

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ADRIEL PARAHYBA LACERDA**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE Ts-MAP1**  
**BIOINSPIRADO NA TOXINA DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***

**Orientador:** Prof. Dr. Ludovico Migliolo

**Coorientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Souza e Silva

Campo Grande – MS

2024

ADRIEL PARAHYBA LACERDA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE Ts-MAP1  
BIOINSPIRADO NA TOXINA DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus***

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

**Orientador:** Prof. Dr. Ludovico Migliolo

**Coorientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Souza e Silva

Campo Grande – MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Bibliotecária Mourâmise de Moura Viana - CRB-1 3360

L131c Lacerda, Adriel Parahyba

Caracterização funcional e estrutural de Ts-MAP1 bioinspirado na toxina do escorpião *Tityus serrulatus*/ Adriel Parahyba Lacerda sob orientação do Prof. Dr. Ludovico Migliolo.--  
Campo Grande, MS : 2024.

1 p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS, 2024

Bibliografia: p. 3-3

1. Peptídeos antimicrobianos. 2. Bactérias patogênicas.  
3. Toxina do escorpião. 4. Erradicação de biofilme.  
5. Potencial zeta I.Migliolo, Ludovico. II. Título.

CDD: 595.46



**“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE TS-MAP1 BIOINSPIRADO NA  
TOXINA DO ESCORPIÃO TITYUS SERRULATUS”**

Autor: ADRIEL PARAHYBA LACERDA

Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Souza E Silva

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia  
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 11 de novembro de 2024.

*Ludovico Migliolo*

---

Prof. Dr. Ludovico Migliolo (Orientador) - UCDB  
Dra. Patrícia Souza E Silva (Coorientadora) - UCDB  
Dr. Caio Fernando Ramalho Oliveira – IFMT  
Dr. Breno Emanuel Farias Frihling - UCDB

“Temos de fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada  
responsabilidade humana”.

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela força e sabedoria que me acompanharam ao longo desta trajetória.

A minha incrível namorada Amanda Costa Rodrigues, que conheci durante o mestrado e que me apoiou e incentivou durante toda a conclusão. Você me incentiva a procurar minha felicidade e alcançar meu verdadeiro potencial! Sempre vou agradecer por ter você comigo, meu amor!

Ao meu orientador, Ludovico Migliolo, pela orientação, paciência e constante incentivo. Sua experiência e conhecimento foram essenciais para que eu alcançasse este resultado.

À minha família, pelo amor incondicional, apoio emocional e compreensão em todos os momentos de ausência e dedicação aos estudos.

Aos amigos e colegas de curso, pela amizade, incentivo e pelas discussões produtivas que enriqueceram o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço especialmente a Patrícia Souza, pelo apoio, pelas horas de estudo conjunto, auxílio e pelo compartilhamento de conhecimento.

Agradeço também à Universidade Católica Dom Bosco pelo fornecimento dos recursos e do ambiente necessários para a execução desta pesquisa.

Aos participantes da pesquisa, pela disponibilidade e cooperação, que foram fundamentais para a realização deste estudo.

Por fim, agradeço a todas as demais pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta dissertação. A todos, o meu muito obrigado.

A conclusão deste trabalho só foi possível graças ao apoio e à colaboração de várias pessoas e instituições. Expresso aqui minha sincera gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa.

## **BIOGRAFIA**

Adriel Parahyba Lacerda é graduado em farmácia pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) em 2022. Nascido e criado em Campo Grande-MS em 09/09/2000.

Já atuou como monitor nas disciplinas de Anatomia e Fisiologia Humana, Química Geral, Química Orgânica, Bioquímica Básica e Avançada, Farmacologia Básica e Avançada, além de já atuado na vacinação de centenas de pessoas durante o período de 2021.

Durante a graduação teve a oportunidade de participar do programa institucional de bolsas de iniciação científica (PIBIC), o que solidificou sua vontade de ingressar no mestrado em biotecnologia.

Atualmente está se aperfeiçoando nas áreas de microbiologia, análise instrumental e bioinformática com ênfase no desenvolvimento de ferramentas farmacêuticas.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>5</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I (ARTIGO CIENTÍFICO).....</b>	<b>6</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do peptídeo parental TsAP-2 e seu análogo Ts-MAP1 frente a bactérias patogénicas.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** A estratégia de desenho racional do peptídeo Ts-MAP1 bioinspirado no TsAP-2 **(A)** Estrutura tridimensional do peptídeo parental TsAP-2 e do peptídeo análogo Ts-MAP1 predito pelo *ColabFold* com *AlphaFold2*, onde as regiões destacadas correspondem a resíduos selecionados para a alteração no Ts-MAP1 **(B)** Projeção da roda helicoidal do *HeliQuest* do peptídeo parental TsAP-2 e do peptídeo análogo Ts-MAP1. A linha pontilhada vermelha representa a anfipaticidade **(C)** DC do peptídeo parental TsAP-2 em TFE 50% (linha vermelha), água (linha verde) e SDS 30mM (linha azul) e **(D)** DC do peptídeo parental TsAP-2 em TFE 50% (linha vermelha), água (linha verde) e SDS 30mM (linha azul). Código de cores: resíduos hidrofóbicos (amarelo), resíduos com carga positiva (azul), prolina (verde), serina (magenta), glicina e alanina (cinzento).

**Figura 2.** Modelo de interação para o peptídeo Ts-MAP1 em membranas bacterianas **(A)** Captação de verde Sytox<sup>TM</sup> em *A. baumannii* (003324845 HRAN ■) e *S. aureus* (7133623 LACEN ●) a 123 µM (30 × CIM) de Ts-MAP1. Esta absorção foi registada durante 100 minutos de incubação **(C)** Carga de superfície medida pelo potencial zeta para *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) tratados com Ts-MAP1 a 123 µM (30 × CIM) **(B)** Carga de superfície para o peptídeo Ts-MAP1 frente membrana bacteriana não danificada para *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) com carga de superfície -47,54 mV e -36,16 mV, respetivamente e após 123 µM (30 × CIM). Foram efetuadas três experiências independentes em triplicata. ANOVA seguido do teste de Dunnett (\*\*\*\*)  $p < 0,05$ .

**Figura 3.** Atividade antibiofilme do Ts-MAP1 contra bactérias patogénicas **(A)** Ilustração que representa a atividade antibiofilme do Ts-MAP1 **(B)** Inibição de biofilme de *A. baumannii* (003324845 HRAN) **(C)** Inibição de biofilme de *S. aureus* (003730529 HRAN) **(D)** Erradicação do biofilme de *A. baumannii* (003324845 HRAN) **(E)** Erradicação do biofilme de *S. aureus* (003730529 HRAN) em diferentes concentrações e a × concentração CIM. Foram efetuadas três experiências independentes em triplicata. ANOVA seguido do teste de Dunnett (\*\*\*\*)  $p < 0,05$ . Imagem feita no software de ilustração *BioRender.com*.

**Figura 4.** Efeito hemolítico e citotóxico do peptídeo Ts-MAP1 (A) Taxa de hemólise frente a diferentes concentrações do peptídeo Ts-MAP1 (B) Viabilidade celular frente a linhagem RAW 264.7 a diferentes concentrações do peptídeo Ts-MAP1. Foram efetuados três experimentos independentes em triplicado. ANOVA seguido do teste de Dunnett (\*\*\*\*)  $p < 0,05$ .

**Figura 5.** Efeito imunomodulador do peptídeo Ts-MAP1 (A) Inibição de NO induzido por LPS em diferentes concentrações do peptídeo Ts-MAP1 (B) Dosagem de IL-6 (C) Dosagem de IL-1 $\beta$  (D) Dosagem de IL-10. Todos os valores de citocina são expressos em pg.mL<sup>-1</sup>. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. ANOVA seguido do teste de Dunnett (\*\*\*\*)  $p < 0,05$ .

**Figura 6.** Ressonância magnética nuclear para o peptídeo análogo Ts-MAP1 (A) Energia livre mais baixa em 40% TFE e 60% H<sub>2</sub>O (B) Sobreposição das dez estruturas de RMN de menor energia para o Ts-MAP1 (C) Potencial eletrostático do Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) para o Ts-MAP1 (D) Menor energia livre em 90% SDS e 10% D<sub>2</sub>O (E) Sobreposição das dez estruturas RMN de menor energia para Ts-MAP1 (F) Potencial eletrostático do Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) para Ts-MAP1.

## RESUMO

A peçonha de escorpião apresenta uma diversidade de moléculas bioativas com ação sobre o sistema fisiológico o que pode ser considerado um excelente modelo na busca ou desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas com potencial farmacológico. Em destaque os peptídeos antimicrobianos e imunomoduladores são moléculas que vem sendo explorados em estudos no controle da inflamação crônica causada por infecções bacterianas. Aqui, usamos o desenho racional para produzir um peptídeo bioinspirado denominado Ts-MAP1 com base no peptídeo TsAP-2 previamente isolado da toxina do escorpião amarelo brasileiro, *Tityus serrulatus*. Após a validação *in silico* a síntese química foi realizada para os ensaios posteriores. O Ts-MAP1 apresentou atividade antibacteriana e antibiofilme contra várias cepas destaque em *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, foi observada atividade hemolítica frente a eritrócitos murinos. Os ensaios de permeabilidade de membrana e carga de superfície demonstram que o peptídeo Ts-MAP1 na concentração 123  $\mu\text{M}$  (30 x CIM) em média permeabilizou a membrana bacteriana em 80 min além de eletroneutralizar para as bactérias Gram-negativa e -positiva. Os resultados de dicroísmo circular para Ts-MAP1 revelaram uma estrutura em  $\alpha$ -hélice nos ambientes contendo SDS 30 mM e 50% de TFE. Além disso, os resultados foram corroborados ao observado para as estruturas resolvidas por RMN, confirmando a estrutura em  $\alpha$ -hélice nos mesmos ambientes. Os dados relatados aqui indicaram que Ts-MAP1, obtido por desenho racional inspirado em toxina, pode ser um candidato para combater e controlar

patógenos bacterianos e formadores de biofilme, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias.

**Palavras-chaves:** Peptídeos antimicrobianos; Bactérias patogênicas; Toxina do escorpião; Erradicação de biofilme; Potencial zeta.

## ABSTRACT

Scorpion venom has a diversity of bioactive molecules that act on the physiological system, which can be considered an excellent model for the search or development of biotechnological tools with pharmacological potential. In particular, antimicrobial and immunomodulatory peptides are molecules that have been explored in studies to control chronic inflammation caused by bacterial infections. Here, we used rational design to produce a bioinspired peptide called Ts-MAP1 based on the TsAP-2 peptide previously isolated from the toxin of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*. After *in silico* validation, the chemical synthesis was carried out for subsequent tests. Ts-MAP1 showed antibacterial and antibiofilm activity against several strains of *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*. On the other hand, hemolytic activity was observed against murine erythrocytes. The membrane permeability and surface charge assays show that the Ts-MAP1 peptide at a concentration of 123  $\mu$ M (30 x MIC) on average permeabilized the bacterial membrane in 80 min and electroneutralized Gram-negative and -positive bacteria. The circular dichroism results for Ts-MAP1 revealed an  $\alpha$ -helix structure in environments containing 30 mM SDS and 50% TFE. Furthermore, the results corroborated those observed for the structures solved by NMR, confirming the  $\alpha$ -helix structure in the same environments. The data reported here indicated that Ts-MAP1, obtained by toxin-inspired rational design, could be a candidate for combating and controlling bacterial and biofilm-forming pathogens, as well as presenting anti-inflammatory properties.

**Keywords:** Antimicrobial peptides; Pathogenic bacteria; Scorpion toxin; Biofilm eradication; Zeta potential



## INTRODUÇÃO

A organização mundial da saúde (OMS) define a resistência bacteriana sendo um processo natural quando microorganismos se adaptam aos antibióticos que previamente foram efetivos no tratamento dessas infecções (MANCUSO et al., 2021). Contudo, com o passar das décadas as bactérias desenvolveram mecanismo de resistência frente as antibióticos convencionais (ASLAM et al., 2018; MANCUSO et al., 2021). Em 2017, a OMS divulgou uma lista para as espécies com maior urgência com intuito de direcionar os esforços na pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos. O grupo ESKAPE é um acrônimo para um grupo de bactérias conhecidas pelo elevado grau de resistência aos atuais tratamentos disponíveis: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* *Enterobacter spp.* (DE OLIVEIRA et al., 2020; OMS., 2017)

Biofilmes bacterianos são responsáveis por cerca de 60 a 80% das infecções (KALIA; PATEL; LEE, 2023; LEBEAUX et al., 2013). Bactérias em forma agregados microbianos (biofilme) podem apresentar até 1.000 x mais resistência frente a antibióticos convencionais (KALIA et al., 2019). Biofilmes são definidos como uma comunidade formada por microrganismos heterogêneos ou homogêneos, presentes em todos os ambientes, envoltos por uma matriz polimérica formado polissacarídeos e glicoproteínas que permite a adesão a diferentes superfícies bióticas e abióticas, além de impedir a entrada de antibióticos por meio de uma barreira física, além de permitir a troca horizontal de genes, contribuindo assim para a resistência bacteriana e permitir a

sobrevivência desses microrganismos em ambientes hostis (DE MORAES et al., 2022; LI et al., 2022; SAHREEN et al., 2022).

