UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Flavia Silva Souto Moreno

Avaliação da atividade antibacteriana e antitumoral de peptídeos curtos derivados do mastoparano-L

Campo Grande- Mato Grosso do Sul
Dezembro-2017

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antibacteriana e antitumoral de peptídeos curtos derivados do mastoparano-L

Autora: Flavia Silva Souto Moreno
Orientador: Dr. Osmar Nascimento Silva
Co-orientador: Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho

"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- Mato Grosso do Sul
Dezembro - 2017

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

M843a Moreno, Flavia Silva Souto
Avaliação da atividade antibacteriana e antitumoral de peptídeos derivados do mastoparano-L) / Flavia Silva Souto Moreno; orientador Osmar Nascimento Silva; coorientador Cristiano Marcelo Espínola Carvalho -- 2017
51 f.+ anexos

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande , 2017.
Inclui bibliografias.

1.Peptídeos 2. Bactérias - Infecções 3.Câncer 4. Biotecnologia I. Silva, Osmar Nascimento II. Carvalho, Cristiano Marcelo Espínola III. Título.

CDD: 579

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

Avaliação da Atividade Antibacteriana e Antitumoral de Peptídeos curtos Derivados do Mastoparano-L

Autora: Flavia Silva Souto Moreno

Orientador: Prof. Dr. Osmar Nascimento Silva

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 28 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Osmar Nascimento Silva - UCDB
(orientador)

Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho - UCDB
(coorientador)

Profa. Dra. Simone Maria Neto - UFMS

Profa. Dra. Suzana Meira Ribeiro - UCDB

“Você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.”

O Menestrel – William Shakespeare

Dedico este trabalho à minha família e aos meus amigos, que sempre me deram apoio mesmo quando eu acreditava que não teria coragem de continuar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Osmar Nascimento Silva e ao meu co-orientador Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho, por terem acreditado em mim e pela paciência, sugestões e incentivo, que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

À minha família, também pela paciência e motivação, sem vocês eu não teria conseguido.

Ás minhas amigas Thaís Barbosa de Souza, Daniele Buccini e Adriana Sabioni Ribas, que sempre me ouviram em todos os momentos de desespero e sempre me deram uma palavra de conforto. Muito obrigada meninas, vou levá-las para sempre comigo.

Aos colaboradores do Biosaúde, pela disponibilidade, simpatia e contribuição para a realização deste trabalho.

A Universidade Católica Dom Bosco, por me proporcionar a busca pelo conhecimento técnico e cientifico, desde a graduação, e suporte para a realização deste projeto de Mestrado.

À FUNDECT e CAPES pelo incentivo financeiro, que em meio a todos os infortúnios políticos ainda continua firme e tornando possível a realização de pesquisas no Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos são encontrados no sistema imune inato de uma variedade de organismos e agora são considerados uma alternativa promissora para as moléculas convencionais usadas contra infecções, algumas das quais demonstraram ter uma atividade antimicrobiana e antitumoral dupla. O mastoparano-L é um peptídeo antimicrobiano α-helicoidal bem caracterizado na literatura, devido às suas propriedades biológicas, o último inclui atividade antitumoral. No presente trabalho, desenhamos seis análogos do mastoparano-L e avaliamos sua atividade antibacteriana e antitumoral. Os análogos foram sintetizados, purificados e as propriedades físico-químicas avaliadas. A atividade antibacteriana foi avaliada em diferentes referências bacterianas e isolados clínicos Gram-negativos e Gram-positivos. A atividade antitumoral foi avaliada contra células do tumor ascítico de Ehrlich. Os resultados indicaram que todos os análogos sintetizados obtiveram resultados interessantes, no entanto destacamos masto-A1 e masto-A2, os quais apresentaram atividade antibacteriana em baixas concentrações, enquanto masto-A4 mostrou uma tendência à atividade antitumoral a 12,5 $\mu g.L^{-1}$ em 24 horas de experimentação, os outros análogos apresentaram baixa atividade antibacteriana e antitumoral quando comparados com os análogos citados acima. Esses resultados demonstraram que as substituições em mastoparan-L levaram a diferentes características físico-químicas que alteram a atividade antibacteriana e antitumoral, abrindo novas possibilidades para a exploração do potencial terapêutico dessas moléculas.

Palavras-chave: câncer, desenho racional, infecções bacterianas multirresistentes, mastoparano-L. peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides are found in the innate immune system of a variety of organisms and are now considered the most promising alternative for the conventional molecules used against infections, some of which have been shown to have dual antimicrobial and antitumor activity. mastoparan-L is an α-helical antimicrobial peptide well characterized in the literature, owing to its biological properties, the latter includes antitumor activity. In the present work, we designed six analogs and evaluated their antibacterial and antitumor activity. The analogs were synthesized, purified and the physicochemical properties evaluated. The antibacterial activity was evaluated in different bacterial references and Gram-negative and Gram-positive clinical isolates. Antitumor activity was evaluated against Ehrlich ascites tumour cells. The results indicated that mast-A1 and mast-A2 analogs exhibited strong antibacterial activity, while mast-A4 showed a tendency to antitumor activity at 12.5 $\mu g.L^{-1}$ in 24 hours of experimentation, the other analogs showed low antibacterial activity and moderate antitumor activity. These results demonstrated that the substitutions in mastoparan-L led to different physico-chemical characteristics that alter the antibacterial and antitumor activity, opening new possibilities for the exploration of the therapeutic potential of these molecules.

Key words: cancer, rational design, multiresistant bacterial infections, mastoparan-L. antimicrobial peptides.

1 INTRODUÇÃO

No início do século XXI, a identificação crescente de bactérias multi-resistentes tornou-se um problema mundial (Arias e Murray, 2009). A Organização Mundial da Saúde já apontou a urgência na busca de novas moléculas antimicrobianas, sendo os antibióticos convencionais cada vez menos eficazes, especialmente contra os chamados patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa* e espécies de Enterobacter), que mostraram ter uma resistência aos antibióticos (McKenna, 2013). Outra preocupação global é o aumento da incidência de câncer.

Os dados divulgados nos últimos anos revelaram 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes, apenas em 2008 (Ferlay et al., 2010). Somente na Europa, 3,45 milhões de novos casos foram diagnosticados e 1.75 milhões de óbitos ocorreram durante o ano de 2012 (Ferlay et al., 2013). Atualmente, o câncer é a segunda maior causa de morte em todo o mundo (Arnold et al., 2015), causada por um crescimento celular anormal, de forma descontrolada, com a capacidade de invadir outros tecidos, levando à formação de massas tumorais, neo- vascularização (angiogênese) e metástase (Thundimadathil, 2012).

O câncer de pulmão, colo-retal, de próstata e de mama são as formas mais diagnosticadas desta doença (Domalaon et al., 2016). Considerando os números revelados, é urgente encontrar novas drogas anticâncer capazes de controlar o crescimento tumoral com efeitos colaterais minimizados (Dennison et al., 2007). Esta situação torna-se pior desde que o DNA-alquilação, agonistas hormonais e antimetabolitos, se mostram seletividade insuficiente e segmentação inespecífica em células saudáveis (Gaspar et al., 2013; Smith e White, 1995), contribuindo para o aumento da resistência a fármacos antitumorais (Wang et al., 2009a).

Além disso, a interseção entre infecção e câncer é destacada pelo número de mortes por câncer e novas ocorrências relacionadas ao tratamento ou infecções crônicas. Aproximadamente, 2 milhões de novos pacientes com câncer são devidos a agentes infecciosos como bactérias e vírus (Attiê, 2014; Parkin, 2006; Vedham, 2013).

Os pacientes que sofrem de uma infecção crônica são mais suscetíveis ao câncer devido ao sistema imunológico debilitado, que não pode combater o

patógeno e o surgimento de células cancerosas (Rolston, 2001). Esta debilidade também pode ocorrer devido a tratamentos de câncer muito agressivos para a saúde do paciente, como quimioterapia, radioterapia e ressecção cirúrgica, deixando-os suscetíveis a agentes infecciosos (Fishman, 2011; Xiao et al., 2015). Além disso, a exposição contínua à infecção leva à inflamação, contribuindo para o desenvolvimento de células tumorais (Vedham, 2013).

Nos últimos anos, foi identificada uma promissora classe de moléculas evolutivamente antigas, mas pouco estudadas, com diferentes tipos de vantagens no uso contra as principais preocupações em saúde pública mundial. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são pequenos peptídeos essenciais para a resposta imune inata de organismos de todos os filos, mostrando atividade contra uma ampla gama de agentes patogênicos, como bactérias, fungos e vírus (Hancock et al., 2016).

Mais recentemente, a atividade anticâncer também foi descrita para alguns desses peptídeos, denominados peptídeos antitumorais (PATs) (Dennison et al., 2006). Propriedades como quadro de interação de curto prazo (que diminui a probabilidade de resistência), baixa toxicidade (que reduz os efeitos colaterais), modo de ação, especificidade, boa solubilidade e, finalmente, boa penetração do tumor são observados como uma futura quimioterapia com alta potencial (Domalaon et al., 2016, Figueiredo et al., 2014, Gaspar et al., 2015, Riedl et al., 2011, Wu et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Peptídeos com atividade antimicrobiana e antitumoral

Os peptídeos antimicrobianos foram primeiro identificados devido à sua importância na imunidade inata de um grande número de organismos, ganhando interesse pela comunidade científica (Jenssen et al., 2006). Desde a primeira identificação até hoje em dia, centenas de PAMs foram identificadas e estudadas, tanto a partir de fontes naturais como de trabalhos *in silico* (Hancock et al., 2016).

Estes peptídeos são caracterizados por uma sequência de aminoácidos usualmente de 5 a 50 resíduos, alta hidrofobicidade e carga líquida positiva (Gaspar et al., 2012; Melo et al., 2011). Essas propriedades físico-químicas estabelecem a base para a atividade contra agentes patogênicos (Dennison et al., 2010). As bactérias apresentam membranas carregadas negativamente, promovendo a interação eletrostática inicial das PAMs.

