de compostos únicos que podem ser explorados para a geração de novas moléculas bioinspiradas com potencial antibiótico (De Castro e Franco, 2015). Muitos PAMs apesar de serem ativos contra microrganismos patogênicos, por vezes possuem propriedades tóxicas em relação às células de mamíferos, podendo também apresentar um elevado custo de produção (Chen *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2016). Outro obstáculo para o uso destas moléculas consiste em sua susceptibilidade à proteólise ou degradação por constituintes do soro sanguíneo (Chen *et al.*, 2005). Ainda assim, os bancos de dados de peptídeos com ação antibacteriana e antibiofilmes apresentam uma vasta quantidade de sequências depositadas e considerados fármacos promissores. Sendo assim o desenvolvimento de peptídeos bioinspirados para a prospecção de PAMs têm se mostrado um grande contribuinte em técnicas de rastreio de novas sequências promissoras.

PAMs naturais podem ser promissores candidatos a fármacos antibacterianos, pois existem diversas maneiras em que podemos melhorar seu potencial farmacêutico, como por exemplo, utilizando abordagens proteômicas, genômicas e metagenômicas (Scanlon *et al.*, 2014) e técnicas de janela deslizante (*sliding window*) (Torrent *et al.*, 2011). Outra alternativa citada consiste na conversão de sequências de PAMs promissores em D-aminoácidos ou retro-inversos. Neste contexto, Wade e colaboradores (1990) apresentaram exemplos de PAMs completamente D-aminoácidos que mantiveram suas propriedades bioativas contra bactérias Gram-positivas e -negativas, onde os peptídeos D-magainina-NH₂ e D-melitina foram efetivos contra cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo também mais resistentes à degradação enzimática (tripsina) em comparação com os L-enantiômeros. Em adição, em um trabalho publicado por de la Fuente Núñez e colaboradores (2015) foi realizado o rastreio de PAMs L e D-aminoácidos e PAMs retro-inversos com atividades antibiofilme, utilizando como base o peptídeo de defesa do hospedeiro IDR-1018. Neste estudo, 9 sequências retro-inversas foram geradas e avaliadas acerca do seu potencial em inibir a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Dentre estes, 5 inibiram mais de 70% da formação de biofilme (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2015).

Estratégias avançadas de desenho aliadas ao poder computacional hoje disponível podem também ser utilizadas para o desenvolvimento de PAMs econômicos, potentes, com amplo espectro (Farris e Steinberg, 2014) e capazes de serem utilizados em biomateriais. GL13K, por exemplo, vem sendo descrito como um peptídeo de ação bactericida e bacterioestática, sendo derivado de proteína secretora parotídea. Este PAM foi modificado visando seu melhor ancoramento em revestimentos de titânio para prevenção de infecções relacionados a implantes odontológicos (Holmberg *et al.*, 2013). Podemos citar também técnicas como o desenho de peptídeos baseados em sequências análogas naturais já descobertas. Tossi e colaboradores (1997) desenharam novos peptídeos helicoidais comparando sequências N-terminais de peptídeos isolados de famílias de insetos, rãs e mamíferos com o objetivo de potencializar a interação peptídeos-membranas. Mais recentemente, Breiji e colaboradores (2018) utilizaram o PAM LL-37 para o desenvolvimento de 25 novos PAMs e antibióticos sintéticos (SAAPs) melhorados sob condições fisiológicas. Neste estudo, após a realização de *screening* por atividades contra *S. aureus* foi identificado um peptídeo candidato (SAAP-148) com ação contra patógenos multirresistentes, capaz de impedir a formação de biofilmes, bem como erradicar biofilmes pré-formados.

Estudos também mostram que metodologias de desenho racional podem bioinspirar peptídeos através de um modelo, alterando e otimizando sua sequência para potencializar ações e reduzir propriedades hemolíticas (Jiang *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2016; Migliolo *et al.*, 2016). Cardoso e colaboradores (2016) avaliaram um PAM sintético desenhado racionalmente a partir de uma sequência de peixe polar (*Pleuronectes americanus*). Neste trabalho, além de reduzir o tamanho da sequência, as modificações em Pa-MAP 1.9 potencializaram sua atividade contra bactérias Gram-negativas e biofilmes, sem ser citotóxico perante células de mamíferos. Em adição as técnicas citadas acima, podemos utilizar metodologias computacionais para produção de sequências e algoritmos que auxiliam na seleção de peptídeos através de cálculos de probabilidade antimicrobiana.

Diversos algoritmos vêm sendo utilizados para prever a estrutura e função peptídeos (Morgenstern *et al.*, 2006). Para isso, ferramentas computacionais vem sendo desenvolvidas seguindo duas principais estratégias, a de métodos empíricos e a de aprendizado de máquina (*machine learning*) (Porto *et al.*, 2012). Algoritmos

baseados em métodos empíricos podem ser qualitativos, e funcionam baseados na probabilidade de uma sequência de entrada (*input*) comparada com sequências de peptídeos antimicrobianos conhecidos em bases de dados para prever uma possível função (Wang *et al.*, 2008). Os algoritmos de aprendizado de máquina podem ser baseados em inteligência artificial, buscando reconhecimento de padrões (Kotsiantis *et al.*, 2007). Sendo assim, estes algoritmos são fundamentados em um conjunto de informações conhecidas que podem prever a informação de saída com base na informação de entrada (Davies e Shamu, 2014). Dentre essas estratégias podem ser aplicadas diversas técnicas ou abordagens computacionais.

Uma das técnicas que pode ser aplicada consiste em abordagens estocásticas, as quais visam a otimização de peptídeos através de processos aleatórios para realizar alterações. Outra abordagem se dá através de algoritmos evolutivos que geram sucessivas gerações de mutações e deleções na sequência buscando aprimorar as características que lhe conferem a atividade (Hiss *et al.*, 2010; Kliger, 2010). Os algoritmos evolutivos são chamados assim, pois sua otimização geralmente tende a ser inspirada na natureza, como uma estratégia de evolução propriamente dita (Holland e Goldberg, 1989). Geralmente, estes métodos compartilham o conceito de variação e seleção *in silico*, onde, de forma geral, através de um conjunto de informações (genes ou sequências, por exemplo), busca pontualmente por um “indivíduo” mais apto. Dessa forma, através da variação podem produzir descendentes (homólogos) com caracteres melhorados ou que favoreçam uma ação específica (Hiss *et al.*, 2010).

PAMs podem ser considerados moléculas promissoras para aplicações de cunho terapêutico, visto que possuem especificidade, atividade biológica e toxicidade. Contudo, na maioria dos casos, diversos parâmetros devem ser levados em consideração para sua otimização e, embora não seja abrangente, uma variedade de métodos para a geração de novos candidatos a PAMs podem ser descritas, com ênfase em tecnologias computacionais (Blondelle e Lohner, 2010; Monte *et al.*, 2012). Bibliotecas peptídicas possuem uma alta diversidade e tornaram-se instrumentos para a investigação e compreensão de sistemas biológicos em nível proteico. Estratégias de transcriptômica e proteômica, por exemplo, permitem que cada vez mais bancos de dados sejam preenchidos com diversas moléculas de potencial biológico (Monte *et al.*, 2012). Neste contexto,

algoritmos podem ser utilizados em bancos de dados visando à busca de novas moléculas bioativas.

Em suma, os métodos de re-desenho (bioinspiração) têm sido utilizados para melhor compreensão estrutural e funcional de sequências através das propriedades físico-químicas envolvidas nestes processos de otimização. Associados aos métodos citados acima outras metodologias têm sido aplicadas como ferramentas de predição da atividade antimicrobiana a partir das sequências dos peptídeos gerados, como por exemplo, o *Collection of Antimicrobial Peptides (CAMP_{R3})* (Waghu *et al.*, 2015). Este banco de dados permite que seus usuários prevejam o potencial que uma sequência possui para ser um PAM, através de quatro algoritmos, sendo eles máquina de vetores de suporte (SVM), conhecida como um robusto algoritmo utilizado como ferramenta de inteligência artificial (Schneider e Wrede, 1998); *random forest* (RF) composto por um grupo gerado aleatoriamente de árvores (Scornet *et al.*, 2015); análise discriminante (AD) que descreve uma distribuição de probabilidade ao longo de um número potencialmente infinito de sequências (Eddy, 1998; Chiang *et al.*, 2004); e rede neural artificial (ANN) que pode emular a aprendizagem humana, raciocínio e tomada de decisão (Davies e Shamu, 2014).

No presente estudo foram utilizados métodos computacionais para bioinspirar as sequências dos peptídeos análogos a mastoparano-L, bem como prever a atividade antimicrobiana. Uma vez que 21 sequências de mastoparanos estão depositadas nos bancos de dados, o algoritmo utilizado foi capaz de estabelecer um padrão de resíduos de aminoácidos importantes para a otimização das propriedades físico-químicas e estrutura secundária dos análogos gerados. De posse das sequências de aminoácidos foi possível avaliar características como carga, hidrofobicidade e momento hidrofóbico, bem como prever *in silico* uma possível ação antimicrobiana. Após a predição das sequências dos potenciais PAMs, ensaios *in vitro* e simulações *in silico* foram então realizadas de forma a caracterizar, bem como comparar funcional e estruturalmente dois análogos de mastoparano-L.

JUSTIFICATIVA

Ao longo dos anos o uso indiscriminado de antibióticos tem facilitado com que microrganismos desenvolvam respostas de resistência a antibióticos tornando-os, assim, patógenos considerados multirresistentes. Dessa forma, existe uma necessidade emergencial na descoberta e desenvolvimento de moléculas potencialmente capazes de agir contra bactérias susceptíveis e resistentes aos antibióticos convencionais, bem como ação antibiofilme. Neste âmbito, PAMs surgem como uma alternativa em resposta a esses patógenos, uma vez que tornaram-se conhecidos por fazer parte do sistema imune inato de diversos organismos, atuando como primeira linha de defesa do hospedeiro. PAMs consistem em moléculas <10 kDa que podem ser de origem natural ou manipulados sinteticamente, podendo ser bioinspirados ou redesenhados através de alterações em suas sequências, modificando, conseqüentemente, sua estrutura e função. PAMs derivados de toxina de vespas podem ser denominados, em sua maioria, mastoparanos. Estes peptídeos possuem diversos mecanismos de ação de potencial biotecnológico, porém podendo causar danos celulares, incluindo toxicidade contra células de mamíferos e hemólise de eritrócitos humanos. Neste contexto, o presente trabalho visou caracterizar funcional e estruturalmente novos análogos de mastoparano, denominados mastoparano-R1 e -R5, bioinspirados em mastoparano-L (PDB: 1D7N). Foram avaliadas suas atividades contra 12 cepas Gram-positivas e negativas, susceptíveis e resistentes, bem como seu potencial de erradicar biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa*. Ensaio de citotoxicidade e hemólise também foram realizados. Ademais, a fim de melhor compreender a conformação estrutural dos análogos gerados, suas estruturas secundárias foram caracterizadas em diferentes ambientes por dicroísmo circular, sendo posteriormente estudadas a nível tridimensional através de metodologias de modelagem e dinâmica molecular.

OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o potencial de dois peptídeos antimicrobianos bioinspirados (mastoparano-R1 e -R5) contra cepas bacterianas susceptíveis, resistentes e biofilmes, buscando também compreender suas diferenças e comportamento a nível estrutural.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Selecionar peptídeos derivados de toxina de vespa com base em mastoparano-L (PDB: 1D7N);
- ii. Avaliar as propriedades físico-químicas dos peptídeos;
- iii. Avaliar a atividade hemolítica dos peptídeos;
- iv. Avaliar a atividade citotóxica dos peptídeos;
- v. Avaliar a atividade contra bactérias susceptíveis e resistentes;
- vi. Avaliar a atividade erradicatória de biofilmes pré-formados;
- vii. Realizar análises estruturais dos análogos de mastoparano-L através de dicroísmo circular, modelagem molecular e dinâmica molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

SELEÇÃO DOS ANÁLOGOS DE MASTOPARANO E SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

O peptídeo mastoparano-L é constituído de 14 resíduos de aminoácidos em sua sequência (INLKALAALAKKIL-NH₂) (PDB: 1D7N) (Hori *et al.*, 2001), na qual foi inserido o padrão "K - [ILV] - [AL] - X - [RKD] - [ILV] - X - X - K - I" através do algoritmo *Joker* (não publicado), sendo então gerados cinco análogos de mastoparanos designados mastoparano-R1 a -R5. O padrão dos peptídeos foi gerado pela combinação dos sub-padrões derivados de 248 peptídeos antimicrobianos helicoidais de acordo com *Pratt 2.1 tool* (Jonassen *et al.*, 1995). Posteriormente, foram selecionados para maiores análises os peptídeos mastoparano-R1 (KILKRLAAKIKKIL-NH₂) e -R5 (INLKKLAARIKKKI-NH₂), os quais tiveram suas propriedades físico-químicas determinadas teoricamente através do servidor *HeliQuest* (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>) (Gautier *et al.*, 2008). De posse da sequência primária de cada peptídeo foram calculados: as cargas dos peptídeos, valores de hidrofobicidade (%) e momento hidrofóbico <μH> [usando a escala de Eisenberg (1982)], bem como construídos os diagramas em hélice para a sequência parental (mastoparano-L) e seus análogos R1 e R5. Além disso, as sequências de estudo foram submetidas a algoritmos de predição de propriedades antimicrobianas descritas para PAMs, sendo eles, máquina de vetores de suporte (SVM), *random forest* (RF), análise discriminante (AD) e rede neural artificial (ANN), usando o servidor *CAMP_{R3}* (Waghu *et al.*, 2015). As sequências geradas foram então sintetizadas em suporte de celulose e testadas contra cepas de *P. aeruginosa* bioluminescentes, e também contra eritrócitos humanos.