Os escorpiões (Arachnida) apresentam uma alta incidência de acidentes domésticos devido a sua alta presença em áreas urbanas (REGINA et al., [s.d.]). Dentre as diversas espécies presentes no Brasil, se destaca a espécie *Tityus serrulatus*, popularmente chamado de escorpião amarelo. O número de acidente escorpiônico cresceu 200% na última década, de aproximadamente 80.000 incidentes em 2013 para mais de 180.000 em 2022 (DE OLIVEIRA et al., 2024). O *T. serrulatus* é a espécie com maior importância médica no Brasil, devido à grande variedade de componentes presente na sua peçonha (PUCCA et al., 2015). Sua peçonha possui uma complexa variedade de moléculas como proteínas, peptídeos em sua maioria, além de outros compostos como sais, proteases, serotonina, histamina entre outros (COLOGNA et al., 2009).

Nas últimas décadas, a peçonha de escorpiões tem se mostrado uma abundante fonte de macromoléculas dentre elas os peptídeos antimicrobianos (PAMs), responsáveis por proteger a sua glândula que armazena a peçonha (HARRISON et al., 2014). Com o avanço das técnicas laboratoriais de isolamento e caracterização de proteínas, os estudos com peçonha de escorpião cresceram nas duas últimas décadas (GUO et al., 2013). Usualmente, os peptídeos presentes na toxina de *T. serrulatus* são classificados em três classes, definidas por suas características estruturais, sendo os peptídeos ricos em resíduos de glicina e prolina, peptídeos sem ponte dissulfeto (PSPDs) e peptídeos com pontes dissulfeto (PPDs) (ALMAAYTAH;ALBALAS,2014)

O TsAP-2 é um peptídeo classificado como PSDP derivado de uma proteína precursora com 73 resíduos que apresenta atividade antimicrobiana e antitumoral (GUO et al., 2013; HARRISON et al., 2014). A proteína precursora apresenta um peptídeo sinal na porção N-terminal seguida pela sequência ativa com propriedades antimicrobianas, na qual é liberada após um reconhecimento enzimático 'GKR' é removido liberando assim o propeptídeo (FONG-CORONADO et al., 2024). Dentre os diversos componentes presente na peçonha do escorpião, se destaca os PAMs na qual são definidos como pequenas moléculas com até 100 resíduos de aminoácidos, presente em diversos seres vivos (LI et al., 2022; MORETTA et al., 2021). Comumente, os

PAMs apresentam características físico-químicas bem definidas como estruturas anfipáticas e helicoidais além de cargas líquidas catiônicas responsáveis pela interação com superfícies hidrofóbicas (LI et al., 2022; VAN EIJK et al., 2020).

Os PAMs podem ser encontrados em diversas fontes biológicas pela natureza, dentre elas se destacasse os animais peçonhentos (LUO; SONG, 2021). Seu mecanismo de ação normalmente está associado a presença de resíduos como lisina (Lys), arginina (Arg) e histidina (His) sendo eles resíduos carregados positivamente, sendo eles responsáveis pela interação com membranas carregadas negativamente, como bacterianas devido à alta presença de fosfolipídeos (MI et al., 2017; WANG et al., 2019). A presença de resíduos hidrofóbico como fenilalanina (Phe) podem promover um aumento na atividade antibacteriana visto que auxiliam na incorporação, por meio da interação hidrofóbica com a bicamada fosfolipídica em bicamadas fosfolipídicas, encontrados em membranas bacterianas (LEE et al., 2014; WANG et al., 2019).

Os trabalhos a seguir foram elaborados segundo as normas da Revista *ACS Publications* como parte do compromisso contínuo da *ACS Publications* de aprimorar a experiência de publicação para autores e revisores, introduzimos os envios em “formato rápido” para todas as revistas da *ACS Publications*. O objetivo dessa iniciativa é economizar o tempo e o esforço dos autores na preparação dos manuscritos para envio, bem como ajudar os revisores a se concentrarem na ciência contida no manuscrito enviado.

## REFERÊNCIAS

- ALMAAYTAH, Ammar; ALBALAS, Qosay. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. **Peptides**, v. 51, p. 35-45, 2014.
- ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance Dove Medical Press Ltd.**, , 2018.
- COLOGNA, C. T. et al. Tityus serrulatus Scorpion Venom and Toxins: An Overview Protein & **Peptide Letters**. [s.l: s.n.].

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. 2020.

DE OLIVEIRA, I. S. et al. Understanding the complexity of Tityus serrulatus venom: A focus on high molecular weight components. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** Centro de Estudos de Venenos e Animais Peconhentos, , 2024.

DE MORAES, L. F. R. N. et al. First generation of multifunctional peptides derived from Iatartoxin-3a from Lachesana tarabaei spider toxin. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 21 set. 2022.

FONG-CORONADO, Pedro Alejandro et al. A critical review of short antimicrobial peptides from scorpion venoms, their physicochemical attributes, and potential for the development of new drugs. **The Journal of Membrane Biology**, v. 257, n. 3, p. 165-205, 2024.

HARRISON, Patrick L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon**, v. 88, p. 115-137, 2014.

KALIA, V. C. et al. Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications. **Biotechnology Advances Elsevier Inc.**, , 1 jan. 2019.

LEBEAUX, D. et al. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens MDPI AG**, , 13 maio 2013.

LI, X. et al. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. **Molecules**, v. 27, n. 9, 1 maio 2022.

MANCUSO, Giuseppe et al. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021.

PUCCA, M. B. et al. Tityus serrulatus venom - A lethal cocktail. **Toxicon Elsevier Ltd**, , 15 dez. 2015.

REGINA, M. et al. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo Scorpionism in Belo Horizonte, MG: a retrospective study **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. [s.l.: s.n.].

SAHREEN, S. et al. Exploring the Function of Quorum Sensing Regulated Biofilms in Biological Wastewater Treatment: A Review. **International Journal of Molecular Sciences MDPI**, , 1 set. 2022.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.

## OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcional e estruturalmente por meio de estudos *in silico* e *in vitro* o peptídeo Ts-MAP1, peptídeo bioinspirado na toxina TsAP-2, frente a bactérias planctônicas e formadoras de biofilme, bem como suas propriedades imunomoduladoras

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar *in vitro* por meio de dicroísmo circular a estrutura do peptídeo Ts-MAP1
- Avaliar *in vitro* o potencial antibacteriano para o peptídeo Ts-MAP1
- Avaliar *in vitro* de permeabilização de membrana por sytox green para o peptídeo Ts-MAP1
- Realizar *in vitro* a medição da carga de superfície para o peptídeo Ts-MAP1
- Analisar *in vitro* o potencial antibiofilme para o peptídeo Ts-MAP1
- Observar *in vitro* o efeito hemolítico para o peptídeo Ts-MAP1

## CAPÍTULO I (ARTIGO CIENTÍFICO)

### Geração de um novo peptídeo ativo de membrana bioinspirado no peptídeo de escorpião TsAP-2

Adriel Parahyba Lacerda<sup>1</sup>, Patrícia Souza e Silva<sup>1</sup>, Gabrielly da Silva Paes<sup>1</sup>, Carlos Daniel Pereira Freitas<sup>4</sup>, Luciano Morais Lião<sup>4</sup>, Claudiane Vilharroel Almeida<sup>2</sup>, Maria Ligia R. Macedo<sup>2</sup>, Valentina Nieto Marín<sup>1</sup>, Danieli Fernanda Buccini<sup>1</sup>, Octávio Luiz Franco<sup>1,3</sup> e Ludovico Migliolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brasil; biotech@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, Unidade de Tecnologia de Alimentos e da Saúde Pública, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil lppfb.ms@gmail.com

<sup>3</sup>Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de RMN, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, Brasil, 74690-900.

\*Correspondente: ludovico@ucdb.br; +55 (67) 3312-3768

#### 1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas, especialmente aquelas causadas por bactérias resistentes, aumentam a morbidade e a mortalidade <sup>1</sup>. A resistência antimicrobiana (RAM) surgiu como uma grave preocupação global no século 21 para os seres humanos, os animais e o meio ambiente. A evolução da resistência em bactérias é um processo natural; entretanto, o uso indevido ou abusivo de antibióticos gera uma pressão seletiva não natural em ambientes clínicos e naturais, o que prejudica a saúde humana e animal <sup>2</sup>. Mecanismos como a formação de biofilme são essenciais para o desenvolvimento da resistência bacteriana <sup>3</sup>. Os biofilmes são definidos como uma comunidade formada por microrganismos heterogêneos ou homogêneos, envoltos por uma matriz de carboidratos que permite a adesão a diferentes superfícies bióticas e abióticas, além de impedir a entrada de antibióticos, contribuir para a resistência bacteriana e permitir a sobrevivência desses microrganismos em ambientes hosts <sup>2,4</sup>.

A inflamação é uma resposta fisiológica vital a estímulos prejudiciais, como vírus, infecções bacterianas, toxinas e lesões teciduais, envolvendo uma sequência de eventos celulares, vasculares e humorais organizados<sup>5</sup>. As doenças inflamatórias crônicas, reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde como uma ameaça significativa à saúde

global, são causadas por macrófagos que secretam citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e PGE2 em resposta a estímulos como o lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas<sup>6,7</sup>. Esses macrófagos liberam uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo o óxido nítrico (NO)<sup>8</sup>. Consequentemente, a modulação da ativação de macrófagos e a inibição desses mediadores é uma estratégia promissora para prevenir e combater doenças relacionadas à inflamação crônica, destacando a necessidade de novas terapias com peptídeos bioativos para tratar infecções bacterianas e prevenir a neuroinflamação<sup>9,10</sup>.

Algumas estratégias para combater a RAM são os peptídeos antimicrobianos (PAMs)<sup>11</sup>. Os AMPs estão entre as ferramentas farmacológicas mais evidentes nas últimas décadas, sendo caracterizados como um grande grupo de compostos endógenos amplamente encontrados na natureza e muito presentes em animais; são proteínas catiônicas de baixo peso molecular que possuem uma estrutura  $\alpha$ -helicoidal anfipática, têm um amplo espectro antibacteriano, imunomodulador, antiviral, antifúngico e atividade antitumoral<sup>4,12</sup>. Entre os AMPs mais abundantes, destacam-se aqueles presentes em animais peçonhentos e não peçonhentos, entre eles aranhas, sapos, cobras, abelhas e escorpiões<sup>12</sup>. Os estudos atuais apontam para mais de 100.000 na composição do veneno do escorpião. No entanto, apenas parte dela é conhecida bioquimicamente. O TsAP-2 é um peptídeo encontrado no veneno do *Tityus serrulatus*, popularmente conhecido como escorpião amarelo, amplamente distribuído no Brasil e responsável por causar acidentes graves. O peptídeo TsAP-2 é derivado de uma proteína putativa que possui 73 aminoácidos com uma região ativa do 23 ao 39, dando origem ao peptídeo funcional TsAP-2 (NH<sub>2</sub>-FLGMIPGLIGGLISAFK-COOH) com 17 resíduos, tem efeito anti-inflamatório contra Gram-positivos, antifúngico, candidicida, hemolítico, antibiofilme e anticancerígeno<sup>13</sup>.