Mesmo sabendo que nem todas as PAMs são PATs, a semelhança em termos de mecanismo de ação é óbvia, devido ao fenótipo da superfície das membranas das células tumorais. As células saudáveis têm na folhagem interna da membrana plasmática a fosfatidilserina (PS), um fosfolípido carregado negativamente. Esta assimetria entre folhetos de membrana interna e externa é perdida em células cancerosas, levando à presença de PS no folheto externo (Bevers et al., 1996). A exposição a PS, a presença de mucinas O-glicosiladas, gangliósidos sialilados e sulfato de heparina, em conjugação com um potencial transmembranar aumentado, área superficial e fluidez da membrana (Hilchie et al., 2011; Schweizer, 2009) promovem a atividade específica de PATs sobre as células tumorais, sem ser afetada pela heterogeneidade tumoral (Kelly et al., 2016).

Os parâmetros fisicoquímicos que determinam a atividade de alguns PAMs sobre células tumorais ainda não são claros, considerando que as características de PAMs/PATs são muito similares. Vários esforços têm sido feitos para melhor compreender estas diferenças, o que permitiria um desenho melhorado dos PATs (Dennison et al., 2006). Alguns PAMs também podem ser PATs independentemente da fonte de identificação ou rota de desenho sintético (Mader e Hoskin, 2006).

O número de PAMs encontrados na natureza com atividade antitumoral aumentou nos últimos anos. Aurein 1.2 é um exemplo de um ACP que mostrou alta atividade sobre 55 diferentes linhagens celulares de câncer *in vitro* (Dennison et al.,

2007; Rozek et al., 2000). O péptido neutrófilico humano 1 (HNP-1) mostrou ser ativo contra células de câncer PC-3 *in vitro* (Gaspar et al., 2015).

Os peptídeos pleuricidina 03/07, mais do que a sua actividade ACP, mostraram-se eficazes contra células de cancer da mama resistentes aos fármacos, sem toxicidade contra fibroblastos ou eritrócitos, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* (Hilchie et al., 2011). Gomesina e NK-lisina 2 são outros dois PATs que mostraram ser efetivos contra diferentes linhas celulares de câncer in vitro, em concentrações muito baixas (Rodrigues et al., 2008; Schröder-Borm et al., 2005).

Estes são apenas exemplos de PATs isolados de diferentes fontes naturais, como animais, plantas e bactérias. Os PATs naturais, mesmo com uma alta atividade antitumoral, têm uma alta probabilidade de apresentar alta toxicidade para células saudáveis e têm normalmente de 30 a 40 aa, o que aumenta o custo de produção. Portanto, trabalhos que abordam o desenho raciona de PATs tem ganhado atenção.

Existem diferentes possíveis abordagens disponíveis, como a melhoria das sequências de PATs naturais ou o uso de métodos *in silico* (Lee et al., 2008; Park et al., 1998). Ambas as estratégias levam em consideração a melhora das propriedades físico-químicas, como amfipaticidade, hidofobicidade e a carga positiva total, com o objetivo de uma melhor seletividade para às células alvo (Huang et al., 2011; Melo et al., 2011; Sinthuvanich et al., 2012).

Além disso, outras estratégias, como a hibridação de diferentes PATs (Hoskin e Ramamoorthy, 2008) ou a alteração dos aminoácidos utilizados para os não naturais (D-enantiômeros ou substituição cíclica de C□ são outros exemplos) (Hicks, 2016) também foram testados. As possibilidades são infinitas e dependem do foco da melhoria para cada caso. Os algoritmos de bioinformática integrados com o aprendizado da máquina, onde o design é automático através das propriedades escolhidas, levando em consideração bibliotecas PAMs/PATs existentes, são considerados o método mais utilizado nos projetos de desenho racional (Lin et al., 2015; Tyagi et al., 2013).

Como descrito PAMs e ACP compartilham a maioria das propriedades físico-químicas já descritas. Deste modo, a estrutura desempenha um papel central na sua atividade. É geralmente aceito que a maioria das PAMs/PATs não se dobram em uma estrutura bem definida quando livre em solução, mas adotam estrutura de α-

hélice ou folha-β quando ocorrem interações eletrostáticas com membranas (Hoskin e Ramamoorthy, 2008).

As diferenças em termos de estrutura foram o primeiro método para a classificação dos PATs. Exemplos de algumas PAMs ultimamente definidas como α-ACP são cecropin, magainin, melitina e buforin II, com a lactoferricina B, HNP-1/3 sendo classificados como β-PATs (Papo e Shai, 2005). Mais recentemente, observou-se que, independentemente da estrutura secundária que o péptido adota, uma classificação considerando os mecanismos de ação sobre as células alvo era mais adequada (Wu et al., 2014).

Os PAMs foram considerados como moléculas que atuam sibre a membrana em relação à sua atividade primária, mas ao longo dos anos, foi esclarecido que eles também podem alvejar diferentes processos do patógeno (nomeadamente, metabolismo e divisão celular) e do sistema imunológico (recrutamento de células imunes) (Hancock et al., 2016). Estes aspectos também foram estudados para os PATs, com a identificação da atividade lítica da membrana celular (necrose), atividade lítica da mitocôndria (apoptose) e atividades sobre outros alvos (Wu et al., 2014). O primeiro é o método antitumoral mais comum, com as interações eletrostáticas que promovem a ruptura da membrana, levando à necrose. Polybia-MPI, um PAT natural e o BTM-P1 sintético são dois exemplos de peptídeos com tal atividade (Segura et al., 2007; Wang et al., 2009a).

Esses PATs têm alta seletividade em relação às membranas de células cancerosas e desenvolvem baixa resistência, quando comparados aos fármacos quimioterápicos convencionais. A atividade sobre a membrana mitocondrial, ocorre ativando a sinalização da apoptose, também foi observada para alguns PATs, como lactoferricina B e diferentes β-PATs (Furlong et al., 2006; Paredes-Gamero et al., 2012). Além da atividade a nível da membrana, os PATs também podem apresentar outras atividades, direcionando proteínas celulares essenciais, inibindo a angiogênese ou recrutando células imunes para atacar células cancerosas (Figura 1) (Wu et al., 2014). O HNP-1 mostrou ser um ACP que recruta e ativa células dendríticas em termos de atividade imunomoduladora (Wang et al., 2009b), mas também inibe a angiogênese, que é essencial para o crescimento e desenvolvimento de tumores (Xu et al., 2008).

2.2 Tumor ascítico de Ehrlich: um modelo para a identificação de candidatos a antitumorais

O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) é um adenocarcinoma mamário de camundongos introduzido em 1886 por Paul Ehrlich. O tumor inicialmente se desenvolveu na forma sólida, podendo ser transplantado para outro animal por via intramuscular ou subcutânea, no entanto em 1932 houve o surgimento da forma ascítica, inoculada no peritônio do camundongo (Souza et al., 2014).

A utilização desta linhagem obteve um crescimento considerável nas últimas três décadas, devido aos benefícios do cultivo in vitro e in vivo, pelo conhecimento de características morfológicas e comportamentais das células, assim como a homogeneidade da linhagem, permitindo a padronização do número de células utilizada e facilidade de se obter uma concentração das mesmas suficientes para um estudo em pouco tempo (Ozaslan et al., 2011).

O TAE é um tumor agressivo, produzindo alterações acentuadas no sistema imunológico do hospedeiro, possuindo mecanismos de imunosupressão frente a células da medula óssea, por exemplo, devido ao alto nível de diversas células com atividade supressora. Este fenômeno pode ser observado devido a interação entre células tumorais e células imunocompetentes e também da produção de moléculas solúveis por estas mesmas células (Bromberg et al., 2010).

O tumor de Ehrlich na forma ascítica tem sido alvo de diversas pesquisas por também apresentar características como, mecanismos moleculares, alterações metabólicas, ação de hormônios sexuais e crescimento rápido e indiferenciado, semelhantes ao desenvolvimento de neoplasias mais sensíveis a antineoplásicos em humanos (Russo & Russo, 1996; 1998;).

2.3 Desenho racional de peptídeos

O desenho racional de peptídeos consiste em uma abordagem moderna para o desenvolvimento de peptídeos com potencial uso clinico. O desenho racional de peptídeos tem sido utilizado a fim de reduzir ou eliminar os efeitos adversos, de acordo com o princípio da toxicidade seletiva, uma vez que o principal obstáculo à utilização de peptídeos reside na sua toxicidade para células de mamífero. Isto não é surpreendente, pois a atividade dos peptídeos depende significativamente da interação membrana-peptídeo. No entanto, para que sejam úteis comercialmente seria necessário dissociar a toxicidade para as células de mamífero da atividade

antimicrobiana, o que pode ser alcançado através do aumento da atividade antimicrobiana ou redução da atividade hemolítica – ou ambos (Chen, 2005).

Outro obstáculo quanto à aplicabilidade dos peptídeos consiste em sua susceptibilidade à proteólise, uma vez que os peptídeos formados por L-aminoácido são sensíveis à degradação proteolítica, o que pode ser amenizado com o uso do desenho racional de peptídeos, mediante a substituição de aminoácidos, incluindo a substituição de L-aminoácidos por D-aminoácidos. Estas substituições podem promover alterações na anfipaticidade/hidrofobicidade, levando a uma redução da citotoxicidade dos peptídeos, para células de mamífero, sem alterar a atividade antimicrobiana, além de deixar os peptídeos menos susceptível à degradação proteolítica (Chen, 2005; Uggerhoj, 2015).

