

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MOLECULAR

NELSON GOMES DE OLIVEIRA JÚNIOR

Potencial antimicrobiano de catelicidinas de serpente e seus derivados

Brasília - DF
2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MOLECULAR

NELSON GOMES DE OLIVEIRA JÚNIOR

Potencial antimicrobiano de catelicidinas de serpente e seus derivados

Tese apresentada como requisito para a obtenção do
Título de Doutor em Patologia Molecular pelo
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Molecular - Universidade de Brasília.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador – Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientadora – Dra. Taia Maria Berto Rezende

**Brasília - DF
2018**

“Cumpriu sua sentença. Encontrou-se com o único mal irremediável, aquilo que é a marca do nosso estranho destino sobre a terra, aquele fato sem explicação que iguala tudo o que é vivo num só rebanho de condenados, porque tudo o que é vivo, morre.”

(Ariano Suassuna)

Agradecimentos

Às grandes e mais importantes mulheres da minha vida, minha avó Luzia (*in memorian*), minha mãe Nilza e minha irmã Fabiana; por todo o apoio, amor incondicional, sabedoria que me foi passada em toda minha vida.

Ao meu pai; pelo seu tímido apoio e orgulho, mesmo com seu jeito peculiar de demonstrá-lo.

Ao meu grande irmão Edgard por todo seu carinho, amor, apoio e incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Octávio Luiz Franco; por seu conhecimento transmitido, apoio, paciência e carinho por toda essa década que trabalhamos juntos.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Taia Maria Berto Rezende; pela sua orientação incrível, incentivo e por sua força.

Ao meu supervisor holandês Prof. Dr. Renko de Vries e sua equipe da Universidade de Wageningen, pelo grande apoio e recepção.

Aos meus mais incríveis e melhores amigos do laboratório e da vida, os Msc. Mirna, Stella, Ana, Flávia, Elisabete, Marlon e Ingrid; pelo constante apoio emocional e por terem cuidado de mim nos momentos mais difíceis dessa jornada.

À minha adorável segunda mãe Kênia Chaves; por todo o suporte dentro do laboratório e sua companhia em todos os dias dessa jornada.

À minha dinda Val; por tanto amor e carinho e pelo seu orgulho que sempre demonstrou.

Às instituições CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

E a toda equipe do CAPB; pelo conhecimento compartilhado durante todos esses anos.

Resumo

Infecções hospitalares e resistência bacteriana se tornaram um problema mundial, contribuindo para o aumento da mortalidade e da morbidade. Essa resistência microbiana pode ocorrer devido ao uso indiscriminado e errôneo de antimicrobianos convencionais. Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos apresentam-se como uma alternativa no controle desses microrganismos. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) do tipo catelicidina vêm sendo explorados como novos agentes no combate a esses microrganismos; por apresentarem grande atividade antimicrobiana, além de desempenharem um papel crucial na imunidade atuando como imunomoduladores e também podem ser utilizados como modelo para o desenho racional de novos PAMs visando aumentar a atividade, estabilidade e reduzir seu tamanho. Neste estudo demonstramos a atividade antibacteriana, imunomoduladora e a caracterização biofísica de duas catelicidinas de serpentes da América do Sul *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus terrificus*, assim como alguns de análogos. Foi demonstrado que ambos os peptídeos (batroxidina e crotalidina) apresentaram atividade contra o bactérias multirresistentes a fármacos (BMF) e nenhum efeito citotóxico nas concentrações testadas em célula Raw 264.7 após 72h, além de sua capacidade de modular a produção de citocinas TNF- α , IL-10 e IL-6 na presença dos estímulos IFN- γ e antígenos de *E. coli* e *K. pneumoniae* multirresistentes (MDR). Além disso, análogos (E₁₀-Ctn [15-34] e GS₄-Ctn [15-34]) de parte do peptídeo da crotalidina (Ctn [15-34]), foram criados para demonstrar a capacidade de pró-peptídeos acídicos inibir a atividade antimicrobiana em peptídeos. O análogo E₁₀-Ctn [15-34], levou a uma redução moderada na ligação e indução de vazamento de lipossomas modelo, enquanto sua atividade antimicrobiana foi completamente inibida pela sua região pró-peptídica. A fixação do pró-peptídeo também induziu uma conformação mais helicoidal a esses análogos. Finalmente, foi descoberta a atividade antimicrobiana e as características estruturais de dois novos PAMs projetados racionalmente, denominados BotrAMP14 e CroAMP14, sendo baseados nas viperidinas batroxidina e crotalidina, respectivamente. Os peptídeos BotrAMP14 e CroAMP14 demonstraram atividade antimicrobiana de amplo espectro contra cepas ATCC e isolados clínicos de bactérias patogênicas com baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Previsões *in silico* e dicroísmo circular demonstraram ambos os peptídeos formaram α -hélices, capazes de romper as membranas de *E. coli*. Baseado em nossos achados, as catelicidinas e seus derivados representam uma molécula promissora no tratamento de infecções causadas por bactérias MDR.

Palavras chave: Peptídeos antimicrobianos, imunomodulação, pró-peptídeo, desenho racional.

Abstract

Hospital infections and bacterial resistance have become a worldwide problem, contributing to increased mortality and morbidity. This microbial resistance is mainly due to the indiscriminate and erroneous use of conventional antibiotics. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) are presented as an alternative in the control of these resistant microorganisms. Cathelicidin AMPs are being explored as novel antimicrobial agents to fight these resistant microorganisms, in addition to presenting great antimicrobial activity, they play a crucial role in immunity by acting as immunomodulators and are also used as template for rational peptide design in order to enhance activity, stability and reduce length size. In this study antibacterial, immunomodulatory activity and biophysical characteristic of two cathelicidins from South American pit vipers *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus* and some of their analogs were evaluated. Both peptides (batroxicidin and crotalicedin) showed activity against MDRB and no cytotoxic effects on Raw 264.7 cell after 72h, as well as the ability to modulate the production of cytokines TNF- α , IL-10 and IL-6 in the presence of IFN- γ stimuli, and MDR *E. coli* and *K. pneumoniae* antigens. Analogs (E₁₀-Ctn [15-34] and GS₄-Ctn [15-34]) were created from a crotalicedin peptide fragment (Ctn [15-34]), to demonstrate how acidic pro-peptides inhibit antimicrobial activity in peptides. The analog E₁₀-Ctn [15-34], leads to a moderately large reduction in the binding to- and induced leakage of liposomes, while the antimicrobial activity was completely inhibited by its pro-peptide region. Attaching the pro-peptide also induces helical conformational. Finally, we describe the antimicrobial activity and structural characteristics of two new rationally designed AMPs, named BotrAMP14 and CrotAMP14, which are based on the viperidins batroxicidin and crotalicedin, respectively. BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides showed broad-spectrum antimicrobial activity against ATCC strains and clinical isolates of pathogenic bacteria, with a low *in vitro* and *in vivo* toxicity. *In silico* predictions and circular dichroism suggested that both peptides form α -helices, capable of disrupting *E.coli* membranes. Based on our findings, cathelicidins and their analogs represent a promising molecule in the treatment of infections caused by MDR bacteria.

Keywords: Antimicrobial peptides, Immunomodulatory, pro-peptide, rational design.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Prevalência de infecções associada a cuidados de saúde em países desenvolvidos (A), subdesenvolvidos e em desenvolvimento (B), no período de 1995-2010.....	15
Figura 2. Mecanismos intrínsecos de resistência. A figura demonstra uma visão geral dos mecanismos de resistência intrínseca. O exemplo mostrado é de antimicrobianos do tipo β -lactâmico tendo como alvo uma proteína de ligação à penicilina (PLP). O antimicrobiano A pode entrar na célula através de uma proteína porina, alcançando seu alvo inibindo a síntese de peptidoglicanos. O antimicrobiano B também pode entrar na célula através de uma porina, mas ao contrário do antimicrobiano A, ele pode ser eficientemente removido por bombas de efluxo. O antimicrobiano C não pode atravessar a membrana externa e, portanto, não consegue acessar a PLP alvo.	23
Figura 3. Modificação de alvo de antimicrobianos. A. Hospedeiro susceptível em que um antimicrobiano pode se ligar firmemente ao seu alvo específico e exercer um efeito inibitório. B. Mutação ou recombinação do sítio alvo gerando um alelo mosaico resultando em um alvo com afinidade reduzida para o antimicrobiano, que não se liga de forma eficiente e, portanto, tem um efeito reduzido ou insignificante. C A modificação do alvo por adição de um grupo químico também pode prevenir a ligação de antimicrobianos sem alterar a sequência da proteína primária do alvo, o que retém a sua atividade.	26
Figura 4. Interações diretas com antimicrobianos. A. Hospedeiro susceptível com um alvo que pode ser efetivamente inibido por um antimicrobiano. B. Aquisição e produção de uma enzima que destrói o antimicrobiano (por exemplo, β -lactamases) evitando a ligação ao alvo e conferindo resistência. C. Aquisição e produção de uma enzima que modifica a estrutura do antimicrobiano (por exemplo, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos) também pode impedir a ligação ao alvo e conferir resistência.	28
Figura 5. Estruturas tridimensionais representativa das diferentes classes de PAMs. A. Pardaxina (PDB:2KNS). B. β -defensina (PDB:1KJ5). C. Indolicidina (PDB: 1QXQ).....	32
Figura 6. Mecanismo de ação propostos para peptídeos antimicrobianos através de formação de canais.	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Catelicidinas, sua função e sítio de expressão em algumas espécies de animais de diferentes classes.	47
---	----

Lista de Abreviatura

ANVISA – Agencia nacional de vigilância sanitária
BLEE - β -lactamases de espectro estendido
CCPD - Centros de controle e prevenção de doenças
CECPD - Centro europeu de controle e prevenção de doenças
CL - Cardioplipina
CVC – Cateter venoso central
CVD – Cateter venoso de demora
DMPC - 1, 2-dimyristoil-fosfatidilcolina
Erm - Eritromicina ribossômicas metilases
IACS - Infecções associadas a cuidados de saúde
IL- Interleucina
IPCS – Infecção primaria de corrente sanguínea
IRAS - Infecções relacionadas a assistência
ITU - Infecção do trato urinário
KPC - *K. pneumoniae* carbapenemases
LPS – Lipopolisacarídeos
MBC – Concentração bactericida mínima
MIC - Concentração inibitória mínima
NDM1 - *New Delhi metallo- β -lactamase 1*
NHSN - *National health safety network*
NO – Oxido nítrico
OMS - Organização mundial de saúde
PAM - Peptídeos antimicrobianos
PAV – Pneumonia associada a ventilação mecânica
PC - Fosfatidilcolina
PE - Fosfatidiletolamina
PG – Fosfatidilglicerol
POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
POPG - 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilglicerol
PS – Fosfatidilserina
RCIAV - Rede de controle de infecção através de vigilância

RMF - Resistência a múltiplos fármacos
RMN – Ressonância magnética nuclear
RTD-1 - *Rhesus theta defensin 1*
RTD-2 - *Rhesus theta defensin 2*
RTD-3 - *Rhesus theta defensin 3*
SARM - *S. aureus* resistentes a meticilina
SCCmec - *staphylococcal cassette mec*
SDS – Sódio docecil sulfato
SM - Esfingomielina
SUS – Sistema único de saúde
TRND - *Tripartite resistance nodulation division*
UTI - Unidades de tratamento intensiva

Sumário

Introdução	12
Infecções associadas a cuidados de saúde	12
Microrganismos resistentes a antimicrobianos	17
Alvos celulares para antimicrobianos	19
Biossíntese de parede celular	19
Síntese de proteínas	20
Reparo e replicação de DNA	21
Mecanismos de resistência bacteriana	21
Interrupção de acesso ao alvo	22
Modificação de alvo de antimicrobianos	24
Modificação direta em antimicrobianos	27
Peptídeos antimicrobianos como alternativa a antimicrobianos convencionais	29
Principais classes estruturais de PAMs	31
PAMs com estruturas em α-hélices	32
PAMs com estruturas em folhas-β	34
PAMs sem estruturas definidas	36
Propriedades físico-químicas de peptídeos antimicrobianos	37
Cationicidade	38
Hidrofobicidade	39
Anfipaticidade	39
Mecanismo de ação de PAMs	40
Peptídeos antimicrobianos do tipo catelicidinas	44
Catelicidinas de répteis	50
Objetivos	53
Objetivos específicos	53
Capítulo I	54
Artigo Científico submetido à Cytokines	54
Capítulo II	81
Artigo Científico aceito pela Scientific Reports	81
Capítulo III	117
Artigo Científico submetido à BBA Biomembranes	117
Discussão Geral e conclusões	152
Perspectivas	161
Referências Bibliográficas	162
Anexos	217

Introdução

Infecções associadas a cuidados de saúde

Os centros de controle e prevenção de doenças (CCPD) definem Infecções associadas a cuidados de saúde (IACS) ou infecções hospitalares como infecções que não se encontravam presentes ou incubadas no momento da admissão do paciente durante o processo de atendimento em um hospital, ou em centros de cuidados a saúde (Allegranzi, Nejad, *et al.*, 2011). As IACSs incluem infecções que foram adquiridas em um hospital, porém, aparecem depois da alta do paciente assim como infecções ocupacionais entre funcionários da instalação médica (Allegranzi, Nejad, *et al.*, 2011). As questões relacionadas as IACSs devem ser analisadas profundamente, visando identificar como elas podem se relacionar a diferentes procedimentos de cuidados de saúde, determinando os fatores que levam a um aumento do risco de transmissão dos patógenos associados (Allegranzi, Nejad, *et al.*, 2011). Grande parte dos estudos descritos sobre IACSs relatam dados endêmicos realizados em unidades de tratamento intensivo (UTI) em países de primeiro mundo. Entretanto, evidências sobre as diferenças epidemiológicas em ambientes de cuidados não agudos em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento vem aumentando rapidamente.

Os fatores de risco associados as IACSs variam de acordo com os tipos de cuidados a saúde e áreas de atendimento onde o paciente é atendido. Em hospitais de países desenvolvidos, os fatores mais comuns associados a ocorrência de IACS são: idades maiores de 65 anos, admissões de emergências, permanência por mais de 7 dias em hospitais, colocação de cateteres venosos, urinários e de tubo endotraqueal, pacientes submetidos à cirurgias, imunossupressão induzida por trauma, doenças rápidas ou fatais e por fim, deficiências funcionais e status de coma (Gravel *et al.*, 2007). Os mesmos fatores de risco, foram também identificados em cuidados agudos de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com o agravante de outros fatores determinantes que estão mais relacionados à pobreza, como falta de higiene básica e recursos limitados. Além disso, barreiras gerais como falta de apoio financeiro, número inadequado de pessoas qualificadas, unidades de tratamento e equipamentos insuficientes, agravam ainda mais o controle de infecções em unidades hospitalares de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Allegranzi, Bagheri Nejad, *et al.*, 2011).