A literatura recente já relatou alguns PAMs sintéticos baseados em mutagênese direcionada ao local, o que pode permitir maior seletividade contra bactérias e menos toxicidade para células de mamíferos. Lin e seus colegas descreveram o peptídeo Temporin-PKE da secreção cutânea de *Pelophylax kl. esculentus*, no qual eles analisaram a relação estrutura-atividade alterando a posição dos resíduos de Lys<sup>14</sup>. Com base nisso, a estratégia usada racionalmente foi a mutagênese dirigida ao local, substituindo os resíduos de aminoácidos, o que pode favorecer a ligação dos PAMs à membrana bacteriana e rompê-la<sup>15</sup>. Com isso em mente, o presente estudo utilizou a metodologia

de design racional *in silico* para tentar otimizar a avaliação *in vitro* de um análogo sintético bioinspirado no peptídeo TsAP-2 encontrado na toxina de *T. serrulatus* contra bactérias patogênicas formadoras de biofilme e imunomodulação de células murinas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Desenho Racional do Ts-MAP1**

A estratégia racional utilizada no presente estudo focou na reorganização da anfifilicidade da TsAP-2 (NH<sub>2</sub>-FLGMIPGLIGGLISAFK-COOH) visando uma conformação helicoidal das faces polar e apolar (GUO et al., 2013). O peptídeo análogo bioinspirado nomeado, *T. serrulatus-multiactivity peptide 1* (Ts-MAP1), as substituições de Gly<sup>3</sup>, Gly<sup>7</sup> e Gly<sup>10</sup> por Lys<sup>3</sup>, Arg<sup>7</sup> e Lys<sup>10</sup>. Todas as substituições visavam aumentar a carga líquida e reduzir a hidrofobicidade geral do peptídeo. O servidor HeliQuest foi usado para calcular os parâmetros físico-químicos de carga líquida, hidrofobicidade e momento hidrofóbico<sup>17</sup>. Os modelos teóricos tridimensionais para todos os peptídeos estudados aqui foram construídos pelo *ColabFold* usando a homologia do *MMseqs2* com o *AlphaFold2*<sup>18</sup>. A validação estrutural *in silico* foi realizada utilizando o *PROCHECK* para calcular a qualidade global dos modelos e, assim, validar a similaridade das estruturas usando o gráfico de Ramachandran<sup>19</sup>. Os parâmetros usados para analisar a qualidade dos modelos, medir a similaridade da estrutura e prever o desvio médio dos átomos são *C-score*, *TM-score*, *RMSD* e *Z-score*. Com o formato PDB, foi usado o software PyMOL versão 3.0.3 para visualização tridimensional.

### **2.2 Síntese química e análise estrutural**

Os peptídeos foram quimicamente sintetizados por um método de fase sólida usando o N-9-fluorenil metoxycarbonil (Fmoc), purificados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) com 95% de pureza em um gradiente ACN:H<sub>2</sub>O:TFA e confirmados por espectrometria de massa de spray de íons pela empresa AminoTech (São Paulo, Brasil). As análises de dicróismo circular foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-1100 (Jasco Inc., Japão) usando uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho ótico. O espectro de 260 a 185 nm foi recolhido com passos de resolução de 0,1 nm a 100 nm.s<sup>-1</sup>, a 25 °C, com uma média de 5 varrimentos acumulados



para cada condição. Foi preparada uma solução-mãe de 120  $\mu\text{M}$  de TsAP-2 e Ts-MAP1 em água e utilizada numa solução de trabalho de 30  $\mu\text{M}$ . A estrutura secundária do péptido foi analisada na presença de água, 50% de trifluoroetanol (TFE) e 30 mM de dodecil sulfato de sódio (SDS). A estrutura secundária dos peptídeos foi analisada pelo servidor *BeStSel.com*

### **2.3 Microdiluição em caldo e ensaio bactericida**

As cepas bacterianas usadas nesse experimento foram *Acinetobacter baumannii* (003324845 HRAN), *Escherichia coli* (3323742), *Escherichia coli* (KPC + 001812446), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC + 13883), *Klebsiella pneumoniae* (KPC + 001450421), *Staphylococcus aureus* (7133623 LACEN) e *Staphylococcus aureus* (003730529 HRAN). As bactérias foram colocadas em placas de ágar Mueller-Hinton (MHA) e incubadas a 37 °C durante a noite. Após esse período, três colônias de cada bactéria foram inoculadas em 5 mL de caldo Mueller-Hinton (MHB) e incubadas durante a noite a 200 rpm, a 37 °C. O crescimento bacteriano foi monitorado a 600 nm em um espectrofotômetro. Conforme descrito anteriormente, a concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada usando o método de diluição em microplacas de 96 poços em uma concentração bacteriana final de  $5 \times 10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> (20). Os peptídeos foram testados em concentrações que variaram de 4 a 128  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , que formam a concentração molar para o TsAP-2 de 2,3 a 73,8  $\mu\text{M}$  e para o Ts-MAP1 de 2,0 a 64,8  $\mu\text{M}$ . O antibiótico ciprofloxacina foi usado como controle positivo nessas mesmas concentrações. Uma suspensão bacteriana também foi usada para o crescimento positivo, e os poços de controle de crescimento negativo continham apenas MHB. As microplacas foram incubadas durante a noite a 37 °C. As microplacas foram lidas em uma microplaca Multiskan Go (Thermo Scientific) a 600 nm após a incubação. O CIM foi determinada como a menor concentração de cada peptídeo, sem crescimento bacteriano significativo. Para a concentração bactericida mínima (CBM), dez  $\mu\text{L}$  de cada poço em que a CIM foi determinada foram colocados em placas MHA, incubadas a 37 °C por 24 h. A CBM foi definida como a menor concentração de cada peptídeo em que nenhum crescimento bacteriano foi detectado. Foram realizados três experimentos independentes para cada condição testada.

## **2.4 Permeabilização de membrana**

A permeabilidade da membrana bacteriana foi investigada usando a captação de verde Sytox<sup>TM</sup> 21,22. No ensaio, *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) foram cultivados em MHB por 18h a 37 °C, preparados em uma densidade óptica de 600 nm de 0,5, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Em seguida, 280 µL de suspensão bacteriana foram transferidos para microplacas pretas de 96 poços, onde 10 µL de Sytox<sup>TM</sup> verde (30 µM) foram adicionados e incubados por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, 10 µL de Ts-MAP1, em uma concentração 30 vezes maior que a CIM, foram adicionados a cada poço, e o ensaio cinético foi realizado por 50 minutos, com leituras a cada 5 minutos. O ensaio foi realizado com leitura de fluorescência, excitação a 485 nm e emissão a 520 nm em um leitor de microplacas Varioskan Lux (Thermo Scientific: Waltham, MA, EUA). O controle negativo de danos à membrana foi realizado com bactérias incubadas com 10 µL de tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

## **2.5 Medição da carga de superfície**

Os estudos de potencial zeta ( $\zeta$ ) foram realizados a 25 °C a partir da média de 15 medições (100 execuções cada), na ausência e na presença de diferentes concentrações de peptídeos, usando células zeta descartáveis DTS 1070 com eletrodos de ouro (Malvern, Reino Unido), após 15 minutos de tempo de equilíbrio. Os dados foram processados usando o software DTS da Malvern após três experimentos independentes 23. Para o ensaio, *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) foram cultivados em MHB por 18 h a 37 °C, preparados em uma densidade óptica de 600 nm de 0,5, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. O peptídeo Ts-MAP1 estava pronto a 123 µM (30 × CIM). As leituras de potencial zeta foram feitas em triplicatas com um desvio padrão de  $\pm 0,05$ .

## **2.6 Inibição da formação do biofilme**

A formação do biofilme foi obtida usando o caldo Luria Bertani (LB). As cepas bacterianas de *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) cresceram da noite para o dia em meio MHB e foram inoculadas em LB em microplacas

de 96 poços na presença dos peptídeos TsAP-2 (de 2,3 a 73,8  $\mu\text{M}$ ) e para o Ts-MAP1 de (2,0 a 64,8  $\mu\text{M}$ ) a 37 °C, por 24 h. O controle de crescimento positivo continha apenas bactérias, e os poços de controle de crescimento negativo continham apenas caldo LB. Após a incubação, as células planctônicas foram removidas e os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água destilada. As bactérias adesivas restantes foram coradas com 100  $\mu\text{L}$  de violeta cristal a 0,01% por 20 minutos. As microplacas foram lavadas duas vezes com água destilada, secas ao ar e solubilizadas com 100  $\mu\text{L}$  de etanol a 60%. A formação do biofilme foi medida a 595 nm. Todas as leituras de absorbância foram realizadas com o leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

## **2.7 Viabilidade do biofilme maduro**

Um biofilme pré-formado de *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) foi obtido, conforme relatado anteriormente, com algumas modificações<sup>24</sup>. A suspensão bacteriana foi cultivada a 37 °C até uma densidade óptica de 1,6 ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) e, em seguida, diluída até uma densidade celular de  $5 \times 10^5 \text{ CFU.mL}^{-1}$ . Aliquotas de 150  $\mu\text{L}$  foram dispensadas nos poços de uma placa de 96 poços e incubadas por 18 h a 37 °C para a formação de biofilme. Após a incubação, o meio contendo células planctônicas foi aspirado dos poços e substituído por 100  $\mu\text{L}$  de solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover as células não aderentes. A lavagem com PBS foi realizada duas vezes. Após a lavagem, cada poço foi preenchido com PBS suplementado com diferentes diluições em série de duas vezes de Ts-MAP1 de 3,8 a 123  $\mu\text{M}$ , e a placa foi incubada por duas horas a 37 °C. Após o tratamento com peptídeo, os poços foram enxaguados duas vezes com PBS, conforme indicado acima, e 20  $\mu\text{L}$  de MTT ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram dispensados em cada poço para observar a viabilidade celular do biofilme. O DMSO 100% foi usado como controle positivo da erradicação do biofilme. Uma maior intensidade de púrpura corresponde a uma maior porcentagem de células metabolicamente ativas e, conseqüentemente, a uma maior viabilidade celular. A placa foi incubada e protegida pela luz a 37 °C por três horas, e a reação foi interrompida com a adição da solução solubilizada. A absorbância de cada poço foi registrada a 570 nm usando um leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), e a porcentagem de viabilidade do biofilme foi calculada em relação às amostras não tratadas.

## 2.8 Ensaio hemolítico

Os ensaios hemolíticos foram efetuados com sangue fresco de camundongos da espécie *Mus musculus*, coletado e centrifugado para separar os glóbulos vermelhos, e lavado com solução salina a 0,9%. O efeito hemolítico dos peptídeos foi avaliado expondo os eritrócitos a diferentes diluições em série destas moléculas. As soluções de peptídeos foram adicionadas à suspensão de eritrócitos (1% por volume) em concentrações que variaram (de 2,3 a 73,8  $\mu\text{M}$ ) para a TsAP-2. Para o Ts-MAP1, a concentração foi feita usando 30 x CIM (concentração inibitória mínima) previamente testada (de 3,8 a 123  $\mu\text{M}$ ). A solução salina 0,9% e o Triton X-100 foram utilizados como controlos negativo e positivo, respetivamente. Após a exposição, a libertação de hemoglobina foi medida a 415 nm <sup>25</sup>. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Este experimento foi aprovado pelo CEUA da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) sob o número 014/2022. Foram realizados três experimentos independentes para cada condição testada.

## 2.9 Viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade dos peptídeos, foi realizado um ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), seguindo um protocolo modificado derivado de <sup>26</sup>. A linha celular de macrófagos RAW 264.7 foi mantida em condições estéreis, de acordo com as instruções. Cultivadas em DMEM (SIGMA) com 10% de soro bovino fetal (SIGMA), as células foram incubadas a 37 °C em um ambiente com mais de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> em um frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (KASVI). Ao atingir 90% de confluência, as células foram separadas, centrifugadas a 970 g por 5 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, semeadas a (2×10<sup>5</sup> células.poço-1) em uma placa de 96 poços. A concentração de Ts-MAP1 foi feita usando 30 × CIM previamente testada de 1,9 a 123  $\mu\text{M}$  e incubada a 37 °C por 24 h. Depois de descartar o sobrenadante, cada poço foi aplicado a uma solução de MTT (SIGMA) (5 mg.mL<sup>-1</sup>) diluída em PBS. A placa coberta foi incubada por 4 horas a 37 °C no escuro. Os cristais de formazan foram solubilizados usando uma solução de ácido clorídrico e álcool isopropílico, e as porcentagens de viabilidade celular foram determinadas a 540 nm usando um leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Britain). Os resultados foram calculados em relação ao controle de células não tratadas.

### ***2.10 Dosagem de Óxido Nítrico***

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi quantificada de acordo com o método de reação de Griess <sup>27</sup>. Os macrófagos peritoneais ( $2 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>) foram incubados com meio DMEM por 24 horas para adesão. Depois disso, as células foram incubadas com diferentes concentrações de Ts-MAP1. O ensaio usou 30 × MIC previamente testado de 1,9 a 123 µM e LPS (200 ng.poço<sup>-1</sup>) Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado e quantificado usando o método de reação de Griess. O sobrenadante da placa foi removido e 50 µL foram incubados com o reagente de Griess. Todos os testes foram realizados em triplicata. A leitura foi obtida em 570 nm (SpectraMax F3, Molecular Devices). Os resultados foram comparados a uma curva de nitrito (1 a 200 µM) e expressos como µM.

### ***2.11 Dosagem de ELISA***

IL-6, IL-10 e IL-1β foram mensuradas por kits ELISA (PeproTech, Thermo Fisher Scientific). A absorbância a 405 e 650 nm foi determinada com um leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific: Waltham, MA, EUA). Os resultados foram feitos em triplicata e expressos em pg.mL<sup>-1</sup>.

### ***2.12 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear***

As medições de espectroscopia NMR para Ts-MAP1 (NH<sub>2</sub>-FLKMIRRLIGGLISAKK-COOH) foram realizadas a 1,5 mM de peptídeo em uma solução micelar contendo 75 mM de SDS deuterado (SDS-d 25) em 500 µL de H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90/10, v/v), pH 6,8. Todos os espectros foram registrados a 298 K em um espectrômetro Bruker Avance III 500 operando a 11,75T e equipado com um cabeçote de sonda de banda larga inversa (BBI) de 5 mm.