Os primeiros estudos que utilizaram o desenho racional de peptídeos geraram vários análogos de peptídeos conhecidos – catelicidinas, defensinas, magaininas e cecropinas. No entanto, a maioria dos análogos gerados foram menos ativos que o protótipo original, mas, estes estudos desempenharam um papel importante na identificação das propriedades físico-químicas envolvidas na atividade antibacteriana dos peptídeos. Estas propriedades serviram de base para o desenvolvimento de abordagens para previsão da atividade antibacteriana, através de vários métodos, como: máquina de vetor de suporte (MVS) (Lata, 2007), redes neurais artificiais (RNAs) (Fjell, 2009) e relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica ou alguma propriedade físico-química (QSAR/QSPR) (Jenssen, 2007). Os peptídeos surgem como uma classe promissora, apesar de suas limitações. Deste modo, os métodos de previsão e planejamento racional desempenham um papel crucial na melhoria da atividade dos PAMs frente as 'superbactérias'.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo principal a avaliação da atividade antibacteriana e antitumoral *in vitro* de seis análogos do mastoparano-L obtidos através de desenho racional.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos análogos Mast-A1, A2, A3, A4, A5 e A6 sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- ✓ Determinar a atividade citotóxica *in vitro* dos peptídeos sobre células do tumor ascítico de Ehrlich;
- ✓ Avaliar a atividade hemolítica;
- ✓ Realizar análises estruturais dos peptídeos através de modelagem molecular e dinâmica molecular

4 CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido a revista *Frontiers in Microbiology*

Evaluation of the antibacterial and antitumor activity of short peptides derived from mastoparan-L

Flávia S.S. Moreno[1], Danieli F. Buccini[2], William F. Porto[3,4], Susana E. Moreno[1], Fajemiroye O. James[5], Octávio L. Franco[1,3], Cristiano M.E. Carvalho[1], Osmar N. Silva[1]

[1]S-Inova Biotech, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil.

[2]Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró-Centro-Oeste, Campo Grande, MS, Brazil.

[3]Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

[4]Porto Reports, Brasília, DF, Brazil.

[5]Centro Universitário de Anápolis, Anápolis, GO, Brazil.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are found in the innate immune system of a variety of organisms. The AMPs are considered the most promising alternative for the conventional molecules used against infections, some of which have been shown to have antimicrobial and antitumor activity. Mastoparan-L is an α-helical antimicrobial peptide well characterized in the literature, owing to its biological properties, the latter includes antitumor activity. In the present work, we designed six analogs and evaluated their antibacterial and antitumor activity. The antibacterial activity was evaluated in different bacterial references and Gram-negative and Gram-positive clinical isolates. Antitumor activity was evaluated against Ehrlich ascites tumour cells. The results indicated that mast-A1 and mast-A2 analogs exhibited strong antibacterial activity, while mast-A4 showed a tendency to antitumor activity at 12.5 $\mu g.L^{-1}$ in 24 hours of experimentation, the other analogs showed low antibacterial activity and moderate antitumor activity. These results demonstrated that the substitutions in mastoparan-L alter the antibacterial and antitumor activity, opening new possibilities for the exploration of the therapeutic potential of these molecules.

Key-words: cell selectivity, mastoparan, rational design.

INTRODUCTION

In recent years, the number of people diagnosed with cancer and multiresistant infections has increased significantly, and currently both diseases are a major cause of death and morbidity worldwide (Felício et al., 2017). In addition, chronic infections are a major cause of cancer due to the instability in the immune system that allows proliferating cancer cells (Goldszmid et al., 2014). Similarly, physical weakness/fatigue associated with chemotherapy itself opens the way for opportunistic infections (Klastersky and Aoun, 2004).

In this scenario, the development of new compounds has been needing. Antimicrobial peptides (AMPs) are among the new alternatives, which have become the target of research by several research groups, mainly due to their ability to inhibit growth and/or kill a variety of microorganisms responsible for pathologies in animals, plants and animals. AMPs are small peptides (<50 amino acid residues) essential for the innate immune response of organisms from all phyla, showing activity against a wide range of pathogens such as bacteria, fungi and viruses (Hancock, 1997; Hancock et al., 2016; Silva et al., 2011). In addition to the described activities, several studies have demonstrated the anticancer activity of some peptides, called antitumor peptides (PATs) (Dennison et al., 2006, 2007, 2010).

The rational design of AMPs consists of a modern approach to the development of antibiotics, and detailed characterization of the target, since antibiotics that target the pathogen specific and do not interact with the host are of extreme importance in order to reduce or eliminate adverse effects based on the selective toxicity principle (Chen et al., 2005b). The main obstacle to the commercial use of AMPs as previously mentioned is their cytotoxicity to mammalian cells.

Ehrlich's ascitic tumor (EAT) is a mammary adenocarcinoma of mice introduced in 1886 by Paul Ehrlich. The use of this lineage has grown considerably in the last three decades, due to the benefits of *in vitro* and *in vivo* culture, knowledge of morphological and behavioral characteristics of the cells, as well as homogeneity of the lineage, allowing the standardization of the number of cells used and (OZASLAN et al., 2011). Ehrlich's tumor in the ascitic form has been the subject of several studies because it also presents characteristics such as molecular mechanisms, metabolic alterations, action of

sex hormones and rapid and undifferentiated growth, similar to the development of neoplasias more sensitive to antineoplastic agents in humans (RUSSO and RUSSO, 1996, 1998; RODRIGUEZ, 2012).

However, in general the use of AMPs/PATs as therapeutic agents presents some limitations, such as stability, cytotoxicity, and especially the number of amino acids, we also reduced the cost of large-scale production. The rational design of AMPs appears as an important tool in the search for smaller and efficient peptides, thus reducing the cost of synthesis, increase of activity, decrease of cytotoxicity (Porto et al., 2012). An obstacle to the applicability of AMPs is toxicity and their susceptibility to proteolysis. The rational design of peptides has been used in order to reduce or eliminate adverse effects according to the principle of selective toxicity, since the main obstacle to the use of peptides is their toxicity to mammalian cells. This is not surprising, since peptide activity depends significantly on membrane-peptide interaction. However, to be commercially useful it would be necessary to dissociate toxicity to mammalian cells from antimicrobial activity, which can be achieved by increasing antimicrobial activity or reducing hemolytic activity (Chen et al., 2005a; Hao et al., 2015).

Mastoparan-L (Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Ile-Leu-NH_2) is a 14-residue peptide isolated from wasp venom *Vespula lewisii*. In general, this peptide shows cytolytic, hemolytic activity, besides promoting mast cell degranulation and leukocyte chemotaxis (Higashijima et al., 1988). Recently, it was demonstrated that whit mastoparan-L is active against to leukemia, myeloma, and breast cancer cells, and showed toxicity towards both slow-growing and MDR cancer cells (Hilchie et al., 2016).

In the present study, we synthesized six analogs of mastoparan-L obtained by rational design of peptides and evaluated its effect in vitro against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and evaluated its effect on the viability of Ehrlich ascites tumor cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Design of Peptide

The peptides were designed using the ToxinPred server

(http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/design.php). The peptide sequences were chosen based on the following properties: 1. Hydrophobicity, 2. Hydropathicity, 3. Hydrophilicity and 4. Charge. The six analogs of mastoparan-L designed here were named as: mastoparan analogs and sequence numeric (mast-A 1-6)

Peptide Synthesis and Purification

Peptides were synthesized by Shanghai Hanhong Chemical (R.P. of China) using the solid-phase with the N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) strategy and purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) (GE, USA). The identity of each peptide was confirmed by MALDI ToF MS (Bruker, Germany). Peptide purity used in biologic assays was higher than 95% and the analogs have four residues less than the original molecule.

Strains and growth conditions

Different bacteria was used, included clinical isolates *E. coli* KPC-positive ID Nº.1812446 (Mandal et al., 2014)*, E. coli* multiresistant ID Nº.2101123 (Mandal et al., 2014) and carbapenemase-producing *K. pneumoniae* 1825971 (KPC971), as well as reference strains *B. subtilis* ATCC 6633, *E. faecalis* ATCC 12953, *S. aureus* ATCC 29213, Methicillin-Resistant *S. aureus* ATCC 33591, *S. pyogenes* ATCC 19615, *E. coli* ATCC 8739, *K. pneumoniae* ATCC 13885, *P. mirabilis* ATCC 25933, *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *S. enterica* ATCC 14028. Bacteria were plated on brain heart infusion (BHI) agar (Himedia, India) from a frozen stock. Following 24 h incubation, three isolated colonies were transferred to 1 mL of BHI broth. The broth culture was incubated overnight (12–16 h) at 37 °C with shaking (Kokai-Kun et al., 2007).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determination

The MIC of peptides was evaluated using the broth microdilution technique in BHI with an initial inoculum of 5×10^5 cells in non-treated polystyrene microtiter plates (Corning, USA) as described by Wiegand and collaborators (Wiegand et al., 2008). MICs were interpreted as the lowest concentration of peptide or antibiotic that completely inhibited the visible growth of bacteria after 12 h of incubation at 37°C. Each agent was tested in triplicate in at least three independent experiments (Silva et al., 2015a, 2016).

Ethics Statement

The use of mice was conducted in accordance with the regulations set forward by the respective national animal protection committees and in accordance with European Community Directive 86/609 and the U.S. Association for Laboratory Animal Care recommendations for the care and use of laboratory animals. All the techniques/procedures have been refined to provide for maximum comfort/minimal stress to the animals. The performed experiments have been approved by Animal Ethics Committees of the Universidade Catolica Dom Bosco (AECs/UCDB), number 005/2016.