ENSAIOS ANTIMICROBIANOS E HEMOLÍTICOS

A atividade antimicrobiana dos peptídeos sintetizados em suporte de celulose foi avaliada contra cepas de *P. aeruginosa* bioluminescentes manipuladas em microplacas de 96 poços. Soluções aquosas de peptídeos liberados das manchas

de celulose foram diluídas duas vezes em meio Basal Mínimo 2 (BM2) (tampão de fosfato de potássio 62 mM [pH 7], MgSO₄ 2 mM, FeSO₄ 10 µM, glicose 0,4% [p/vol] 0,1% [p/vol]) nos 8 poços de uma placa de 96 poços, atingindo um volume final de 25 µL em cada poço. Subsequentemente, cultivou-se 50 µL de cultura de *P. aeruginosa* H1001 *overnight* em 5 mL de meio *Luria-Bertani* (LB). O crescimento bacteriano foi avaliado até atingir uma densidade óptica (D.O.) de 0,4 a 600 nm. Esta suspensão bacteriana foi então diluída a 4:100 (v/v) em meio BM2, sendo 25 µL deste diluído transferidos para os poços de microplacas contendo 25 µL de solução peptídica. As concentrações finais de R1 e R5 testadas variaram de 1 a 100 µM. As placas foram incubadas durante 4 h a 37 °C com agitação constante a 50 rpm. A luminescência foi medida em um leitor de microplacas *Tecan SPECTRA Fluor Plus* (Tecan US, Morrisville, NC). A atividade antimicrobiana foi avaliada pela capacidade dos peptídeos em reduzir a luminescência da cepa de *P. aeruginosa* em comparação com cepas não tratadas. Utilizou-se água destilada como controle negativo e como controle positivo foi utilizado o PAM magainina 2 e antibióticos carbapenêmico-meropenêmicos em concentrações idênticas as de peptídeo testadas. Para os ensaios de hemólise foi coletado sangue venoso humano de voluntários saudáveis e, posteriormente, incubados em tubos *Vacutainer*® contendo heparina de sódio como anticoagulante (*BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ*). Amostras sanguíneas foram centrifugadas a 1.500 rpm e então removido o soro sobrenadante. O precipitado contendo eritrócitos foi lavado três vezes com o mesmo volume de solução estéril de NaCl 0,85%. O concentrado de eritrócitos foi diluído dez vezes novamente em solução de NaCl sendo posteriormente submetidos a diluições duplas de peptídeos durante 1 h a 37 °C. As concentrações utilizadas para o ensaio antimicrobiano foram as mesmas para a realização deste teste, na proporção de 1:1 (v/v) e volume final de 100 µL. O ensaio foi realizado em placas de polipropileno de 96 poços. 1% de Triton X-100 foi utilizado como controle positivo, representando 100% de lise celular, e solução salina estéril foi utilizada como controle negativo. A liberação de hemoglobina foi monitorada cromogenicamente a 546 nm utilizando um leitor de microplacas.

SÍNTESE QUÍMICA E ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE R1 E R5

Os peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 foram adquiridos das empresas *Peptide 2.0 Incorporated* (USA) e *Aminotech* (Brasil), as quais realizaram síntese através da metodologia de fase sólida *F-moc* (9-fluorenilmetiloxicarbonila) com 95% de pureza. Os peptídeos acima foram submetidos à análise por espectrometria de massas. Para isso estes foram solubilizados em água ultrapura e misturados em solução saturada de matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3) e, por fim, depositados em uma placa do tipo *MTP 384 massive* para peptídeos sintéticos. As placas foram deixadas a temperatura ambiente até completa secagem das amostras aplicadas. As massas moleculares dos peptídeos de estudo foram determinadas através do espectrômetro de massa do tipo *MALDI-ToF/ToF Ultraflex III (Bruker Daltonics)* em modo refletido. A calibração foi realizada utilizando *Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics)* como padrões de massa molecular.

ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Cepas de *E. coli* (ATCC 25922, BL21 e KPC+ 001812446), *K. pneumoniae* (ATCC 13883 e KPC+ 001825971), *S. aureus* (ATCC 25923 e ATCC 12600), *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *P. aeruginosa* (PAO1 e PA14) e duas cepas isoladas de casos clínicos, sendo elas *A. baumannii* (HRAN 003326263), *Enterobacter cloacae* resistente a colistina (LACEN 1383251) foram plaqueadas em placas *Müller-Hinton* ágar (MHA) e incubadas a 37 °C durante aproximadamente 18 h. Após este período foram selecionadas três colônias isoladas de cada bactéria (réplica biológica) e inoculadas em 5 mL de caldo *Müller-Hinton* (MHB) e incubadas em agitador sob rotação de 200 rpm a 37 °C, *overnight*. As leituras para análise de crescimento bacteriano foram medidas em espectrofotômetro a 600 nm utilizando 100 µL de cada réplica. Os testes de CIM foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* (Wayne, 2012), através do método de diluição em microplacas de 96 poços. Três réplicas biológicas e três réplicas técnicas foram organizadas nas microplacas a uma

concentração bacteriana final de $2-5 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹. Os peptídeos foram testados em concentrações que variaram de 2 a 32 μ M (Wiegand *et al.*, 2008). Como controle positivo foi utilizado cloranfenicol nas mesmas concentrações dos peptídeos, enquanto que a suspensão bacteriana ($2-5 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹) em MHB foi utilizada como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 18 h e as leituras foram realizadas em leitor de microplacas a 600 nm após o tempo de incubação (Wayne, 2012).

ENSAIO DE ERRADICAÇÃO DE BIOFILMES PRÉ-FORMADOS

Para o tratamento de biofilmes pré-formados, cepas de *P. aeruginosa* (PAO1) foram cultivadas em meio BM2 suplementado com glicose, durante 24 h. Após a esterilização de tubos de silicone e câmaras de fluxo através de autoclavagem, foi utilizada a passagem de solução 0,5% de hipoclorito utilizando uma bomba peristáltica multicanal onde foi estabelecido um fluxo de água destilada e meio BM2 a 6 rpm por 30 min. Após este processo foi inoculada a cepa PAO1. Para isso 400 μ L de cultura bacteriana foi diluída 1:25 (v:v). Uma vez estabelecido o crescimento dos biofilmes nas câmaras foi programado um fluxo contínuo de diferentes concentrações dos peptídeos em meio BM2 por 24 h. Os biofilmes foram marcados com SYTO-9 (fluorescência verde, células vivas) e iodeto de propídio (fluorescência vermelha, células mortas). A morfologia e eventos de erradicação dos biofilmes foram analisados por microscopia confocal (*Olympus, Fluoview FV1000*), sendo as construções tridimensionais geradas pelo pacote computacional *Imaris (Bitplane, AG)*. Por fim, todos os eluídos foram coletados e plaqueados por microgota em meio sólido de forma a confirmar a atividade bactericida e, conseqüentemente, erradicatória perante biofilmes bacterianos pré-formados.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas culturas de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e adipócitos de camundongos (3T3-L1). Ambas foram cultivadas em *EGMTM-2 BulletKitTM* suplementado com

SingleQuots[™] (suplementos: fatores de crescimento, citocinas, antibióticos, Lonza 10% (v:v) FBS). Todas as células foram mantidas a 37 °C em 5% de CO₂. Os ensaios de citotoxicidade celular foram realizados de acordo com Chan e colaboradores (2015). Todas as células foram mantidas usando as condições de média descritas acima, e as passagens 2-10 foram usadas para linhagens celulares estudadas. Foram utilizadas 5x10³ de células por poço (100 µL) tanto para HUVEC quanto 3T3-L1. Ambas as células foram incubadas durante 24 h (aderência) e tratadas com meios frescos no dia seguinte, antes da adição de peptídeos. Após a adição de peptídeos (concentrações finais obtidas através de diluição seriada a partir de 100 µM), as células foram incubadas por 24 h. Após este período 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) foi adicionado (10 µL; 5 mg.mL⁻¹ em PBS), e as células foram incubadas por mais 4 h. O sobrenadante foi então removido e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os experimentos foram realizadas em triplicata e a viabilidade celular aferida a 600 nm. Foi utilizado como controle positivo 0,1% (v/v) Triton X-100.

ENSAIO HEMOLÍTICO

Os ensaios hemolíticos foram realizados com eritrócitos humanos isolados de voluntários saudáveis. O sangue venoso fresco foi coletado e armazenado em tubos contendo tampão fostato-salino (PBS). As amostras de sangue foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 1 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células sanguíneas foram lavadas três vezes em 1 mL de PBS. Após a última lavagem, foram preparadas soluções de eritrócitos a 0,25 % em PBS. O estoque de peptídeos foi preparado a partir de diluições seriadas, onde a concentração inicial utilizada foi de 100 µM (maior concentração utilizada por poço em microplacas de 96 poços). PBS foi utilizado como controle negativo, enquanto que 1% de Triton X-100 (100% de lise dos eritrócitos), bem como o peptídeo melitina (preparado assim como os peptídeos de estudo, porém com diluições seriadas partindo de 20 µM) foram utilizados como controles positivos. Os ensaios foram realizados em placas de polipropileno de 96 poços a 37 °C durante 1 h. Após esse período as placas foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante (100 µL) transferido para placas de 96 poços de fundo chato. As absorbâncias foram aferidas a 415 nm.

Os ensaios hemolíticos foram realizados em triplicata. A porcentagem de hemólise para todos os casos foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(\text{amostra} - \text{PBS})}{(\text{Triton} - \text{PBS})} \times 100$$

DICROÍSMO CIRCULAR

As mensurações de dicroísmo circular (DC) foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO (J-810), acoplado a um sistema de controle de temperatura *Peltier Jasco*. Os espectros de DC foram obtidos a 25 °C usando células de quartzo de comprimento de caminho de 0,1 cm e adquiridos entre os comprimentos de onda de 185 e 260 nm a uma velocidade de varredura de 50 nm.mim⁻¹. A resolução foi de 0,1 nm com um tempo de resposta de 1 s e cinco acumulações de varredura para cada amostra. A caracterização da estrutura secundária dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 foi investigada em água ultrapura, tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,4), 30% de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) em água (v/v) e dodecilsulfato de sódio (SDS) 50 mM. Foram utilizados 50 µM de cada peptídeo como concentração final. Todos os espectros foram analisados usando o algoritmo *Fast Fourier de Jasco* e a linha de base corrigida. O teor de hélice para todos os peptídeos foi calculado a partir da elipticidade média residual em 222 nm ($[\theta]_{222}$) de acordo com a seguinte equação, onde n significa o número total de ligações peptídicas.

$$\% \text{ hélice} = 100 \frac{([\theta]_{222})}{(-39,500(1 - 2,57/n))}$$

MODELAGEM MOLECULAR

Para realizar a modelagem molecular dos peptídeos R1 e R5 foram realizadas etapas de identificação de proteína molde (*template*), alinhamento entre a sequência de interesse e *template*, construção de coordenadas atômicas e validação dos

modelos teóricos gerados. Por ser a sequência utilizada na construção dos análogos, as coordenadas atômicas de mastoparano-L foram utilizadas como *template*, sendo sua estrutura resolvida por RMN na presença detergente e depositada no PDB sob o código 1D7N (Hori *et al.*, 2001). Seguindo as etapas citadas acima, foi realizado o alinhamento individual entre R1/1D7N e R5/1D7N usando o *software MODELLER 9v14* (Fiser e Šali, 2003). Para a construção dos modelos tridimensionais (3D), foi utilizado o método de modelagem pela satisfação de restrições espaciais, onde novamente foi utilizado o *MODELLER 9v14* (Fiser e Šali, 2003), sendo gerados 100 modelos tridimensionais teóricos para cada peptídeo, individualmente. Os melhores modelos teóricos para ambos os peptídeos foram escolhidos com base na sua energia livre (*DOPE score*). Para avaliar os parâmetros estereoquímicos tais como posição dos ângulos diedros, incluindo *phi* (Φ) e *psi* (Ψ), bem como construção de mapas de Ramachandram foi utilizado o servidor *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993). Para avaliação da qualidade do dobramento dos modelos teóricos gerados foi utilizada a ferramenta *ProSA-web* (Wiederstein e Sippl, 2007). Por fim as estruturas validadas foram visualizadas e analisadas no programa *PyMOL v1.8 (Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC)*.

DINÂMICA MOLECULAR

As simulações de dinâmica molecular para os modelos teóricos tridimensionais de mastoparano-L, R1 e R5 foram conduzidas em três ambientes diferentes: hidrofílico (água), hidrofóbico (30% TFE/água (v:v)) e micelar (SDS). Todas as simulações foram realizadas utilizando o campo de força *GROMOS96 43a1* (Lindahl *et al.*, 2001) através do pacote computacional *GROMACS 5.0.4* (Lindahl *et al.*, 2001). As estruturas iniciais dos melhores modelos tridimensionais de cada peptídeo previstas na modelagem molecular (com exceção ao peptídeo mastoparano-L – PDB: 1D7N) foram imersas em caixas cúbicas contendo moléculas de água de ponto de carga único (*SPC – Simple point charge*). As simulações em 30% de TFE também foram realizadas em caixas cúbicas, os peptídeos imersos em moléculas de água *SPC*, seguido da inserção de moléculas de TFE até a concentração ideal ser alcançada. A fim de se neutralizar as cargas do sistema, íons cloro (Cl) também

foram adicionados (três íons para mastoparano-L e seis íons para R1 e R5). Além disso, o algoritmo *LINCS* (Hess *et al.*, 1997) foi utilizado para ligar todos os comprimentos das ligações atômicas. A distribuição de partículas foi realizada por *Particle Mesh Ewald (PME)* utilizada para correções eletrostáticas, com um raio de corte de 1,4 nm para minimizar o tempo de simulação computacional. O mesmo raio de corte foi também utilizado para interações de *van der Waals*. A lista de vizinhos de cada átomo foi atualizada a cada 10 passos de simulação de 2 fs cada. Um gradiente conjugado (2 ns) e os algoritmos de descida mais acentuada (2 ns) foram implementados para minimização de energia. Depois disso, os sistemas foram submetidos a uma normalização de pressão e temperatura, utilizando a dinâmica estocástica do integrador (*SD – Stochastic Dynamics*), 2 ns cada. Os sistemas de minimização de energia, equilíbrio de temperatura e pressão foram realizadas por meio de um passo de restrição de posição, usando o integrador de dinâmica molecular, durante 2 ns. As simulações foram realizadas a 27 °C *in silico*. Para a construção de micelas de SDS foi utilizado o servidor CHARMM-GUI (Jo *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2009). Após a construção da micela e inserção dos peptídeos (individualmente) o sistema também passou por passos de minimização de energia, equilíbrio de temperatura e pressão e as análises foram realizadas através do pacote computacional já citado acima. O tempo total das simulações de mastoparano-L, R1 e R5 foi de 100 ns, realizados em triplicata. Posteriormente, foram realizadas análises acerca do desvio médio quadrático (RMSD), flutuação média quadrática (RMSF) e raio de giro (Rg). Ademais foram gerados *snapshots* durante a trajetória dos peptídeos em um intervalo de 50 ns (0, 50, 100).