Os experimentos TOCSY de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H foram registrados com 48 transientes de 4096 x 1024 pontos (F2, F1) e tempo de mistura de spinlock de 70 ms, usando a sequência de pulso dipsi2gpqh<sup>28</sup>. Os espectros de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY foram registrados com 56 transientes de 4096 x 1024 pontos e tempo de mistura de 200 ms, usando a sequência de pulso noesygpqh<sup>29</sup>. Os espectros 1H-13C HSQC foram adquiridos com a sequência de pulso padrão da Bruker hsqcetgp 130 transientes de 4096 x 512 pontos. Todos os dados de RMN 2D foram processados com o Bruker TopsSpin 3.6.3 e analisados com o

*CcpNMR Analysis* 2.5.2. O método Wuthrich<sup>30</sup>, foi usado para a atribuição dos sistemas de spin das ressonâncias <sup>1</sup>H observadas nos espectros TOCSY e NOESY. O sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanossulfônico-d 6 DSS-d<sub>6</sub> a 0,05% foi usado como referência interna. Os espectros heteronucleares de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC foram usados para auxiliar na atribuição de sistemas de spin e na confirmação da atribuição de deslocamentos químicos

A determinação de estruturas tridimensionais foi realizada usando o software ARIA<sup>31-34</sup> versão 2.3 com a compilação do programa CNS<sup>35</sup> e pelo protocolo de recozimento simulado de dinâmica molecular (MDSA)<sup>36</sup>. As intensidades/volumes de pico, classificadas como fortes, médias e fracas, obtidas por correlações de picos NOE dos espectros NOESY, foram convertidas semiquantitativamente em restrições de distância usando 1,72, 3,2 e 8,0 Å como limite inferior, distância de referência e limite superior de distância, respectivamente. As restrições de ângulo diedro foram determinadas a partir dos deslocamentos químicos de <sup>1</sup>HN, <sup>1</sup>H $\alpha$ , <sup>13</sup>C $\alpha$  e <sup>13</sup>C $\beta$  (Tabela 1) usando o algoritmo DANGLE<sup>37</sup> do *software CcpNMR Analysis*<sup>38</sup>. As restrições de distância e de ângulo diedro foram empregadas como entrada de dados do CCPN<sup>39</sup> no cálculo no *software ARIA* 2.3. Duzentas estruturas foram geradas para cada iteração em um protocolo de 8 iterações e, para a última iteração, o refinamento das estruturas foi realizado usando o protocolo de refinamento de água<sup>40,41</sup>, resultando em 10 estruturas refinadas. As estruturas foram visualizadas usando o *PyMOL* e o programa *UCSF Chimera*<sup>42</sup>. As 10 conformações de energia mais baixa foram selecionadas para representar o conjunto da estrutura. A análise estrutural foi realizada pelos pacotes PROCHECK<sup>43</sup> e WHAT IF<sup>44</sup> integrados ao *software ARIA*.

A qualidade das estruturas foi analisada com base nos valores da raiz do desvio quadrático médio (*RMSD*), a qualidade estereoquímica foi avaliada usando o *PROCHECK*, o diagrama de Ramachandran e o *ProSA (Protein Structure Analysis)*<sup>45</sup>, que indica a qualidade da dobra do peptídeo. Além disso, a energia total mínima foi exigida pelas estruturas no cálculo. O cálculo do potencial eletrostático foi realizado para a estrutura 3D de menor energia resolvida pela espectroscopia NMR. O arquivo .pdb foi convertido em arquivo .pqr usando o servidor *PDB2PQR* com o campo de força AMBER. O *PDB2PQR* também definiu as dimensões da grade para calcular o solucionador Adaptive Poisson-Boltzmann (APBS). No APBS, a energia potencial de solvatação foi estimada<sup>46</sup>. A superfície foi visualizada usando o plug-in APBS do *PyMOL*.

### **2.13 Análise estatística**

A significância estatística dos resultados experimentais foi determinada por (*ONE WAY ANOVA*) seguida do teste de comparação múltipla de Dunnett. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. O *GraphPad Prism* versão 8.0.2 foi utilizado para todas as análises estatísticas.

## **3. RESULTADOS**

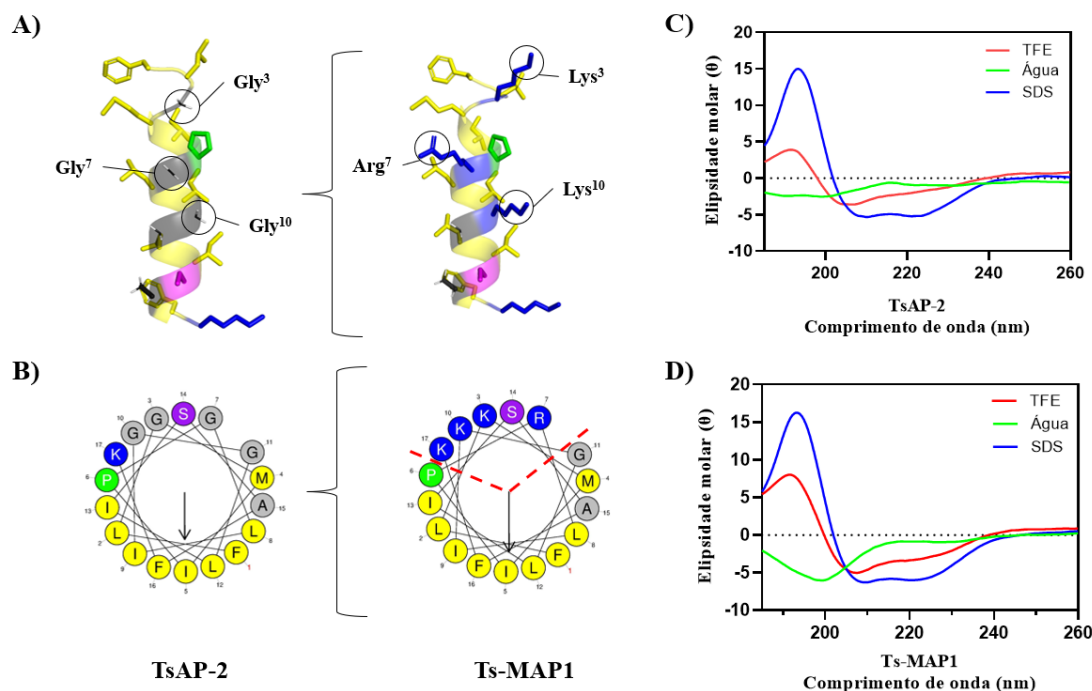
### **3.1 Desenho racional do Ts-MAP1**

A estratégia racional utilizada no presente estudo focou na reorganização do peptídeo parental TsAP-2 (Figura 1). Após a estratégia o peptídeo análogo Ts-MAP1 (NH<sub>2</sub>-FLKMIPRLIKGLISAFK-COOH) (Patente depositada BR 1020240159969) teve sua carga líquida aumentada de +1 para +4, com o aumento de resíduos de Lys e Arg, ambos catiônicos e mantendo a hidrofobicidade de 64%. A hidrofobicidade é crucial para a interação dos peptídeos antimicrobianos com as membranas biológicas. No entanto, o aumento da hidrofobicidade pode aumentar a toxicidade contra as células de mamíferos. De acordo com a escala de Eisenberg, a hidrofobicidade diminuiu de 0,901 para 0,725. O momento hidrofóbico aumentou de 0,594 para 0,749. A semelhança estrutural entre as sequências primárias do TsAP-2 e do Ts-MAP1 foi de 82%, o que demonstra que o peptídeo análogo Ts-MAP1 conversou com algumas porções do peptídeo parental.

### **3.2 Síntese e Análise Estrutural do Ts-MAP1**

Os peptídeos foram sintetizados quimicamente, apresentando 95% de pureza e massa molecular de 1734,10 e 1975,50 daltons (Da) para TsAP-2 e Ts-MAP1. Ambos os peptídeos foram diluídos em água ultrapura para estabelecer uma solução estoque e armazenados em um freezer a -20°C para todos os ensaios in vitro. As características estruturais dos peptídeos TsAP-2 e Ts-MAP1 foram obtidas através de estudos de dicroísmo circular (DC), incubando os peptídeos em soluções que imitam diferentes ambientes. Em solução aquosa, o TsAP-2 apresentou uma estrutura coloidal aleatória caracterizada por uma banda negativa a 195-210 nm e nenhum sinal a ~220 nm. O padrão do sinal mudou quando a TsAP-2 foi incubada com trifluoroetanol (TFE) a 50% e micelas de SDS a 30 mM, apresentando bandas positivas a cerca de 192 nm e bandas negativas a

208 e 222 nm. As alterações no sinal de DC e a presença de bandas negativas a 208 e 222 nm indicam uma transição conformacional que indica a aquisição de uma  $\alpha$ -hélice. O Ts-MAP1 apresentou uma conformação de bobina aleatória num ambiente aquoso. Em TFE e SDS, o peptídeo apresentou bandas positivas a cerca de 192 nm e bandas negativas entre 208 e 222 nm, indicando a transição conformacional para  $\alpha$ -hélice.



**Figura 1.** A estratégia de desenho racional do peptídeo Ts-MAP1 bioinspirado no TsAP-2 (A) Estrutural tridimensional do peptídeo parental TsAP-2 e do peptídeo análogo Ts-MAP1 predito pelo *ColabFold* com *AlphaFold2*, onde as regiões destacadas correspondem a resíduos selecionados para a alteração no Ts-MAP1 (B) Projeção da roda helicoidal do *HeliQuest* do peptídeo parental TsAP-2 e do peptídeo análogo Ts-MAP1. A linha pontilhada vermelha representa a anfipaticidade (C) DC do peptídeo parental TsAP-2 em TFE 50% (linha vermelha), água (linha verde) e SDS 30mM (linha azul) e (D) DC do peptídeo parental TsAP-2 em TFE 50% (linha vermelha), água (linha verde) e SDS 30mM (linha azul). Código de cores: resíduos hidrofóbicos (amarelo), resíduos com carga positiva (azul), prolina (verde), serina (magenta), glicina e alanina (cinzento).

Utilizando os dados obtidos a partir da DC, foi possível calcular a porcentagem de estruturas secundárias nos diferentes ambientes. O TsAP-2 formou 0,0% de hélice em água e SDS, enquanto apresentou 6,3% em TFE 50%. A Ts-MAP1 apresentou 0,0% em água e 50% TFE, mas demonstrou 7,8% em SDS. (Tabela S1). Os resíduos de Gly e Pro reduzem a formação de estruturas helicoidais, enquanto a adição de resíduos com carga positiva, como Lys e Arg, favorece a percentagem de hélices. Considerando que o TFE estimula ambientes hidrofóbicos enquanto o SDS estimula ambientes carregados



negativamente, o aumento de resíduos hidrofílicos pode favorecer a formação de estruturas helicoidais em ambientes relacionados com bactérias.

### 3.3 Atividade antibacteriana

No ensaio de microdiluição, o peptídeo parental TsAP-2 não apresentou qualquer atividade bacteriostática ou bactericida na concentração testada de 2,0 a 73,8  $\mu\text{M}$ . Em contraste, o Ts-MAP1 mostrou atividade frente *A. baumannii* (003324845 HRAN), *E. coli* (3323742), *E. coli* (KPC+001812446), *K. pneumoniae* (ATCC+13883), *K. pneumoniae* (KPC+001450421), *S. aureus* (7133623 LACEN) e *S. aureus* (003730529 HRAN) com CIM de 4,1, 8,1, 16,2, 32,4, 32,4, 4,1 e 4,1  $\mu\text{M}$ , respetivamente.

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do peptídeo parental TsAP-2 e seu análogo Ts-MAP1 frente a bactérias patogénicas.