Anticancer activity

Ehrlich ascites tumour (EAT cells) were provided as courtesy sample by Department of Pathology of UNESP, Botucatu-SP, Brazil. Cells were maintained *in vivo* in ascites form by successive transplantation of 6×10^6 cells/mice in a volume of 0.2 mL in PBS (Patra and Muthuraman, 2013). Seven days after the inoculation of EAT cells in the abdominal cavity of the mice; cells were harvested by needle aspiration, washed with PBS (Justo et al., 2000). Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with Hepes (25 mM), L-glutamine (2 mM), sodium bicarbonate (25 mM), 10% FBS antibiotics (100 $U.mL^{-1}$ penicillin and 100 $\mu g.mL^{-1}$ streptomycin) at 37° C in 5% in CO_2 incubator. Cell viability was determined by the trypan blue dye exclusion test (Patra and Muthuraman, 2013).

Cells were seeded in 96-well microtiter plates in a concentration of 2.0 x 10^5 cells per well, in RPMI medium, supplemented with different concentrations of peptides (1.6-100.0 $\mu g.mL^{-1}$). After 24 h of the incubation, a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl\-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA) protocol was performed. Briefly, 60% of the medium was removed, and 0.1 $mg.mL^{-1}$of MTT was added to each well and the plate was incubated for 4 h, in 5% CO_2, at 37 ºC in the dark. The blue formazan product generated was dissolved by the addition of 100 µL of DMSO (Mallinckrodt, Germany) per well. Plates were then gently swirled for 5 min, at room temperature, to dissolve the precipitate. Absorbance was monitored at 575 nm using a microplate spectrophotometer (Bio-Tek, USA). Viability was determined as a percentage of

the maximum value after subtracting the background. Results were expressed as the percentage of each sample compared to the negative control (medium).

Haemolysis assays

Haemolytic activity of peptides was evaluated against fresh mouse red blood cells (mRBCs) by measuring the peptide-induced change in the optical density (OD) at 540 nm (Victor X, Perkin-Elmer, Germany) (Dathe et al., 1996) of a mRBC cell suspension [a 20% (v/v) erythrocytes/phosphate buffered saline (PBS) suspension]. Maximum lysis (100%) was determined by analysing the supernatant of erythrocytes that had been incubated with 1% Triton X-100 while PBS was used as a negative control (Dathe et al., 1996; Lima et al., 2011; Silva et al., 2012, 2015b).

Molecular Modelling

The molecular modelling was performed according Irazazabal et al. (2016), with minor modifications. One hundred molecular models for each analogue were constructed by comparative molecular modelling using MODELLER 9.19, using the structure of mastoparan L with detergents (PDB ID: 1D7N) . The models were constructed using the default methods of automodel and environ classes from MODELLER. The final models were selected according to the discrete optimized protein energy score (DOPE score). This score assesses the energy of the models and indicates the best probable structures. The best models were evaluated through PROSA II and PROCHECK. PROCHECK checks the stereochemical quality of a protein structure by means of Ramachandran plot, where good quality models are expected to have 90% of amino acid residues in most favoured and additional allowed regions, while PROSA II indicates the fold quality. The solvation potential energy was calculated by Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) under default parameters (Baker et al., 2001). APBS evaluates electrostatic interactions in biomolecular assembles by continuum solvation methods. The utility PDB2PQRusing the AMBER force field (Dolinsky et al., 2004) was used for the conversion of pdb files into pqr files. The grid dimensions for APBS calculation were also determined by PDB2PQR. Structure and electrostatic surface visualization was done in PyMOL.

Statistical analysis

Data are presented as the mean ± standard error (S.E.) for all replicates (n = 9). Significant differences among groups was performed by ANOVA followed by Bonferroni correction. $p < 0.05$ values were considered significant. GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, USA) was used for the determination of the IC_{50} value for the cell toxicity and haemolytic activity assays using a log(inhibitor) vs. response – variable slope regression model.

RESULTS

Mastoparan analogs design

In the present work six peptides were designed based on mastoparan-L, considering the characteristics of natural PATs, including small size (maximum 10aa), hydrophobicity, hydropathicity, hydrophilicity and charge. Peptide sequences and their physicochemical characteristics can be observed in Table 1.

Antibacterial activity

The antibacterial activity of the peptides was tested against Gram-negative bacteria (*E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. aeruginosa* and *S. enterica*) and Gram-positive bacteria (*B. subtilis, E. faecalis, S. aureus* and *S. pyogenes*) including reference strains (ATCC) and clinical isolates, the experiments was performed using microdilution technique. The MICs of mastoparan-L and analogs are listed in table 2. Both the original peptide and its analogs showed antibacterial activity (Gram-negative and Gram-positive), with MICs ranging from 1.6-100.0 $\mu g.mL^{-1}$. The peptide Mast-A2 presented the best antibacterial activity, being more active against Gram-positive and Gram-negative bacteria, with MIC ranging from 1.6 to 12.5 $\mu g.mL^{-1}$, being more active against *S. pyogenes* (1.6 $\mu g.mL^{-1}$), and the highest MIC against *S. aureus* (MRSA) (12.5 $\mu g.mL^{-1}$). On the other hand, against Gram-negative bacteria with MIC varying between 3.1 to 25.0 $\mu g.mL^{-1}$, being more active against *E. coli* (3.2 $\mu g.mL^{-1}$), and the highest MIC against *K. pneumoniae* KPC+ (25.0 $\mu g.mL^{-1}$). The analogs the Mast-A5 peptide was the one that had the worst performance with MIC ranging from 50.0 to 100.0 $\mu g.mL^{-1}$. Mastoparan-L showed a strong antibacterial activity, presenting MICs (3.1-25.0 $\mu g.mL^{-1}$) lower or close to the controls used,

the peptide already characterized in the LL-37 literature, and the antibiotics gentamicin and imipenem.

Haemolytic activity

In the present study we determined the haemolytic effects of the peptides against mouse red blood cells (mRBCs). On here we determined the haemolytic activity by calculating the percentage of lysis of mRBCs. Mastoparan-L was the peptide with the highest haemolytic activity (15%), when the cells were treated with 200 $\mu g.mL^{-1}$ of the peptide, that is, a higher concentration of 8x that presented antibacterial activity (25.0 $\mu g.mL^{-1}$).

Antitumor activity

The antitumor activity of mastoparan-L and its analogs against Ehrlich's ascites tumour was evaluated by incubating the peptides with the tumour cells for 24 hours. As can be seen in Figure 1, both mastoparan-L and its analogs have affected the viability of tumour cells. Among the analogs, mast-A4 was the one that presented the best results, significantly inhibiting (approximately 30%) the viability of the tumour cells when they were treated with 12.5 $\mu g.mL^{-1}$ of the peptide, and completely inhibiting (100%) the cell viability when the cells were treated with 100 $\mu g.mL^{-1}$, presenting similar performance to that of mastoparan-L

Molecular Modelling

Figure 2 shows the three-dimensional structures predicted for each mastoparan derived peptides. The six peptides were predicted to be α-helical peptides, similar to their template structure, mastoparan-L. The structural assessments are summarized on Table 4. All structures are cationic and amphipathic, the cationic character is given by the N-terminal and the lysine residues, except for mast-A5, which has no charged residues. The solvation potential energies are listed on Table 4.

DISCUSSION

In order to reduce costs related to the production of AMPs since the 1990s, several methods for the rational design of AMPs have been developed in order to generate analogs with improved activity, thus reducing the limitations

and increasing the advantages regarding the use of AMPs (Loose et al., 2006; Rapsch et al., 2014; Uggerhøj et al., 2015). However, for commercial use, it is of utmost importance to dissociate the toxicity to mammalian cells from antimicrobial activity. This reduction can be achieved by increasing antimicrobial activity, reducing haemolytic activity or, ideally both (Chen et al., 2005b). The rational design of AMPs has been used to revolve these problems through amino acid substitutions, including the substitution of L-amino acids by D-amino acids, and identification of amino acid patterns responsible for antimicrobial activity. These substitutions may promote changes in amphipathy/hydrophobicity, leading to reduced cytotoxicity of peptides to mammalian cells without altering antimicrobial activity, in addition to rendering AMPs less susceptible to proteolytic degradation (Chen et al., 2005b; Pag et al., 2004) .

Here we modify known peptide, mastoparan-L, in order to reduce the length and increase the antibacterial activity of resulting peptides. The obtained peptides (Mas-A1 –A6) show a reliable *in vitro* antibacterial activity against clinically relevant Gram-positive and Gram-negative strains, including resistant bacteria MRSA and *E. coli* carbapenemase-positive. An interesting finding were obtained with Mast-A2, which showed *in vitro* antibacterial activity close to or better than mastoparan-L (Table 2). As for antitumor activity, all peptides affected cell viability, and mast-A4 showed the best activity, an activity that is statistically the same as that presented by mastoparan-L (Figure 1).

The great structural diversity of the AMPs makes it difficult to understand the structure-activity relationship to design competitive AMPs. In an attempt to improve the antimicrobial activity of a peptide, several primary sequence optimization strategies have been adopted, such as cyclization (Wessolowski et al., 2004), increase in the positive charge, or hydrophobicity (Dathe et al., 2002).

Several works studying the structure-function relationship of AMPs suggest that AMPs activity is determined by a subtle combination of factors such as hydrophobicity and the position of amino acid residues (Dathe et al., 2001, 2002; Tossi et al., 2000). However, despite extensive studies, little is known about the molecular basis underlying the selectivity of AMPs to attack bacterial cells rather than mammalian cells. A general indication seems

impossible to obtain because of the complexity of the target and the mechanism of action involved. In the present study the modification significantly affected the hydrophobicity of the mastoparan-L (0.05) and between 0.16 to 0.21 for the mast-Ax peptides, these data suggest that a higher hydrophobicity in short peptides (up to 10aa) appears to be unrelated to cytotoxic activity of peptides, considering that relatively high values of mast-Ax in relation to mastoparan-L, no significant differences in the cytotoxicity of these peptides were observed for erythrocytes.