RESULTADOS

ANÁLOGOS DE MASTOPARANO-L E SUAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Com base na sequência do peptídeo mastoparano-L foram realizadas modificações pontuais pelo algoritmo *Joker* (dados não publicados), sendo que para o peptídeo R1 houve substituições de cinco resíduos de aminoácidos nas posições 1, 2, 5, 9 e 10: [K¹,I²,R⁵,K⁹,I¹⁰]. Adicionalmente para o peptídeo R5, houve

substituição dos resíduos 5, 9, 10, 13 e 14: [K⁵,R⁹,I¹⁰,K¹³,I¹⁴] (Figura 6). Tais modificações resultaram na redução das taxas de hidrofobicidade e aumento do momento hidrofóbico de ambos os análogos em relação ao peptídeo parental (Tabela 2).

Características como carga, hidrofobicidade, momento hidrofóbico e predição de propriedades antimicrobianas foram teoricamente calculadas e preditas através dos servidores *HelixQuest* (Gautier *et al.*, 2008) e *CAMP_{R3}* (Waghu *et al.*, 2015). Foram calculadas cargas líquidas +3 para mastoparano-L e +6 para R1 e R5, bem como valores de hidrofobicidade (%) e momento hidrofóbico (Eisenberg *et al.*, 1982) iguais a 57,6% e 0,398 para mastoparano-L; 36,9% e 0,775 para R1; e 20,4% e 0,472 para R5 (Tabela 2). Ademais, ambos os análogos (R1 e R5) gerados mostraram ser promissores de acordo com os quatro preditores antimicrobianos intrínsecos ao *CAMP_{R3}* (Waghu *et al.*, 2015) com valores de referência $\geq 0,5$ para PAMs.

As avaliações prévias em relação ao potencial antimicrobiano e hemolítico dos peptídeos R1 e R5 foram realizadas de acordo com metodologias de larga escala descritos anteriormente (Material e Métodos). Os resultados de inibição obtidos contra cepas de *P. aeruginosa* bioluminescente (H1001) mostraram que tanto R1 quanto R5 inibiram 100% do crescimento bacteriano (CIM) a 4 μ M. Ademais, R1 e R5 não apresentaram propriedades hemolíticas perante eritrócitos humanos em concentrações até 100 μ M. Uma vez confirmado o potencial antimicrobiano desses peptídeos através de metodologias *in silico* e *in vitro*, os mesmos foram sintetizados em maiores quantidades para estudos mais aprofundados detalhados a seguir.

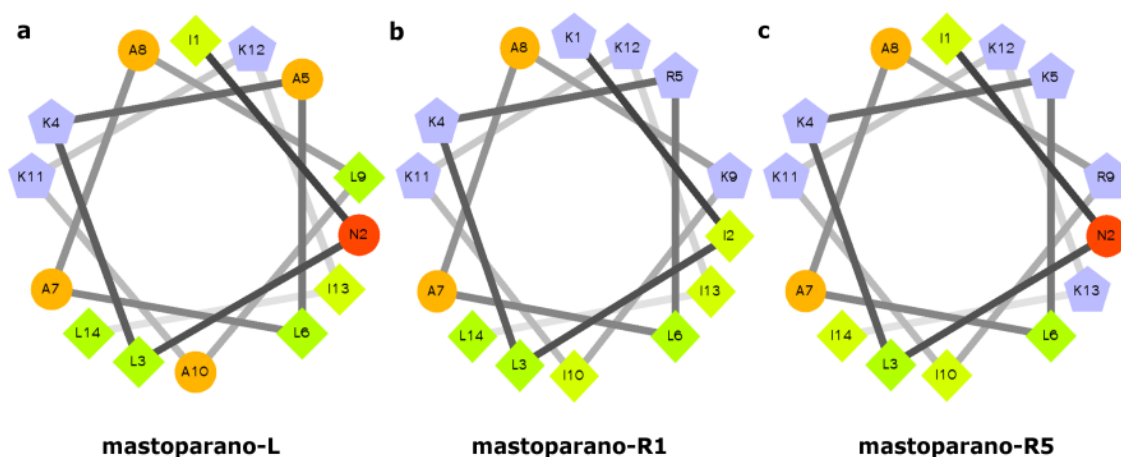


Figura 6. As sequências de mastoparano-L (PDB 1D7N) (a) e seus análogos R1 (b) e R5 (c) apresentadas como diagrama em hélice, mostrando a distribuição de resíduos de aminoácidos por posição ao longo de uma estrutura helicoidal. Os resíduos hidrofílicos estão representados como círculos, resíduos hidrofóbicos em formato de diamantes, carregados negativamente como triângulos, e carregados positivamente como pentágonos. Os gradientes de hidrofobicidade estão codificados por cores sendo o resíduo mais hidrofóbico, verde, e menos hidrofóbicos (zero) representados em amarelo.

Tabela 2. Comparação entre as sequências de mastoparano-L (Hori et al., 2001), R1 e R5, destacando em vermelho o padrão mantido nas sequências; propriedades físico-químicas e predição das probabilidades para antimicrobianos através das análises: máquina de vetores de suporte (SVM), *random forest* (RF), análise discriminante (DA) e rede neural artificial (ANN), usando o servidor *Collection of Anti-Microbial Peptides* (CAMP_{R3}) (Waghu et al., 2015).

Análise dos peptídeos	mastoparano-L	mastoparano-R1	mastoparano-R5
Sequência	INL K A L A L A K KIL	KIL K R L A A KIKKIL	INL K K L A A R I KKKI
Carga	+3	+6	+6
Hidrofobicidade (%)	57,6	36,9	20,4
Momento hidrofóbico (Eisenberg et al., 1982)	0,398	0,775	0,472
SVM	0,985	0,259	0,974
RF	0,995	0,948	0,983
AD	0,994	0,775	0,972
ANN	PAM	PAM	PAM

SÍNTESE QUÍMICA E ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MASTOPARANO-L, -R1 E -R5

Os peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 foram sintetizados por *F-moc* com um grau de pureza acima de 95%. As análises *MALDI-ToF* foram realizadas revelando íons *m/z* principais de 1479,89 Da, 1636,14 Da e 1636,39 Da, correspondentes a mastoparano-L, R1 e R5, respectivamente. (Figura 7). Estes dados foram ainda de acordo com as massas teóricas esperadas para ambos os peptídeos, tornando estas moléculas aptas para os experimentos posteriores.

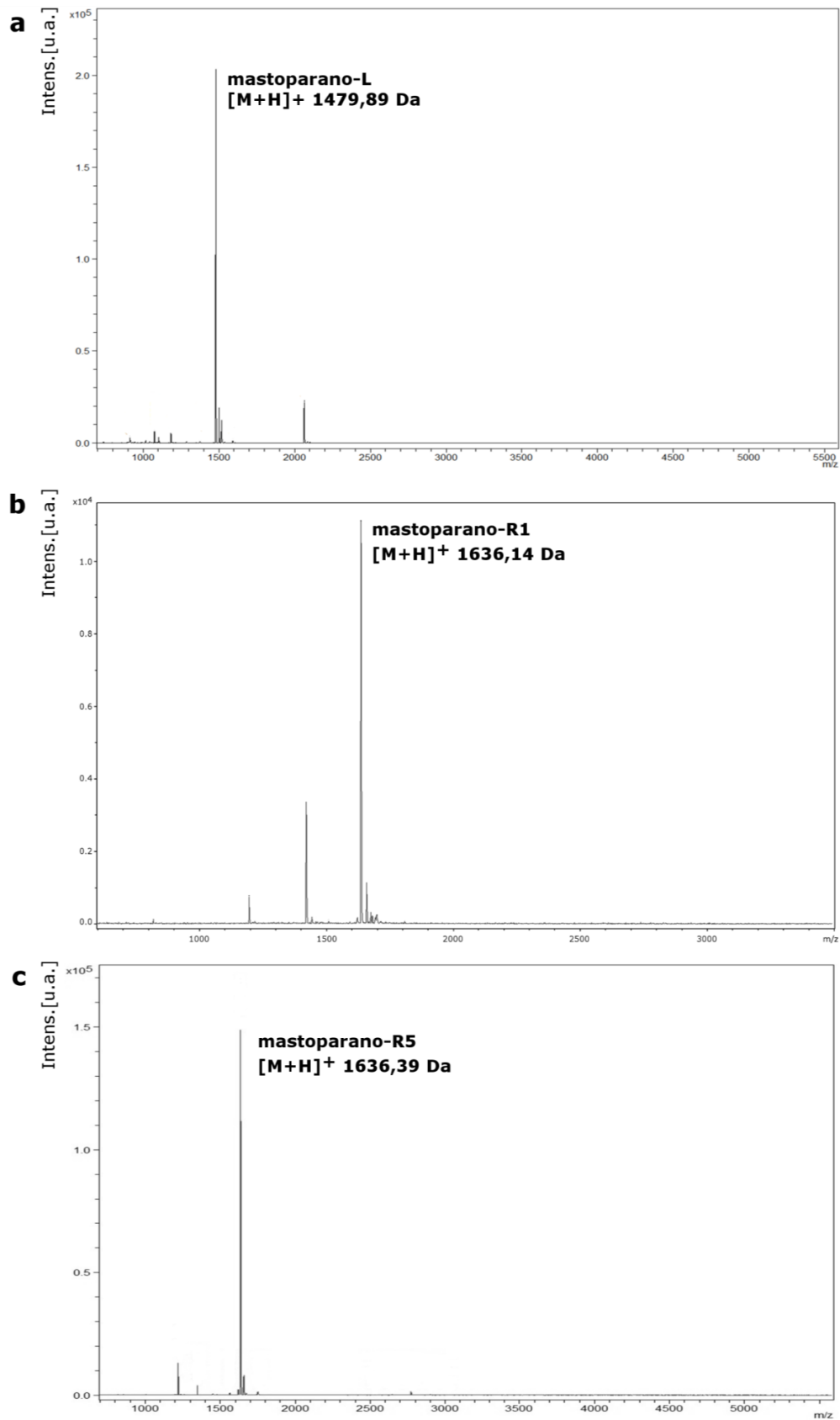


Figura 7. Análises por espectrometria de massas (MALDI-ToF) de (a) mastoparano-L revelando um íon m/z de 1479,89, (b) R1 revelando um íon m/z de 1636,14 Da, e (c) R5 revelando um íon m/z de 1636,39 Da.

ENSAIOS *IN VITRO*

Os peptídeos foram avaliados quanto as suas CIMs frente a cepas bacterianas susceptível e resistentes descritas na metodologia. R1 e R5 foram capazes de inibir as cepas de *E. coli* (ATCC 25922) a 4 μM e *E. coli* (KPC+ 001812446) a 8 μM , enquanto mastoparano-L inibiu somente cepas ATCC entre 16 – 32 μM . Por outro lado, todos os peptídeos (parental e análogos) inibiram *E. coli* (BL21) a 2 μM . Quando avaliado contra *K. pneumoniae* (ATCC 13883), foi observada CIM igual a 8 μM para R1. Contudo, para os peptídeos mastoparano-L e R5, não foram obtidos valores de CIM inferiores a 32 μM . Ademais, todos os peptídeos aqui testados não foram capazes de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* (KPC+ 001825971), *A. baumannii* (003326263) e *E. cloacae* (1383251) na concentração máxima utilizada neste ensaio (32 μM) (Tabela 3).

Cepas Gram-positivas, incluindo *S. aureus* (ATCC 12600) puderam ser inibidas a 8 μM por mastoparano-L, e a 4 μM por R1 e R5. Além disso, o peptídeo R5 inibiu a cepa de MRSA a 8 μM , enquanto os peptídeos mastoparano-L e R1 não foram capazes de inibir essa cepa nas concentrações máximas testadas. Outro resultado considerado promissor foram as atividades contra cepas de *P. aeruginosa* (PAO1 e PA14), com CIMs de 8 μM para mastoparano-L e 4 μM para R1 e R5 (Tabela 3).

A partir dos dados de inibição obtidos contra *P. aeruginosa* (PAO1), e visto que esta cepa está padronizada para ensaios de erradicação de biofilmes pré-formados (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2012), estudos de *flow-cell* foram realizados. Os resultados de *flow-cell* mostram que os peptídeos R1 e R5 foram capazes de erradicar biofilmes pré-formados na concentração testada de 16 μM . Entretanto, mastoparano-L não mostrou o mesmo potencial de erradicação, levando somente a uma ligeira dispersão das células constituintes do biofilme avaliado (Figura 8).

Em muitos casos, peptídeos isolados de vespas possuem atividade citolítica, hemolítica, degranuladora de mastócitos e podem causar quimiotaxia de leucócitos (Nakajima *et al.*, 1986), tornando importante avaliar a atividade citotóxica e hemolítica dos peptídeos testados. Os ensaios de citotoxicidade contra adipócitos de camundongos (3T3-L1) e células endoteliais humanas (HUVEC) mostram que o peptídeo mastoparano-L apresenta atividade citotóxica (IC50: 50% de viabilidade celular) em concentrações iguais a 12,5 e 50 μM contra 3T3-L1 e HUVEC,

respectivamente. Por outro lado, nas concentrações máximas (100 μ M) testadas, não foram observadas atividades citotóxicas para os peptídeos R1 e R5 (Tabela 4 e Figura 9). Para os ensaios hemolíticos a concentração máxima dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 foi de 100 μ M. Nesta concentração mastoparano-L induziu mais de 45% de hemólise, enquanto que R1 e R5 causaram menos de 10% de hemólise (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) para os peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 contra cepas bacterianas Gram-positivas e -negativas, susceptível e resistentes.