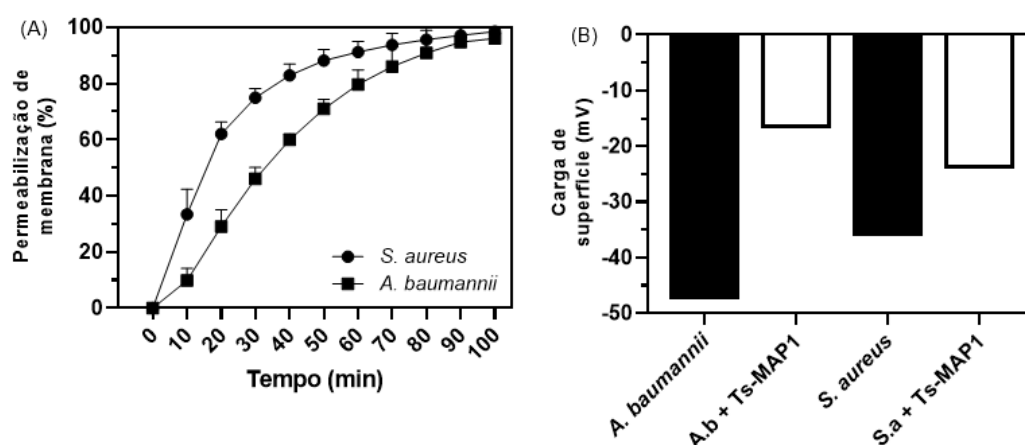
Microorganismos	MIC ( $\mu\text{M}$ )		
	TsAP-2	Ts-MAP1	Ciprofloxacino
<b>Gram-negativa</b>			
<i>A. baumannii</i> (003324845 HRAN)	>73.8	4.1	96.5
<i>E. coli</i> (3323742)	>73.8	8.1	>193.1
<i>E. coli</i> (KPC+001812446)	>73.8	16.2	6.0
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	>73.8	32.4	>193.1
<i>K. pneumoniae</i> (KPC+001450421)	>73.8	32.4	95.6
<b>Gram-positiva</b>			
<i>S. aureus</i> (7133623 LACEN)	>73.8	4.1 (8.1)	>193.1
<i>S. aureus</i> (003730529 HRAN)	>73.8	4.1	>193.1

() concentração bactericida mínima; os valores estão expressos a partir de experiências realizadas com réplicas técnicas e biológicas em triplicata.

Os valores de CIM dos peptídeos também foram utilizados para eliminar células bacterianas; o Ts-MAP1 mostrou atividade bactericida contra *S. aureus* (7133623 LACEN) a 8,1  $\mu\text{M}$ . (Tabela 1). A ciprofloxacina foi utilizada como controlo positivo e demonstrou resistência às estirpes bacterianas. O antibiótico apresentou uma CIM mais elevada para as bactérias do que o Ts-MAP1. Para *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *K. pneumoniae* (KPC+001450421), a CIM foi de 95,6  $\mu\text{M}$ . A CIM para *E. coli* (KPC+001812446) foi de 6,0, inferior à de 16,2 para o Ts-MAP1.

### 3.4 Permeabilização e eletroneutralização do peptídeo Ts-MAP1

Para investigar o possível mecanismo de ação do Ts-MAP1, o ensaio Sytox™ green foi realizado com *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) e incubado com o péptido a 123  $\mu\text{M}$  ( $30 \times \text{MIC}$ ). Para a TsAP-2, não foi observada qualquer fluorescência no final de 100 min de Ts-MAP1 na membrana de *A. baumannii* (003324845 HRAN) em 30 min, atingindo 50% de permeabilização; foi observado um pico de 100% em 90 min. No caso do *S. aureus* (7133623 LACEN), o Ts-MAP1 apresentou um aumento da fluorescência, atingindo 50% aos 15 minutos e 100% aos 70 minutos. Estes dados sugerem danos nas membranas bacterianas, mas existem provas de diferenças na interação de TsAP-2 e Ts-MAP1 com membranas Gram-negativas e ---positivas (Figura 2)



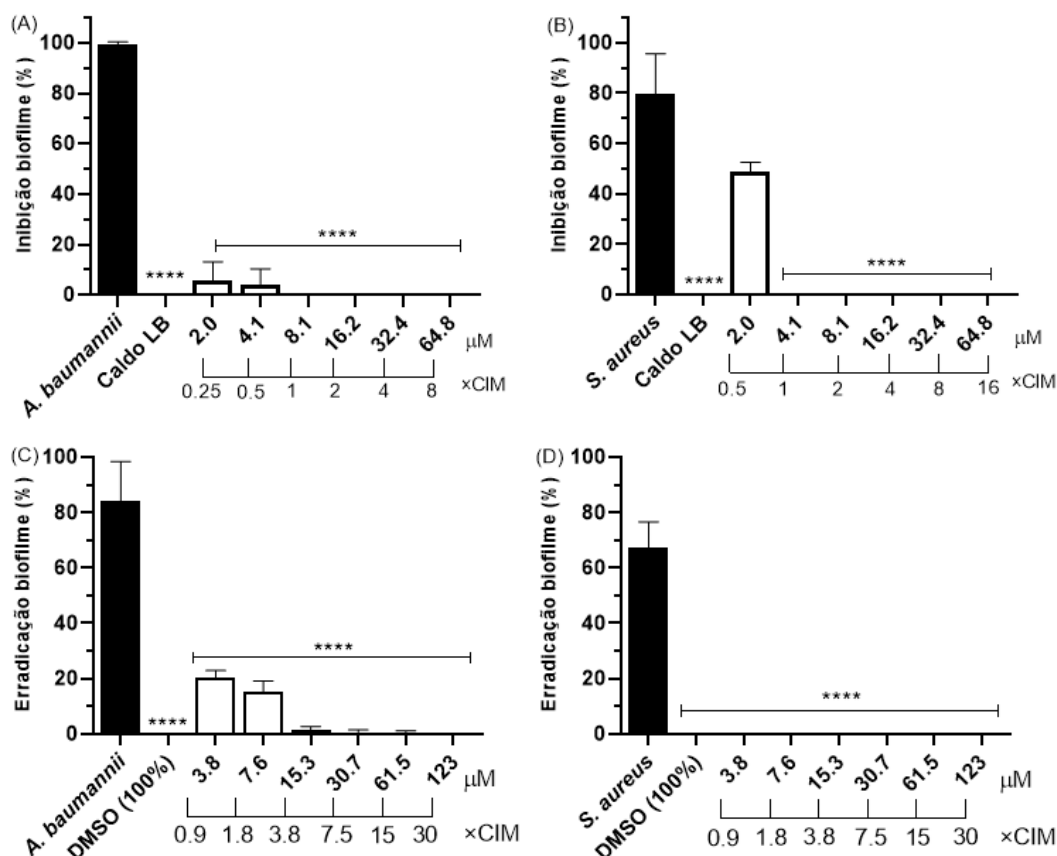
**Figura 2.** Modelo de interação para o peptídeo Ts-MAP1 em membranas bacterianas (A) Captação de verde Sytox™ em *A. baumannii* (003324845 HRAN ■) e *S. aureus* (7133623 LACEN ●) a 123  $\mu\text{M}$  ( $30 \times \text{CIM}$ ) de Ts-MAP1. Esta absorção foi registrada durante 100 minutos de incubação (C) Carga de superfície medida pelo potencial zeta para *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) tratados com Ts-MAP1 a 123  $\mu\text{M}$  ( $30 \times \text{CIM}$ ) (B) Carga de superfície para o peptídeo Ts-MAP1 frente membrana bacteriana não danificada para *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (7133623 LACEN) com carga de superfície -47,54 mV e -36,16 mV, respectivamente e após 123  $\mu\text{M}$  ( $30 \times \text{CIM}$ ). Foram efetuadas três experimentos independentes em triplicata. ANOVA seguido do teste de Dunnett (\*\*\*\*)  $p < 0,05$ .

Conforme demonstrado no resultado anterior, o peptídeo Ts-MAP1 foi capaz de interagir com células bacterianas, causando danos à membrana. No teste de potencial zeta, as células de *A. baumannii* (003324845 HRAN) apresentaram uma carga de superfície negativa de -47,54 mV, e as células de *S. aureus* (7133623 LACEN) apresentaram -36,16 mV. Depois de 100 minutos de tratamento com 123  $\mu\text{M}$  ( $30 \times \text{MIC}$ ), o peptídeo Ts-MAP1 promoveu a eletroneutralização, aproximando o potencial da membrana do neutro,

causando a ruptura. Para o *A. baumannii* (003324845 HRAN), a carga de superfície foi de -16,91 mV e para o *S. aureus* (7133623 LACEN) foi de -24,07 mV.

### 3.5 Atividade antibiofilme do Ts-MAP1

O nosso resultado mais baixo de CIM foi frente *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (003730529 HRAN), e foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima de biofilme de Ts-MAP1. Este ensaio revelou que o Ts-MAP1 foi capaz de inibir 100% da formação de biofilme de *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (003730529 HRAN) a 8,1 e 4,1  $\mu$ M, respectivamente (Figura 3A e B).



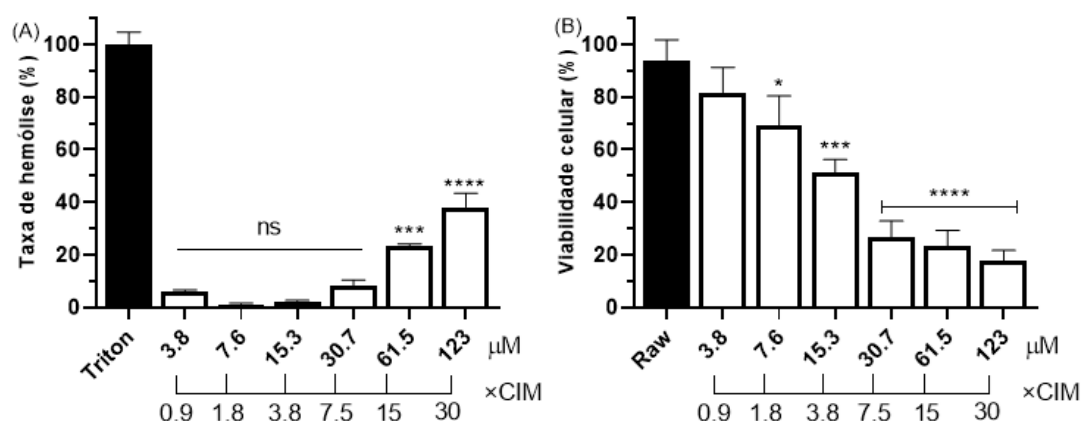
**Figura 3.** Atividade antibiofilme do Ts-MAP1 contra bactérias patogênicas (A) Inibição de biofilme de *A. baumannii* (003324845 HRAN) (B) Inibição de biofilme de *S. aureus* (003730529 HRAN) (C) Erradicação do biofilme de *A. baumannii* (003324845 HRAN) (D) Erradicação do biofilme de *S. aureus* (003730529 HRAN) em diferentes concentrações e a  $\times$  concentração CIM. Foram efetuadas três experiências independentes em triplicata. ANOVA seguido do teste de Dunnett (\*\*\*\*)  $p < 0,05$ .

Após a inibição de biofilme, o peptídeo Ts-MAP1 foi testado frente ao biofilme pré-formado de *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (003730529 HRAN). O

Ts-MAP1 mostrou atividade de erradicação a 15,3  $\mu\text{M}$  ( $3,8 \times \text{CIM}$ ), levando a  $\sim 100\%$  de morte da viabilidade do biofilme maduro das células de *A. baumannii* (Figura 3C). Para o *S. aureus*, o Ts-MAP1 erradicou a viabilidade do biofilme em todas as concentrações (Figura 3D). O DMSO a 100% foi utilizado como comparativo da erradicação do biofilme.

### 3.6 Atividade hemolítica e citotóxica do Ts-MAP1

A atividade hemolítica foi realizada para o Ts-MAP1 frente eritrócitos murinos, que pode perturbar os eritrócitos murinos em concentrações. A taxa hemolítica foi realizada de 3,8 a 123  $\mu\text{M}$ . De 3,8 a 15,3  $\mu\text{M}$ , o peptídeo não apresentou taxa de hemólise significativa. Em 30,7  $\mu\text{M}$ , o peptídeo apresentou  $\sim 8\%$  de hemólise, e a 61,5  $\mu\text{M}$  ( $15 \times \text{CIM}$ ) apresentou  $\sim 23\%$  de hemólise. A 123  $\mu\text{M}$  ( $30 \times \text{CIM}$ ), o Ts-MAP1 apresentou  $\sim 38\%$  de hemólise (Figura 4A).