The present work presented novel peptides that could be used on the fight against multiresistant bacteria and tumour cells, since the mastoparan-L analogs obtained here present a smaller sequence (28%) than the original peptide, and even then, have been shown to be effective in eliminating resistant bacteria, as well as being effective in eliminating tumour cells. In addition, the study in question covers the prospects for further studies as molecules obtained from mastoparan-L due to significant results at low concentrations.

REFERENCES

Blondelle, S. E., and Houghten, R. A. Probing the relationships between the structure and hemolytic activity of melittin with a complete set of leucine substitution analogs. *Peptide research* 4, 12–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1802233 [Accessed December 7, 2017].

Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., and Hodges, R. S. (2005a). Rational Design of Alpha-Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. *Journal of Biological Chemistry* 280, 12316–12329. doi:10.1074/jbc.M413406200.

Chen, Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., and Hodges, R. S. (2005b). Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *The Journal of biological chemistry* 280, 12316–29. doi:10.1074/jbc.M413406200.

Dathe, M., Meyer, J., Beyermann, M., Maul, B., Hoischen, C., and Bienert, M. (2002). General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica et biophysica acta* 1558, 171–86. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779567 [Accessed December 7, 2017].

Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., and Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS letters* 501, 146–50. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470274 [Accessed December 7, 2017].

Dathe, M., Schümann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., et al. (1996). Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* 35, 12612–22. doi:10.1021/bi960835f.

Dennison, S. R., Harris, F., Bhatt, T., Singh, J., and Phoenix, D. A. (2010). A theoretical analysis of secondary structural characteristics of anticancer peptides. *Molecular and Cellular Biochemistry* 333, 129–135. doi:10.1007/s11010-009-0213-3.

Dennison, S. R., Harris, F., and Phoenix, D. A. (2007). The interactions of aurein 1.2 with cancer cell membranes. *Biophysical Chemistry* 127, 78–83. doi:10.1016/j.bpc.2006.12.009.

Dennison, S., Whittaker, M., Harris, F., and Phoenix, D. (2006). Anticancer alpha-helical peptides and structure / function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Current Protein & Peptide*

Science 7, 487–499. doi:10.2174/138920306779025611.

Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., and Franco, O. L. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry* 5. doi:10.3389/fchem.2017.00005.

Goldszmid, R. S., Dzutsev, A., and Trinchieri, G. (2014). Host immune response to infection and cancer: unexpected commonalities. *Cell host & microbe* 15, 295–305. doi:10.1016/j.chom.2014.02.003.

Hancock, R. E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet (London, England)* 349, 418–22. doi:10.1016/S0140-6736(97)80051-7.

Hancock, R. E. W., Haney, E. F., and Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology* 16, 321–334. doi:10.1038/nri.2016.29.

Hao, X., Yan, Q., Zhao, J., Wang, W., Huang, Y., and Chen, Y. (2015). TAT Modification of Alpha-Helical Anticancer Peptides to Improve Specificity and Efficacy. *PLOS ONE* 10, e0138911. doi:10.1371/journal.pone.0138911.

Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., and Ross, E. M. (1988). Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *The Journal of biological chemistry* 263, 6491–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3129426 [Accessed November 3, 2017].

Hilchie, A. L., Sharon, A. J., Haney, E. F., Hoskin, D. W., Bally, M. B., Franco, O. L., et al. (2016). 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* 1858, 3195–3204. doi:10.1016/j.bbamem.2016.09.021.

Justo, G. Z., Durán, N., and Queiroz, M. L. (2000). Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from Aspergillus oryzae. *European journal of pharmacology* 388, 219–26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675729 [Accessed November 3, 2017].

Klastersky, J., and Aoun, M. (2004). Opportunistic infections in patients with cancer. *Annals of Oncology* 4, iv329–iv335. doi:10.1093/annonc/mdh947.

Kokai-Kun, J. F., Chanturiya, T., and Mond, J. J. (2007). Lysostaphin as a treatment for systemic Staphylococcus aureus infection in a mouse model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 60, 1051–9. doi:10.1093/jac/dkm347.

Lima, T. B., Silva, O. N., Migliolo, L., Souza-Filho, C. R., Gonçalves, E. G., Vasconcelos, I. M., et al. (2011). A Kunitz proteinase inhibitor from corms of Xanthosoma blandum with bactericidal activity. *Journal of natural products* 74, 969–75. doi:10.1021/np200312r.

Loose, C., Jensen, K., Rigoutsos, I., and Stephanopoulos, G. (2006). A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. *Nature* 443, 867–9. doi:10.1038/nature05233.

Mandal, S. M., Migliolo, L., Silva, O. N., Fensterseifer, I. C. M., Faria-Junior, C., Dias, S. C., et al. (2014). Controlling resistant bacteria with a novel class of β-lactamase inhibitor peptides: from rational design to in vivo analyses. *Scientific reports* 4, 6015. doi:10.1038/srep06015.

Ozaslan, M., Karagoz, I.D., Kilic, I.H., Guldur, M.E. Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology* 10, 2375-78, 2011.

Pag, U., Oedenkoven, M., Papo, N., Oren, Z., Shai, Y., and Sahl, H.-G. (2004). In vitro activity and mode of action of diastereomeric antimicrobial peptides against bacterial clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 230–239. doi:10.1093/jac/dkh083.

Patra, S., and Muthuraman, M. S. (2013). Gracilaria edulis extract induces apoptosis and inhibits tumor in Ehrlich Ascites tumor cells in vivo. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13, 331. doi:10.1186/1472-6882-13-331.

Porto, W. F., Pires, Á. S., and Franco, O. L. (2012). CS-AMPPred: an updated SVM model for antimicrobial activity prediction in cysteine-stabilized peptides. *PloS one* 7, e51444. doi:10.1371/journal.pone.0051444.

Rapsch, K., Bier, F. F., and von Nickisch-Rosenegk, M. (2014). Rational Design of Artificial β-Strand-Forming Antimicrobial Peptides with Biocompatible Properties. *Molecular Pharmaceutics* 11, 3492–3502. doi:10.1021/mp500271c.

Silva, O. N., Fensterseifer, I. C. M., Rodrigues, E. A., Holanda, H. H. S., Novaes, N. R. F., Cunha, J. P. A., et al. (2015a). Clavanin a improves outcome of complications from different bacterial infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59. doi:10.1128/AAC.03732-14.

Silva, O. N., Fensterseifer, I. C. M., Rodrigues, E. A., Holanda, H. H. S., Novaes, N. R. F., Cunha, J. P. A., et al. (2015b). Clavanin A improves outcome of complications from different bacterial infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59, 1620–6. doi:10.1128/AAC.03732-14.

Silva, O. N., Fuente-Núñez, C. de la, Haney, E. F., Fensterseifer, I. C. M., Ribeiro, S. M., Porto, W. F., et al. (2016). An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. *Scientific reports* 6, 35465. doi:10.1038/srep35465.

Silva, O. N., Mulder, K. C. L., Barbosa, A. E. A. D., Otero-Gonzalez, A. J., Lopez-Abarrategui, C., Rezende, T. M. B., et al. (2011). Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: From natural screenings to biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology* 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00232.

Silva, O. N., Porto, W. F., Migliolo, L., Mandal, S. M., Gomes, D. G., Holanda, H. H. S., et al. (2012). Cn-AMP1: a new promiscuous peptide with potential for microbial infections treatment. *Biopolymers* 98, 322–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193596 [Accessed February 10, 2016].

Souza, C.M., Auler, P.A., Reis, D.C., Lavalle, G.E., Ferreira, E., Cassali, G.D. Subcutaneous administration of ketoprofen delays Ehrlich solid tumor growth in mice. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66, 1376-82, 2014.

Subbalakshmi, C., Krishnakumari, V., Nagaraj, R., and Sitaram, N. (1996). Requirements for antibacterial and hemolytic activities in the bovine neutrophil derived 13-residue peptide indolicidin. *FEBS letters* 395, 48–52. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849687 [Accessed December 7, 2017].

Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, α-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55, 4–30. doi:10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M.

Uggerhøj, L. E., Poulsen, T. J., Munk, J. K., Fredborg, M., Sondergaard, T. E.,

Frimodt-Moller, N., et al. (2015). Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides: do's and don'ts. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 16, 242–53. doi:10.1002/cbic.201402581.

Wessolowski, A., Bienert, M., and Dathe, M. (2004). Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, d-amino acid substitution and cyclization. *Journal of Peptide Research* 64, 159–169. doi:10.1111/j.1399-3011.2004.00182.x.

Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* 3, 163–75. doi:10.1038/nprot.2007.521.

Yang, S.-T., Shin, S. Y., Lee, C. W., Kim, Y.-C., Hahm, K.-S., and Kim, J. Il (2003). Selective cytotoxicity following Arg-to-Lys substitution in tritrpticin adopting a unique amphipathic turn structure. *FEBS letters* 540, 229–33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12681513 [Accessed December 7, 2017].

TABLES

Table 1. Amino acid sequences of mastoparan-L and its analogs and analogs (mast-Ax).

Peptide	Sequence	Hydrophobicity	Hydropathicity	Hydrophilicity	Charge	MW (Da)	Changes
Mastoparan-L	INLKALAALAKKIL- NH_2	0.05	1.16	-0.26	3.00	1480.13	-
Mast-A1	CFLP**LAALGK**- NH_2	0.17	1.44	-0.69	1.00	1032.45	6
Mast-A2	II**LAALAKK**I-NH_2	0.18	1.87	-0.45	2.00	1053.55	3
Mast-A3	P**LAAL**GKVFG-NH_2	0.19	1.19	-0.56	1.00	972.34	6
Mast-A4	PII**INLKAL**A-NH_2	0.19	1.57	-0.68	1.00	1065.52	3
Mast-A5	I**INLKALAAL**-NH_2	0.21	1.84	-0.73	1.00	1039.48	1
Mast-A6	**INLKALAALA**-NH_2	0.16	1.57	-0.60	1.00	997.39	4

Table 2. Antibacterial activity of mastoparan-L (mast-L) and analogs (mast-Ax). Bacteria were cultured in the presence of different peptide concentrations. Gentamicin (genta), imipenem (imp) and peptide LL-37 were used as positive controls. Data are representative of three independent experiments.