Cepas bacterianas	CIM (μ M)		
	L	R1	R5
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	16 - 32	4	4
<i>E. coli</i> (BL21)	2	2	2
<i>E. coli</i> (KPC 001812446)	>32	8	8
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	>32	8	>32
<i>K. pneumoniae</i> (KPC 001825971)	>32	>32	>32
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	>32	>32	8
<i>S. aureus</i> (ATCC 12600)	8	4	4
<i>S. aureus</i> (MRSA)	>32	>32	8
<i>A. baumannii</i> (003326263)	>32	>32	>32
<i>E. cloacae</i> (1383251)	>32	>32	>32
<i>P. aeruginosa</i> (PAO1)	8	4	4
<i>P. aeruginosa</i> (PA14)	8	4	4

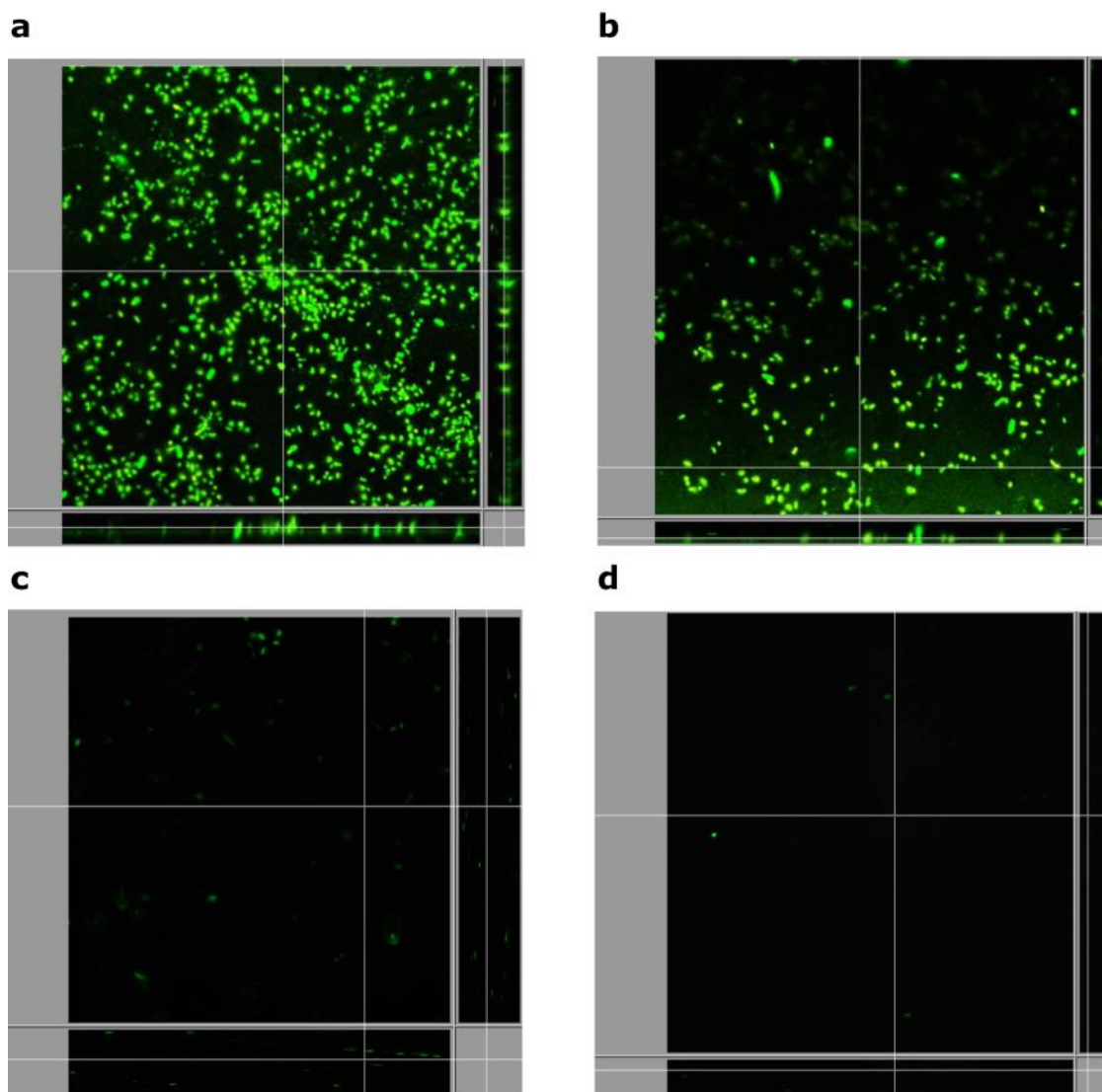


Figura 8. Análise de erradicação de biofilmes de *P. aeruginosa* (PAO1) na ausência (controle) e presença dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 a 16 μ M. (a) Biofilme pré-formado de *P. aeruginosa* antes do tratamento (controle) e (b) tratado com mastoparano-L, (c) -R1 e (d) e -R5.

Tabela 4. Atividade citotóxica (IC50) de mastoparano-L, R1 e R5 contra adipócitos de camundongos (3T3-L1) e células endoteliais de humanos (HUVEC), bem como suas propriedades hemolíticas frente a eritrócitos humanos.

IC 50 (μ M)	L	R1	R5
3T3-L1	12,5	>100	>100
HUVEC	50	>100	>100
% de hemólise			
eritrócitos humanos	45	3	8

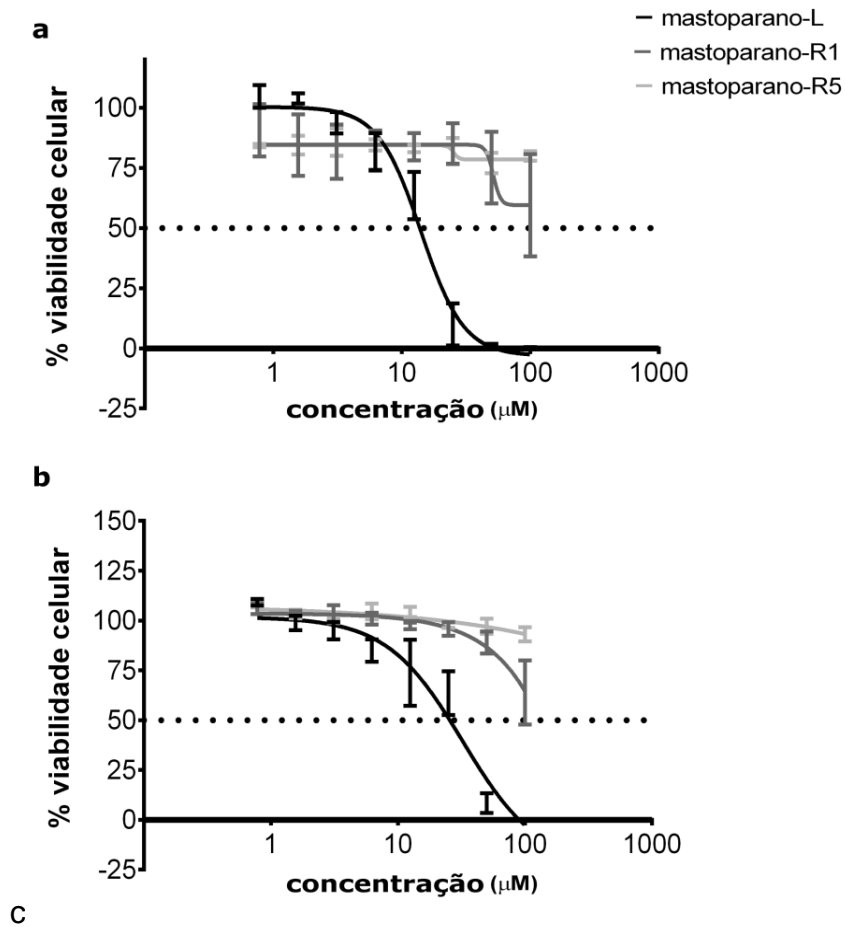


Figura 9. Ensaio de citotoxicidade contra (a) adipócitos de camundongos (3T3-L1) e (b) células endoteliais humanas (HUVEC) apresentando no eixo x as concentrações dos peptídeos em μM , eixo y a porcentagem de viabilidade celular, as linhas pontilhadas representam 50% da viabilidade celular em relação à concentração de peptídeo testado. Em escalas de cinza as linhas representam: preto, mastoparano-L; cinza escuro, mastoparano-R1 e cinza claro, mastoparano-R5.

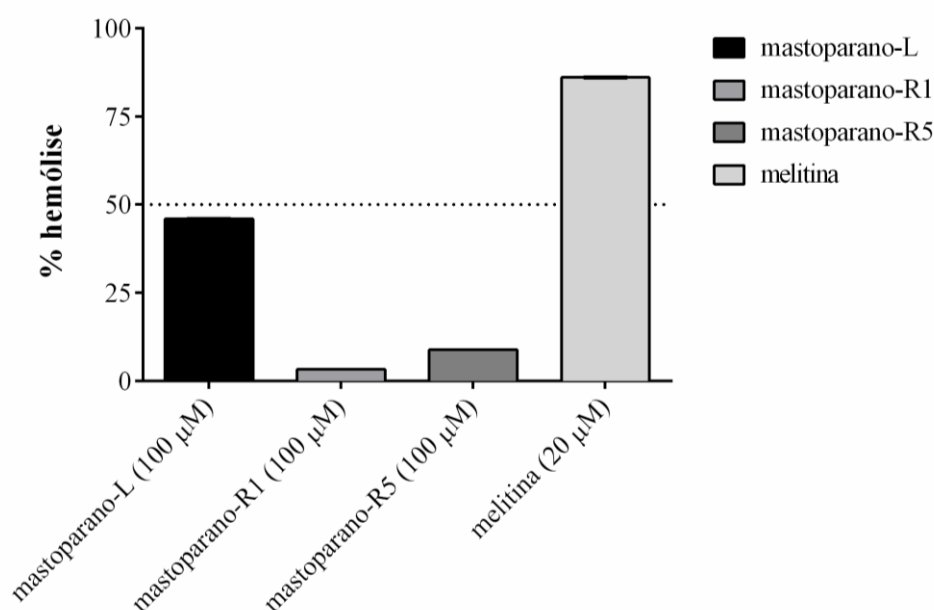


Figura 10. Percentual de hemólise dos peptídeos mastoparano-L (barra cor preta), R1 (barra cinza claro) e R5 (barra cinza escuro) nas concentrações de 100 µM frente a eritrocitos humanos. Melitina (barra cinza claro) testada até 20 µM foi utilizado com um dos controles positivos para este ensaio. Eixo y representa a porcentagem de hemólise e a linha pontilhada representa 50% da viabilidade celular em relação à concentração de peptídeo testado.

ANÁLISES ESTRUTURAIS

Buscando caracterizar a estrutura secundária dos peptídeos deste estudo, análises de dicroísmo circular foram realizadas em diferentes ambientes, incluindo água ultrapura, tampão de fosfato de potássio 10 mM (pH 7,4), TFE 30% em água (v/v) em SDS 50 mM (micelas). Quando analisados em água (Figura 11a) o peptídeo mastoparano-L apresentou uma banda positiva a 190 nm e duas bandas negativas a 208 e 222 nm, mostrando maior conteúdo de hélice (35,4%) em água em relação aos peptídeos R1 (5,5%) e R5 (4,8%). Estes, por outro lado, apresentam suas bandas negativas no comprimento de onda de 190 nm, característico de *random coil* (Tabela 5). Os perfis de bandas exibidos no tampão fosfato de potássio 10 mM não mostraram grandes mudanças em relação as análises de bandas em água mostrando que a concentração de sal utilizada no tampão não influenciou na formação de α -hélice. Em ambiente hidrofóbico, TFE 30% (Figura 11c), foi possível observar uma banda positiva (190 nm) e duas bandas negativas (208 e 222 nm)

características para estruturas em α -hélice para o peptídeo mastoparano-L. Já os peptídeos R1 e R5 tiveram o mesmo padrão de bandas, porém com menor intensidade em relação ao seu parental. Essas diferenças podem ser analisadas mais precisamente em relação a porcentagem de hélice, sendo elas 97,3% para mastoparano-L, 55,5% para R1 e 46,7 para R5 (Tabela 5). Na presença de micelas de SDS (50 mM) (Figura 11d) todos os peptídeos obtiveram bandas bem definidas e intensas, sendo assim calculadas porcentagens de hélice de 100% para todos os peptídeos (Tabela 5).

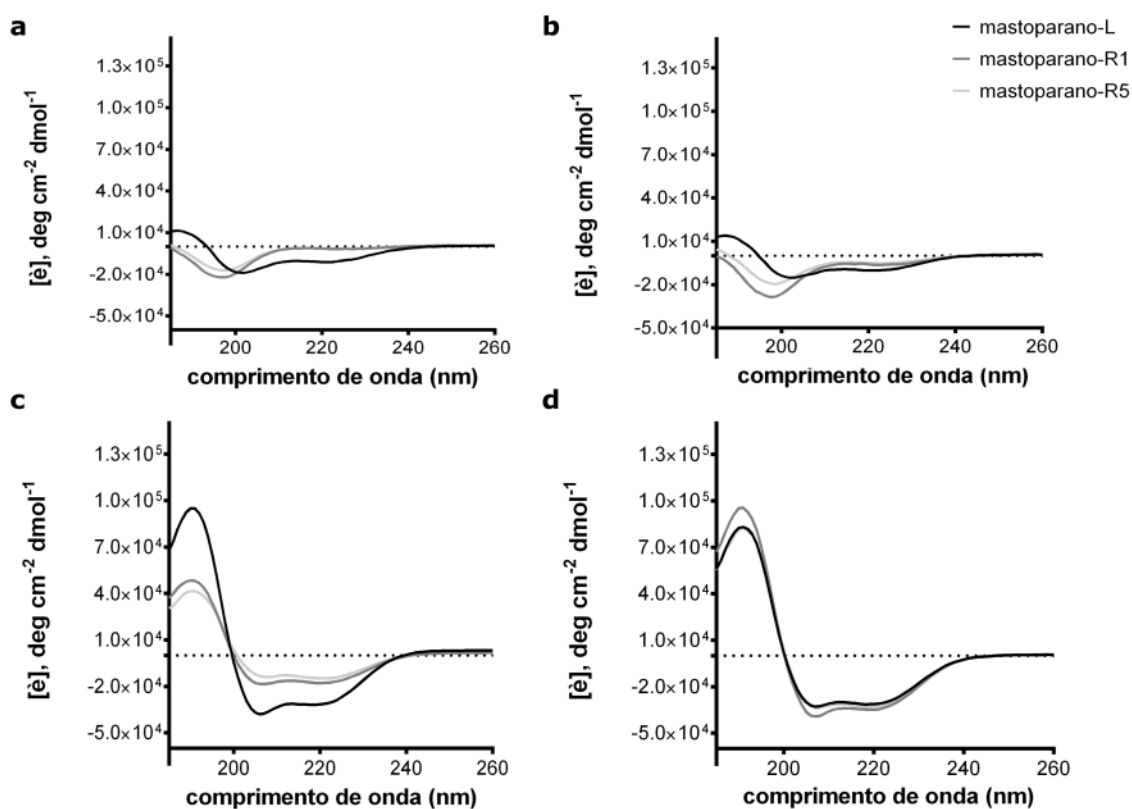


Figura 11. Análise de dicroísmo circular dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5. Espectros de DC em (a) água ultrapura, (b) tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,4), (c) TFE 30% em água (v/v) e (d) SDS 50 mM.