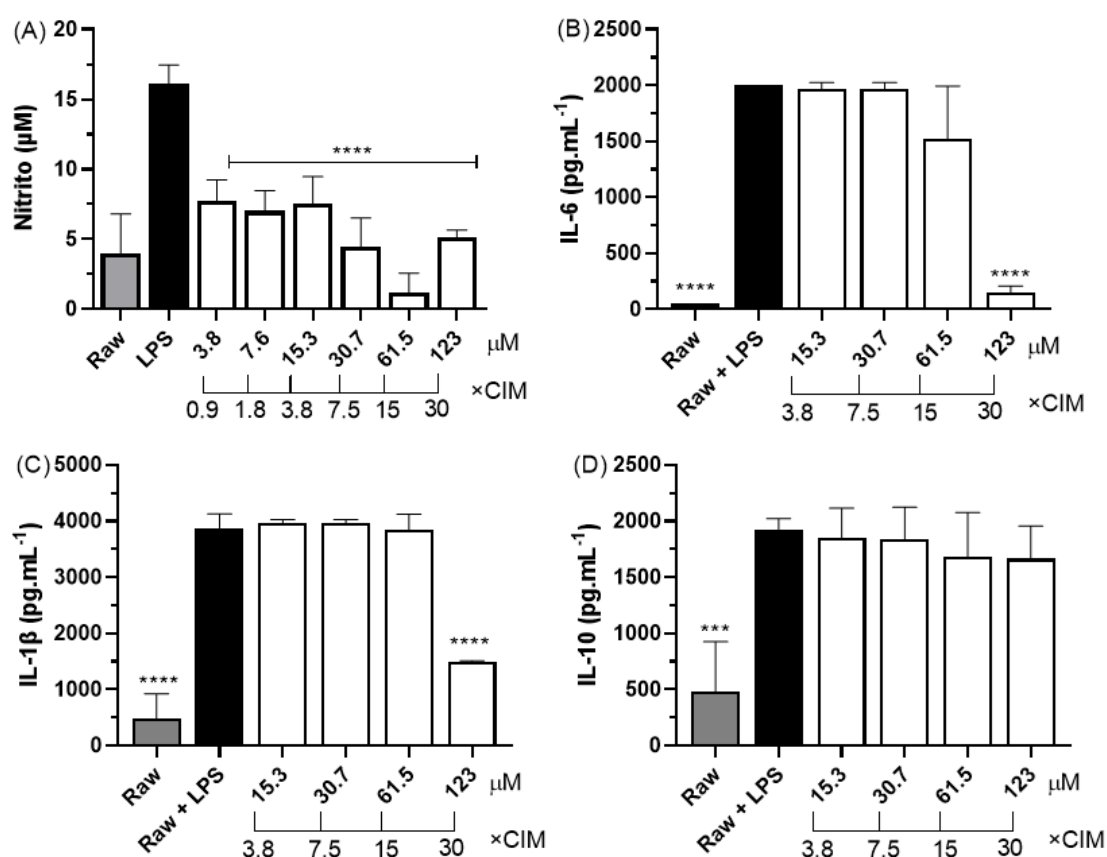


**Figura 4.** Efeito hemolítico e citotóxico do peptídeo Ts-MAP1 **(A)** Taxa de hemólise frente a diferentes concentrações do peptídeo Ts-MAP1 **(B)** Viabilidade celular frente a linhagem RAW 264.7 a diferentes concentrações do peptídeo Ts-MAP1. Foram efetuados três experimentos independentes em triplicado. ANOVA seguido do teste de Dunnett (\*\*\*\*)  $p < 0,05$ .

Para determinar se o peptídeo Ts-MAP1 era citotóxico frente a RAW 264.7, o ensaio MTT foi realizado 24 horas após o tratamento. O ensaio de viabilidade celular foi realizado de 1,9 a 123  $\mu\text{M}$ . Os resultados mostraram que o Ts-MAP1 não teve efeitos citotóxicos significativos em concentrações iguais a  $\leq 7,6 \mu\text{M}$  (Figura 4B). O valor de  $\text{IC}_{50}$  foi determinado usando a curva de dose-resposta, revelando que o Ts-MAP1 apresentou um  $\text{IC}_{50}$  de 109,7  $\mu\text{M}$ .

### 3.7 Atividade imunomodulatória do Ts-MAP1

Ao analisar a atividade do Ts-MAP1 na prevenção da estimulação de LPS em células murinas de macrófagos, a quantificação de nitrito foi realizada usando a metodologia da reação de Griess (Figura 6B). As concentrações que apresentaram a menor produção de nitrito foram 61,5  $\mu\text{M}$  ( $15 \times \text{CIM}$ ), e a redução de NO foi de  $\sim 88\% \pm 0,05$ . A 123  $\mu\text{M}$ , observou-se que houve um aumento na liberação de NO, o que pode ser explicado pelo estresse celular das células RAW 264.7.



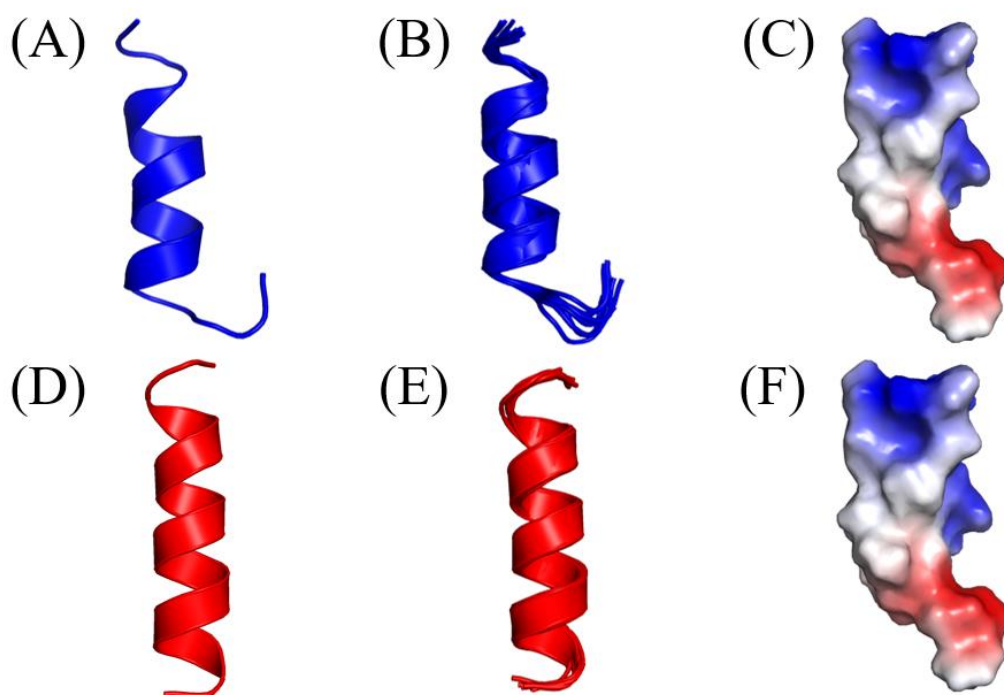
**Figura 5.** Efeito imunomodulador do peptídeo Ts-MAP1 (A) Inibição de NO induzido por LPS em diferentes concentrações do peptídeo Ts-MAP1 (B) Dosagem de IL-6 (C) Dosagem de IL-1 $\beta$  (D) Dosagem de IL-10. Todos os valores de citocina são expressos em  $\text{pg.mL}^{-1}$ . Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. ANOVA seguido do teste de Dunnett (\*\*\*\*)  $p < 0,05$ .

O análogo do peptídeo Ts-MAP1 não apresentou nenhuma capacidade imunomoduladora em relação à liberação de citocinas. Para as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 $\beta$ , não houve redução na liberação até 61,5  $\mu\text{M}$  ( $15 \times \text{MIC}$ ), mas a 123  $\mu\text{M}$  houve uma redução, embora isso tenha sido associado ao estresse celular e tenha sido

observado na viabilidade do MTT. Para a citocina anti-inflamatória IL-10, também não foi observada imunomodulação contra macrófagos RAW 264.7.

### 3.8 RMN para o peptídeo Ts-MAP1

Para determinar a estrutura secundária do Ts-MAP1, a ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada em ambientes diferentes (Figura 6). Como observado na análise de DC, o análogo de peptídeo Ts-MAP1 apresentou maior formação de hélice em SDS do que em TFE. A porcentagem de hélice em SDS foi de aproximadamente 58,8% e 82,3% em TFE. Em comparação com os dados fornecidos pelo dicroísmo circular, o peptídeo Ts-MAP1 manteve sua conformação helicoidal em SDS. No entanto, os dados de NMR mostraram que o peptídeo Ts-MAP1 perdeu sua estrutura secundária em TFE.



**Figura 6.** Ressonância magnética nuclear para o peptídeo análogo Ts-MAP1 **(A)** Energia livre mais baixa em 40% TFE e 60% H<sub>2</sub>O **(B)** Sobreposição das dez estruturas de RMN de menor energia para o Ts-MAP1 **(C)** Potencial eletrostático do Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) para o Ts-MAP1 **(D)** Menor energia livre em 90% SDS e 10% D<sub>2</sub>O **(E)** Sobreposição das dez estruturas RMN de menor energia para Ts-MAP1 **(F)** Potencial eletrostático do Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) para Ts-MAP1.

#### 4. DISCUSSÃO

Os peptídeos de veneno de escorpião são geralmente classificados em dois grupos principais: os peptídeos com ponte de dissulfeto (PPDs), que geralmente têm como alvo os canais de íons ligados à membrana, e os peptídeos sem ponte de dissulfeto (PSPDs) num grupo menor dentro do arsenal de peptídeos de veneno de escorpião que apresenta atividades multifuncionais<sup>28</sup>. Aqui, descrevemos um novo peptídeo antimicrobiano, anti-biofilme e imunomodulador chamado Ts-MAP1, derivado do TsAP-2, ambos classificados como PSPDs. O novo peptídeo desenvolvido por projeto racional teve sua carga e anfipaticidade modificadas, com uma face polar rica em lisina oposta a uma face não polar rica em leucina-isoleucina. Peptídeos antimicrobianos catiônicos sem ligações dissulfeto estão sendo identificados em diferentes espécies de escorpiões.

Acredita-se que o aumento de resíduos carregados positivamente seja benéfico para as interações eletrostáticas iniciais entre os PAMs e as membranas bacterianas carregadas negativamente, auxiliando na seletividade. Os peptídeos antimicrobianos com uma face rica em lisina têm um melhor espectro antibacteriano, especialmente em Gram-negativos, pois aumentam o contato eletrostático com a membrana<sup>29</sup>. Neste estudo, isso ficou evidente quando aumentamos a carga líquida do peptídeo análogo de +1 para +4. O Ts-MAP1 apresentou CIM em diferentes concentrações, sendo 4,1 a mais baixa e 32,4 a mais alta, onde a mais baixa foi em *A. baumannii* (003324845 HRAN) e duas cepas de *S. aureus* (7133623 LACEN) e *S. aureus* (003730529 HRAN).

Silva e colaboradores descreveram a incorporação de uma região hidrofóbica (FLPII) no terminal N da clavanina A<sup>30</sup>. Alinhando a região hidrofóbica com o peptídeo Ts-MAP1, ambos mostraram a conservação de três resíduos: Phe, Leu e Iso. A alteração do resíduo Pro na etiqueta para Lys no Ts-MAP1 foi feita para aumentar a carga catiônica líquida, a interação de hidrogênio com a membrana bacteriana e aumentar a porcentagem de helicidade.

Na literatura, o TsAP-2 apresentou CIM para *S. aureus* (NCTC 10788) a 5 e *E. coli* (NCTC 10418) a  $> 320 \mu\text{M}$ <sup>16</sup>. Essa diferença destaca as modificações feitas pela bioinformática avançada no peptídeo Ts-MAP1. De Melo e colaboradores relataram um peptídeo encontrado em *T. stigmurus* denominado stigmurina, que também apresentou atividade em *S. aureus* (ATCC 29213) a 8,68 e  $>139 \mu\text{M}$  em *E. coli* (ATCC 25922). Vale a pena mencionar que o Ts-MAP1 tem 64% de similaridade com a stigmurina<sup>31</sup>.

O gênero *Tityus* tem um alto polimorfismo de toxinas clinicamente importantes<sup>32</sup>. Utilizando a ferramenta de busca do banco de dados PAM, presente no *APD3*, foi possível filtrar os peptídeos presentes no gênero *Tityus* depositados com 17 resíduos de aminoácidos com atividade antibacteriana. O software *Clustal Omega 2.1* foi utilizado para realizar um alinhamento da matriz de identificação de porcentagem com os peptídeos. Os resultados demonstraram que o peptídeo Ts-MAP1 tem uma similaridade de 82% com o TsAP-2, 71% com o ToAP3, 65% com a stigmurina e o TtAP-2 e 59% com o TtAP-3.

Pelo ensaio Sytox<sup>TM</sup> green, o Ts-MAP1 demonstrou a capacidade de permeabilizar a membrana de *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (003730529 HRAN) em 100 minutos a 123  $\mu\text{M}$  ( $30 \times \text{CIM}$ ). O dano à membrana bacteriana do Ts-MAP1 também pode ser corroborado com a medição da carga da superfície pelo potencial zeta. Alves e colaboradores relataram que a neutralização da carga da superfície bacteriana pelo pepR ocorre em concentrações muito baixas de peptídeo, o que é uma consequência provável da alta cationicidade do peptídeo<sup>33</sup>. Tanto a permeabilização da membrana quanto a eletroneutralização podem fornecer alguns insights e sugerir o mecanismo antimicrobiano adotado pelo Ts-MAP1.

Cardoso e colaboradores descreveram o bioinspirado sintético em *Candida albicans* denominado Ca-MAP1. Esse peptídeo demonstrou a capacidade de permeabilizar a membrana de *E. coli* a 273  $\mu\text{M}$  (30 vezes o CIM de 9,1  $\mu\text{M}$ )<sup>34</sup>. O peptídeo Ts-MAP1 permeabilizou a membrana de *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (003730529 HRAN) a 123  $\mu\text{M}$  ( $30 \times \text{CIM}$ ).