Grande parte das infecções hospitalares se mostram evidentes após 48h de admissão do paciente em ambiente hospitalar, podendo ainda se apresentar após a alta do paciente

(Horan *et al.*, 2008). Em casos onde o paciente foi contaminado durante a estadia hospitalar, o período de incubação do patógeno pode exceder o período de internação, alguns estudos relatam que mais de 50% das infecções que ocorrem em ambiente cirúrgico se manifestam após a alta (Oliveira e Carvalho, 2004; Huenger *et al.*, 2005; Fernandez-Ayala *et al.*, 2006). Infecções hospitalares em geral, podem ser causadas por agentes infecciosos endógenos ou através de fontes exógenas. Fontes endógenas podem ser aquelas de cunho corporal, ou seja, pele, nariz, boca, trato gastrointestinal e genitais, sendo esses colonizados pela microbiota local. A microbiota, pode se tornar invasiva em ocasiões favoráveis e/ou quando colonizam locais estéreis, sendo a mão a maior via de transmissão para esses locais (Pittet *et al.*, 2006; Allegranzi, Nejad, *et al.*, 2011). Fontes exógenas de infecção, são aquelas externas ao paciente, tais como visitantes, equipamentos de atendimento ao paciente, ambiente de cuidados médicos e até os próprios profissionais da saúde, além disso, as IACSs não estão restritas somente aos pacientes; trabalhadores de saúde, auxiliares e visitantes também podem ser infectados.

As IACSs podem ocorrer oriundas de uma epidemia dentro de instalações de cuidados à saúde, ou como epidemias, ou seja, quando certos casos de infecção ocorrem à uma determinada população dentro de um espaço de tempo que excede abruptamente o que se é normalmente esperado baseando-se em dados locais. Surtos endêmicos que ocorrem dentro de ambientes hospitalares, servem como importantes controles de qualidade e segurança do paciente. Por razões como essas, a vigilância consiste no ponto principal das prevenções e controle de infecções, sendo a ferramenta essencial para se reduzir IACSs, uma vez que, atividades de vigilância por um tempo prolongado, ajuda na conscientização do problema, visando a diminuição das taxas de infecção (Schwab *et al.*, 2007).

Baseados em dados de 2003, 5 a 10% dos pacientes que são admitidos em hospitais de cuidados agudos, cerca de dois milhões de pacientes por ano nos Estados Unidos, adquiriram infecção hospitalar. Cerca de 90.000 mortes por ano tem sido contabilizadas, fazendo com que as infecções nosocomiais sejam a quinta maior causa de morte nos hospitais de cuidados agudos (Stone *et al.*, 2005). Essas infecções geram um acréscimo de 4,5 a 5,7 bilhões de dólares por ano em assistência ao paciente (Burke, 2003). Aproximadamente 25% das infecções hospitalares ocorrem em UTIs, que sofreram um aumento de permanência de 4 a 15 dias, sendo responsáveis por 20% dos custos totais de UTI (Chen, Y. Y. *et al.*, 2005).

Em decorrência desses fatores de infecções associadas a cuidados de saúde, sistemas voltados a vigilâncias em saúde foram criados visando o levantamento de dados a respeito sobre infecções hospitalares. Sistemas nacionais de vigilância de infecções hospitalares ou

IACSs estão presentes em vários países desenvolvidos, geralmente os dados desses sistemas estão disponíveis através de relatórios nacionais ou publicados em literatura.

A vigilância de infecções hospitalares em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento sofre com o monitoramento regular da ocorrência de infecções hospitalares, sendo assim, o ministério da saúde não consegue obter informações detalhadas sobre o ônus causado pelas infecções hospitalares, além disso, um número limitado de artigos científicos foram publicados nesse âmbito. Um relatório da equipe *Clean Care* da OMS *Patient Safety*, em colaboração com a universidade de Genebra, publicou recentemente uma revisão sistemática e meta-análise sobre a carga endêmica de infecções hospitalares em países em desenvolvimento (Allegranzi, Bagheri Nejad, *et al.*, 2011). Em uma revisão feita pela OMS no período de 1995-2010, 276 artigos incluindo informações relevantes sobre epidemiologia dos quadros tipos mais frequentes de infecções hospitalares (pneumonias associadas aos cuidados de saúde, UTI, infecções sanguíneas e infecções cirúrgicas) foram publicados em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, ainda assim, somente 46% atenderam a critérios que definem estudos epidemiológicos de alta qualidade.

Brasil, Índia, México, Tailândia e Turquia foram identificados como países com o maior número de estudos. De acordo com a OMS, 66% (97/147) dos países em desenvolvimento não possuem dados publicados. Sendo assim, o número limitado de estudos de amplo espectro, junto à falta de sistemas nacionais de vigilância, torna ainda mais difícil a estimativa de ônus de infecções hospitalares a nível nacional. Além disso, grande parte dos estudos (144/276 [52,2%]) foram realizados por hospitais universitários que representa um contexto específico e não global.

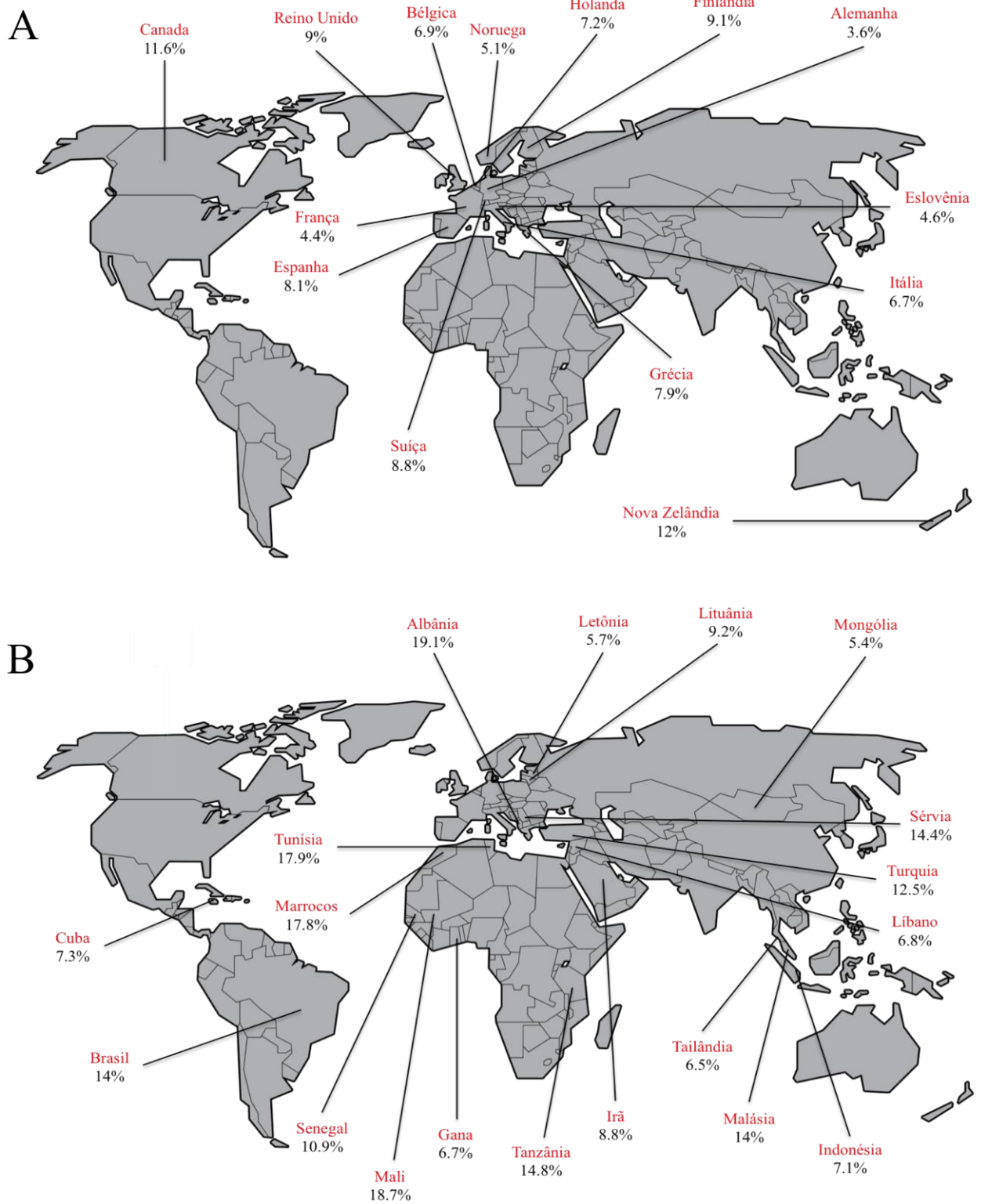


Figura 1. Prevalência de infecções associada a cuidados de saúde em países desenvolvidos (A), subdesenvolvidos e em desenvolvimento (B), no período de 1995-2010.

A história brasileira do controle de infecções relacionadas a assistência (IRAS) no Brasil sofreu o impacto de eventos epidêmicos. Surtos como os de micobactérias, de crescimento rápido, enterobactérias, *K. pneumoniae* e *Enterococcus spp* resistentes a vancomicina revelaram falhas importantes que repercutiram na imprensa leiga (televisiva e impressa), culminando na proibição de compra de antimicrobianos sem receita médica (Padoveze e Fortaleza, 2014). Apesar disso, pouquíssimos são os dados relacionados a infecções hospitalares no Brasil de uma maneira geral.

A única avaliação sobre infecções relacionadas a assistência em saúde conhecidas a nível nacional, foi o estudo feito por Prade e colaboradores em 1994, onde se identificou a prevalência de 15% de taxas de infecções hospitalares em 99 hospitais terciários, onde 28,9% foram relacionadas ao sistema respiratório, 15,6% cirúrgico, 15,5% de pele e 11% urinário (Prade Ss *et al.*, 1995). Após o ano de 2001, a Anvisa iniciou um maior controle da IRAS no Brasil, onde achados importantes mostraram questões da fragilidade estrutural para o controle dessas IRAS, onde, 1/3 dos hospitais não apresentavam nenhum suporte laboratorial de microbiologia, sendo essas proporções mais evidentes no Nordeste (46%) e menor no Sudeste (24%) (Padoveze e Fortaleza, 2014). Nesse âmbito, alguns requisitos essenciais não eram atendidos pelas instituições, como realizar a vigilância epidemiológica. Contudo, é sabido que somente um sistema efetivo de vigilância epidemiológica de espectro nacional poderá demonstrar a magnitude real do problema de IRAS no país. Sendo assim, os estados de São Paulo e Paraná, foram os primeiros estados que visaram obter resultados concretos sobre os sistemas de vigilância no país (Padoveze e Fortaleza, 2014).

Uma recente análise da ANVISA, do ano de 2016 demonstrou que somente 2.212 hospitais notificaram os dados de IRAS no Brasil. Desse total, 29,7% dos hospitais são de administração pública, 34,6% de entidades sem fins lucrativos e 35,4% de entidades empresariais. Além disso, 71,3% desses hospitais possuem vínculo com o SUS e 28,7% não possuem. Foram notificados também, que 53% dos hospitais que possuem leitos de UTI apresentaram Infecção primária de Corrente Sanguínea (IPCS) associada a Cateter Venoso Central (CVC) de 10 a 12 meses em 2016 (André Anderson Carvalho *et al.*, 2016). Ainda, 43% dos hospitais apresentaram pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) durante o mesmo período e 56% apresentaram Infecção do trato urinário (ITU) associada a Cateter Venoso de demora (CVD). Venoso de demora (CVD).

Com os fatos acima listados sobre infecções associadas a saúde, o problema mundial associado as infecções hospitalares merece destaque não somente devido ao fato do número de afetados a cada ano, além disso, o seu impacto em termos de excesso de custos,

prolongamento da permanência do afetado em ambiente hospitalar, morbidade e mortalidade também podem ser consideráveis. Os dados relativos a tais fatores importantes podem difíceis de se obter, uma vez que é preciso uma avaliação complexa em grande parte para se confirmar que estão realmente ligados a episódios de infecção hospitalares ou outros fatores. Os registros de dados clínicos de pacientes apresentados, variam em todo o mundo, entretanto, em países em desenvolvimento essa disponibilidade se mostra ainda mais limitada.

Microrganismos resistentes a antimicrobianos

Em 1928, Alexander Fleming notou o crescimento de uma contaminação com uma zona associada a depuração bacteriana em suas placas de petri. Ao estudar as variações das cores de *S. aureus*, ele então demonstrou que essa substância bioativa que causa lise bacteriana poderia ser encontrada na cultura do fungo da espécie do gênero *Penicillium* (Demain e Elander, 1999; Bentley, 2005). Posteriormente, devido as suas descobertas, em 1940, os químicos Florey e Chain foram capazes de isolar e purificar essa substância que veio a ser conhecida como penicilina (Demain e Elander, 1999). Em 1942, a penicilina G foi utilizada pela primeira vez em práticas clínicas. Entretanto, a falta da sua atividade confiável contra bactérias gram-negativas levou a busca de novos produto com potencial antimicrobiano e as cefalosporinas foram posteriormente descobertas em 1950 (Sydnor e Perl, 2011). Logo em 1950, a resistência de *Staphylococcus* à penicilina aumentou drasticamente, o que alimentou a descoberta de aminopenicilinas como, por exemplo, a ampicilina. Desde então, as taxas de resistência antimicrobiana vem crescendo ao longo dos anos, tornando cada vez mais difíceis de se tratar (Sydnor e Perl, 2011).

Antimicrobianos estão entre umas das ferramentas mais importantes da medicina. Entretanto, sua eficácia está ameaçada devido ao aumento da evolução da resistência bacteriana (Baym *et al.*, 2016). Desde o princípio do desenvolvimento dos antimicrobianos, a resistência bacteriana vem sendo observada e reconhecida como um desafio (Baym *et al.*, 2016). Em tempos atuais, muitos antimicrobianos que foram pioneiros estão se apresentando de certa forma inofensiva aos microrganismos. Até o presente, foi possível evitar uma crise mundial através de modificações de compostos já existentes, assim como a descoberta de novas classes de antimicrobianos (Baym *et al.*, 2016). No entanto, à medida que a resistência antimicrobiana sofre um aumento constante, a taxa de descoberta de novos agentes antimicrobianos vem sofrendo uma queda explícita (Laxminarayan, 2014). Em pleno século

21, a resistência microbiana vem subtraindo aproximadamente 25 e 23 mil vidas na União Europeia e Estados Unidos, respectivamente a cada ano (Baym *et al.*, 2016).