Microorganisms	MIC (μg.mL^{-1})									
	Mast-L	Mast-A1	Mast-A2	Mast-A3	Mast-A4	Mast-A5	Mast-A6	LL-37	Genta	Imp
Gram-positive										
B. subtilis ATCC6633	12.5	25.0	3.1	50.0	50.0	50.0	50.0	6.2	6.2	0.8
E. faecalis ATCC12953	3.1	25.0	3.1	50.0	50.0	100.0	50.0	6.2	6.2	0.8
S. aureus ATCC29213	6.2	12.5	3.1	25.0	12.5	50.0	12.5	12.5	1.6	0.8
S. aureus (MRSA) ATCC33591	6.2	50.0	12.5	50.0	50.0	>100.0	50.0	50.0	25.0	12.5
S. aureus MRSA #SAP0017	25.0	50.0	6.2	50.0	50.0	>100.0	50.0	50.0	25.0	12.5
S. pyogenes ATCC19615	3.1	25.0	1.6	50.0	25.0	50.0	25.0	25.0	25.0	0.8
Gram-negative										
E. coli ATCC8739	6.2	25.0	3.1	50.0	12.5	100.0	25.0	12.5	0.8	0.8
E. coli 1812446 (KPC+)	6.2	25.0	12.5	50.0	25.0	>100.0	25.0	25.0	25.0	6.0
E. coli 2101123	6.2	25.0	12.5	50.0	25.0	>100.0	25.0	25.0	25.0	6.0
E. coli 0157	25.0	25.0	6.2	50.0	25.0	>100.0	25.0	12.5	25.0	6.0
K. pneumoniae	1	12	12	25	12	50	12	12	1	

ATCC13885	2.5	.5	.5	.0	.5	.0	.5	.5	.6	.6
K. pneumoniae 1825971 (KPC+)	25.0	25.0	25.0	50.0	25.0	>100.0	25.0	6.2	25.0	12.0
P. mirabilis ATCC25933	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	50.0	12.5	12.5	6.2	1.6
P. aeruginosa ATCC 15442	12.5	6.2	12.5	12.5	12.5	50.0	12.5	6.2	1.6	1.6
S. enterica ATCC14028	12.5	6.2	12.5	12.5	25.0	50.0	25.0	6.2	6.2	1.6

Table 3. Haemolytic activity of mastoparan-L (mast-L) and analogs (mast-Ax). Assays evaluating the cytotoxic activity of the peptides against fresh mouse red blood cells (mRBCs) 1% Triton X-100 served as positive control (100% haemolysis).

Treatments	Haemolysis (%)						
	200 µg.mL^{-1}	100 µg.mL^{-1}	50 µg.mL^{-1}	25,0 µg.mL^{-1}	12.5 µg.mL^{-1}	6.2 µg.mL^{-1}	3.1 µg.mL^{-1}
Mast-L	15.0±4.0	10.0±3.0	6.0±4.0	2.0±1.0	1.0±1.0	N/O	N/O
Mast-A1	10.0±4.0	5.0±1.0	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O
Mast-A2	18.0±3.0	7.0±4.0	1.0±1.0	N/O	N/O	N/O	N/O
Mast-A3	8.0±2.0	2.0±1.0	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O
Mast-A4	17.0±4.0	8.0±1.0	2.0±1.0	1.0±1.0	N/O	N/O	N/O
Mast-A5	7.0±2.0	2.0±1.0	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O
Mast-A6	12.0±3.0	6.0±3.0	1.0±2.0	N/O	N/O	N/O	N/O
LL-37	100.0±5.0	60.0±6.0	30.0±4.0	25.0±5.0	10.0±2.0	5.0±1.0	1.0±1.0
Gentamicin	25.0±6.0	15.0±3.0	10.0±3.0	5.0±3	N/O	N/O	N/O
Imipenem	20.0±2.0	7.0±3.0	1.0±2.0	N/O	N/O	N/O	N/O

PBS	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O

N/O = not observed

Table 4. Three-dimensional structure assessments of mastoparan derived peptides.

Peptide	Z-Score (Prosa II)	Ramachandran Plot (%)		Solvation Potential Energy (Kcal.mol^{-1})
		Favored	Allowed	
Mast-A1	-1.39	100	0	4.38E+02
Mast-A2	-1.76	100	0	7.79E+02
Mast-A3	-1.04	100	0	4.79E+02
Mast-A4	-1.67	100	0	4.47E+02
Mast-A5	-1.50	100	0	5.12E+02
Mast-A6	-1.69	100	0	5.21E+02

FIGURES

Figure 1. Antitumor effect of mastoparan-derived peptides against Ehrlich's ascites tumour cells. Viability effect, after 24 h incubation time, of each designed peptide (Table 1) at different concentrations. (ANOVA, Post hoc Bonferroni, $p < 0.05$).

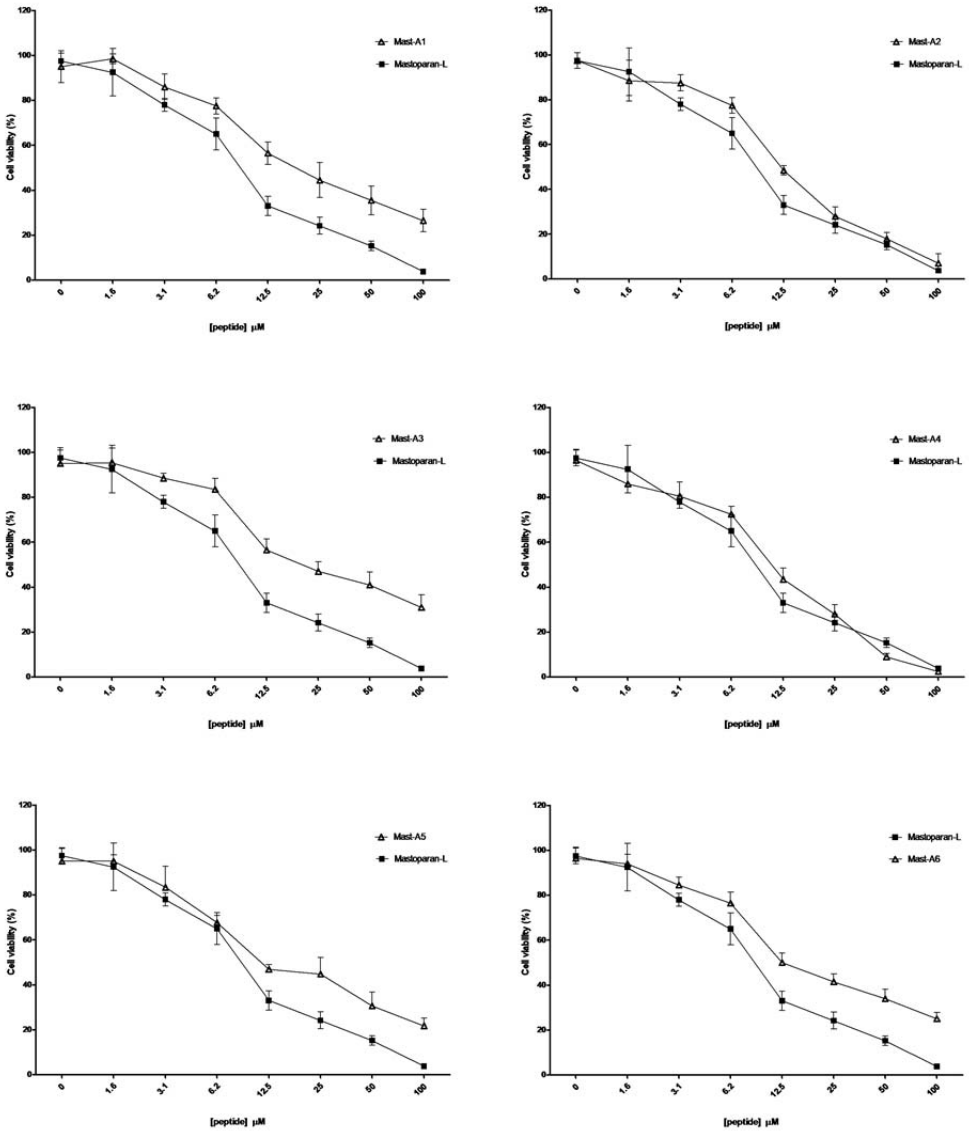
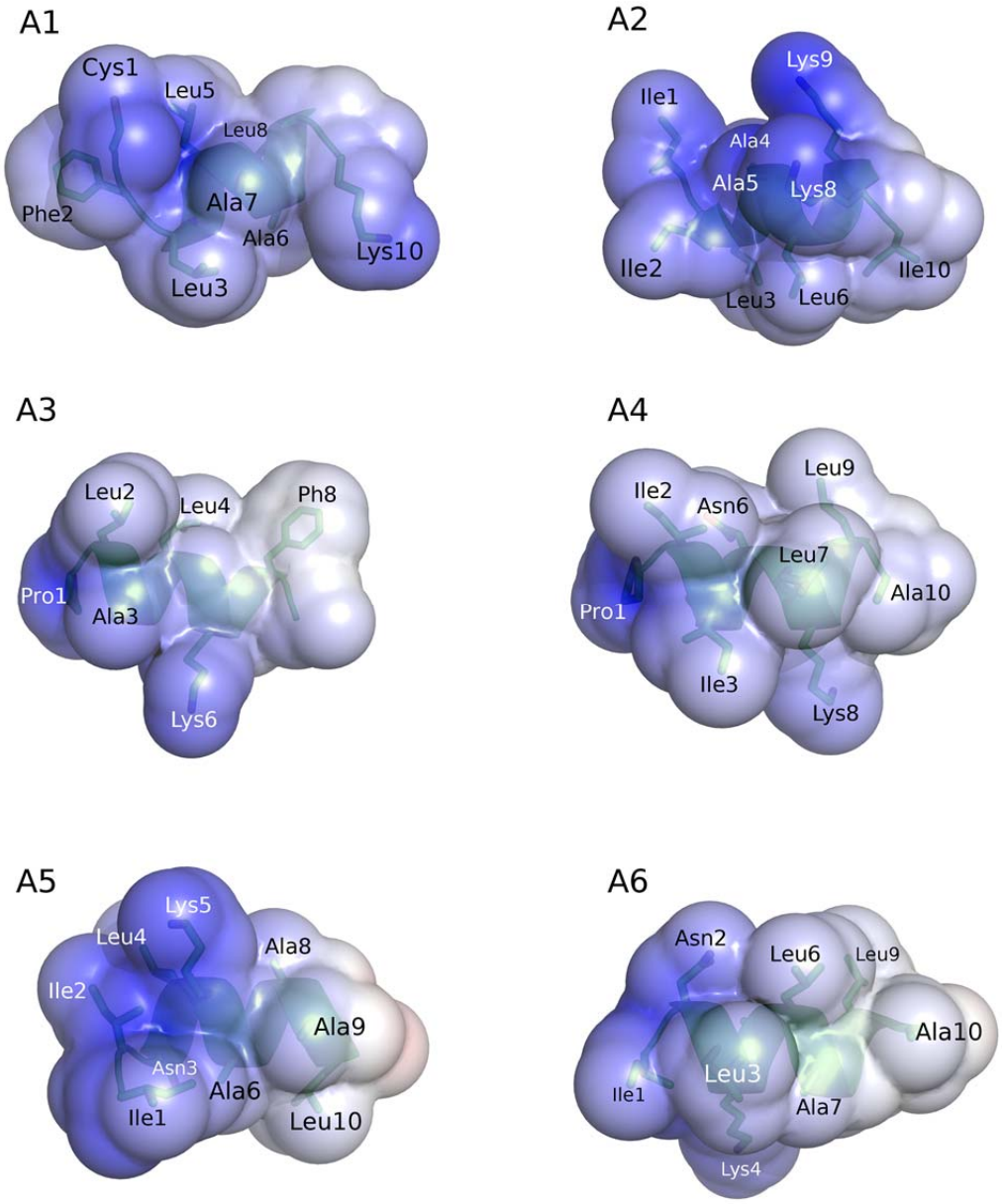