Tabela 5. Conteúdo de hélice dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5. O teor de hélice para todos os peptídeos foi calculado a partir da elipticidade média residual em 222 nm ($[\theta]_{222}$) de acordo com a seguinte equação: %hélice = $100 ([\theta]_{222}/(-39,500(1-2.57/n)))$ onde n constitui o número total de ligações peptídicas.

	Água ultrapura	KH ₂ PO ₄ 10 mM, 150 mM NaF, pH 7.4	TFE 30%	SDS 50 mM
mastoparano-L	35,4	32,6	97,3	100
mastoparano-R1	5,5	20,3	55,5	100
mastoparano-R5	4,8	16,3	46,7	100

Sabe-se que propriedades físico-químicas, bem como, estrutura, estabilidade e função estão intimamente conectadas. Dessa forma, simulações de modelagem molecular foram realizadas a fim de se obter esclarecimentos acerca das estruturas tridimensionais de R1 e R5. As estruturas foram modeladas com base no peptídeo mastoparano-L (PDB: 1D7N), mostrando identidades de 75% e 71% para R1 e R5, respectivamente. A partir de técnicas de modelagem por homologia foram gerados 100 modelos teóricos classificados de acordo com sua energia livre. Os modelos escolhidos foram validados pelo *ProSA-II* (Wiederstein e Sippl, 2007), apresentando um valor de *z-score* de -2,25 para R1 e -1,97 para R5, mostrando que as estruturas de entrada estavam dentro do intervalo de pontuações encontradas para peptídeos de tamanho similar depositados no PDB e resolvidas por RMN. O servidor *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993) mostrou uma pontuação média para os ângulos diedros juntamente com forças covalentes da cadeia principal dentro do intervalo esperado para uma estrutura confiável ($> -0,05$). Ademais o mapa de Ramachandran mostrou que 100% dos resíduos de aminoácidos estão localizados nas regiões mais favoráveis. Os modelos gerados por homologia para R1 (Figura 12b) e R5 (Figura 12c) revelaram uma estrutura predominantemente em α -hélice, semelhante ao modelo *template*, mastoparano-L (Figura 12a). Em adição, a anfipaticidade de ambos os peptídeos pôde ser claramente observada a nível tridimensional, onde a disposição de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos foram bem definidos ao longo da cadeia em hélice (Figura 8). Associados a isso, o potencial eletrostático de superfície dos modelos dos análogos mostraram a anfipaticidade de cada peptídeo (Figura 12a ,b e c).

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para melhor compreender o comportamento das estruturas teóricas tridimensionais em diferentes ambientes ao longo do tempo. Em ambiente hidrofílico, após 50 ns de simulações de dinâmica molecular em água, observou-se que mastoparano-L, R1 e R5 apresentam desvio médio quadrático (RMSD) de cerca de 0,6 nm (Figura 14a), mostrando que estes desvios acompanhavam a mudança estrutural (desestabilização) da molécula. Em 100 ns ocorre a perda total de conformação em α -hélice (Figura 13a, b e c). A análise de flutuação média quadrática (RMSF) foi de aproximadamente 0,1 nm a 0,7 nm, sendo que o peptídeo com maior variação de flutuação foi para R1. Todos os peptídeos mostraram maior flutuação em regiões C-terminal (Figura 14b). Ainda que os peptídeos mastoparano-L e R5 tenham apresentado menor flutuação, todas as moléculas perderam totalmente a conformação de α -hélice (Figura 13a, b e c). Foi possível observar um aumento nos valores de raio de giro (R_g) (Figura 14c), indicando que todos os peptídeos perdem a estrutura α -hélice inicial, mas não tendem a se compactar.

Em ambiente hidrofóbico, TFE 30%, todos os peptídeos apresentaram maior estabilidade. Os peptídeos apresentaram um RMSD de aproximadamente 0,3 nm sendo este desvio mais evidente até os 50 ns iniciais de simulação, principalmente para os peptídeos R1 e R5 (Figura 14d). A análise de RMSF dos peptídeos neste ambiente mostram uma variação maior a partir do resíduo 5, sendo que a região C-terminal apresenta maior instabilidade para os peptídeos R1 e R5 (Figura 14e). As análises de raio de giro em TFE 30% mostraram que o peptídeo mastoparano-L obteve uma variação de eixo menor, $\sim 0,1$ nm, apresentando maior estabilidade da estrutura em α -hélice (Figura 13d), já os peptídeos R1 (Figura 13e) e R5 (Figura 13f) variaram em $\sim 0,3$ nm (Figura 14f).

As análises em micelas de SDS mostraram que estes peptídeos possuem uma alta estabilidade neste ambiente. Mastoparano-L (Figura 13g), R1 (Figura 13h) e R5 (Figura 13i) apresentaram maior conteúdo de hélice em contato com micelas, assim como observados nos experimentos de DC. Foi observado RMSD com variação entre 0,2 nm durante o período de 100 ns de simulação (Figura 14g). Ademais, análises de RMSF mostraram pequena flutuação no N-terminal e maior estabilidade a partir do resíduo 5 (Figura 14h). As análises de raio de giro reafirmam a alta estabilidade dos peptídeos de estudo em ambiente micelar aniônico (Figura 14i)

Dessa forma, as análises das simulações de dinâmica molecular de (Figura 14), combinadas aos *snapshots* das estruturas tridimensionais (Figura 13), corroboram com os dados experimentais de DC, revelando a alta instabilidade dessas moléculas em ambiente hidrofílico em relação aos ambientes hidrofóbico e micelar aqui avaliados.

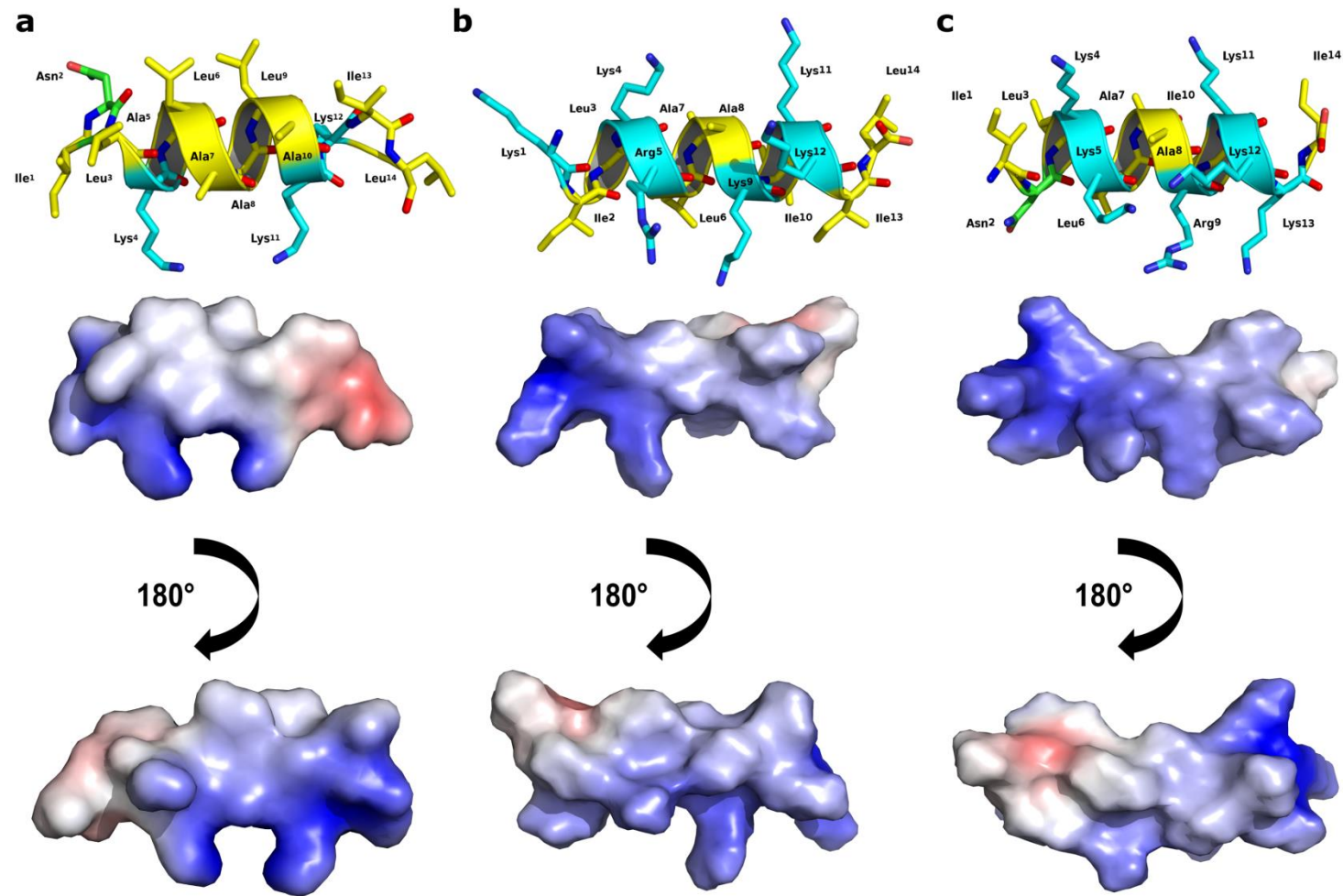


Figura 12. Modelos tridimensionais teóricos e superfícies eletrostáticas para (a) mastoparano-L (1D7N), (b) R1 (c) R5. Em ciano, resíduos apolares; em amarelo, resíduos polares e em verde resíduos polares não carregados. O potencial eletrostático dos modelos foi calculado através do Adaptive Poisson-Boltzmann solver (APBS), com potenciais variando de -5 kT/e (vermelho) a +5 kT/e (azul).

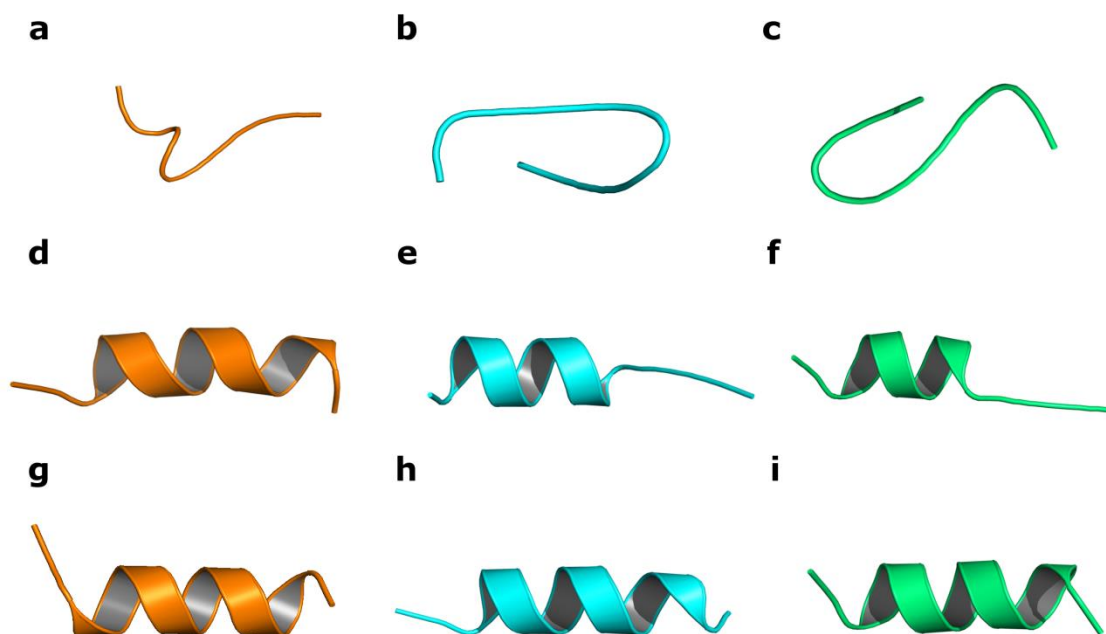


Figura 13. Estruturas teóricas tridimensionais (a) mastoparanos-L, (b) R1 e (c) R5 em água; (d) mastoparanos-L, (e) R1 e (f) R5 em TFE 30%; (g) mastoparano-L, (h) R1 e (i) R5 em micelas de SDS.