Os biofilmes são comunidades microbianas de microrganismos sésseis compostos por células incorporadas a uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares ligadas a um substrato ou interface<sup>3</sup>. O aspecto mais alarmante das infecções relacionadas ao biofilme é que elas são altamente resistentes aos antibióticos convencionais que foram desenvolvidos para eliminar as células planctônicas. Consequentemente, a descoberta de agentes anti-infecciosos ativos contra microrganismos planctônicos e biofilmes é de grande importância para a saúde pública<sup>24</sup>. Nesse estudo, eles revelaram que o TsAP-2 não teve atividade na inibição da formação de biofilme em nenhuma concentração testada, mas o peptídeo Ts-MAP1 foi capaz de inibir a formação de biofilme contra o isolado clínico *A. baumannii* em 8,1  $\mu\text{M}$ .



Das Neves e colaboradores mostraram que o peptídeo Con 10 (APD3 ID: AP02761) encontrado em *Opisthacanthus cayaporum* demonstrou uma capacidade de inibir a formação de biofilme de três cepas clínicas isoladas *A. baumannii* 53 (AB 53), *A. baumannii* (AB 72) em 12,5  $\mu$ M e 25  $\mu$ M em *A. baumannii* (AB 02)<sup>31</sup>. Souza e Silva e colaboradores descreveram que o Hp-MAP3, encontrado em *Hylarana picturata*, teve o efeito de inibir a formação de biofilme de *A. baumannii* em 2,7 e erradicá-lo totalmente em 173,2  $\mu$ M<sup>24</sup>. O peptídeo candidato Ts-MAP1 mostrou atividade na inibição da formação de *A. baumannii* (003324845 HRAN) e *S. aureus* (003730529 HRAN) a 8,1 e 4,1  $\mu$ M. Além disso, o Ts-MAP1 erradicou as mesmas cepas em 15,3 e 3,8  $\mu$ M.

A baixa porcentagem de hemólise em peptídeos antibacterianos e anti-inflamatórios é um ponto notável no desenvolvimento de novas moléculas bioativas devido à baixa quantidade de efeitos colaterais<sup>34</sup>. O peptídeo Ts-MAP1 não apresentou atividade de hemólise de 3,8 a 61,5  $\mu$ M. Na literatura, o TsAP-2 não é hemolítico a 15  $\mu$ M, mas causou 50% de hemólise com um HC<sub>50</sub> a 30  $\mu$ M e 100% de hemólise a 80  $\mu$ M<sup>16</sup>. É comumente aceito que uma das primeiras etapas do mecanismo de ação dos PAMs é sua interação com as membranas por meio da atração eletrostática entre os PAMs carregados positivamente e as membranas bacterianas carregadas negativamente<sup>24</sup>.

Embora todas as membranas bacterianas tenham grandes quantidades de moléculas carregadas negativamente, há diferenças na composição das membranas das bactérias Gram-positivas e negativas que influenciam sua sensibilidade a diferentes PAMs. Para começar, as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que não está presente nas bactérias Gram-positivas. Essa membrana externa representa uma barreira que as PAMs devem atravessar para alcançar a membrana citoplasmática<sup>35</sup>.

O ensaio de tetrazólio MTT é uma ferramenta popular para estimar a atividade metabólica de células vivas<sup>36</sup>. Em nosso estudo, o ensaio MTT foi realizado em células de macrófagos RAW 264.7. O Ts-MAP1 não apresentou atividade citotóxica de 1,9 a 15,3  $\mu$ M (3,8  $\times$  CIM), o que representa 50% das células viáveis. A partir de 30,7  $\mu$ M, o peptídeo Ts-MAP1 diminuiu a viabilidade das células RAW 264.7. A linha celular RAW 264.7 produz uma resposta inflamatória robusta e bem conhecida, especialmente quando desafiada com estimulantes inflamatórios, como o LPS<sup>37</sup>. O Ts-MAP1 promoveu a liberação de NO de 3,8 a 61,5  $\mu$ M, onde houve a menor produção de nitrito.

As citocinas são mediadores essenciais que supervisionam e regulam as respostas imunes e inflamatórias por meio de redes complexas e servem como biomarcadores para muitas doenças<sup>38</sup>. A medição da citocina foi realizada pelo kit ELISA. O Ts-MAP1 foi capaz de diminuir os níveis em  $\text{pg.mL}^{-1}$  de IL-1 $\beta$  e IL-6 a 123  $\mu\text{M}$ . As citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos são essenciais na defesa contra infecções<sup>30</sup>. Além disso, o Ts-MAP1 também aumentou a produção de IL-10 a 123  $\mu\text{M}$ . A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória com função imunomoduladora que inibe a produção de várias citocinas pró-inflamatórias<sup>35</sup>.

A espectrometria de dicroísmo circular é uma ferramenta muito útil para determinar a conformação estrutural secundária de proteínas usando luz polarizada<sup>39</sup>. Usando o modelo PDB gerado pelo *ColabFold* com *AlphaFold2*, a porcentagem de hélice foi calculada in silico. O TsAP-2 mostrou 76,47% de helicidade, enquanto o Ts-MAP1 apresentou 82,35%. A porcentagem de hélice in vitro também foi observada pela análise de CD. Daniele-Silva e colaboradores demonstraram por dicroísmo circular que a stigmurina tem estrutura helicoidal TFE e SDS<sup>40</sup>. Em nosso estudo, o Ts-MAP1 apresentou bandas positivas em aproximadamente 192 nm e bandas negativas entre 208 e 222 nm, indicando a transição conformacional para  $\alpha$ -hélice. Na literatura, a capacidade dos NDBPs de modificar sua conformação estrutural, dependendo do ambiente, proporciona uma flexibilidade importante para interagir com as membranas, contribuindo para sua atividade antibiótica<sup>28</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

Portanto, neste estudo, descrevemos um novo peptídeo, denominado Ts-MAP1, bioinspirado no TsAP-2 e obtido por meio da modulação das propriedades físico-químicas com o objetivo de organizar estruturas  $\alpha$ -helicoidais anfipáticas. O Ts-MAP1 não apresentou atividade hemolítica, é capaz de permeabilizar, eletroneutralizar e eliminar células bacterianas em baixas concentrações, exibindo atividade contra biofilme maduro. Portanto, o Ts-MAP1 é um candidato promissor contra microrganismos patogênicos, fornecendo informações importantes para auxiliar no projeto de novas sequências de peptídeos.

## REFERÊNCIAS

- (1) Bassetti, S.; Tschudin-Sutter, S.; Egli, A.; Osthoff, M. Optimizing Antibiotic Therapies to Reduce the Risk of Bacterial Resistance. *European Journal of Internal Medicine*. Elsevier B.V. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2022.01.029>.
- (2) Sahreen, S.; Mukhtar, H.; Imre, K.; Morar, A.; Herman, V.; Sharif, S. Exploring the Function of Quorum Sensing Regulated Biofilms in Biological Wastewater Treatment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI September 1, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23179751>.
- (3) Assefa, M.; Amare, A. Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections: A Review. *Infect Drug Resist* 2022, Volume 15, 5061–5068. <https://doi.org/10.2147/idr.s379502>.
- (4) de Moraes, L. F. R. N.; Silva, P. S. e; Pereira, T. C. P. L.; Almeida Rodrigues, T. A.; Farias Frihling, B. E.; da Costa, R. A.; Torquato, H. F. V.; Lima, C. S.; Paredes-Gamero, E. J.; Migliolo, L. First Generation of Multifunctional Peptides Derived from Latarein-3a from *Lachesana Tarabaei* Spider Toxin. *Front Microbiol* 2022, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.965621>.
- (5) L. Kiss, A. Inflammation in Focus: The Beginning and the End. *Pathology and Oncology Research*. Frontiers Media S.A. January 4, 2022. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.1610136>.
- (6) Roma Pahwa, A. G. I. J. Chronic Inflammation; 2023.
- (7) Hong, J. M.; Kwon, O. K.; Shin, I. S.; Jeon, C. M.; Shin, N. R.; Lee, J.; Park, S. H.; Bach, T. T.; Hai, D. Van; Oh, S. R.; Han, S. B.; Ahn, K. S. Anti-Inflammatory Effects of Methanol Extract of *Canarium Lyi* C.D. Dai & Yakovlev in RAW 264.7 Macrophages and a Murine Model of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury. *Int J Mol Med* 2015, 35 (5), 1403–1410. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2117>.
- (8) Viola, A.; Munari, F.; Sánchez-Rodríguez, R.; Scolaro, T.; Castegna, A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>.
- (9) Marasinghe, C. K.; Jung, W. K.; Je, J. Y. Anti-Inflammatory Action of Ark Shell (*Scapharca Subcrenata*) Protein Hydrolysate in LPS-Stimulated RAW264.7 Murine Macrophages. *J Food Biochem* 2022, 46 (12). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14493>.
- (10) Majc, B.; Novak, M.; Lah, T. T.; Križaj, I. Bioactive Peptides from Venoms against Glioma Progression. *Front Oncol* 2022, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.965882>.
- (11) Parmanik, A.; Das, S.; Kar, B.; Bose, A.; Dwivedi, G. R.; Pandey, M. M. Current Treatment Strategies Against Multidrug-Resistant Bacteria: A Review. *Current Microbiology*. Springer November 1, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03061-7>.
- (12) Boparai, J. K.; Sharma, P. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett* 2019, 27 (1), 4–16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>.
- (13) Guo, X.; Ma, C.; Du, Q.; Wei, R.; Wang, L.; Zhou, M.; Chen, T.; Shaw, C. Two Peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the Venom of the Brazilian Yellow Scorpion, *Tityus*

Serrulatus: Evaluation of Their Antimicrobial and Anticancer Activities. *Biochimie* 2013, 95 (9), 1784–1794. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.003>.

(14) Lin, Y.; Jiang, Y.; Zhao, Z.; Lu, Y.; Xi, X.; Ma, C.; Chen, X.; Zhou, M.; Chen, T.; Shaw, C.; Wang, L. Discovery of a Novel Antimicrobial Peptide, Temporin-PKE, from the Skin Secretion of *Pelophylax Kl. Esculentus*, and Evaluation of Its Structure-Activity Relationships. *Biomolecules* 2022, 12 (6). <https://doi.org/10.3390/biom12060759>.

(15) Li, G.; Yuan, X.; Chen, H.; Li, B.; Shao, C.; Zhu, Y.; Lai, Z.; Shan, A. Optimization of Antibacterial Activity in Tibetan Swine  $\alpha$ -Helix Peptide TP by Site-Directed Mutagenesis. *Front Microbiol* 2022, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.864374>.

(16) Guo, X.; Ma, C.; Du, Q.; Wei, R.; Wang, L.; Zhou, M.; Chen, T.; Shaw, C. Two Peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the Venom of the Brazilian Yellow Scorpion, *Tityus Serrulatus*: Evaluation of Their Antimicrobial and Anticancer Activities. *Biochimie* 2013, 95 (9), 1784–1794. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.003>.

(17) Gautier, R.; Douguet, D.; Antonny, B.; Drin, G. HELIQUEST: A Web Server to Screen Sequences with Specific  $\alpha$ -Helical Properties. *Bioinformatics* 2008, 24 (18), 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>.

(18) Mirdita, M.; Schütze, K.; Moriwaki, Y.; Heo, L.; Ovchinnikov, S.; Steinegger, M. ColabFold: Making Protein Folding Accessible to All. *Nat Methods* 2022, 19 (6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.

(19) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for Checking the Quality of Protein Structures Solved by NMR\*; 1996; Vol. 8. <http://www-nmr.chem.ruu.nl/users/rull/>.

(20) M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition; 2015. [www.clsi.org](http://www.clsi.org).

(21) Almeida, C. V.; de Oliveira, C. F. R.; dos Santos, E. L.; dos Santos, H. F.; Júnior, E. C.; Marchetto, R.; da Cruz, L. A.; Ferreira, A. M. T.; Gomes, V. M.; Taveira, G. B.; Costa, B. O.; Franco, O. L.; Cardoso, M. H.; Macedo, M. L. R. Differential Interactions of the Antimicrobial Peptide, RQ18, with Phospholipids and Cholesterol Modulate Its Selectivity for Microorganism Membranes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2021, 1865 (9). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129937>.

(22) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays; 1983; Vol. 65.