Devido ao aumento no número de infecções hospitalares e organismos resistentes a vários fármacos, muitos outros fatores podem ser importantes a se considerar, incluindo nestes, a definição da necessidade de epidemiologistas de saúde. Um exemplo consiste em intervenções que venham a causar uma melhora juntamente com as práticas baseadas em evidências. Estudos têm demonstrado que o cumprimento de medidas de prevenção de infecções, como a higiene das mãos, diminui a transmissão de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e que o uso de medidas de prevenção diminui as taxas de infecções associadas à corrente sanguínea (Pittet *et al.*, 2000; Pronovost *et al.*, 2006).

Um total de 22.502 infecções associadas à saúde, incluindo infecções associadas à corrente sanguínea e pneumonias associadas à ventilação, foram descritas ao *National Health Safety Network* (NHSN) entre o período de janeiro de 2006 a outubro de 2007, em 621 hospitais dos EUA (Edwards *et al.*, 2009). De 2006 a 2007, o NHSN apresentou dados demonstrando que *E. coli* e *P. aeruginosa*, foram os organismos gram-negativos mais frequentemente isolados em infecções associadas à saúde, juntamente com outros organismos, tais como *K. pneumoniae*, espécies de *Enterobacter*, *Acinetobacter baumannii*, e *Klebsiella oxytoca* (Hidron *et al.*, 2008). Esses dados ainda sugerem que a incidência de infecções hospitalares devido a bactérias gram-negativas sofreu aumento (Lautenbach e Polk, 2007). Um estudo ainda mais recente descreveu o aumento na saúde primária de 15% em 1999, para 24%, em 2003, devido a infecções sanguíneas causadas por bactérias gram-negativas (Albrecht *et al.*, 2006).

A proporção de bactérias gram-negativas resistentes a antimicrobianos convencionais vem sofrendo aumento durante os anos. Dados nacionais demonstram um aumento significativo de resistência a múltiplos fármacos em várias espécies incluindo *K. acinetobacter* e *Pseudomonas spp.* (National Nosocomial Infections Surveillance, 2004; Paterson, 2008). Em estudos recentes de isolados de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, e *A. baumannii*, foram reportados à Rede Nacional de Segurança e Saúde (RNSS), de janeiro de 2006 a dezembro de 2008, que mais que 60% dos isolados foram documentados como multirresistentes a antimicrobianos convencionais (Kallen *et al.*, 2010).

Em um hospital, a susceptibilidade à ciprofloxacina, que pode ser um agente com cobertura amplo a gram-negativas, caiu de 86% para 76% ao longo de 5 anos e a resistência de microrganismos a beta-lactâmicos de amplo espectro e *Enterobacteriaceae* à carbapenemase vem sendo descritas globalmente (Neuhauser *et al.*, 2003; Hawkey e Jones,

2009). Vem sendo reportado que os fatores de risco mais importantes para a colonização ou infecções por bactérias gram-negativas multirresistentes entre adultos e crianças pode ser a residência em instalações de cuidados de longa duração ou centro de reabilitação, tratamento com antimicrobianos nos últimos 3 meses e hospitalização nos últimos 3 meses (Nseir *et al.*, 2010). Riscos adicionais à infecção e colonização por bactérias negativas multirresistentes incluem imunossupressão, hospitalização por 5 dias ou mais, participação de diálise crônica, terapia de infusão em casa ou tratamento de feridas nos últimos 30 dias (American Thoracic e Infectious Diseases Society Of, 2005). Nas estruturas de cuidados de saúde moderna, a transição de pacientes por várias instalações e cuidados agudos de longo prazo em hospitais implicam em uma fonte de surtos regionais de infecções por bactérias gram-negativas multirresistentes (Munoz-Price, 2009).

Infecções devido a bactérias resistentes a antimicrobianos levam a um aumento da morbidade, mortalidade e custos adicionais aos hospitais (Cosgrove, 2006). Um estudo com pacientes cirúrgicos, comparando pacientes com bactérias gram-negativas resistentes a gram-negativas não resistentes, demonstrou que as infecções gram-negativas resistentes estão associadas com maiores custos médios (US\$80,500 contra US\$29,604) e maior tempo de estadia nos hospitais (29 contra 13 dias) (Evans *et al.*, 2007). Sendo assim, vale a pena a discussão sobre o impacto significativo da morbidade, da mortalidade e dos cuidados de saúde associados.

Alvos celulares para antimicrobianos

Biossíntese de parede celular

O peptidoglicano presente na camada de parede celular bacteriana pode conferir força à essa estrutura, sendo formado por uma malha de peptidoglicanos ligados covalentemente (Walsh, 2000). Uma vez que, uma maior quantidade da cadeia de peptídeos adjacentes se encontram conectadas por ação de transpeptidases, uma maior resistência mecânica a lise osmótica também pode ser mais presente. As transglicosilases por sua vez atuam em cadeias de glicanos visando estender os cadeias de açúcares a partir da incorporação de unidades de peptidoglicanos a partir de lipídeos tipo 2 (N-acetilglucosamina-b-1,4-N-acetilmuramil-pentapeptídeo-pirofosforil-undecaprenol) (Walsh, 2000). As enzimas que possuem os domínios de transpeptidases e transglicosilases tem sido os alvos utilizados pelas penicilinas e cefalosporinas, que agem como pseudosubstratos, acilando os sítios das transpeptidases (denominadas proteínas de ligação à penicilina). As

transpeptidases podem ser desacetiladas muito lentamente, ocupando assim os sítios ativos das enzimas, evitando que aconteça a reticulação normal das cadeias peptídicas nas camadas de peptidoglicanos, tornando-as assim mais fracas mecanicamente, ficando susceptíveis a lises e mudanças osmóticas (Walsh, 2000).

Além das penicilinas e cefalosporinas, os antimicrobianos da família das vancomicinas também atuam na segmentação da camada de peptidoglicanos da parede celular bacteriana. Entretanto, ao invés de redirecionar as enzimas relacionadas na reticulação peptídica, as vancomicinas se ligam ao substrato peptídico, impedindo que este reaja com as transpeptidases e transglicosilases (Williams, 1996). O efeito desse processo, onde há falta da reticulação dos peptidoglicanos, leva a um enfraquecimento da parede levando a uma morte celular devido a lise bacteriana. A superfície inferior da vancomicina pode ser capaz de fazer cinco ligações de hidrogênio com a porção terminal dipeptídica (D-Ala-D-Ala) das cadeias laterais dos peptidoglicanos. Tal processo explica a afinidade da vancomicina com seu alvo, tanto nas paredes reticuladas, quanto nos lipídeos tipo 2. Sendo assim, os β -lactâmicos e as vancomicinas funcionam em etapas adjacentes (substrato e enzima), demonstrando sinergia quando administradas em conjunto (Walsh, 2000).

Síntese de proteínas

O maquinário para a produção de proteínas e RNA ribossômicos de organismos procaríotos pode ser essencialmente diferente do maquinário análogo em eucariotos, que possuem diversos inibidores de síntese de proteínas, tendo como alvo vários passos envolvidos no funcionamento dos ribossomos, com ação antibacteriana seletiva (Walsh, 2000). Esses inibidores de síntese de proteínas incluem importantes antimicrobianos, tais como a classe das eritromicinas (Brisson-Noel *et al.*, 1988), tetraciclina (Knabe, 1985) (que podem ser produtos de vias biosintéticas de policétidos aromáticos) e os aminoglicosídeos (Fourmy *et al.*, 1996) (dos quais a estreptomicina foi o primeiro a ser descoberto, sendo substituído posteriormente por variantes sintéticas como a canamicina). Devido as várias etapas relacionadas na iniciação, alongamento e no término da montagem de moléculas proteicas feitas pelos ribossomos, muitos podem ser os locais de ligação ou catálise que podem ser interrompidos por essas classes de antimicrobianos que inibem a síntese de proteínas (Walsh, 2000). Essa grande multiplicidade de passos associados a síntese de proteínas, também proporciona um maior número de alvos para novos antimicrobianos como os oxazolidinonas (Kloss *et al.*, 1999), aprovada nos EUA no primeiro trimestre de 2000.

Reparo e replicação de DNA

As fluoroquinolonas, assim como as ciprofloxacinas, são antimicrobianos sintéticos que atuam destruindo bactérias a partir da inativação da enzima DNA girase que pode ser a enzima responsável por desenrolar o entrelaçamento circular do DNA bacteriano de dupla hélice que se forma após cada rodada de replicação de DNA (Walsh, 2000). As DNA girases são topoisomerases, que podem ser classificadas como tipo 1 ou tipo 2, onde, as do tipo 1 produzem a ruptura em cadeias de DNA permitindo o giro da cadeia que foi rompida sobre a cadeia que se manteve intacta, conservando a energia do rompimento da ligação fosfodiéster. As do tipo 2 por sua vez, quebram as duas cadeias de DNA ao mesmo tempo, introduzindo ou retirando as hélices de DNA (Walsh, 2000). As girases bacterianas estão dentre as topoisomerases do tipo 2, onde a quebra da dupla fita de DNA envolve a ligação reversível das extremidade 5' do DNA clivado aos resíduos de tirosina em cada uma das duas subunidades (GyrA e GyrB) de girases (Maxwell, 1997).

Os antimicrobianos das classes das quinolonas, assim como as ciprofloxacinas, atuam na inibição dos mecanismos de DNA girase, agindo formando um complexo com enzima e a fita dupla de DNA clivada que é ligada por ligações covalentes às subunidades de Girase A (Walsh, 2000). Nos complexos de ciprofloxacina, as girases não religam o DNA clivado e como consequência, as fitas de DNA clivadas se acumulam e desencadeiam o mecanismo de reparo que leva a morte bacteriana (Walsh, 2000). Sendo assim, dentre os três alvos principais, os antimicrobianos utilizam as diferenças bioquímicas entre o maquinário dos procaríotos e eucaríotos para a sua atuação seletiva.

Mecanismos de resistência bacteriana

Bactérias muitas vezes se apresentam intrinsecamente resistentes a certos antimicrobianos, mas também tem a capacidade de adquirir essa resistência através de mutação em seus genes cromossômicos ou por transferência horizontal de genes, sendo que esses microrganismos podem continuar a crescer normalmente na presença de antimicrobianos, enquanto o crescimento das bactérias sensíveis pode ser interrompido (Baym *et al.*, 2016). Assim sendo, as bactérias resistentes crescem rapidamente e se espalham por toda a população, superando as bactérias sensíveis, tornando assim o fármaco ineficaz (Baym *et al.*, 2016). A resistência intrínseca de espécies bacterianas a certos tipos de antimicrobianos, pode ser a capacidade dessa população de bactéria de resistir a ação desses

antimicrobianos, sendo essa capacidade devido a características estruturais ou funcionais que podem ser inerentes (Blair *et al.*, 2015). Além dessa resistência inerente que as bactérias possuem, estas também podem adquirir e desenvolver resistência a antimicrobianos. Tal resistência pode ser devido a vários mecanismos, se dividindo em três principais: primeiro, existem aqueles que diminuem as concentrações intracelulares de antimicrobianos, como resultado de uma fraca entrada na bactéria ou ainda pela expulsão dos antimicrobianos; segundo, existem aqueles que modificam o alvo das moléculas dos antimicrobianos através de mutações gênicas ou de modificações pós-traducionais desses alvos; e por último, existem aqueles que inativam as moléculas de antimicrobianos através de hidrólises ou outras modificações (Blair *et al.*, 2015).

Interrupção de acesso ao alvo

Em relação as espécies de bactérias gram-positivas, as gram-negativas podem ser morfológicamente menos acessíveis a muitos antimicrobianos, devido a permeabilidade de sua membrana externa (Kojima e Nikaido, 2013). As moléculas de antimicrobianos hidrofílicas atravessam a membrana externa das bactérias através de difusão por meio de proteínas de membrana externa (porinas) (Figura 2). Em grande parte das *Enterobacteriaceae*, as principais porinas, como as proteínas de membrana externa OmpFs e OmpCs de *E. coli*, funcionam como canais não específicos; porém, evidências anteriores sugerem que tais sítios de ligação de fármacos podem estar incorretos (Kojima e Nikaido, 2013; Tran *et al.*, 2013). Consequentemente, a limitação da entrada de antimicrobianos nas células bacterianas, assim como a redução da permeabilidade da membrana externa podem ser resultado da regulação negativa de porinas ou pela substituição dessas por canais com mais seletividade, sendo que tal mecanismo de resistência intrínseca a antimicrobianos por bactérias gram-negativas já foi revisado (Tamber e Hancock, 2003; Blair *et al.*, 2015). No entanto, estudos mais recentes demonstraram que em *Enterobacteriaceae* como *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* as reduções de expressão de porinas contribuem fortemente para a resistência de novos medicamentos como carbapenemas e cefalosporinas, que possuem a resistência devido a degradação enzimática (Baroud *et al.*, 2013; Lavigne *et al.*, 2013).

Bombas de efluxo de bactérias tem a capacidade de transportar ativamente muitas classes de antimicrobianos para o meio extracelular, contribuindo amplamente para a resistência intrínseca de bactérias gram-negativas a muitos medicamentos (Figura 2). Quando essas bombas de efluxo são superexpressas em bactérias, essas podem contribuir grandemente

para a resistência a antimicrobianos que anteriormente eram clinicamente úteis (Blair *et al.*, 2015). Algumas bombas de efluxo possuem uma especificidade de substrato (Bombas Tet), entretanto muitas das bombas de transporte possuem um amplo espectro de substrato, sendo conhecidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplos fármacos (RMF) (Blair *et al.*, 2015). Embora todas as bactérias possuam genes que codificam bombas de efluxo RMF em seus cromossomos, alguns foram adicionados aos plasmídeos, que podem ser transferidos para outras bactérias. Genes que codificam novas bombas de efluxo do tipo *tripartite resistance nodulation division* (TRND), foram recentemente descobertas em plasmídeos IncH1 isolados de cepas de *Citrobacter freundii*, que também continham genes para a enzima *New Delhi metallo- β -lactamase 1* (NDM1) de clivagem de antimicrobianos (Dolejska *et al.*, 2013). Essa família de bombas TRND que estão dentre as bombas RMF, são encontradas em bactérias gram-negativas sendo as mais caracterizadas dentre as clinicamente relevantes bombas de efluxo RMF, que, quando superexpressas, exportam uma grande quantidade de substratos para fora das células bacterianas, podendo ser exemplificadas como as bombas de efluxo AcrB em *E.coli* e MexB em *P. aeruginosa* (Pidcock, 2006; Blair *et al.*, 2015).