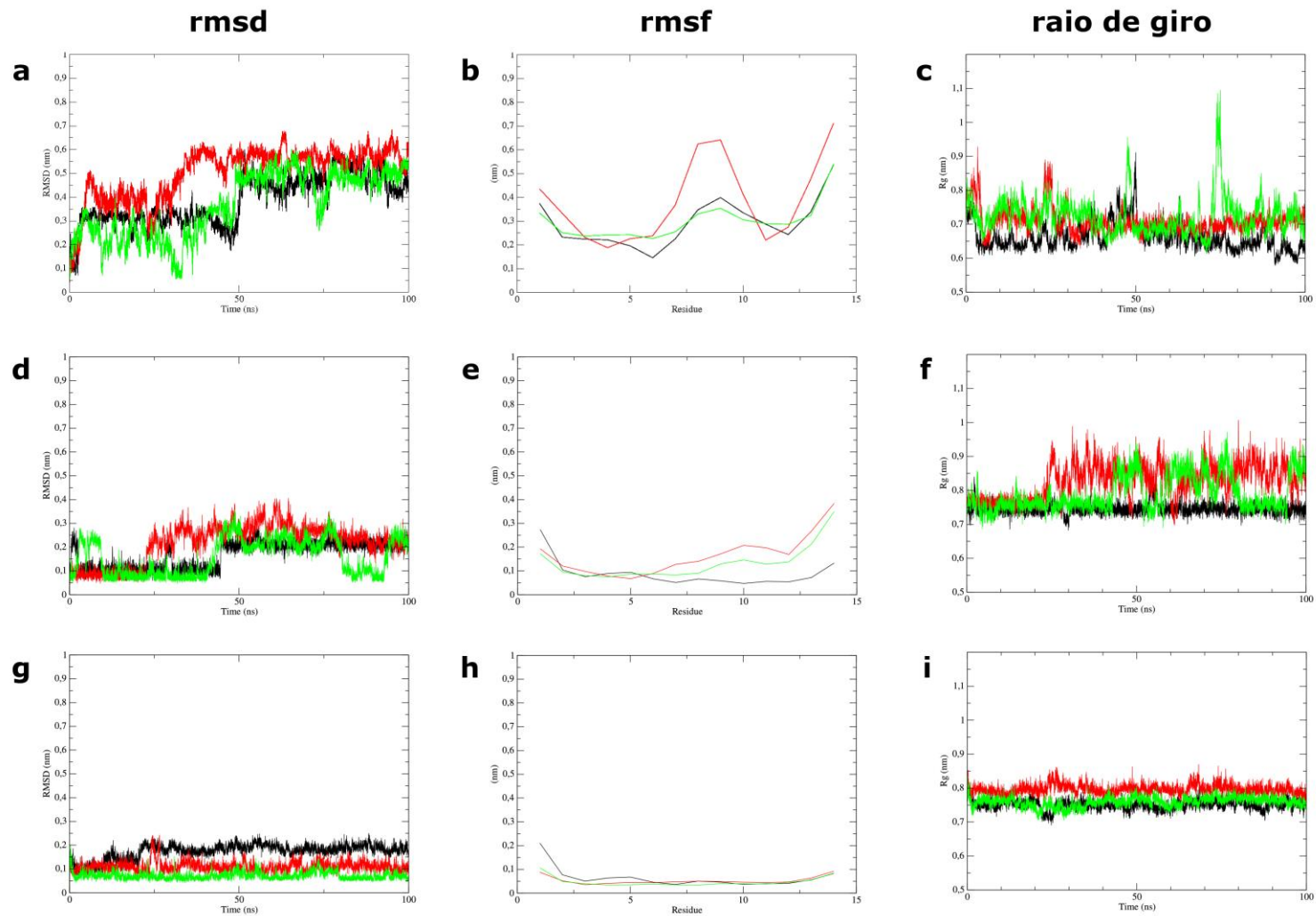


Figura 14. Representação dos parâmetros resultantes de simulações de dinâmica molecular onde foram analisados: desvio médio quadrático (RMSD), flutuação média quadrática (RMSF) e raio de giro. Em (a), (b) e (c) análises em água; (d), (e) e (f) análises em TFE 30%; (g), (h) e (i) em micelas de SDS. As cores representam os peptídeos mastoparano-L (preto); R1 (vermelho); R5 (verde).

DISCUSSÃO

O uso indiscriminado de antibióticos pela população tornou-se uma preocupação pública, levando ao fenômeno de resistência a múltiplos fármacos (Cao *et al.*, 2017), especialmente em hospitais e comunidades onde o arsenal de antibióticos já não pode ser eficaz para combater infecções causadas por bactérias resistentes (Xie *et al.*, 2017). Neste contexto, vários esforços estão sendo realizados pela comunidade científica a fim de se desenvolver alternativas favoráveis para restringir as infecções causadas por essas cepas patogênicas. Entre essas alternativas, destacamos os PAMs como candidatos promissores, representando uma classe de moléculas antibacterianas promíscuas produzidas pela maioria dos organismos na natureza (Giuliani *et al.*, 2007)

Os mastoparanos consistem em peptídeos catiônicos isolados de toxinas de vespa. Em sua maioria estes peptídeos podem ser caracterizados por possuir 14 resíduos de aminoácidos e contendo geralmente resíduos hidrofóbicos, incluindo leucina, isoleucina, valina, lisina, bem como um C-terminal amidado (Nakajima *et al.*, 1986; Higashijima *et al.*, 1988). O peptídeo mastoparano-L foi isolado inicialmente do veneno da *Vespa lewissii* possuindo atividades citolítica, hemolítica, além de promover a degranulação de mastócitos. Como observado a partir de sua sequência (INLKALAALAKKIL-NH₂) (Hirai *et al.*, 1979; Hori *et al.*, 2001), mastoparano-L possui carga líquida igual a +3, 57,6 de hidrofobicidade e um momento hidrofóbico de 0,398 μH (Tabela 2). Os resíduos de leucina (L), isoleucina (I) e lisina (K) foram mantidos nas sequências primárias dos análogos R1 e R5, bem como C-terminal amidado (-NH₂). Contudo, ao contrário da sequência do parental, mastoparan-L (PDB 1D7N), os análogos R1 e R5 aqui avaliados apresentam argininas (R), bem como um aumento nos números de lisina ou arginina onde o arranjo dos resíduos ao longo da hélice, podendo levar ao aumento de interações eletrostáticas peptídeos-membranas aniônicas (Chen *et al.*, 2005).

Irazazabal e colaboradores (2016) aplicaram técnicas de desenho racional para modificar a sequência de mastoparano-L, gerando o PAM denominado [I⁵R⁸] (INLKILARLAKKIL-NH₂). Este peptídeo sofreu alteração nas posições 5 e 8, onde houve a substituição de alaninas por resíduos de isoleucina e arginina,

respectivamente, resultando em um aumento de carga de +3 para +4. Foram também observadas reduções na hidrofobicidade e aumento do valor do momento hidrofóbico para o análogo [I⁵R⁸]. As substituições únicas de duas alaninas nas posições 5 e 8 de mastoparano-L por resíduos de isoleucina e arginina, respectivamente [I⁵, R⁸], tornaram o peptídeo menos citotóxico e mais eficaz contra bactérias Gram-positivas e negativas (Irazazabal *et al.*, 2016). As modificações pontuais nas sequências dos peptídeos R1 e R5, também lhes em resultaram mudanças em suas propriedades físico-químicas, conferindo carga +6 para os dois novos análogos, uma redução de sua hidrofobicidade e aumento do momento hidrofóbico em relação ao peptídeo parental mastoparano-L. Além disso, podemos observar que as alterações realizadas nas sequências dos peptídeos (R1 e R5) interferiram não só nas características físico-químicas, mas também na reorganização das faces hidrofílicas e hidrofóbicas (anfipaticidade) dos peptídeos. Essas alterações das características físico-químicas dos peptídeos R1 e R5 podem estar diretamente ligadas a perda da ação hemolítica e citotóxica em relação ao seu parental, mastoparano-L.

Estudos têm demonstrado que o redesenho de peptídeos lineares pode alterar o alvo e o modo de ação dessas moléculas (Giangaspero *et al.*, 2001) e, embora as sequências peptídicas tenham conservado algumas regiões, as substituições de determinados resíduos de aminoácidos podem interferir em suas atividades biológicas (Murata *et al.*, 2006; Porto *et al.*, 2012). Estudos com mastoparanos redesenhados mostraram que tais modificações influenciam suas estruturas e mecanismos de ação (Dos Santos Cabrera *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011).

Diversos mastoparanos tem sido relatados possuindo ação antimicrobiana, sendo que a maioria dos estudos que envolvem análogos desta classe atua contra bactérias Gram-negativas e -positivas. Dentro deste contexto, de Souza e colaboradores (De Souza *et al.*, 2011) mostraram que a posição de lisinas ao longo da cadeia peptídica pode influenciar na estrutura secundária e bioatividade. Dessa forma, os análogos de mastoparano por eles estudados apresentaram baixos valores de inibição contra *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 6538). Os peptídeos desenvolvidos, R1 e R5, foram capazes de inibir as cepas de *E. coli* (ATCC 25922) a 4 µM e *E. coli* (KPC 001812446) a 8 µM, enquanto mastoparano-L

inibiu as mesmas cepas a 16 – 32 μM respectivamente. Além disso, todos os peptídeos (L, R1 e R5) inibiram *E. coli* (BL21) a 2 μM . Konno e colaboradores (2001) utilizaram uma metodologia semelhante à aplicada em nossos experimentos, mostrando que o potencial de inibição de Anopline (vespa *Anoplin samariensis*) contra *E. coli* (ATCC 25922) foi de 40 μM e *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. aureus* (ATCC 6538) foram 4,3 e 40 μM , respectivamente. Este peptídeo apresenta 10 resíduos de aminoácidos e possui carga +3; contudo, apesar de possuir ação antibacteriana e formar uma α -hélice anfifílica, possui ação hemolítica.

Mastoparano-L e R1 foram capazes de inibir a cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) acima de 32 μM e o peptídeo R5 a 8 μM . Já a cepa (ATCC 12600) foi inibida por R5 a 4 μM , enquanto mastoparano-L apresentou MIC igual a 8 μM . Além disso, o peptídeo R5 inibiu o crescimento de MRSA a 8 μM , enquanto os peptídeos mastoparano-L e R1 não foram capazes de inibir essa cepa resistente na concentração máxima utilizada. O peptídeo semelhante aos análogos estudados, mastoparano [I⁵, R⁸] foi capaz de inibir a cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) a 25 μM . Sendo assim, R1 e R5 mostram uma maior eficiência em relação ao peptídeo [I⁵, R⁸]. Quando avaliados contra *K. pneumoniae* (ATCC 13883), o peptídeo R1 foi capaz de inibir a 8 μM . Lin e colaboradores (2011), mostraram em seus estudos que os análogos de mastoparano inibiram *K. pneumoniae* entre 32 a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, entretanto vários dos análogos testados exibiram ação hemolítica.

Os resultados de *flow-cell* demonstram que os peptídeos R1 e R5 foram capazes de erradicar os biofilmes pré-formados na concentração testada de 16 μM . Entretanto mastoparano-L não apresentou o mesmo potencial de erradicação. Até o momento, não foram encontrados estudos de mastoparanos com atividade anti-biofilme contra *P. aeruginosa* tornando este resultado de grande importância na elucidação de potencial antibacteriano dos peptídeos desta família. O peptídeo LL-37 foi caracterizado como um PAM humano derivado de catelicidina. Nagan e colaboradores (2012) demonstraram que os fragmentos LL7-37 e LL-31 foram capazes de reduzir a biomassa dos biofilmes da cepa PAO1 (a mesma testada em nossos estudos).

As análises de dicroísmo circular fornecem informações que refletem tanto as características estruturais, quanto as mudanças conformacionais de interação de peptídeos em determinados ambientes. A partir dos espectros de dicroísmo circular

de proteínas e peptídeos pode ser possível determinar a porcentagem de cada estrutura secundária na molécula, porém não é possível determinar quais resíduos de aminoácidos estão envolvidos na formação das estruturas secundárias (Greenfield, 2006).

Mastoparanos de forma geral possuem estruturas ambiente-dependente e diversos trabalhos utilizam metodologias de dicroísmo circular, modelagem e dinâmica molecular para investigar tal plasticidade estrutural. Os experimentos de dicroísmo circular de Lin e colaboradores (2011) caracterizaram a estrutura secundária de 6 mastoparanos em diferentes ambientes, onde apenas um apresentou porcentagem de formação helicoidal em sistema aquoso; enquanto os outros 5 mastoparanos mostraram estruturas randômicas, dados também observados em nosso experimento. Konno e colaboradores (2006) mostraram através de dicroísmo circular que eumenitina e EMP-AF tendem a formar hélices em condições hidrofóbicas (TFE), SDS e em vesículas zwitteriônicas e aniônicas. R1 e R5 por sua vez, também apresentam essa tendência em relação a TFE (acima de 40%) e SDS (100%). de Souza e colaboradores (2011) também corroboram seus resultados mostrando uma média de 40% de hélice para seus análogos testados em SDS e TFE.

A conformação de AMP em diferentes ambientes tem sido um campo crescente e atraente na biofísica computacional uma vez que podemos observar e correlacionar os dados experimentais de dicroísmo circular com dinâmicas moleculares. Os resultados da modelagem comparativa utilizando a estrutura PDB de mastoparano-L como modelo (1D7N) (Hori *et al.*, 2001) mostraram que ambos R1 e R5 adotam conformações em α -hélice, mostrando claramente a organização dos resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos de acordo com a disposição no diagrama de hélice e superfícies eletrostáticas. Esse arranjo estrutural é ainda semelhante ao observado para o peptídeo [⁵, R⁸] descrito por Irazazabal e colaboradores (2016). Por outro lado, a dinâmica molecular dos peptídeos mastoparano-L, R1 e R5 em sistemas hidrofílicos durante 100 ns revelou que essas moléculas perderam drasticamente sua conformação inicial através da adoção de organizações em *random coil*, onde a análise gráfica mostra através do RMSD um aumento deste desvio em associação com os resultados da flutuação de cada resíduo (RMSF). de Souza e colaboradores (De Souza *et al.*, 2011) também observaram a

desestruturação de 4 mastoparanos, mostrando a desestabilização deste peptídeos em água. Outros experimentos envolvendo peptídeos catiônicos de diferentes organismos, como magainina (Esmaili e Shahlaei, 2015), *Pa*-MAP 1.9 (Cardoso *et al.*, 2016) e o mastoparano [I⁵, R⁸] (Irazazabal *et al.*, 2016) também apresentam características de instabilidade estrutural em ambiente aquoso, e maior estabilidade em ambientes de membrana. Estes dados podem ainda ser relacionados aos obtidos para R1 e R5, os quais em TFE 30% revelaram conteúdos de hélice estável até 100 ns de simulação, perdendo esta conformação apenas na porção C-terminal. Houve uma estabilidade maior da conformação em α -hélice em ambiente micelar, SDS, mostrando a importância de estudos de dinâmica molecular em diferentes tipos de ambiente para avaliar a estabilidade ou instabilidade de PAMs em diferentes condições.