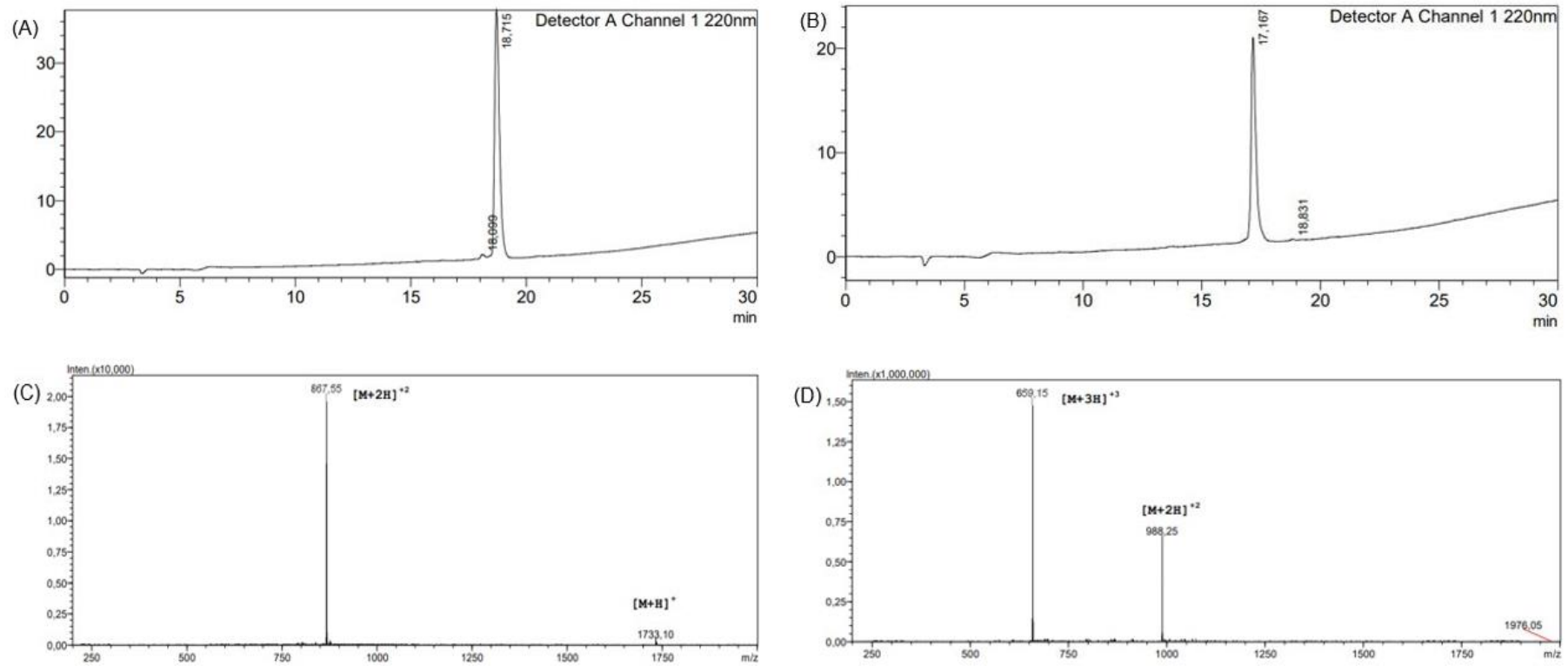
(23) Felício, M. R.; Silveira, G. G. O. S.; Oshiro, K. G. N.; Meneguetti, B. T.; Franco, O. L.; Santos, N. C.; Gonçalves, S. Polyalanine Peptide Variations May Have Different Mechanisms of Action against Multidrug-Resistant Bacterial Pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2021, 76 (5), 1174–1186. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa560>.

(24) Silva, P. S. e; Guindo, A. S.; Oliveira, P. H. C.; de Moraes, L. F. R. N.; Boleti, A. P. de A.; Ferreira, M. A.; de Oliveira, C. F. R.; Macedo, M. L. R.; Rossato, L.; Simionatto, S.; Migliolo, L. Evaluation of the Synthetic Multifunctional Peptide Hp-MAP3 Derivative of Temporin-PTa. *Toxins (Basel)* 2023, 15 (1), 42. <https://doi.org/10.3390/TOXINS15010042>.

- (25) Park, Y.; Kim, H. N.; Park, S. N.; Jang, S.-H.; Choi, C.-H.; Lim, H.-T.; Hahm, K.-S. Design of Novel Analogues with Potent Antibiotic Activity Based on the Antimicrobial Peptide, HP(2-9)-ME(1-12); 2004; Vol. 26.
- (26) Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018, 2018 (6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>.
- (27) Stone, W. L.; Yang, H.; Qui, M. Assays for Nitric Oxide Expression. <http://home.ncifcrf.gov/lcc/nitricoxide/aboutNOresearch>.
- (28) PIOTTO, Martial; SAUDEK, Vladimir; SKLENÁŘ, Vladimir. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of biomolecular NMR*, v. 2, n. 6, p. 661-665, 1992.
- (29) LIU, Maili et al. Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 132, n. 1, p. 125-129, 1998.
- (30) WÜTHRICH, Kurt. Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, n. 36, p. 22059-22062, 1990.
- (31) Nilges, M. and O'Donoghue, S. I. (1998) Ambiguous NOEs and automated NOESY assignment. *Prog. NMR Spec.* 32 , 107–139.
- (32) Linge, J. P., O'Donoghue, S. I., and Nilges, M. (2001) Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods Enzymol.* 339 , 71–90.
- (33) Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W., and Nilges, M. (2003) ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* 19 , 315–316.
- (34) Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Malliavin, T., and Nilges, M. (2007) ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* 23 , 381–382.
- (35) Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography and NMR system (CNS): A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. sect. D* 54 , 905–921.
- (36) Nilges, M., Bernard, A., Bardiaux, B., Malliavin, T., Habeck, M., and Rieping, W. (2008) Accurate NMR structures through minimisation of an extended hybrid energy. *Structure* 16 , 1305–1312.
- (37) Cheung, M.-S., Maguire, M. L., Stevens, T. J., and Broadhurst, R. W. (2010) DANGLE: A Bayesian inferential method for predicting protein backbone dihedral angles and secondary structure. *J. Magn. Reson.* 202 , 223–33.
- (38) Skinner SP, Goult BT, Fogh RH, Boucher W, Stevens TJ, Laue ED, et al. Structure calculation, refinement and validation using CcpNmr Analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2015 Jan 1;71(Pt 1):154–61.
- (39) Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., and Laue, E. D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59 , 687–696.

- (40) Linge, J. P., Williams, M. A., Spronk, C. A., Bonvin, A. M., and Nilges, M. (2003) Refinement of protein structures in explicit solvent. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 20 , 496–506.
- (41) Linge, J. P. and Nilges, M. (1999) Influence of non-bonded parameters on the quality of NMR structures: a new force-field for NMR structure calculation. *J. Biomol. NMR* 13 , 51–59.
- (42) Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605–12.
- (43) Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26 , 283–291.
- (44) Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8 , 52–56.
- (45) Markus Wiederstein, Manfred J. Sippl, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Research*, Volume 35, Issue suppl\_2, 1 July 2007, Pages W407–W410.
- (46) JURRUS, E. et al. Improvements to the <scp>APBS</scp> biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, v. 27, n. 1, p. 112–128, 24 jan. 2018.
- (47) Almaaytah, A.; Albalas, Q. Scorpion Venom Peptides with No Disulfide Bridges: A Review. *Peptides*. Elsevier Inc. 2014, pp 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.10.021>.
- (48) Souza e Silva, P.; Ferreira, M. A.; de Moraes, L. F. R.; de Barros, E.; Preza, S. L. E.; Cardoso, M. H.; Franco, O. L.; Migliolo, L. Synthetic Peptides Bioinspired in Temporin-PTa with Antibacterial and Antibiofilm Activity. *Chem Biol Drug Des* 2022, 100 (1), 51–63. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14052>.
- (49) Silva, O. N.; De La Fuente-Núñez, C.; Haney, E. F.; Fensterseifer, I. C. M.; Ribeiro, S. M.; Porto, W. F.; Brown, P.; Faria-Junior, C.; Rezende, T. M. B.; Moreno, S. E.; Lu, T. K.; Hancock, R. E. W.; Franco, O. L. An Anti-Infective Synthetic Peptide with Dual Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. *Sci Rep* 2016, 6. <https://doi.org/10.1038/srep35465>.
- (50) De Melo, E. T.; Estrela, A. B.; Santos, E. C. G.; Machado, P. R. L.; Farias, K. J. S.; Torres, T. M.; Carvalho, E.; Lima, J. P. M. S.; Silva-Júnior, A. A.; Barbosa, E. G.; Fernandes-Pedrosa, M. D. F. Structural Characterization of a Novel Peptide with Antimicrobial Activity from the Venom Gland of the Scorpion Tityus Stigmurus: Stigmurin. *Peptides* (N.Y.) 2015, 68, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.003>.
- (51) Borges, A.; Lomonte, B.; Angulo, Y.; Acosta de Patiño, H.; Pascale, J. M.; Otero, R.; Miranda, R. J.; De Sousa, L.; Graham, M. R.; Gómez, A.; Pardal, P. P. O.; Ishikawa, E.; Bonilla, F.; Castillo, A.; de Avila, R. A. M.; Gómez, J. P.; Caro-López, J. A. Venom Diversity in the Neotropical Scorpion Genus Tityus: Implications for Antivenom Design Emerging from Molecular and Immunochemical Analyses across Endemic Areas of Scorpionism. *Acta Trop* 2020, 204. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105346>.

- (52) Alves, C. S.; Melo, M. N.; Franquelim, H. G.; Ferre, R.; Planas, M.; Feliu, L.; Bardají, E.; Kowalczyk, W.; Andreu, D.; Santos, N. C.; Fernandes, M. X.; Castanho, M. A. R. B. Escherichia Coli Cell Surface Perturbation and Disruption Induced by Antimicrobial Peptides BP100 and PepR. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285 (36), 27536–27544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130955>.
- (53) Cardoso, P. H. de O.; Boleti, A. P. de A.; Silva, P. S. e.; Mukoyama, L. T. H.; Guindo, A. S.; Moraes, L. F. R. N. de; Oliveira, C. F. R. de; Macedo, M. L. R.; Carvalho, C. M. E.; de Castro, A. P.; Migliolo, L. Evaluation of a Novel Synthetic Peptide Derived from Cytolytic Mycotoxin Candidalysin. *Toxins (Basel)* 2022, 14 (10). <https://doi.org/10.3390/toxins14100696>.
- (54) Jiménez-Vargas, J. M.; Ramírez-Carretero, S.; Corzo, G.; Possani, L. D.; Becerril, B.; Ortiz, E. Structural and Functional Characterization of NDBP-4 Family Antimicrobial Peptides from the Scorpion Mesomexovis Variegatus. *Peptides (N.Y.)* 2021, 141. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170553>.
- (55) Grela, E.; Kozłowska, J.; Grabowiecka, A. Current Methodology of MTT Assay in Bacteria – A Review. *Acta Histochemica*. Elsevier GmbH May 1, 2018, pp 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>.
- (56) Facchin, B. M.; dos Reis, G. O.; Vieira, G. N.; Mohr, E. T. B.; da Rosa, J. S.; Kretzer, I. F.; Demarchi, I. G.; Dalmarco, E. M. Inflammatory Biomarkers on an LPS-Induced RAW 264.7 Cell Model: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflammation Research*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH August 1, 2022, pp 741–758. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01584-0>.
- (59) Liu, C.; Chu, D.; Kalantar-Zadeh, K.; George, J.; Young, H. A.; Liu, G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science*. John Wiley and Sons Inc August 1, 2021. <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>.
- (60) Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat Protoc* 2007, 1 (6), 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>.
- (61) Daniele-Silva, A.; Rodrigues, S. de C. S.; dos Santos, E. C. G.; Queiroz Neto, M. F. de; Rocha, H. A. de O.; Silva-Júnior, A. A. da; Resende, J. M.; Araújo, R. M.; Fernandes-Pedrosa, M. de F. NMR Three-Dimensional Structure of the Cationic Peptide Stigmurin from Tityus Stigmurus Scorpion Venom: In Vitro Antioxidant and in Vivo Antibacterial and Healing Activity. *Peptides (N.Y.)* 2021, 137. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.17047>

**MATERIAL SUPPLEMENTAR**

**Figura S1.** Purificação por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa para **(A)** TsAP-2 e **(B)** Ts-MAP1 com 95% de pureza. Espectros de massa de electrospray para **(C)** TsAP-2 com 1733,10 Da e **(D)** Ts-MAP1 com 1975,05 Da.



**Tabela S1.** Estrutura secundária pelo webserver *BeStSel* para os peptídeos em diferentes ambientes.

Ambientes		Peptídeos	
		TsAP-2	Ts-MAP1
Água	Hélice	0.0	0.0
	Antiparalela	38.5	35.1
	Volta	16.5	18.1
SDS 30mM	Hélice	0.0	7.8
	Antiparalela	41.0	28.6
	Volta	13.2	15.6
50% TFE	Hélice	6.3	0.0
	Antiparalela	33.8	37.0
	Volta	16.8	13.7