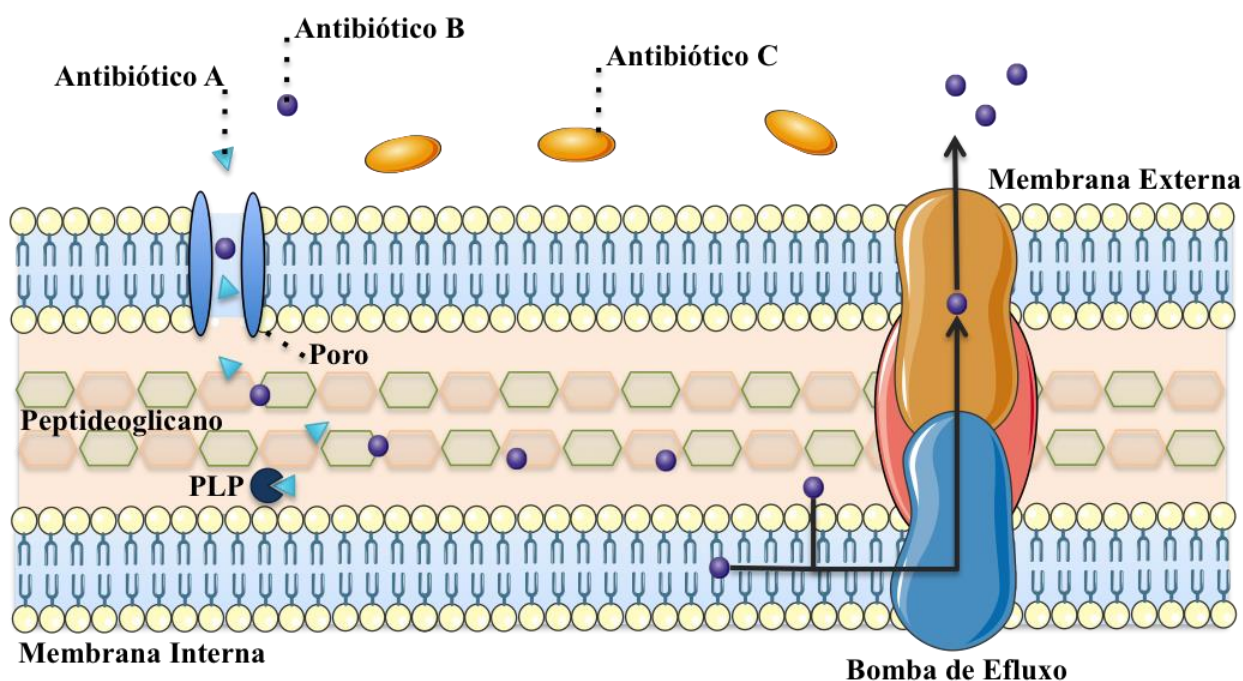


Figura 2. Mecanismos intrínsecos de resistência. A figura demonstra uma visão geral dos mecanismos de resistência intrínseca. O exemplo mostrado é de antimicrobianos do tipo β -lactâmico tendo como alvo uma proteína de ligação à penicilina (PLP). O antimicrobiano A pode entrar na célula através de uma proteína porina, alcançando seu alvo inibindo a síntese de peptidoglicanos. O antimicrobiano B também pode entrar na célula através de uma porina, mas ao contrário do antimicrobiano A, ele pode ser eficientemente removido por bombas de efluxo. O antimicrobiano C não pode atravessar a membrana externa e, portanto, não consegue acessar a PLP alvo.

O entendimento do mecanismo de superexpressão se apresenta importante, uma vez que esse mecanismo pode ser comum em cepas de isolados clínicos e um conhecimento desse tipo de mecanismo permite o estudo de nova terapias para burlar a produção de proteínas de efluxo (Blair *et al.*, 2015). A transcrição desses genes codificantes de bombas de efluxo pode ser controlada por reguladores locais que estão localizados ao lado dos genes de bomba de efluxo e também por reguladores globais que apresentam funções biológicas mais amplas (Blair *et al.*, 2015). Além disso, altos níveis de expressão de genes de efluxo encontrado em bactérias resistentes a múltiplos fármacos muitas vezes estão relacionado a mutações nas redes reguladoras que controlam a expressão dessas bombas de efluxo (Blair *et al.*, 2015). Entretanto, o mecanismo mais comum relacionado a indução da expressão de genes de bombas de efluxo, é a ligação direta de moléculas antimicrobianas à genes de transcrição de proteínas repressoras, que diminui a ligação do repressor ao DNA alvo (Blair *et al.*, 2015). O entendimento molecular da indução de bombas de efluxo permite o desenvolvimento de moduladores químicos que visam a diminuição dessas bombas, que poderiam ser usados em conjunto com antimicrobianos em novas estratégias terapêuticas.

Modificação de alvo de antimicrobianos

Grande parte dos antimicrobianos atuam se ligando em seus alvos através de ligações específicas de alta afinidade, neutralizando a atividade dos mesmos. Mudanças conformacionais dos alvos impedem a ligação dos antimicrobianos de forma eficiente, o que permite que esses alvos ainda desempenhem suas funções normais, conferindo assim resistência à bactérias (Blair *et al.*, 2015). Durante o processo de infecção, geralmente estão presentes grandes populações de patógenos, onde, a presença de uma única mutação nos genes que codificam os alvos dos antimicrobianos, podem conferir resistência a esses, fazendo com que cepas que possuem essas mutações possam se proliferar livremente (Blair *et al.*, 2015). Genes codificantes de alvos de antimicrobianos existem em várias cópias nos genomas bacterianos, como a subunidade 23S dos ribossomos de bactérias gram-positiva que podem ser alvos dos antimicrobianos oxazolidinona como o linezolid. Outro exemplo associado a modificações de alvos de antimicrobianos é a aquisição de genes homólogos aos dos alvos originais, como acontece em *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), onde, a resistência a meticilina pode ser conferida devido a aquisição do elemento do cromossomo *staphylococcal cassette mec* (SCCmec). Esse elemento carrega genes de *mecA* que codifica a proteína PBP2a insensível a β -lactâmicos; esta proteína permite que a biossíntese da parede

celular aconteça apesar da proteína PBP nativa ser inibido na presença de antimicrobiano (Katayama *et al.*, 2000).

Proteções do alvo de antimicrobianos através de modificações também pode ser um meio eficiente de bactérias se tornarem resistentes a antimicrobianos (Figura 3), além de não requererem alterações por meio de mutações nos genes que codificam os alvos dos antimicrobianos. Recentemente, a proteção de alvos tem sido colocada como relevantes mecanismos de resistência à vários tipos de antimicrobianos; a família de genes de eritromicina ribossômicas metilases (*erm*), alteram os sítios de ligação de medicamentos (16S rRNA) por metilação, prevenindo a ligação de lincosaminas e estreptograminas (Kumar *et al.*, 2014).

Os antimicrobianos das classes dos aminoglicosídeos tem a capacidade de inibir a síntese proteica se ligando ao cromossomo das bactérias. Um dos mecanismos de resistência a aminoglicosídeos pode ser a modificação dos ribossomos através de metilação (Figura 3). Antes não se pensava que esse mecanismo fosse clinicamente relevante, entretanto, as enzimas responsáveis por essa metilação foram recentemente encontradas em vários patógenos bacterianos; por exemplo, temos o gene *ArmA* que codifica metiltransferases, que foram isoladas de Enterobactérias em toda América do Norte, Europa e Índia, além dos genes *rmt* que codificam outras metiltransferases que foram descobertas na Américas do Norte, Central e Sul, e também na Índia (Fritsche *et al.*, 2008; Hidalgo *et al.*, 2013; Blair *et al.*, 2015). As polimixinas, A e E (conhecidas como colistinas) são peptídeos antimicrobianos cíclicos com longas caudas hidrofóbicas que tem ação contra bactérias gram-negativas (Cai *et al.*, 2012). A atividade das colistinas é baseada da ligação dessas moléculas aos lipopolisacarídeos (LPS), onde, suas cadeias hidrofóbicas destroem ambas as membranas celulares das bactérias (Kumar *et al.*, 2014). Devido a falta de terapias alternativas nos últimos anos, a colistina foi bastante utilizada no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* e *Enterobacteriaceae* multirresistentes. Como consequência, houve o desenvolvimento de resistência a esse medicamento, que pode ser frequentemente associada a mudanças nas expressões dos reguladores que alteram a produção de LPS, resultando em alterações nesses alvos, reduzindo a ligação do fármaco (Cai *et al.*, 2012).

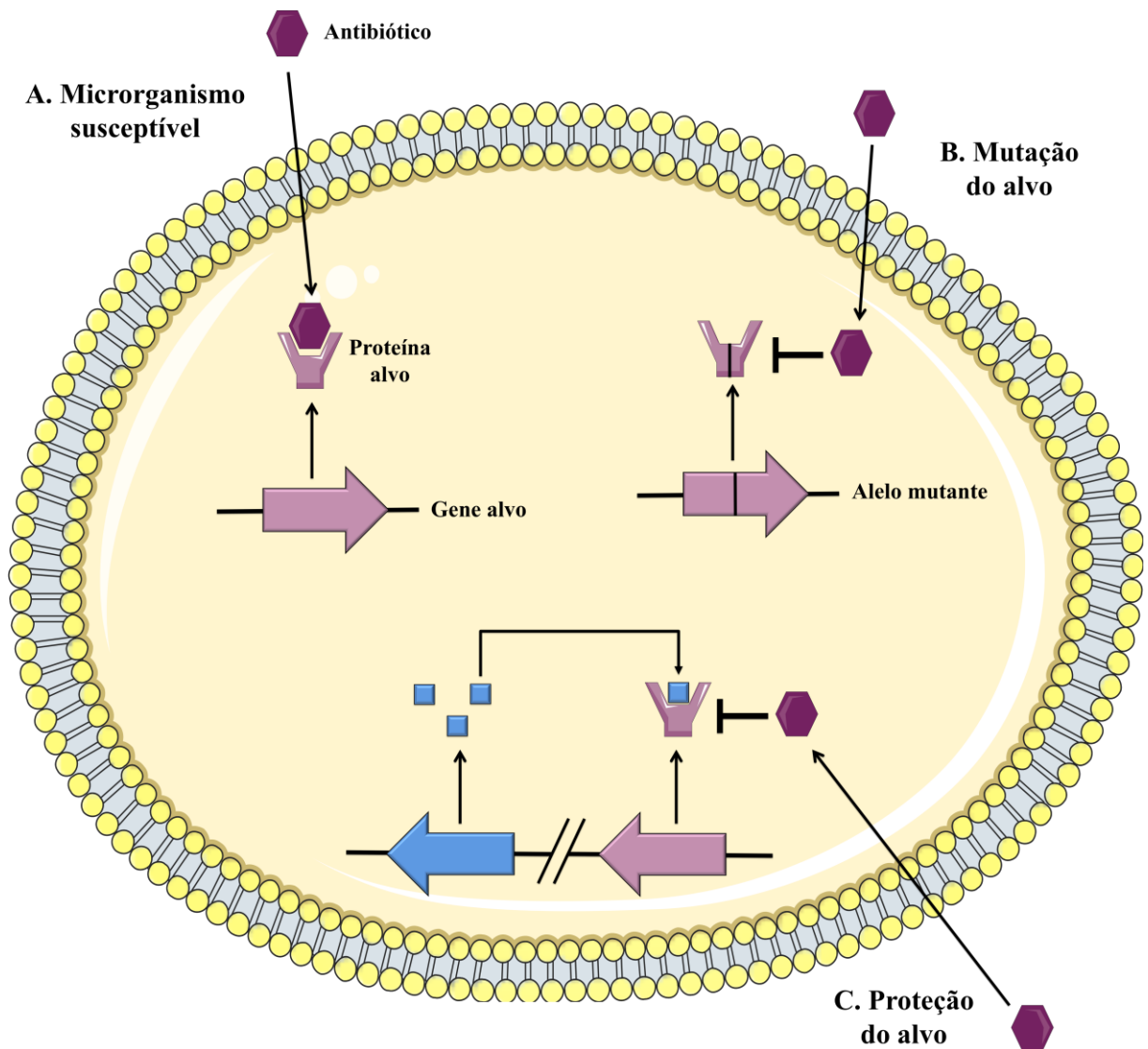


Figura 3. Modificação de alvo de antimicrobianos. A. Hospedeiro susceptível em que um antimicrobiano pode se ligar firmemente ao seu alvo específico e exercer um efeito inibitório. B. Mutação ou recombinação do sítio alvo gerando um alelo mosaico resultando em um alvo com afinidade reduzida para o antimicrobiano, que não se liga de forma eficiente e, portanto, tem um efeito reduzido ou insignificante. C. A modificação do alvo por adição de um grupo químico também pode prevenir a ligação de antimicrobianos sem alterar a sequência da proteína primária do alvo, o que retém a sua atividade.

Antimicrobianos das classes das daptomicinas atuam especificamente em fosfolípidos aniônicos das membranas citoplasmáticas de bactérias gram-positivas, que na presença de íons de cálcio, se inserem na membrana causando despolarização e extravasamento do conteúdo intracelular (Randall *et al.*, 2013). Em *S. aureus*, a resistência a daptomicinas ocorre devido a mutações no gene *mprF* (codificantes de resistência a peptídeos), que resulta na remodelagem dos fosfolípidos da membrana, que por sua vez altera a carga membranar, reduzindo a ligação das moléculas de daptomicinas (Mishra *et al.*, 2013).

Modificação direta em antimicrobianos

A catálise enzimática de antimicrobianos, pode ser um mecanismo importante de resistência microbiana a antimicrobianos que tem sido relevantes desde a descoberta da penicilina (uma β -lactamase), em 1940 (Abraham e Chain, 1988) (Figura 4). Milhares de enzimas já foram identificadas com a capacidade de degradar antimicrobianos de diferentes classes, dentre eles; β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fenicóis e macrolídeos. Além disso, existem também subclasses de enzimas que tem a capacidade de degradar antimicrobianos dentro de uma mesma classe, como por exemplo os antimicrobianos β -lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas, clavams, carbapenêmicos e monobactâmicos, que podem ser hidrolisados por uma gama diversificada de β -lactamases (Livermore, 2008; Nordmann, Poirel, Walsh, *et al.*, 2011; Woodford *et al.*, 2011). As primeiras β -lactamases possuíam ação somente contra β -lactâmicos de primeira geração, Entretanto, o surgimento de β -lactamases de espectro estendido (BLEE) e carbapenemases, incluindo as imepenemases, *K. pneumoniae* carbapenemases (KPC), oxacilinas, enzimas *New Delhi* metalobetalactamases (NDM) em bactérias gram-negativa como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. pneumoniae* e *A. baumannii*, resultou no surgimento de isolados resistentes a todos os β -lactâmicos, implicando em um problema no tratamento de infecções graves em pacientes hospitalares (Johnson e Woodford, 2013; Voulgari *et al.*, 2013).