Figure 2. Three-dimensional models of mastoparan-derived peptides. All peptides were predicted to have cationic and hydrophobic alpha-helical structures. Blue regions indicate cationic patches, while white ones the hydrophobic patches. Surface potentials were set to ±5kTe^{-1} (13,356 mV).



5 REFERÊNCIAS

Andreu, D., and Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415–33. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<415::AID-BIP2>3.0.CO;2-D.

Arias, C. A., and Murray, B. E. (2009). Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. *N. Engl. J. Med.* 360, 439–443. doi:10.1056/NEJMp0804651.

Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G. Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., et al. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. Nat.Prod. Rep. 30, 108–160.

Arnold, M., Karim-Kos, H. E., Coebergh, J. W., Byrnes, G., Antilla, A., Ferlay, J., et al. (2015). Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *Eur. J. Cancer* 51, 1164–1187. doi:10.1016/j.ejca.2013.09.002.

Attiê, R. (2014). Acute bacterial infection negatively impacts cancer specific survival of colorectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.* 20, 13930. doi:10.3748/wjg.v20.i38.13930.

Baguley, B. C. (2010). Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer. *Mol. Biotechnol.* 46, 308–316. doi:10.1007/s12033-010-9321-2.

Bevers, E. M., Confurius, P., and Zwaal, R. F. . (1996). Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implicationspub.Com/. *Lupus* 5, 480–487.

Boakes, S., Wadman, S., 2008. The therapeutic potential of lantibiotics. Innovation in Pharmaceutical Technology: Drug Discovery and Development (IPT 27), 22–25.

Caetano, et. al, (2011). Heterologous Expression, Biosynthesis, and Mutagenesis of Type II Lantibiotics from Bacillus licheniformis in Escherichia coli, Chemistry & Biology 18, 90–100.

Castiglione, Lazzarini, F., Carrano, A., Corti, L., Ciciliato, E., Gastaldo, I., Candiani, L.,Losi, P., Marinelli, D., Selva, F., Parenti, E., 2008. Determining the structure

andmode of action of microbisporicin a potent lantibiotic active against multiresis-tant pathogens. Chem. Biol. 15, 22–31.

Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., and Hodges, R. S. (2005). Rational Design of Alpha-Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. *J. Biol. Chem.* 280, 12316–12329. doi:10.1074/jbc.M413406200.

Dąbrowska, K., Kaźmierczak, Z., Majewska, J., Miernikiewicz, P., Piotrowicz, A., Wietrzyk, J., et al. (2014). Bacteriophages displaying anticancer peptides in combined antibacterial and anticancer treatment. *Future Microbiol.* 9, 861–869. doi:10.2217/fmb.14.50.

de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Mansour, S. C., Reckseidler-Zenteno, S. L., Hernández, D., Brackman, G., et al. (2015). D-Enantiomeric Peptides that Eradicate Wild-Type and Multidrug-Resistant Biofilms and Protect against Lethal Pseudomonas aeruginosa Infections. *Chem. Biol.* 22, 196–205. doi:10.1016/j.chembiol.2015.01.002.

Dennison, S. R., Harris, F., and Phoenix, D. A. (2007). The interactions of aurein 1.2 with cancer cell membranes. *Biophys. Chem.* 127, 78–83. doi:10.1016/j.bpc.2006.12.009.

Dennison, S. R., Harris, F., Bhatt, T., Singh, J., and Phoenix, D. A. (2010). A theoretical analysis of secondary structural characteristics of anticancer peptides. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 129–135. doi:10.1007/s11010-009-0213-3.

Dennison, S., Whittaker, M., Harris, F., and Phoenix, D. (2006). Anticancer alpha-helical peptides and structure / function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7, 487–499. doi:10.2174/138920306779025611.

Domalaon, R., Findlay, B., Ogunsina, M., Arthur, G., and Schweizer, F. (2016). Ultrashort cationic lipopeptides and lipopeptoids: Evaluation and mechanistic insights against epithelial cancer cells. *Peptides* 84, 58–67. doi:10.1016/j.peptides.2016.07.007.

Drusano, G. L. (2004). Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of “bug and drug.” *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 289–300. doi:10.1038/nrmicro862.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., et al. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* 49, 1374–1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027.

Figueiredo, C. R., Matsuo, A. L., Massaoka, M. H., Polonelli, L., and Travassos, L. R. (2014). Anti-tumor activities of peptides corresponding to conserved complementary determining regions from different immunoglobulins. *Peptides* 59, 14–19. doi:10.1016/j.peptides.2014.06.007.

Fishman, J. A. (2011). Infections in immunocompromised hosts and organ transplant recipients: Essentials. *Liver Transplant.* 17, S34–S37. doi:10.1002/lt.22378.

Furlong, S., Mader, J., and Hoskin, D. (2006). Lactoferricin-induced apoptosis in estrogen-nonresponsive MDA-MB-435 breast cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen. *Oncol. Rep.* 15, 1385–1390. doi:10.3892/or.15.5.1385.

Gaspar, D., Freire, J. M., Pacheco, T. R., Barata, J. T., and Castanho, M. A. R. B. (2015). Apoptotic human neutrophil peptide-1 anti-tumor activity revealed by cellular biomechanics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853, 308–316. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.006.

Gaspar, D., Veiga, A. S., and Castanho, M. A. R. B. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front. Microbiol.* 4, 294. doi:10.3389/fmicb.2013.00294.

Gaspar, D., Veiga, A. S., Sinthuvanich, C., Schneider, J. P., and Castanho, M. A. R. B. (2012). Anticancer Peptide SVS-1: Efficacy Precedes Membrane Neutralization. *Biochemistry* 51, 6263–6265. doi:10.1021/bi300836r.

Gordon, Y. J., Romanowski, E. G., and McDermott, A. M. (2005). A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Curr. Eye Res.* 30, 505–515. doi:10.1080/02713680590968637.

Hamman, J. H., Enslin, G. M., and Kotzé, A. F. (2005). Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. *BioDrugs* 19, 165–77. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15984901.

Hancock, R. E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet* 349, 418–422. doi:10.1016/S0140-6736(97)80051-7.

Hancock, R. E. W., Haney, E. F., and Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 321–334. doi:10.1038/nri.2016.29.

Hao, X., Yan, Q., Zhao, J., Wang, W., Huang, Y., and Chen, Y. (2015). TAT Modification of Alpha-Helical Anticancer Peptides to Improve Specificity and Efficacy. *PLoS One* 10, e0138911. doi:10.1371/journal.pone.0138911.

Hicks, R. P. (2016). Antibacterial and anticancer activity of a series of novel peptides incorporating cyclic tetra-substituted Cα amino acids. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 4056–4065. doi:10.1016/j.bmc.2016.06.048.

Hilchie, A. L., Doucette, C. D., Pinto, D. M., Patrzykat, A., Douglas, S., and Hoskin, D. W. (2011). Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts. *Breast Cancer Res.* 13, R102. doi:10.1186/bcr3043.

Hoskin, D. W., and Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778, 357–375. doi:10.1016/j.bbamem.2007.11.008.

Huang, Y. -b., Wang, X. -f., Wang, H. -y., Liu, Y., and Chen, Y. (2011). Studies on Mechanism of Action of Anticancer Peptides by Modulation of Hydrophobicity Within a Defined Structural Framework. *Mol. Cancer Ther.* 10, 416–426. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0811.