CONCLUSÕES

- Os análogos possuem atividade contra cepas bacterianas susceptíveis e resistentes, Gram-positivas e -negativas.
- R1 e R5 possuem atividade contra biofilme de *P. aeruginosa*
- R1 e R5 não apresentaram ação citotóxica ou hemolítica
- Os peptídeos apresentam estruturas em *random coil* instáveis em água
- Os peptídeos tendem a formar hélices em ambiente hidrofóbico e micelar.

PERSPECTIVAS

- Analisar farmacologicamente os peptídeos mastoparano-R1 e R5
- Realizar experimentos de infecção cutânea e sistêmica em modelo animal
- Determinar o potencial imunomodulatório dos peptídeos de estudo e explorar os possíveis mecanismos de ação de mastoparano-R1 e –R5 frente a cepas bacterianas patogênicas
- Determinar as estruturas tridimensionais por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)
- Criar um paralelo estrutura-função para estes novos membros da classe dos mastoparanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of medical research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005. ISSN 0188-4409.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 10106-10111, 1984. ISSN 0021-9258.

BAPTISTA-SAIDEMBERG, N. B. et al. Protonectin (1–6): A novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaisia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 880-889, 2010. ISSN 0041-0101.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Micro**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 01//print 2015. ISSN 1740-1526. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>>.

BLANCO, F. J.; RIVAS, G.; SERRANO, L. A short linear peptide that folds into a native stable β -hairpin in aqueous solution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 1, n. 9, p. 584-590, 1994.

BLONDELLE, S.; LOHNER, K. Optimization and high-throughput screening of antimicrobial peptides. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 28, p. 3204-3211, 2010. ISSN 1381-6128.

BRADSHAW, J. P. Cationic antimicrobial peptides. **BioDrugs**, v. 17, n. 4, p. 233-240, 2003. ISSN 1173-8804.

BRAFF, M.; GALLO, R. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. In: (Ed.). **Antimicrobial Peptides and Human Disease**: Springer, 2006. p.91-110.

BROEKAERT, W. F. et al. Antimicrobial peptides from plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 16, n. 3, p. 297-323, 1997. ISSN 0735-2689.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005. ISSN 1740-1526.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545-1614, 2009. ISSN 1096-987X.

CAO, H. et al. 266 Prevalence and risk factors for antimicrobial resistance on US dairy operations. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. suppl_4, p. 131-132, 2017. ISSN 0021-8812.

CARDOSO, M. H. et al. A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

CHAN, L. Y.; CRAIK, D. J.; DALY, N. L. Cyclic thrombospondin-1 mimetics: grafting of a thrombospondin sequence into circular disulfide-rich frameworks to inhibit endothelial cell migration. **Bioscience reports**, v. 35, n. 6, p. e00270, 2015. ISSN 0144-8463.

CHEN, Y. et al. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12316-12329, 2005. ISSN 0021-9258.

CHIANG, L. H.; KOTANCHEK, M. E.; KORDON, A. K. Fault diagnosis based on Fisher discriminant analysis and support vector machines. **Computers & chemical engineering**, v. 28, n. 8, p. 1389-1401, 2004. ISSN 0098-1354.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999. ISSN 0036-8075.

DANILENKO, M. et al. Selective effects of mastoparan analogs: separation of G-protein-directed and membrane-perturbing activities. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 196, n. 3, p. 1296-1302, 1993. ISSN 0006-291X.

DAVIES, A.; SHAMU, C. **An introduction to high content screening: imaging technology, assay development, and data analysis in biology and drug discovery**. John Wiley & Sons, 2014. ISBN 1118859413.

DE AZEVEDO, R. A. et al. Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity in vivo. **Peptides**, v. 68, p. 113-119, 6// 2015. ISSN 0196-9781. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978114002939>>.

DE BREIJ, A. et al. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms. **Science translational medicine**, v. 10, n. 423, p. eaan4044, 2018. ISSN 1946-6234.

DE CASTRO, A. P.; FRANCO, O. L. Modifying natural antimicrobial peptides to generate bioinspired antibiotics and devices. **Future medicinal chemistry**, v. 7, n. 4, p. 413-415, 2015. ISSN 1756-8919.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2696-2704, 2012. ISSN 0066-4804.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013. ISSN 1369-5274.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Chemistry & biology**, v. 22, n. 2, p. 196-205, 2015. ISSN 1074-5521.

DE SOUZA, B. M. et al. Investigating the effect of different positioning of lysine residues along the peptide chain of mastoparans for their secondary structures and biological activities. **Amino acids**, v. 40, n. 1, p. 77-90, 2011. ISSN 0939-4451.

DENNISON, S. R. et al. Amphiphilic α -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2005. ISSN 0929-8665.

DOS SANTOS CABRERA, M. et al. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 64, n. 3, p. 95-103, 2004. ISSN 1399-3011.

EDDY, S. R. Profile hidden Markov models. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 14, n. 9, p. 755-763, 1998. ISSN 1460-2059.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. **Nature**, v. 299, n. 5881, p. 371-374, 1982. ISSN 0028-0836.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1462, n. 1, p. 11-28, 1999. ISSN 0005-2736.

ESMAILI, E.; SHAHLAEI, M. Analysis of the flexibility and stability of the structure of magainin in a bilayer, and in aqueous and nonaqueous solutions using molecular dynamics simulations. **Journal of molecular modeling**, v. 21, n. 4, p. 1-15, 2015. ISSN 1610-2940.

FARRIS, M.; STEINBERG, A. Mitrecin A, an endolysin-like bacteriolytic enzyme from a newly isolated soil streptomycete. **Letters in applied microbiology**, v. 58, n. 5, p. 493-502, 2014. ISSN 1472-765X.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 661-681, 2012. ISSN 0893-8512.

FISER, A.; ŠALI, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. **Methods in enzymology**, v. 374, p. 461-491, 2003. ISSN 0076-6879.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, 2017. ISSN 1740-1526.

FLOSS, H. G.; YU, T.-W. Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, p. 621-632, 2005. ISSN 0009-2665.

FRANCO, O. L. Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. **FEBS letters**, v. 585, n. 7, p. 995-1000, 2011. ISSN 1873-3468.

GALLO, R. L. et al. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 6, p. 823-831, 2002. ISSN 0091-6749.

GAUTIER, R. et al. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics**, v. 24, n. 18, p. 2101-2102, 2008. ISSN 1367-4803.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α helical antimicrobial peptides. **The FEBS Journal**, v. 268, n. 21, p. 5589-5600, 2001. ISSN 1432-1033.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Open Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-33, 2007. ISSN 2391-5412.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876, 2006. ISSN 1750-2799.

HANCOCK, R.; PATRZYKAT, A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. **Current drug targets-Infectious disorders**, v. 2, n. 1, p. 79-83, 2002. ISSN 1568-0053.

HANCOCK, R. E.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402-410, 2000. ISSN 0966-842X.

HANCOCK, R. E.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 82-88, 1998. ISSN 0167-7799.

HANCOCK, R. E.; ROZEK, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. **FEMS microbiology letters**, v. 206, n. 2, p. 143-149, 2002. ISSN 0378-1097.

HANCOCK, R. E.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the national Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8856-8861, 2000. ISSN 0027-8424.

HESS, B. et al. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997. ISSN 0192-8651.

HIGASHIJIMA, T. et al. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 14, p. 6491-6494, 1988. ISSN 0021-9258.

HILCHIE, A. L. et al. Mastoparan is a membranolytic anti-cancer peptide that works synergistically with gemcitabine in a mouse model of mammary carcinoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 12, p. 3195-3204, 2016. ISSN 0005-2736.

HIRAI, Y. et al. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespa lewisii*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 27, n. 8, p. 1942-4, Aug 1979. ISSN 0009-2363 (Print) 0009-2363.

HISS, J.; HARTENFELLER, M.; SCHNEIDER, G. Concepts and applications of "natural computing" techniques in de novo drug and peptide design. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 15, p. 1656-1665, 2010. ISSN 1381-6128.

HO, C.-L. et al. Enhancing the hypotensive effect and diminishing the cytolytic activity of hornet mastoparan B by D-amino acid substitution. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1561-1566, 2001. ISSN 0041-0101.

HOLLAND, J.; GOLDBERG, D. Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning. **ed: Addison-Wesley, Reading, MA**, 1989.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012. ISSN 2150-5594 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3485979/> >.

HOLMBERG, K. V. et al. Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 9, p. 8224-8231, 2013. ISSN 1742-7061.

HOOPER, D. C. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 530-538, 2002. ISSN 1473-3099.

HORI, Y. et al. Interaction of mastoparan with membranes studied by 1H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state 2H-NMR and 15N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 2, p. 302-309, 2001. ISSN 1432-1033.

IRAZAZABAL, L. N. et al. Selective amino acid substitution reduces cytotoxicity of the antimicrobial peptide mastoparan. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 11, p. 2699-2708, 2016. ISSN 0005-2736.

IZADPANA, A.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 381-390, 2005. ISSN 0190-9622.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006. ISSN 0893-8512.

JIANG, Z. et al. Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides to Target Gram-negative Pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Utilization of Charge, 'Specificity Determinants,' Total Hydrophobicity, Hydrophobe Type and Location as Design Parameters to Improve the Therapeutic Ratio. **Chemical biology & drug design**, v. 77, n. 4, p. 225-240, 2011. ISSN 1747-0285.

JO, S. et al. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of computational chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859-1865, 2008. ISSN 1096-987X.

JONASSEN, I.; COLLINS, J. F.; HIGGINS, D. G. Finding flexible patterns in unaligned protein sequences. **Protein science**, v. 4, n. 8, p. 1587-1595, 1995. ISSN 1469-896X.

JONES, S.; HOWL, J. Biological applications of the receptor mimetic peptide mastoparan. **Current Protein and Peptide Science**, v. 7, n. 6, p. 501-508, 2006. ISSN 1389-2037.

JOO, S. H. Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 20, n. 1, p. 19-26, Jan 2012. ISSN 1976-9148 (Print) 1976-9148 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116270> >.

KLIGER, Y. Computational approaches to therapeutic peptide discovery. **Peptide Science**, v. 94, n. 6, p. 701-710, 2010. ISSN 1097-0282.

KONNO, K. et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1550, n. 1, p. 70-80, 2001. ISSN 0167-4838.

KONNO, K. et al. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2624-2631, 2006. ISSN 0196-9781.

KONNO, K. 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**, v. 38, n. 11, p. 1505-1515, 2000. ISSN 0041-0101.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306, 2013. ISSN 2157-1422.

KOTSIANTIS, S. B.; ZAHARAKIS, I.; PINTELAS, P. **Supervised machine learning: A review of classification techniques** 2007.

LAI, Y.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in immunology**, v. 30, n. 3, p. 131-141, 2009. ISSN 1471-4906.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993. ISSN 0021-8898.

LEDERBERG, J.; HAMBURG, M. A.; SMOLINSKI, M. S. **Microbial threats to health: emergence, detection, and response**. National Academies Press, 2003. ISBN 030908864X.

LI, M.-L. et al. Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan M. **International journal of antimicrobial agents**, v. 13, n. 3, p. 203-208, 2000. ISSN 0924-8579.

LIN, C.-H. et al. Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan. **Peptides**, v. 32, n. 10, p. 2027-2036, 2011. ISSN 0196-9781.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Molecular modeling annual**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001. ISSN 0949-183X.

LLARRULL, L. I. et al. The future of the β -lactams. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 5, p. 551-557, 2010. ISSN 1369-5274.

LORIN, C. et al. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology**, v. 334, n. 2, p. 264-275, 2005. ISSN 0042-6822.

MANABE, T.; KAWASAKI, K. D-form KLKLLLLLKLK-NH₂ peptide exerts higher antimicrobial properties than its L-form counterpart via an association with bacterial cell wall components. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Current opinion in pharmacology**, v. 6, n. 5, p. 468-472, 2006. ISSN 1471-4892.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 4, p. 647-679, 2002. ISSN 0893-8512.

MENDES, M. A. et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 67-74, 2004. ISSN 0041-0101.

MIGLIOLO, L. et al. Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 7, p. 1488-1498, 2016. ISSN 0005-2736.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165-199, 2001. ISSN 0066-4227.

MONTE, A. A.; VASILIOU, V.; HEARD, K. J. Omics screening for pharmaceutical efficacy and safety in clinical practice. **Journal of pharmacogenomics & pharmacoproteomics**, 2012.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 242-249, 2004. ISSN 0028-0836.

MORGENSTERN, B. et al. Multiple sequence alignment with user-defined anchor points. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 6, 2006. ISSN 1748-7188.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015, 2016. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/> >.

MURATA, K. et al. Novel biologically active peptides from the venom of *Polistes rothneyi* iwatai. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 12, p. 2493-2497, 2006. ISSN 0918-6158.

NAGANT, C. et al. Identification of peptides derived from the human antimicrobial peptide LL-37 active against biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* using a library of truncated fragments. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5698-5708, 2012. ISSN 0066-4804.

NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, v. 25 Suppl, p. S115-21, 1986. ISSN 0006-3525 (Print) 0006-3525.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464-472, 9// 2011. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779911000886> >.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009. ISSN 0066-4154.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000. ISSN 0066-4227.

OKUMURA, K. et al. **THE EFFECT OF MASTOPARAN ON ION MOVEMENT IN BLACK LIPID-MEMBRANE: BIOMED RES FOUND KANDA PO BOX 182 CHIYODAKU, TOKYO 101-91, JAPAN. 2: 450-452 p. 1981.**

ORGANIZATION, W. H. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. 2015. ISSN 9241564946.

OSBORN, A. M.; BÖLTNER, D. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative-and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. **Plasmid**, v. 48, n. 3, p. 202-212, 2002. ISSN 0147-619X.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1693-1703, 2003. ISSN 0196-9781.

PARK, N. G. et al. Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. **Biopolymers**, v. 36, n. 6, p. 793-801, 1995. ISSN 1097-0282.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010. ISSN 0028-4793.

PELEGRINI, P. B. et al. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. **Biochemistry Research International**, v. 2011, 2011. ISSN 2090-2247.

PETSKO, G. A. On the other hand. **Science**, v. 256, n. 5062, p. 1403-1404, 1992. ISSN 0036-8075.

PIEK, T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 139-149, 1991. ISSN 0041-0101.

PORTO, W. F.; SILVA, O. N.; FRANCO, O. L. Prediction and rational design of antimicrobial peptides. In: (Ed.). **Protein Structure**: InTech, 2012.

POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681-1691, 2003. ISSN 0196-9781.