Com o aumento do número de bactérias carregadores dos genes de β -lactamases de espectro estendido (BLEE), o uso de carbapenemases no ambiente clínico sofreu aumento nos últimos anos e, como consequência, um número crescente de isolados clínicos que possuem genes que codificam β -lactamases com atividade de hidrólise de carbapenêmicos (carbapenemases) tem sido encontrados (Queenan e Bush, 2007; Tzouveleki *et al.*, 2012). As carbapenemases incluem principalmente membros da classe A, B e D de β -lactamases. Uma característica destas enzimas é a capacidade de inativar uma ampla gama de β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro (Blair *et al.*, 2015). A disseminação de carbapenemases ocorreu de maneira diferente como exemplificado pelos genes de *kpc* e *ndm*. As KPCs serino carbapenemases foram encontradas primeiramente em 1996 (Yigit *et al.*, 2001), sendo descritas desde então em várias *Enterobacteriaceae* (Deshpande *et al.*, 2006). O gene de *kpc* pode ser transferido através do plasmídeo, sendo relacionado a clones dominantes de *K. pneumoniae* produtores de KPC (ST258), que pode ser encontrado em todo mundo (Qi *et al.*, 2011). Esse gene pode ser carregado no plasmídeo pKP-Qil ou em variantes próximas, onde há a substituição de um único aminoácido,

mantendo ainda a atividade similar (Leavitt *et al.*, 2010). As carbapenemases NDM foram descritas primeiro na Índia em 2009 (Kumarasamy *et al.*, 2010), se tornando bastante difundidas em bactérias gram-negativas, tais como *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *E. coli* em todo mundo (Blair *et al.*, 2015). NDMs conferem resistência a todos os β -lactâmicos com exceção dos aztreonâmicos. Seus genes foram frequentemente descobertos em plasmídeos conjugativos de amplo espectro pertencentes a diversos tipos de replicons (IncA, IncC, IncF, IncHI1 e IncL–IncM) (Walsh *et al.*, 2011; Giske *et al.*, 2012; Kumarasamy e Kalyanasundaram, 2012), e em conjunto com outros genes de resistência (Nordmann, Poirel, Carrer, *et al.*, 2011). Isolados clínicos que produzem NDM foram identificados em muitas espécies, com seus genes localizados tanto em plasmídeos quanto nos cromossomos dos hospedeiros, podendo se mover em ambos com uma alta frequência (Shakil *et al.*, 2011).

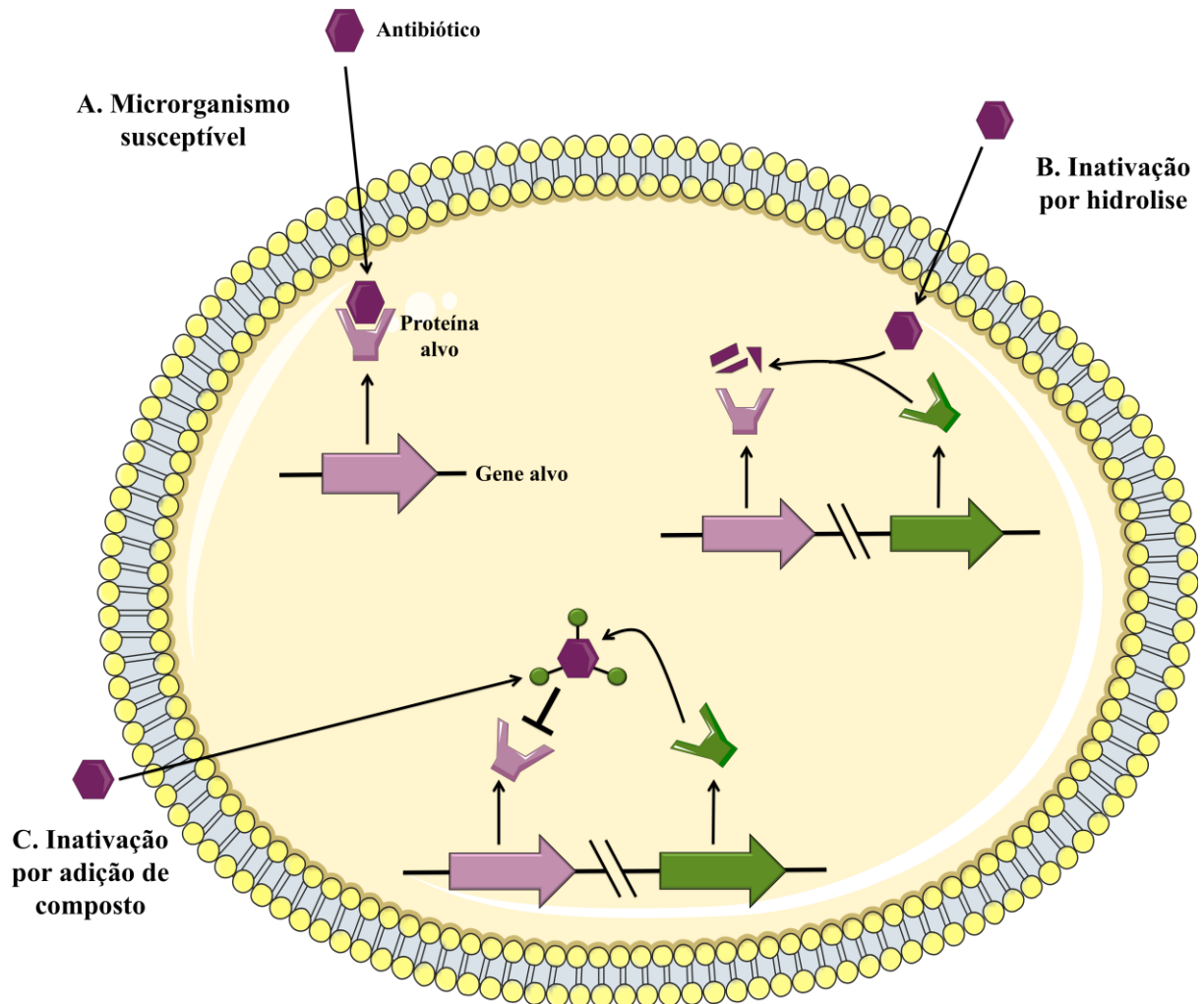


Figura 4. Interações diretas com antimicrobianos. A. Hospedeiro susceptível com um alvo que pode ser efetivamente inibido por um antimicrobiano. B. Aquisição e produção de uma enzima que destrói o antimicrobiano (por exemplo, β -lactamases) evitando a ligação ao alvo e conferindo resistência. C. Aquisição e produção de uma enzima que modifica a estrutura do antimicrobiano (por exemplo, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos) também pode impedir a ligação ao alvo e conferir resistência.

Uma das formas de bactérias se tornarem resistentes a antimicrobianos pode ser pela adição de grupos químicos a locais mais vulneráveis nas moléculas dos antimicrobianos, o que impede que esses antimicrobianos se liguem em suas proteínas alvo como resultado de um impedimento estérico (Figura 4). Vários grupos químicos diferentes podem ser transferidos à antimicrobianos, tais como, grupamentos acil, fosfato, nucleotídeo e ribitol, sendo que as enzimas responsáveis por essa ação, são uma ampla e diversificada família de enzimas de resistência a antimicrobianos (Wright, 2005). Antimicrobianos do tipo aminoglicosídeos são bastante susceptíveis a modificações por terem a tendência de ser moléculas grandes com vários grupos amida e hidroxila expostos (Blair *et al.*, 2015). As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos conferem altos níveis de resistência aos antimicrobianos que são modificados por elas. Três classes de enzimas são as principais atuantes nessa modificações: acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotídeo transferases. Essas classes de enzimas podem ser evolutivamente diversas, variando nos tipos de aminoglicosídeos que são capazes de modificar, assim como a porção dessas moléculas que podem ser modificadas (Norris e Serpersu, 2013). Uma descoberta recente e preocupante foi uma nova ilha genômica em *Campylobacter coli* isoladas de frangos de corte na China; esta ilha genômica codifica seis enzimas que possuem a capacidade de modificar aminoglicosídeos, incluindo os membro das três classes, conferindo resistência a vários aminoglicosídeos (incluindo gentamicinas) diferentes que podem ser usados no tratamento de infecções por *Campylobacter* (Qin *et al.*, 2012).

Peptídeos antimicrobianos como alternativa a antimicrobianos convencionais

Como discutido anteriormente, a resistência de microrganismos a antimicrobianos convencionais vem se tornando uma grande preocupação em todo o mundo e algumas formas foram descritas a fim de minimizar essa intensa crise mundial. Portanto, como estratégia de controle a esses novos super-microrganismos, os peptídeos antimicrobianos se apresentam como uma alternativa diferente. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas defensivas existentes no reino animal e vegetal, exibindo forte atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos, como bactérias gram-negativas e positivas, fungos, parasitas e vírus, através de vários mecanismos de ação diferentes (Andreu e Rivas, 1998). Além de demonstrar efeitos antimicrobianos diretos, os PAMs ainda têm a capacidade de controlar

respostas imunes adaptativas e inatas, gerando um acúmulo de células imunes como macrófagos e linfócitos, além de anular os efeitos tóxicos das endotoxinas lipopolissacarídicas de bactérias Gram-negativas, estimulando angiogênese (Kai-Larsen e Agerberth, 2008; Lavery *et al.*, 2011). PAMs podem ser ainda capazes de destruir microrganismos com grandes resistências a antimicrobianos convencionais, uma vez que esses podem ser mortos por ação direta e rápida dessas moléculas (Zasloff, 2002; Aoki *et al.*, 2012). Em conjunto, os PAMs possuem diversos benefícios no tratamento de infecções, por isso, o desenvolvimento de PAMs tem sido considerado como uma estratégia promissora para a geração de novos antimicrobianos.

PAMs que ocorrem naturalmente na natureza podem se apresentar como polipeptídeos curtos, onde seus comprimentos podem variar até cerca de 50 resíduos de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas (Kang *et al.*, 2014; Da Costa *et al.*, 2015). Em geral possuem entre +2 e +9 resíduos de aminoácidos básicos, como Arginina (Arg), Lisina (Lys) e Histidina (His) (Hancock e Scott, 2000). Embora PAMs se apresentem não estruturados em soluções aquosas, em ambientes miméticos de membranas, os PAMs adotam uma estrutura induzindo uma anfipaticidade significativa, onde, seus resíduos hidrofóbicos se mantem de um lado da molécula e seus resíduos hidrofílicos do lado oposto, permitindo que esses PAMs interajam seletivamente com a carga negativa das membranas externas das bactérias (Nguyen *et al.*, 2011). Em última análise, a integridade da barreira citoplasmática bacteriana fica comprometida devido a adsorção dos PAMs que podem ser difundidos para as superfícies carregadas negativamente das membranas microbianas dentro das quais podem ser encontrados polímeros ácidos, como lipopolissacarídeos e ácidos teicóicos (Hancock e Lehrer, 1998). A interação específica dos PAMs com a membrana bacteriana resulta no vazamento do conteúdo da célula bacteriana. Em contraste, os PAMs positivamente carregados têm dificuldade em se ligar a membrana celular de mamífero, uma vez que a composição da membrana celular se mostra bastante diferente da membrana bacteriana. Em comparação com a membrana bacteriana, os fosfolipídios neutros, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e/ou esfingomiéline, podem ser abundantes na membrana celular de mamífero (Gentilucci *et al.*, 2006).

Os PAMs podem apresentar um elevado grau de especificidade, o que pode ser atribuído às estruturas complexas de sua forma lábil, e ainda sua estrutura quaternária formada ao interagir com o alvo (Da Costa *et al.*, 2015). A toxicidade atribuída a esses peptídeos geralmente pode ser baixa, uma vez que eles tendem a possuir uma interação

específica com seus alvos moleculares e podem ser facilmente metabolizados devido a sua composição feita de resíduos de aminoácidos (Da Costa *et al.*, 2015).

Há um crescente interesse por esses peptídeos por parte das indústrias farmacêuticas quando se fala em desenvolvimento de novos medicamentos, que vêm se intensificando devido a uma aceitação crescente dessas proteínas terapêuticas por parte de médicos e pacientes (Da Costa *et al.*, 2015). Alguns *blockbusters* já ultrapassaram a marca de mais de meio bilhão de dólares em vendas destes novos agentes terapêuticos. Em 2011, a Lupron[®] (*leuprolideacetate*) atingiu vendas globais de 800 milhões de dólares. No mesmo ano, a Zoladex[®] (*goserelinacetate*) teve uma venda mundial de 1,2 bilhões de dólares, e a copaxone[®] (*glatirameracetate*) superou os 4 bilhões de dólares em 2012. Compreensivelmente, isso gerou uma corrida por fármacos à base de peptídeos (Da Costa *et al.*, 2015). O ano de 2012 foi particularmente prolífico em termos de aprovação de medicamentos à base de peptídeos, com cinco medicamentos autorizados para comercialização, tanto nos EUA e na União Europeia, sendo essas: *lucinactant* (*Discovery Labs*), *pasireotido* (*Novartis*), *carfilzomib* (*Onyx Pharmaceuticals*), *linaclotide* (*Forest Laboratories*) e *teduglutide* (*NPS Pharmaceuticals*) (Da Costa *et al.*, 2015). Os próximos anos deverão entregar muitos mais, pois vários compostos já estão em estudos clínicos de estágio tardio (Kaspar e Reichert, 2013).

Principais classes estruturais de PAMs

Peptídeos antimicrobianos podem ser classificados basicamente em três grandes classes baseados em suas estruturas: α -helicoidais, folhas- β e peptídeos antimicrobianos sem estruturas definidas (Mcphee e Hancock, 2005) (Figura 5). Os PAMs α -helicoidais compreendem as pardaxinas (Ting *et al.*, 2014), dermasseptinas (Nicolas e El Amri, 2009), e as tão estudadas LL-37 (Wang *et al.*, 2014). Os peptídeos anfipáticos, na natureza, podem formar estruturas α -helicoidais na presença de membranas modelo ou em solução aquosa (Ahmad *et al.*, 2012). Os PAMs em estruturas de folhas- β podem ser caracterizados pela presença de duas ou mais folhas, esses PAMs estão ligados pela formação de pontes dissulfeto incluindo as α -, β -, e θ -defensinas (Mcphee e Hancock, 2005; Kountouras *et al.*, 2014). Por fim, os peptídeos sem estrutura definida são peptídeos que podem ser ricos em histidinas, argininas ou glicinas (Ahmad *et al.*, 2012). Exemplos incluem indolicidinas (Shaw *et al.*, 2006), histatinas (Huo *et al.*, 2011) e drosocinas (De Visser *et al.*, 2005), entre outros.