Jabes, D., Brunati, C., Guglierame, S., Donadio, S., 2009. In vitro antibacterial profile ofthe new lantibiotic NAI-107. In: 49th Annual Meeting of Interscience Conferenceon Antimicrobial Agents and Chemotherapy, September 12–15, San Francisco.

Jasmin Dischinger, Shradha Basi Chipalu, Gabriele Bierbaum (2014). Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. International Journal of Medical Microbiology 304 (2014) 51– 62

Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R. E. W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491–511. doi:10.1128/CMR.00056-05.

Kakde, D., Jain, D., Shrivastava, V., Kakde, R., and Patil, a T. (2011). Cancer therapeutics-opportunities, challenges and advances in drug delivery. *J. Appl. Pharm. Sci.* 1, 1–10.

Kang, H.-K., Kim, C., Seo, C. H., and Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J. Microbiol.* 55, 1–12. doi:10.1007/s12275-017-6452-1.

Kelly, G. J., Kia, A. F.-A., Hassan, F., O'Grady, S., Morgan, M. P., Creaven, B. S., et al. (2016). Polymeric prodrug combination to exploit the therapeutic potential of

antimicrobial peptides against cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* 14, 9278–9286. doi:10.1039/C6OB01815G.

Kwok, P. C. L., Grabarek, A., Chow, M. Y. T., Lan, Y., Li, J. C. W., Casettari, L., et al. (2015). Inhalable spray-dried formulation of D-LAK antimicrobial peptides targeting tuberculosis. *Int. J. Pharm.* 491, 367–374. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.07.001.

Lan, Y., Lam, J. T., Siu, G. K. H., Yam, W. C., Mason, A. J., and Lam, J. K. W. (2014). Cationic amphipathic D-enantiomeric antimicrobial peptides with in vitro and ex vivo activity against drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* 94, 678–689. doi:10.1016/j.tube.2014.08.001.

Lee, H. S., Park, C. B., Kim, J. M., Jang, S. A., Park, I. Y., Kim, M. S., et al. (2008). Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide. *Cancer Lett.* 271, 47–55. doi:10.1016/j.canlet.2008.05.041.

Li, P., Li, X., Saravanan, R., Li, C.M., Leong, S.S.J., 2012. Antimicrobial macromolecules:synthesis methods and future applications. RSC Adv. 2, 4031–4044.

Lin, Y.-C., Lim, Y. F., Russo, E., Schneider, P., Bolliger, L., Edenharter, A., et al. (2015). Multidimensional Design of Anticancer Peptides. *Angew. Chemie Int. Ed.* 54, 10370–10374. doi:10.1002/anie.201504018.

Lincke, C. R., van der Bliek, a M., Schuurhuis, G. J., van der Velde-Koerts, T., Smit, J. J., and Borst, P. (1990). Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human mdr1 complementary DNA. *Cancer Res.* 50, 1779–85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1968359.

Mader, J. S., and Hoskin, D. W. (2006). Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* 15, 933–946. doi:10.1517/13543784.15.8.933.

Mandell, L. A., Ball, P., and Tillotson, G. (2001). Antimicrobial Safety and Tolerability: Differences and Dilemmas. *Clin. Infect. Dis.* 32, S72–S79. doi:10.1086/319379.

Mansour, S. C., Pletzer, D., de la Fuente-Núñez, C., Kim, P., Cheung, G. Y. C., Joo, H.-S., et al. (2016). Bacterial Abscess Formation Is Controlled by the Stringent Stress Response and Can Be Targeted Therapeutically. *EBioMedicine* 12, 219–226. doi:10.1016/j.ebiom.2016.09.015.

McKenna, M. (2013). Antibiotic resistance: The last resort. *Nature* 499, 394–396.

doi:10.1038/499394a.

Melo, M. N., Ferre, R., Feliu, L., Bardají, E., Planas, M., and Castanho, M. A. R. B. (2011). Prediction of Antibacterial Activity from Physicochemical Properties of Antimicrobial Peptides. *PLoS One* 6, e28549. doi:10.1371/journal.pone.0028549.

Ortega et al. (2016). Structure and tRNA Specificity of MibB, a Lantibiotic Dehydratase from Actinobacteria Involved in NAI-107 Biosynthesis, Cell Chemical Biology 23, 1–11

Papo, N., and Shai, Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *C. Cell. Mol. Life Sci.* 62, 784–790. doi:10.1007/s00018-005-4560-2.

Paredes-Gamero, E. J., Martins, M. N. C., Cappabianco, F. A. M., Ide, J. S., and Miranda, A. (2012). Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: Regulated cell death or membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820, 1062–1072. doi:10.1016/j.bbagen.2012.02.015.

Park, C. B., Kim, H. S., and Kim, S. C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 253–7. doi:10.1006/bbrc.1998.8159.

Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* 118, 3030–3044. doi:10.1002/ijc.21731.

Renukuntla, J., Vadlapudi, A. D., Patel, A., Boddu, S. H. S., and Mitra, A. K. (2013). Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int. J. Pharm.* 447, 75–93. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.030.

Riedl, S., Zweytick, D., and Lohner, K. (2011). Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem. Phys. Lipids* 164, 766–781. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.09.004.

Rodrigues, E. G., Dobroff, A. S., Cavarsan, C. F., Paschoalin, T., Nimrichter, L., Mortara, R. A., et al. (2008). Effective Topical Treatment of Subcutaneous Murine B16F10-Nex2 Melanoma By the Antimicrobial Peptide Gomesin. *Neoplasia* 10, 61–68. doi:10.1593/neo.07885.

Rolston, K. V. I. (2001). The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. *Curr. Opin. Oncol.* 13, 218–223. doi:10.1097/00001622-200107000-00002.

Rozek, T., Wegener, K. L., Bowie, J. H., Olver, I. N., Carver, J. A., Wallace, J. C., et

al. (2000). The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs Litoria aurea and Litoria raniformis. *Eur. J. Biochem.* 267, 5330–5341. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01536.x.

Schröder-Borm, H., Bakalova, R., and Andrä, J. (2005). The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine. *FEBS Lett.* 579, 6128–6134. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.084.

Schweizer, F. (2009). Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 625, 190–194. doi:10.1016/j.ejphar.2009.08.043.

Segura, C., Guzmán, F., Salazar, L. M., Patarroyo, M. E., Orduz, S., and Lemeshko, V. (2007). BTM-P1 polycationic peptide biological activity and 3D-dimensional structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 908–914. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.113.

Sinthuvanich, C., Veiga, A. S., Gupta, K., Gaspar, D., Blumenthal, R., and Schneider, J. P. (2012). Anticancer β-Hairpin Peptides: Membrane-Induced Folding Triggers Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 6210–6217. doi:10.1021/ja210569f.

Smith, L. L., and White, I. N. H. (1995). Chemoprevention of breast cancer by tamoxifen: risks and opportunities. *Toxicol. Lett.* 82–83, 181–186. doi:10.1016/0378-4274(95)03476-5.

Theuretzbacher, U. (2012). Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 295–299. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.12.006.

Thundimadathil, J. (2012). Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. *J. Amino Acids* 2012, 1–13. doi:10.1155/2012/967347.

Tørfoss, V., Ausbacher, D., Cavalcanti-Jacobsen, C. de A., Hansen, T., Brandsdal, B.-O., Havelkova, M., et al. (2012a). Synthesis of anticancer heptapeptides containing a unique lipophilic β2,2-amino acid building block. *J. Pept. Sci.* 18, 170–176. doi:10.1002/psc.1434.

Tørfoss, V., Isaksson, J., Ausbacher, D., Brandsdal, B.-O., Flaten, G. E., Anderssen, T., et al. (2012b). Improved anticancer potency by head-to-tail cyclization of short cationic anticancer peptides containing a lipophilic β 2,2 -amino acid. *J. Pept. Sci.* 18, 609–619. doi:10.1002/psc.2441.

Tyagi, A., Kapoor, P., Kumar, R., Chaudhary, K., Gautam, A., and Raghava, G. P. S. (2013). In Silico Models for Designing and Discovering Novel Anticancer

Peptides. *Sci. Rep.* 3, 2984. doi:10.1038/srep02984.

Uggerhøj, L. E., Poulsen, T. J., Munk, J. K., Fredborg, M., Sondergaard, T. E., Frimodt-Moller, N., et al. (2015). Rational Design of Alpha-Helical Antimicrobial Peptides: Do's and Don'ts. *ChemBioChem* 16, 242–253. doi:10.1002/cbic.201402581.

van Heel, A.J., Montalban-Lopez, M., Kuipers, O.P., 2011. Evaluating the feasibilityof lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans.Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 7, 675–680.

Vedham (2013). Multiple Infections and Cancer: Implications in Epidemiology. *Technol. Cancer Res. Treat.* 13. doi:10.7785/tcrt.2012.500366.

Wang, K., Yan, J., Zhang, B., Song, J., Jia, P., and Wang, R. (2009a). Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. *Cancer Lett.* 278, 65–72. doi:10.1016/j.canlet.2008.12.027.

Wang, Y. -s., Li, D., Shi, H. -s., Wen, Y. -j., Yang, L., Xu, N., et al. (2009b). Intratumoral Expression of Mature Human Neutrophil Peptide-1 Mediates Antitumor Immunity in Mice. *Clin. Cancer Res.* 15, 6901–6911. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0484.

Wu, D., Gao, Y., Qi, Y., Chen, L., Ma, Y., and Li, Y. (2014). Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 351, 13–22. doi:10.1016/j.canlet.2014.05.002.

Xiao, Y.-F., Jie, M.-M., Li, B.-S., Hu, C.-J., Xie, R., Tang, B., et al. (2015). Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–13. doi:10.1155/2015/761820.

Xu, N., Wang, Y. -s., Pan, W. -b., Xiao, B., Wen, Y. -j., Chen, X. -c., et al. (2008). Human alpha-defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1588–1597. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0010.