REDDY, K.; YEDERY, R.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International journal of antimicrobial agents**, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004. ISSN 0924-8579.

RICE, L. B. **Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE**: The University of Chicago Press 2008.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of internal medicine**, v. 272, n. 6, p. 541-561, 2012. ISSN 1365-2796.

SAIDEMBERG, D. M. et al. Polybioside, a neuroactive compound from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Journal of natural products**, v. 73, n. 4, p. 527-531, 2010. ISSN 0163-3864.

SCANLON, T. C.; DOSTAL, S. M.; GRISWOLD, K. E. A high-throughput screen for antibiotic drug discovery. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 232-243, 2014. ISSN 1097-0290.

SCHNEIDER, G.; WREDE, P. Artificial neural networks for computer-based molecular design. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 70, n. 3, p. 175-222, 1998. ISSN 0079-6107.

SCHWARZ, G.; BLOCHMANN, U. Association of the wasp venom peptide mastoparan with electrically neutral lipid vesicles: Salt effects on partitioning and conformational state. **FEBS letters**, v. 318, n. 2, p. 172-176, 1993. ISSN 0014-5793.

- SCORNET, E.; BIAU, G.; VERT, J.-P. Consistency of random forests. **The Annals of Statistics**, v. 43, n. 4, p. 1716-1741, 2015. ISSN 0090-5364.
- SCOTT, M. G.; YAN, H.; HANCOCK, R. E. Biological properties of structurally related α -helical cationic antimicrobial peptides. **Infection and immunity**, v. 67, n. 4, p. 2005-2009, 1999. ISSN 0019-9567.
- SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002. ISSN 1097-0282.
- SILVA, O. N. et al. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. 2011.
- TODOKORO, Y. et al. Structure of tightly membrane-bound mastoparan-X, a G-protein-activating peptide, determined by solid-state NMR. **Biophysical journal**, v. 91, n. 4, p. 1368-1379, 2006. ISSN 0006-3495.
- TORRENT, M. et al. AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions. **Bioinformatics**, v. 28, n. 1, p. 130-131, 2011. ISSN 1460-2059.
- TOSSI, A.; TARANTINO, C.; ROMEO, D. Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. **European journal of biochemistry**, v. 250, n. 2, p. 549-558, 1997. ISSN 1432-1033.
- TOSTESON, M. et al. Melittin lysis of red cells. **The Journal of membrane biology**, v. 87, n. 1, p. 35-44, 1985. ISSN 0022-2631.
- VILA-FARRES, X. et al. In vitro activity of several antimicrobial peptides against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 4, p. 383-387, 4// 2012. ISSN 1198-743X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X1461452X>>.
- VLAMAKIS, H. et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 157-168, 2013. ISSN 1740-1526.
- WADE, D. et al. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4761-4765, 1990. ISSN 0027-8424.
- WAGHU, F. H. et al. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic acids research**, p. gkv1051, 2015. ISSN 0305-1048.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_1, p. D933-D937, 2008. ISSN 1362-4962.
- WANG, Z.; WANG, G. APD: the antimicrobial peptide database. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl 1, p. D590-D592, 2004. ISSN 0305-1048.
- WAYNE, P. USA: CLSI; 2012. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M100-S22**, 2012.

WEISS, R. A.; MCMICHAEL, A. J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. **Nat Med**, 2004.

WELLINGTON, E. M. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2013. ISSN 1473-3099.

WHO. World Health Organization. Global strategy for containment of antimicrobial resistance. 2001.

_____. **World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals**. 2017. 9 ISBN ISBN 978-92-4-156548-6.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl 2, p. W407-W410, 2007. ISSN 0305-1048.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature protocols**, v. 3, n. 2, p. 163, 2008. ISSN 1750-2799.

WRIGHT, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical communications**, v. 47, n. 14, p. 4055-4061, 2011.

XIE, J. et al. Clinical features and antimicrobial resistance profiles of important Enterobacteriaceae pathogens in Guangzhou representative of Southern China, 2001–2015. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 206-211, 2017. ISSN 0882-4010.


YANG, L. et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical journal**, v. 81, n. 3, p. 1475-1485, 2001. ISSN 0006-3495.

YANG, M. J. et al. Enhancing antimicrobial activity of mastoparan-B by amino acid substitutions. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 16, n. 4, p. 349-355, 2013. ISSN 1226-8615.


ZASLOFF, M.; MARTIN, B.; CHEN, H.-C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 3, p. 910-913, 1988. ISSN 0027-8424.

ANEXOS

Anexo 1. Artigo de revisão publicado na *Frontiers in Microbiology* (2017) sobre PAMs de frutos, mostrando seus potenciais usos e ferramentas biotecnológicas. (doi: 10.3389/fmicb.2016.02136)



REVIEW
published: 10 January 2017
doi: 10.3389/fmicb.2016.02136



Antimicrobial Peptides from Fruits and Their Potential Use as Biotechnological Tools—A Review and Outlook

Beatriz T. Meneguetti¹, Leandro dos Santos Machado¹, Karen G. N. Oshiro¹, Micaella L. Nogueira², Cristiano M. E. Carvalho^{1,2} and Octávio L. Franco^{1,3,4*}

¹S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil, ²Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil, ³Centro de Análises Protômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:
Tsz Bun Ng,
The Chinese University of Hong Kong,
Hong Kong

Reviewed by:
Guozhang Zou,
National Center for Nanoscience and
Technology, China
Fidris Cepik,
University of Regensburg, Germany
Margaret E. Bauer,
Indiana University School of Medicine,
USA
Janice Lorraine Straat,
University of Ontario Institute of
Technology, Canada

***Correspondence:**
Octávio L. Franco
oofranco@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance and
Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 11 October 2016
Accepted: 19 December 2016
Published: 10 January 2017

Citation:
Meneguetti BT, Machado LS, Oshiro
KGN, Nogueira ML, Carvalho CME
and Franco OL (2017) Antimicrobial
Peptides from Fruits and Their
Potential Use as Biotechnological
Tools—A Review and Outlook.
Front. Microbiol. 7:2136.
doi: 10.3389/fmicb.2016.02136

Bacterial resistance is a major threat to plant crops, animals and human health, and over the years this situation has increasingly spread worldwide. Due to their many bioactive compounds, plants are promising sources of antimicrobial compounds that can potentially be used in the treatment of infections caused by microorganisms. As well as stem, flowers and leaves, fruits have an efficient defense mechanism against pests and pathogens, besides presenting nutritional and functional properties due to their multifunctional molecules. Among such compounds, the antimicrobial peptides (AMPs) feature different antimicrobials that are capable of disrupting the microbial membrane and of acting in binding to intra-cytoplasmic targets of microorganisms. They are therefore capable of controlling or halting the growth of microorganisms. In summary, this review describes the major classes of AMPs found in fruits, their possible use as biotechnological tools and prospects for the pharmaceutical industry and agribusiness.

Keywords: antimicrobial peptides, biotechnological potential, fruits, infections, microorganisms

INTRODUCTION

Intensive and prolonged antimicrobial therapy, and the over-prescription and indiscriminate use of these drugs in veterinary medicine, have increased the resistance of microorganisms to conventional antimicrobials by selection pressure, so it is urgently necessary to search for new alternatives to these drugs. For bacteria to remain in the human organism, they have developed several defense mechanisms against antibiotics (Podschun and Ullmann, 1998). The selection pressure on susceptible microbes, the long duration and over-prescription of antimicrobial therapy and the use of various antimicrobial agents in animals raised commercially for food has made it necessary to search for new alternatives to conventional antibiotics. Thus, the types of antibiotics already commercialized and new combinations that may be available among them (Gordon et al., 2010) should be analyzed, so that they may present higher antibacterial activity against infections and biofilms (Corvec et al., 2013).

Like many living organisms, plants are constantly targets of insects, fungi and bacteria. These ongoing challenges can be responsible for the development of an efficient defense system through the synthesis of secondary metabolites such as phenols, oxygen-substituted derivatives, terpenoids, quinines, tannins, and antimicrobial peptides (AMPs) (Abreu et al., 2013).

Anexo 2. Capítulo de livro (*Peptide applications in biomedicine, biotechnology and bioengineering, edited by Sotirios Koutsopoulos*) publicado pela Elsevier (2017) relacionado ao desenho e futuras aplicações de PAMs constituídos parcial ou inteiramente por D-aminoácidos, bem como retro-inversos. (ISBN: 978-0-08-100742-6)

Peptides containing D-amino acids and retro-inverso peptides: General applications and special focus on antimicrobial peptides

5

Marlon H. Cardoso^{1,2,3}, Elizabete S. Cândido^{2,3}, Karen G.N. Oshiro³, Samilla B. Rezende³ and Octávio L. Franco^{1,2,3}

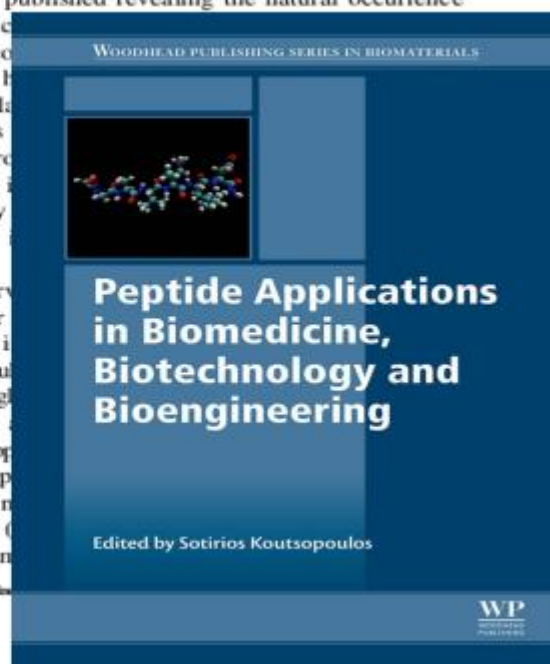
¹University of Brasília, Brasília, Brazil, ²Catholic University of Brasília, Brasília, Brazil, ³Catholic University Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

5.1 Introduction and overview

According to the central dogma established by classical naturalists and biologists, proteins/peptides were expected to be exclusively constituted by 20 building blocks, including 19 L-amino acids (L-AAs) and glycine, which is not chiral. At that time, special cases were reported for D-amino acids (D-AAs) containing proteins/peptides such as the presence of D-alanine in octopine derivatives from octopus [1]. Over the years, however, increasing reports were published revealing the natural occurrence of D-AAs in several organisms [2,3]. Since the discovery of D-AAs, a significant gap regarding the biogenesis of D-AAs emerged, which has been the subject of other studies, which have led to diverse hypotheses regarding the incorporation of D-AAs during the translation of L-AAs within polypeptide chains, such as the action of specific isomerases [4]. From a translational and chemical modifications perspective, D-AAs confer on them an unusual stereochemistry and are subject to an enzyme-catalyzed breakdown, which is of great interest for pharmaceutical and pharmacological investments.

Structurally, apart from the conservation of the L- and D-enantiomers, each enantiomer is translated in opposite directions. In other words, it means that if the L-peptide has a right-handed helix of the parent L-peptide could be mimicked by the D-peptide analogues [5]. Interestingly, it has been shown that D-AAs may act as α -helical breakers in L-peptides, contributing to a completely opposite conformation to their parent L-peptides, thus favoring peptide availability in vivo [6]. On the other hand, D-AAs stabilize turns, for example, in the α -turns and II β -turns, respectively [7]. In addition, n

Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100742-6.500005-3>
Copyright © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Anexo 3. Artigo aceito para publicação em *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology (APCSB)* com o relacionado a relação estrutura-função de peptídeos antimicrobianos, e o que podemos obter a partir dos dados estruturais.



The Structure/Function Relationship in Antimicrobial Peptides: What Can we Obtain From Structural Data?

Marlon H. Cardoso^{*,†,‡,1,2}, Karen G.N. Oshiro^{‡,2},
Samilla B. Rezende[‡], Elizabete S. Cândido^{†,‡},
Octávio L. Franco^{*,†,‡,1}

^{*} Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

[†] Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

[‡] S-inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

¹ Corresponding author: *Email address:* ocf Franco@gmail.com (O.L. Franco)

Contents

1. Introduction	2
2. Experimental Approaches for the Structural Elucidation of AMPs	3
2.1. Solution NMR	3
2.2. Solid-State NMR	10
2.3. X-Ray Crystallography	13
2.4. Cryo-Electron Microscopy	14
3. Computational Approaches for AMPs Structure Prediction	18
3.1. Molecular Modeling, Dynamics, and Docking	18
4. Outlook	20
References	23
Further Reading	28

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) have been widely isolated from most organisms in nature. This class of antimicrobials may undergo changes in their sequence for improved physicochemical properties, including charge, hydrophobicity, and hydrophobic moment. It is known that such properties may be directly associated with AMPs' structural arrangements and, consequently, could interfere in their modes of action against microorganisms. In this scenario, biophysical methodologies, such as nuclear magnetic resonance spectroscopy, X-ray crystallography, and cryo-electron mi-

² These authors contributed equally.

Anexo 4. Declaração de trâmite processual do do pedido de patente emitido pelo Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT), Agência S-Inova-UCDB.



DECLARAÇÃO DE TRÂMITE PROCESSUAL

Declaro, para os devidos fins, que a Srta. **KAREN GARCIA NOGUEIRA OSHIRO** junto dos inventores, **MARLON HENRIQUE E SILVA CARDOSO, ELIZABETE DE SOUZA CÂNDIDO, SILVIA GOMES RODRIGUES, SUZANA MEIRA RIBEIRO, WILLIAN FARIAS PORTO e OCTÁVIO LUIZ FRANCO** apresentaram ao Núcleo de Inovação Tecnológica da Universidade Católica Dom Bosco o projeto de pesquisa e inovação resultante no processo de Pedido de Depósito de Patente (NIT/S-INOVA/UCDB nº01.2017-10), sob o título "**R1 E R5, PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COM AÇÃO ANTIBACTERIANA**", o qual encontra-se em trâmite processual interno de depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, sob o protocolo **BR10 2018 0005359**.

Campo Grande/MS, 25 de Janeiro de 2017.



NEILA FARIAS LOPES

Diretora de Inovação

Agência de Inovação e Empreendedorismo S-INOVA

Universidade Católica Dom Bosco - UCDB