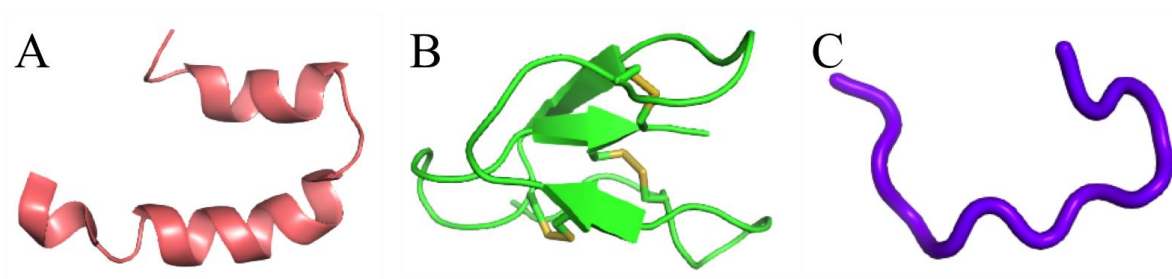


Figura 5. Estruturas tridimensionais representativa das diferentes classes de PAMs. A. Pardaxina (PDB:2KNS). B. β -defensina (PDB:1KJ5). C. Indolicidina (PDB: 1QXQ)

PAMs com estruturas em α -hélices

Os peptídeos anfipáticos, na natureza podem formar estruturas α -helicoidais na presença de membranas modelo ou em solução aquosa e muitas vezes esses peptídeos apresentam uma ligeira dobra no centro da molécula (Ahmad *et al.*, 2012). Em um estudo, essa dobra foi decisiva para a seletividade da molécula, o que suprimiu a atividade hemolítica (Zhang *et al.*, 1999). As magaininas são um ótimo exemplo dessa classe estrutural de peptídeos, sendo isoladas de pele de sapos africanos *Xenopus leavis*, as magaininas 1 e 2 possuem 23 resíduos de aminoácidos e uma leve atividade antimicrobiana ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Zasloff, 1987). A estrutura da magainina 2 foi elucidada através de RMN na presença de micelas de DPC e SDS, apresentando uma conformação anfipática e helicoidal, com uma leve curvatura no centro, nos resíduos 12 e 13 (Gesell *et al.*, 1997). O mecanismo de ação de magaininas foi proposto por promover a permeabilização das membranas bacterianas levando a ruptura. Esse mecanismo pode ser apoiado pela observação de que não existem diferenças na atividade entre os peptídeos d- e l-enantioméricos, descartando o envolvimento de um receptor quiral ou uma enzima como alvo (Wade *et al.*, 1990; Matsuzaki, 1998). O modelo proposto para explicar o mecanismo de ação da magainina 2 segue o modelo de agregação micelar, onde as magaininas interagem com os fosfolipídios carregados negativamente formando poros transientes tornando a membrana bacteriana permeável (Matsuzaki *et al.*, 1997). Esse sistema foi demonstrado em sistemas modelo, onde a despolarização foi induzida em membranas modelo e *E. coli* (Juretic *et al.*, 1994; Matsuzaki *et al.*, 1995).

As cecropinas foram os primeiros PAMs indutíveis de origem animais a serem caracterizados, sendo isolados de hemolinfa de lepidópteros (mariposas) e dípteros (moscas) previamente desafiadas com bactérias (Hultmark *et al.*, 1980; Steiner *et al.*, 1981). Esses peptídeos possuem entre 35-40 resíduos de aminoácidos e uma região N-terminal helicoidal básica, separados por uma dobradiça flexível de uma porção C-terminal com características mais hidrofóbicas (Tossi *et al.*, 2000). Geralmente essas classes de PAMs se encontram

sempre amidadas em seu C-terminal e podem ser ativos principalmente contra bactérias gram-negativas. Entretanto o espectro de sua atividade varia consideravelmente, de modo que as cecropinas A e B podem ser também ativas contra bactérias gram-positivas e fungos, sendo ainda inativos contra células de origem animal em concentrações antimicrobianas (De Lucca e Walsh, 1999; Tossi *et al.*, 2000).

Peptídeos em conformação helicoidal foram encontrados em várias espécies de peixes. As pardaxinas consistem em componentes neurotóxicos encontrados nas secreções tóxicas de diferentes espécies de *Red Sea flat fish (Pardachirus marmoratus)*, também conhecido como linguado (Oren e Shai, 1996). Esses peptídeos possuem características hidrofóbicas se assemelhando as melitinas em atividade e estrutura, possuindo uma região N-terminal hidrofóbica articulada e uma porção C-terminal polar, sendo ativas contra bactérias gram-negativas, porém sendo cerca de 10 vezes menos ativas contra bactérias gram-positivas e eritrócitos (Saberwal e Nagaraj, 1994). Estudos de RMN de fase sólida mostraram que, quando a pardaxina é inserida em bicamadas lipídicas como DMPC (1,2-dimyristoil-fosfatidilcolina), ela possui uma orientação transmembranar. Em contrapartida, em bicamadas lipídicas com caudas hidrofóbicas mais longas, a pardaxina possui uma orientação mais superficial. Essas características se dão por conta do comprimento da cauda hidrofóbica do peptídeo, afetando a membrana hidrofóbica de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina) e POPG (1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilglicerol) (Jafari *et al.*, 2017). Hallock e colaboradores indicaram que o modo de ação das pardaxinas depende do comprimento da cadeia de acil de lipídios, levando a um mecanismo de barreira-barragem em DMPC e um mecanismo de tapete em POPC a pH 4.5 (Hallock *et al.*, 2002).

Amplios estudos são realizados com LL-37, sendo estes peptídeos de defesa do hospedeiro um representante da classe das catelicidinas, eles possuem uma ampla variedade de funções, tais como atividade antimicrobiana e papel na imunidade do hospedeiro (Vandamme *et al.*, 2012). A catelicidina LL-37 pode ser expressa por vários tipos celulares que estão susceptíveis a agentes patogênicos, tais como células epiteliais, intestino, vias aéreas, superfície ocular ou trato reprodutivo, mas também estão presentes em células imunes inatas como neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, células *natural killers*, monócitos e macrófagos (Durr *et al.*, 2006). Sua sequência primária, indica uma clara anfipaticidade, possui 37 resíduos de aminoácidos, sendo catiônico além de adotar uma conformação α -helicoidal. A LL-37 se liga a membrana celular bacteriana carregada negativamente. Após a inserção ela pode ser capaz de induzir a ruptura da membrana resultando em um efeito bactericida (Lee *et al.*, 2011). Além de estar envolvida no sistema imune inato, a LL-37

também exerce efeito como imunomodulador. Após as infecções, a LL-37 atua como sinal de alerta, unindo o sistema inato e adaptativo através do recrutamento de células imunocompetentes para o local da infecção (Verjans *et al.*, 2016). Além disso, as LL-37 modulam os níveis de citocinas inflamatórias, controlando o equilíbrio entre as respostas anti- e pró-inflamatórias. Esse efeito complementa seu papel como antimicrobiano endógeno, além de implicar em vários processos biológicos fundamentais envolvendo células não imunes, como apoptose, angiogênese, re-epitelização, fechamento de ferida e manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal (Otte *et al.*, 2009; Barlow *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011).

PAMs com estruturas em folhas- β

As protegrinas estão entre um dos peptídeos mais estudados dentre as pertencentes ao grupo de folhas- β , sendo elas isoladas de leucócitos porcinos. Esses PAMs apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias gram-negativas e positivas, incluindo *E.coli*, *P. aeruginosa* e *Neisseria gonorrhoeae* (Kokryakov *et al.*, 1993). As protegrinas que aparecem naturalmente na natureza possuem entre 16-18 resíduos de aminoácidos, sendo ricas em resíduos carregados de arginina. As protegrinas possuem a presença de duas folhas- β antiparalelas estabilizadas por duas pontes dissulfeto entre si. A estrutura em solução da variante de protegrinas mais comum que ocorre naturalmente, denotada PG-1 (RGGRLCYCRRRFCVGR-NH₂), é mostrada e teve sua estrutura baseada no estudo de RMN conduzido por Fahrner e colaboradores (Fahrner *et al.*, 1996). Foi demonstrado que as ligações dissulfeto nesses PAMs, impõem restrições rígidas à estrutura do peptídeo. Isto tem o efeito de confinar os resíduos de arginina altamente hidrofílicos carregados positivamente em regiões espaciais distintas, enquanto a estrutura restante consiste em grande parte de resíduos hidrofóbicos (Bolinteanu e Kaznessis, 2011). Sua estrutura rígida dá à PG-1 sua natureza anfipática, comum a muitos outros PAMs. Devido à sua estrutura altamente restrita, PG-1 provavelmente não sofre alterações significativas após a associação com membranas ou após oligomerização (Bolinteanu e Kaznessis, 2011). Acredita-se que a carga altamente catiônica das protegrinas seja essencial para sua capacidade de se ligar mais fortemente às membranas celulares bacterianas, que contêm uma porção significativa de lipídios aniônicos, ao contrário das membranas de mamíferos, que podem ser principalmente compostas de lipídeos zwitteriônicos (Yeaman e Yount, 2003).

A gomesina, um outro representante de peptídeos em formação de folhas- β , consiste em um peptídeo antimicrobiano rico em cisteína de 18 resíduos isolado das células sanguíneas (hemócitos) da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, possuindo duas pontes dissulfeto que ligam as cisteínas Cys2 a Cys15 e Cys6 a Cys11 (Silva *et al.*, 2000). Além disso, a gomesina possui duas modificações pós-translacionais incluindo a ciclização da glutamina N-terminal em ácido piroglutâmico (pGlu ou Z) e amidação da arginina C-terminal (Mandard *et al.*, 2002). A molécula de gomesina é altamente catiônica com a presença de cinco resíduos de argininas e uma lisina além da amidação em sua porção C-terminal e nenhum aminoácido ácido. A gomesina exibe ampla atividade em concentrações bastante baixas (geralmente abaixo de 10 μ M) contra uma gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras (Silva *et al.*, 2000). Além disso, constatou-se que este peptídeo afeta a viabilidade do parasita *Leishmania amazonensis* e apresenta baixa atividade hemolítica contra eritrócitos humanos. Os alinhamentos de sequência sugerem fortemente semelhanças com vários peptídeos antimicrobianos que adotam uma estrutura de folha- β , como taquiplesinas, androctonina e protegrinas (Silva *et al.*, 2000). A estrutura total da gomesina pode ser formada por uma estrutura em forma de grampo com uma extensão de dois resíduos na extremidade do C-terminal. Esta estrutura em forma de grampo consiste em duas cadeias β -antiparalelas formando uma folha torcida (Mandard *et al.*, 2002).

Θ -defensinas são uma família mais nova filogeneticamente dentre as defensinas, onde seus genes provavelmente apareceram por processo de mutação de um gene já existente de α -defensinas em macacos do velho mundo (Lehrer e Ganz, 1999). Essas defensinas podem ser menos numerosas em mamíferos, e podem ser as únicas a apresentarem uma estrutura circular (Jarczak *et al.*, 2013). As θ -defensinas maduras são uma folha- β com duas cadeias circulares que podem ser estabilizadas por três pontes dissulfetos. No entanto, a orientação paralela da disposição das pontes, permitem uma flexibilidade substancial em torno do seu eixo curto (Pasupuleti *et al.*, 2012). Foram identificadas pela primeira vez em neutrófilos e monócitos de macaco *Rhesus* (*Macaca mulatta*), onde, três Θ -defensinas foram identificadas em seus leucócitos: RTD-1 (*Rhesus theta defensin 1*), RTD-2 e RTD-3 (Tang *et al.*, 1999). Além disso, isoformas dessas defensinas foram encontradas em babuínos (*Papio anubis*), sendo quatro encontradas na medula óssea e cinco em leucócitos de sangue periférico (Garcia *et al.*, 2008). As Θ -defensinas podem ser produzidas a partir do resultado de uma quebra de dois nonapeptídeos derivados de uma sequência de 76 resíduos aminoácidos de precursores de α -defensinas (Tran *et al.*, 2008). Esses peptídeos possuem uma atividade antimicrobiana que não possuem alteração devido a presença de sais e cátions divalentes. Primatas como

humanos (*Homo sapiens*), chimpanzés (*Pan troglodytes*), bonobos (*Pan paniscus*) e gorilas (*Gorilla gorilla*) podem ser portadores de pseudogenes de Θ -defensinas, onde, seis pseudogenes foram identificados no genoma humano (cinco deles no cromossomo 8 p23 e um no cromossomo 1) (Welkos *et al.*, 2011). Os transcritos de mRNA de Θ -defensinas, mas não os peptídeos, foram encontrados em órgãos humanos como baço, timo, testículos, músculo esquelético e medula óssea, entretanto, devido a uma mutação no gene DEFT das Θ -defensinas que gera um códon STOP, interrompendo a tradução desse gene (Doss *et al.*, 2009).

PAMs sem estruturas definidas

Indolicidinas podem ser pequenos peptídeos antimicrobianos com 13 resíduos de aminoácidos isolados de neutrófilos bovinos. Sua sequência se mostra rica em triptofanos (39%) e argininas (23%), com seu C-terminal amidado (Falla *et al.*, 1996). Sua atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e positivas, fungos e protozoários não é um resultado de sua estrutura secundária, uma vez que estudos de RMN não demonstraram uma estrutura definida ou anfipaticidade, que é uma das características presentes na maioria dos PAMs (Hsu *et al.*, 2005). Entretanto, as indolicidinas apresentam os domínios hidrofóbicos e carregados positivamente bem marcantes, sendo cruciais para suas interações com agentes bacterianos patogênicos. Estudos demonstraram que as indolicidinas não foram capazes de induzir lise bacteriana, mesmo em concentrações 4 vezes mais elevadas que as concentrações de MIC. Com isso foi excluída o mecanismo de despolarização da membrana e os modelos de formação de poros (Mojsoska e Jenssen, 2015). Esses PAMs podem ser então capazes de se ligar ao DNA inibindo a síntese de DNA responsável pela filamentação celular (Hsu *et al.*, 2005). Estudos mais recentes também demonstraram que a inibição da replicação e transcrição do DNA pode ser devido a região central PWWP dos peptídeos, que pode ser capaz de estabilizar as estruturas de DNA (Ghosh *et al.*, 2014). Visando uma melhora na potência das indolicidinas, varias modificações estruturais foram testadas. Mudanças como a substituição de triptofano por aminoácidos não naturais (Ryge *et al.*, 2004), a expressão de estruturas mutantes como as CP10A (ILAWKWAWWARR-NH₂) e CP11 (ILKKWPWWPWRK-NH₂), incrementando a potência contra bactérias gram-positivas (Friedrich *et al.*, 2001), e aumentando a cationicidade do peptídeo, que melhorou seu perfil hemolítico e atividade contra bactérias gram-negativas (Falla e Hancock, 1997). Além disso

estudos adicionais indicaram que a ciclização das indolicidinas melhoraram sua estabilidade proteolítica sem afetar seu mecanismo de ação e atividade antibacteriana (Rozek *et al.*, 2003).

Histatinas estão entre os PAMs de origem salivar mais estudados (Imamura e Wang, 2014). Histatinas podem ser pequenos peptídeos catiônicos ricos em resíduos de histidina, possuem geralmente de 7 a 38 resíduos de aminoácidos de comprimento e são encontradas em saliva de humanos e outros primatas superiores (Kavanagh e Dowd, 2004), sendo expressos pela parótida e pelas glândulas salivares submandibulares e sublinguais em humanos (Rijnkels *et al.*, 2003). Ele são pertencentes a família de peptídeos ligantes de metal, e possuem a habilidade de inibir collagenases e cisteína proteases, ainda, junto a sua capacidade antimicrobiana e antifúngica, apresentam uma grande aplicação como potencial terapêutico (Gusman *et al.*, 2001). Histatinas 1, 3 e 5 possuem 38, 32 e 24 resíduos, respectivamente, sendo os 22 resíduos iniciais idênticos entre si (Kavanagh e Dowd, 2004). As histatinas 1 e 3 são produtos de genes distintos, a histatina 5 por outro lado, é resultado da clivagem proteolítica da histatina 3 (Oppenheim *et al.*, 1988). Esse fragmento, emergiu como um potente peptídeo antimicrobiano, sendo a histatina mais ativa contra leveduras, como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida dubliniensis* (Sugimoto *et al.*, 2006; Conti *et al.*, 2013; Puri e Edgerton, 2014). Histatinas além de apresentarem uma atividade antifúngica, constituem um elemento extremamente relevante na resposta imune dentro da cavidade oral. Além de possuir ação microbiana por permeabilização da membrana, as histatinas também visam a mitocôndria, ou a proteína mitocondrial F₀F₁ ATPase, causando efluxo de ATP, o que resulta em depleção de conteúdos intracelulares de ATP causando morte celular (Kavanagh e Dowd, 2004; Luque-Ortega *et al.*, 2008).

Propriedades físico-químicas de peptídeos antimicrobianos

As propriedades estruturais de qualquer biomolécula desempenham um papel importante para interpretar sua atividade biológica. Muitos estudos foram conduzidos para dissecar os elementos importantes que definem os peptídeos como "armas" antimicrobianas. Uma grande diversidade de sequências de PAMs existem na natureza, o que contribui para a diversidade estrutural geral, mas existem ainda características evolutivas que foram conservadas para garantir sua atividade em vários tipos de bactérias com diferentes composições de membrana e diferentes alvos. A cationicidade, a hidrofobicidade e a anfipaticidade podem ser os elementos-chave mais importantes que permitem a caracterização de PAMs.

Cationicidade

Uma propriedade muito comum entre diversos PAMs pode ser sua característica catiônica, que é representada pelo número de aminoácidos carregados positivamente (lisina, arginina histidina) presente em sua sequência (Wang, 2013). Vários estudos correlacionam essa característica com a atividade antimicrobiana de peptídeos. A importância dessa propriedade se dá principalmente nas interações entre a carga positiva dos peptídeos e a superfícies negativamente carregada das membranas de bactérias através de interações eletrostáticas (Mojsoska e Jenssen, 2015). Como exemplo, temos a família das defensinas, onde a maioria da atividade de seus membros estão relacionados a sua cationicidade. A defensina humana 5 por exemplo, interage com a superfície bacteriana através de seus resíduos de arginina podendo exercer sua atividade microbiana (Mojsoska e Jenssen, 2015). A mudança dos resíduos de arginina da posição 9 e 28, por resíduos de alanina reduziram a capacidade microbiana dos peptídeos, bem como sua interação com as células hospedeiras (De Leeuw *et al.*, 2009). Entretanto, a carga positiva global de PAMs, pode não ser a principal característica determinante para a atividade antibacteriana, como acontece no caso das α -defensinas humanas que geralmente se apresentam mais ativas contra bactérias gram-positivas do que as beta-defensinas, mesmo as últimas sendo mais catiônicas (Wei *et al.*, 2009). Além disso, a cationicidade apresenta um certo limite, além do qual o aumento da carga não resulta no aumento da atividade antibacteriana. Dathe e colaboradores (2001) demonstraram que o aumento da carga de análogos de magainina-2 de +3 para +5, aumentou a atividade antibacteriana desses peptídeos contra bactérias gram-positivas e negativas devido a relação entre carga e momento hidrofóbico, entretanto, quando aumentada de +6 ou +7, uma perda de atividade microbiana e aumento a propensão hemolítica foi observada (Dathe *et al.*, 2001). Além da carga positiva do peptídeo, foi demonstrado que a posição onde esses resíduos catiônicos estão inseridos também podem ser importantes para a atividade, por exemplo, alterando a posição de alguns resíduos dentro da estrutura da bactericina Bac2A, resultou em um aumento também da atividade microbiana (Hilpert *et al.*, 2006). Além da importância da cationicidade para a interação eletrostática inicial em membranas carregadas negativamente, a carga líquida pode ser importante para a absorção autopromovida de PAMs, onde a interação desses peptídeos com os cátions divalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) da membrana externa causa um deslocamento desses cátions, desestabilizando a membrana, permitindo a adsorção das moléculas de PAMs (Sawyer *et al.*, 1988).

Hidrofobicidade

A hidrofobicidade consiste em uma das características mais determinantes para a atividade microbiana de PAMs, sendo descrita como essencial na literatura. Essa característica afeta o potencial de interação dos peptídeos com as diferentes composições de membrana bacteriana, além disso, direciona o grau de partição do peptídeo na camada lipídica (Mojsoska e Jenssen, 2015). O aumento de hidrofobicidade, esta diretamente relacionada com a perda de especificidade antibacteriana, o que resulta em uma alta taxa de toxicidade em relação às células de mamíferos (Mojsoska e Jenssen, 2015). Yin e colaboradores (2012), mostraram que a substituição de quatro resíduos de alanina por quatro resíduos de leucina, induziu uma maior atividade hemolítica do peptídeo modelo (Yin *et al.*, 2012). Os análogos de magainina-2 com hidrofobicidade variável, também foram usados para demonstrar que pequenas mudanças na hidrofobicidade podem influenciar drasticamente e influenciar a atividade de ligação e permeabilização em membranas (Wieprecht *et al.*, 1997). O efeito na hidrofobicidade de PAMs foi ainda demonstrado usando uma série de peptídeos construídos com repetições de lisina e triptofano. A adição de uma série de repetições destes dois resíduos resultou em aumento paralelo tanto da hidrofobicidade, quanto atividade antimicrobiana. No entanto, quando cinco unidades repetidas estavam presentes na estrutura (Lys, Trp)⁵, um aumento desfavorável no perfil hemolítico (aumento da toxicidade) e diminuição da atividade antimicrobiana foi causada devido à auto-agregação (Gopal *et al.*, 2013). Em conclusão, a hidrofobicidade de uma sequência específica no desenvolvimento de um novo peptídeo antimicrobiano deve ser desafiada, mas não exagerada.

Anfipaticidade

A anfipaticidade dos peptídeos antimicrobianos reflete a abundância e a polarização dos domínios hidrofóbicos e hidrofílicos. Os peptídeos catiônicos naturais, além de apresentarem uma carga líquida variável, pode ser composto por cerca de 50% de resíduos hidrofóbicos, que contribuem para o reconhecimento e interferência com a barreira da membrana citoplasmática, ou absorção auto promovida através de membranas celulares (Mojsoska e Jenssen, 2015). As cargas catiônicas e os grupos hidrofóbicos acabam se agregando em estruturas anfifílicas. Uma medida usada para quantificar a anfipaticidade, é o momento hidrofóbico, que se aplica a peptídeos em conformação de α -hélice, sendo usada como um descritor do papel da anfipaticidade para a atividade antimicrobiana dos peptídeos

(Eisenberg, 1984). A importância da anfipaticidade em peptídeos ainda pode ser controversa, uma vez que diferentes grupos de pesquisa relatam contribuições positivas e negativas, como o aumento de atividade antimicrobiana e o aumento da atividade hemolítica, respectivamente (Pathak *et al.*, 1995; Fernandez-Vidal *et al.*, 2007; Thaker *et al.*, 2013). Um estudo recente, demonstrou que a anfipaticidade pode ser um determinante para a atividade biológica de uma pequena biblioteca de hexapeptídeos lineares e cíclicos ricos em arginina e triptofano, nesse estudo, o posicionamento ideal dos agrupamentos hidrofóbicos pareciam determinar a atividade antimicrobiana e seletividade dos peptídeos (Wessolowski *et al.*, 2004). Em outro estudo utilizando estruturas híbridas de cecropina A e melitina, demonstrou uma maior anfipaticidade e helicidade, correlacionando-se com alta atividade antibacteriana e baixa toxicidade contra células de mamíferos (Andreu *et al.*, 1992). A anfipaticidade nos peptídeos antimicrobianos em conformações de folha- β pode ser caracterizada pelo número de folhas- β organizadas por dois domínios distintos, polares e não polares. As cadeias de β -peptídeos são normalmente estabilizadas através de pontes dissulfeto ou ciclização, o que proporciona uma alta rigidez conformacional em solução aquosa (Mojsoska e Jenssen, 2015). Os domínios polares e não polares em folhas- β permitem que os PAMs interajam com sucesso com membranas alvo, uma vez associadas à membrana, a natureza anfipática permite a interrupção da membrana através da formação de canais transmembranares (Yeaman e Yount, 2003).

Mecanismo de ação de PAMs

O mecanismo molecular de permeabilização e disrupção de membrana por PAMs dependem de vários fatores, tais como sequência de aminoácidos, composição de lipídeos da membrana e concentração dos peptídeos. Atualmente, a demonstração de experimentos relacionados a interação de peptídeos catiônicos se dá principalmente com sistemas de membranas modelo. Alguns estudos também demonstraram essa interação em células microbianas inteiras, com utilização de corantes sensíveis e fluorescentes utilizados na marcação de peptídeos. Esses estudos indicam que todos os PAMs interagem com membranas, sendo divididos em duas classes de mecanismos de ação: 1) mecanismos de rupturas de membrana (barril formador de poros, carpete e agregação micelar) (Figura 5 e 2) mecanismos não disruptivos de membranas (alvos intracelulares) (Powers e Hancock, 2003). Vários modelos para explicar a permeabilização de membranas por PAMs foram propostos, mesmo não existindo um consenso entre os cientistas a esse respeito.

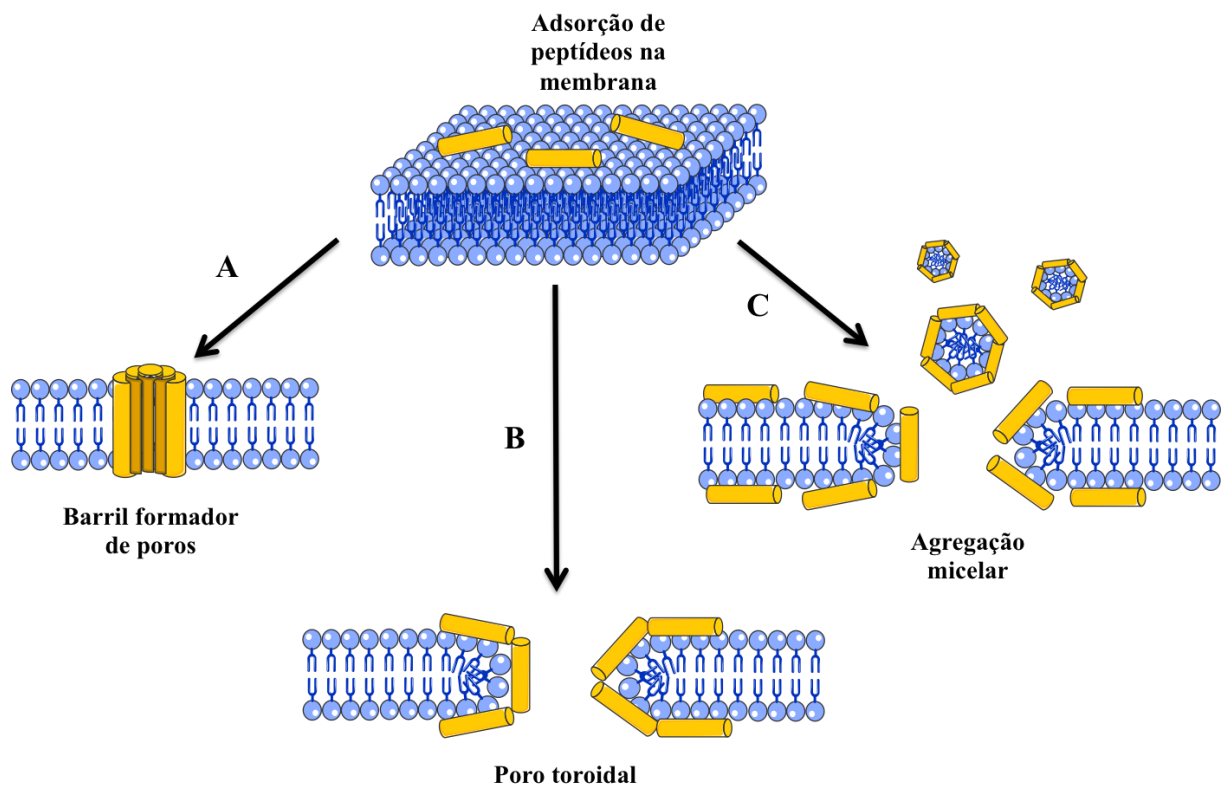


Figura 6. Mecanismo de ação propostos para peptídeos antimicrobianos através de formação de canais.

Membranas de bactérias são carregadas negativamente dependendo do ambiente onde se encontra podendo variar de acordo com o pH, elas carregam os principais grupos de lipídeos, tais como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) ou fosfatidilserina (PS). As membranas de mamíferos ao contrário, podem ser enriquecidas de fosfolipídios zwitteriônicos (carga líquida neutra) como fosfatidiletolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e esfingomiéline (SM) (Yeaman e Yount, 2003). Além desses lipídeos, a presença do colesterol que pode ser um dos principais constituintes das membranas celulares de mamíferos, podem reduzir a atividade de PAMs estabilizando a bicamada, ou algumas vezes interagindo diretamente com esses PAMs, neutralizando sua atividade (Matsuzaki, 1999). A composição da membrana pode ser determinante para que os PAMs tenham seletividade pra seus alvos microbianos.

A aproximação do peptídeo com uma célula bacteriana ocorre inicialmente através de interações eletrostáticas entre um peptídeo catiônico e o lipopolissacarídeo aniônico, sendo esses um dos maiores componentes de membrana de uma bactéria gram-negativa, eles podem ser estabilizados por interações entre cátions divalentes tais como, Mg^{2+} e Ca^{2+} (Hancock e Chapple, 1999). A remoção desses íons, ou o seu deslocamento causado por PAMs, facilita a formação de pontos de instabilidade na membrana, permitindo com que os PAMs se insiram na membrana externa das bactérias, causando um efeito disruptivo que culmina no vazamento

do conteúdo celular (Hancock, 1997). Essa interação pode ser essencial para a atividade de PAMs e muitos mecanismos de ação diferentes foram sugeridos (Jenssen *et al.*, 2006). Esses incluem a formação de poros através de “Barril formador de poros” ou “poro toroidal bem como os mecanismos de “carpete” com base em propriedades de ligação tipo detergente (Nguyen *et al.*, 2011).

O modelo de barril formador de poros foi descrito pela primeira vez na década de 70 (Ehrenstein e Lecar, 1977). De acordo com esse modelo, um número variável de moléculas de peptídeos pode ficar dispostas de maneira a formar um poro ou um canal semelhante a um barril. Nesse mecanismo, as superfícies hidrofóbicas dos peptídeos interagem com as cadeias acil do lipídeos da membrana gerando um poro aquoso constituído de alguns peptídeos (Ehrenstein e Lecar, 1977). Um momento crucial nesse modelo, é que os peptídeos devem reconhecer uns aos outros na membrana carregada negativamente das bactérias, uma vez que pode ser energeticamente desfavorável para um único peptídeo atravessar a membrana, sendo assim, agregados podem ser formados por eles na superfície bacteriana até atingir uma concentração limiar, em seguida, os PAMs se inserem no núcleo hidrofóbico da membrana, forçando os grupos polares dos fosfolipídios para os lados induzindo uma desestabilização local (Yeaman e Yount, 2003). Esse evento se segue através de um recrutamento de mais moléculas de peptídeos em torno do canal, levando a um aumento no tamanho dos poros, matando o microrganismo por extravasamento dos componentes intracelulares (Pasupuleti *et al.*, 2012). Esse tipo de processo de formação de poros, exige propriedades peptídicas específicas em termos de helicidade, tamanho e anfifilicidade, tornando esse mecanismo menos frequente (Pasupuleti *et al.*, 2012). Os poros do tipo barril só foram demonstrados experimentalmente para alguns peptídeos como a alameticina (Qian *et al.*, 2008; Mihajlovic e Lazaridis, 2010). Embora ele seja demonstrado com frequência como modelo para poros transmembranares induzidos por peptídeos, ele só pode ser aplicado a um grupo muito pequeno de PAMs (Pasupuleti *et al.*, 2012).

Ao contrário dos poros do tipo barril, os poros toroidais podem ser formados por uma gama de peptídeos. Assim como no mecanismo de barril, na formação de poros toroidais, os peptídeos adsorvem paralelamente à superfície da membrana (Melo *et al.*, 2009). Assim que certa concentração é alcançada, os peptídeos se inserem na membrana, induzindo uma tensão de curvatura na membrana, resultando em uma abertura chamado de poro toroidal. Ao aumentar ainda mais a concentração de peptídeos, ou simultaneamente com a formação de poros toroidais, um desequilíbrio de potencial químico em toda a bicamada acontece, devido a adsorção de peptídeos no camada externa, resultando na translocação dos peptídeos através da

membrana para a camada interna, que pode ocorrer através de poros toroidais transitórios, ou sem formação de poros (Pokorny e Almeida, 2004). Além disso, a adsorção de peptídeos na região polar dos fosfolipídios, provoca uma expansão lateral da membrana lipídica, permitindo o relaxamento das cadeias de alquilo, resultando na desestabilização, facilitando a ruptura (Mecke *et al.*, 2005).

O modelo de mecanismo de ação denominado "carpete" é um dos modelos mais citado quando se fala de peptídeos antimicrobianos que causam ruptura de membrana (Fernandez *et al.*, 2012). Nele, um acúmulo de peptídeos ocorre na superfície da membrana principalmente devido a interações eletrostáticas (Shai e Oren, 2001). Quando esse acúmulo de peptídeos atinge altos níveis de concentração, ocorre alterações na fluidez da membrana e/ou reduções das propriedades desta membrana e ela torna-se mais permeável a tais peptídeos (Wimley e Hristova, 2011). Porém, alguns peptídeos foram relatados como capazes de atravessar a bicamada lipídica sem causar qualquer tipo de dano, tendo como alvo os componentes intracelulares por bloqueio da atividade enzimática ou inibição da síntese de proteínas e de ácidos nucleicos (Nguyen *et al.*, 2011; Di Luca *et al.*, 2014). Estes mecanismos intracelulares podem ser aumentados pela cationicidade dos PAMs anteriormente mencionadas, causando uma interação entre a carga global positiva e com os grupos carregados negativamente de ácidos nucleicos, lipídeos de membrana e de fosfoproteínas (Da Costa *et al.*, 2015).

Em termos gerais, os mecanismos de morte celular podem ser associados à disfunção da membrana, ou inibição de funções intracelulares, e ainda à inibição de eventos de síntese de biopolímeros extracelulares (Yeaman e Yount, 2003). O evento de disfunção da membrana pode ser baseado no fato de que a barreira citoplasmática provavelmente pode ser a chave da mediação de muitas funções celulares essenciais, tais como a permeabilidade seletiva, energia celular e motilidade (Radhakrishnan *et al.*, 2010). Portanto, conceitualmente, o dano na membrana celular, pode interferir em um ou mais desses processos, levando à morte celular de modo direto ou indireto (Yeaman e Yount, 2003). A inibição da síntese de biopolímeros pode também resultar em morte celular. Por exemplo, a biossíntese dos peptídeoglicanos parece ser essencial para a manutenção da integridade celular e também sua função (Vollmer e Bertsche, 2008). Por conseguinte, qualquer perturbação que venha a ser causada na célula pode culminar na morte desta. Por fim, foi demonstrado que a interrupção de quaisquer processos intracelulares pode levar a uma morte celular (Xiong *et al.*, 2002).

Em última análise, essas observações sugerem que a morte celular por indução de peptídeos antimicrobianos pode ocorrer devido a múltiplos mecanismos de ação ou então de

eventos únicos. Simultaneamente, mesmo atuantes sobre as mesmas espécies microbianas, diferentes mecanismos podem prevalecer sobre os outros, dependendo de vários fatores que podem variar desde as definições ambientais, a fase de crescimento e a presença de respostas imunes (Choi e Lee, 2012a; b). Embora estes modelos contribuam grandemente para um melhor entendimento dos mecanismos de ação dos PAMs, a organização molecular de como ocorre de fato esse rompimento da membrana celular ainda não se encontra compreendida (Wimley e Hristova, 2011). Portanto, as correlações entre sequência-estrutura-atividade continuam a ser um desafio a ser desvendado, e, subsequentemente, o mesmo acontece com o desenho de novos PAMs.

Peptídeos antimicrobianos do tipo catelicidinas

Em meio a inúmeras classes de antimicrobianos, uma das mais conhecidas são as chamadas catelicidinas (Tabela 1). As catelicidinas, juntamente com as defensinas, pertencem ao grande grupo de peptídeos catiônicos com propriedades anfipáticas e representam a principal parte do sistema imunológico em muitos vertebrados, incluindo humanos (Bals e Wilson, 2003). Muitos PAMs podem ser armazenados em grânulos de neutrófilos e macrófagos. Eles fazem parte da atividade independente de oxigênio contra agentes patogênicos. As catelicidinas podem ser peptídeos pequenos que receberam esse nome devido ao seu domínio catelina conservado. A primeira catelicidina encontrada foi descrita no inseto *Hyalophoracecropia*, após um estudo sobre seu sistema imunológico realizado durante 10 anos (Hultmark *et al.*, 1980). Outro membro muito conhecido da família das catelicidinas consiste na magainina, isolada da pele do sapo *X. leavis*, em 1987 (Zasloff, 1987). Em mamíferos, as primeiras catelicidinas pareciam muito ser bactericinas, isoladas no final dos anos 80 de neutrófilos bovinos, que foram nomeadas Bac5 e 7 (Gennaro *et al.*, 1989; Kosciuczuk *et al.*, 2012). Entretanto, alguns autores sugerem que a primeira catelicidina de mamíferos foi isolada de uma espécie de coelho e nomeada CAP18 (Hirata *et al.*, 1990). Até agora, várias catelicidinas foram identificadas em diversas espécies: bovinos (Gennaro *et al.*, 1989), búfalos (Das *et al.*, 2006), cavalos (Scocchi *et al.*, 1999), porcos (Kokryakov *et al.*, 1993), ovelhas (Brogden *et al.*, 2001), cabras (Shamova *et al.*, 1999), veados (Fernandez De Mera *et al.*, 2008), galinhas (Xiao *et al.*, 2006) e algumas espécies de peixes (Uzzell *et al.*, 2003; Durr *et al.*, 2006), enquanto apenas peptídeos individuais foram encontrados em seres humanos (Bals *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001), macacos *Rhesus* (Bals *et al.*, 2001),

camundongos (Gallo *et al.*, 1997), ratos (Termen *et al.*, 2003) e suínos guinéus (Nagaoka *et al.*, 1997).

Recentemente, a primeira catelicidina isolada a partir da peçonha da serpente *Bungarus fasciatus* (Wang *et al.*, 2008) foi descrita. As catelicidinas consistem em um grupo de peptídeos antimicrobianos que apresentam uma grande variação de sequência de aminoácidos (A.A), estrutura e tamanho. Elas podem ser armazenadas nos grânulos de secreção de neutrófilos e macrófagos como precursores inativos (pré-peptídeos) e podem ser libertadas extracelularmente após a ativação de leucócitos como peptídeos maduros, após serem clivados por elastases de neutrófilos (Treffers *et al.*, 2005). Posteriormente, a sua expressão também foi encontrada em células não mielóides, como por exemplo, células epiteliais (Zanetti, 2005). Catelicidinas contêm dois domínios funcionais, devendo o nome dessa classe de peptídeos, à presença da região com uma alta homologia para região catelina, o inibidor de catepsina L. O domínio catelina demonstra uma homologia interespecífica quando analisada sua sequência de A.A, e, por outro lado, o domínio antimicrobiano, localizado no C-terminal, demonstra uma ampla diversidade tanto intraespecífica quanto interespecífica (Bals e Wilson, 2003; Zanetti, 2005). Os domínios C-terminais em algumas catelicidinas possuem conformações α -helicoidais, em outros beta-hairpininas e alguns peptídeos podem ser ricos em prolina/arginina, com o peptídeo maduro variando em tamanho de 12 a 80, ou mais resíduos de aminoácidos (Zanetti *et al.*, 1995).

A família das catelicidinas é composta por cinco grupos de peptídeos, sendo eles: (1) dodecapeptídeos cíclicos com uma ligação dissulfeto, (2) protegrinas com duas ligações dissulfeto, (3) peptídeos com estruturas helicoidais como a catelicidina humana hCAP18; (4) peptídeos com um alto número de resíduos de triptofano como as indolicidinas e peptídeos contendo um alto número de resíduos de prolina e arginina; e (5) peptídeos curtos com repetições em "tandem", tais como as batenecinas (Tomasinsig e Zanetti, 2005; Zanetti, 2005). Todas as catelicidinas são codificadas por genes que são constituídos por quatro éxons. O primeiro éxon consiste na sequência que codifica o peptídeo sinal (pré-peptídeo) de 29-30 resíduos de aminoácidos, enquanto os éxons 2 e 2 codificam o domínio catelina (pré-peptídeo) de 99-114 resíduos de aminoácidos (Kosciuczuk *et al.*, 2012). O éxon 4 codifica o peptídeo maduro, com o domínio antimicrobiano composto de 12-100 resíduos (Kosciuczuk *et al.*, 2012).

Catelicidinas maduras geralmente exibem atividade antimicrobiana contra uma gama de espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Certas catelicidinas podem ser eficazes também para eliminar isolados clínicos de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, ou *P.*

aeruginosa que podem ser resistentes ao tratamento com antimicrobianos convencionais (Zanetti *et al.*, 2002). As catelicidinas também demonstram atividade inibidora contra certos fungos (por exemplo, *C. albicans*), parasitas (por exemplo o *Crypto sporidium parvum*) ou vírus com envelope (por exemplo o vírus da imunodeficiência humana-HIV). Acredita-se que o mecanismo de morte, na maioria dos casos, envolve intercolação e montagem dos peptídeos dentro da membrana bacteriana para romper a integridade da membrana (Oren *et al.*, 1999), embora certas catelicidinas, tais como a porcina RP-39, atinjam alvos intracelulares para bloquear a síntese de proteínas bacterianas (Boman *et al.*, 1993).

Tabela 1. Catelicidinas, sua função e sítio de expressão em algumas espécies de animais de diferentes classes.

Nome do Gene	Nome do peptídeo	Sítio de expressão	Função	Autoria	Número de acesso
Búfalo (<i>Buballus bubalis</i>)					
CATH	Catelicidina	Trato reprodutor feminino	Informação ausente	(Das <i>et al.</i> , 2006)	Q0MX34
Serpente (<i>Bungarus fasciatus</i>)					
	Catelicidina-BF	Glândulas de peçonha, estômago, pele, músculos, coração, pulmões, rins, cérebro, fígado e ovários	Potente peptídeo antimicrobiano contra alguma bactérias Gram-positivas e fungos	(Wang <i>et al.</i> , 2008)	B6D434
Bovina (<i>Bos taurus</i>)					
CATHL5 (BMAP28)	Catelicidina-5 (Peptídeo antimicrobiano BMAP28)	Grandes grânulos dos neutrófilos	Antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas e positivas	(Storici <i>et al.</i> , 1996)	P54229
Bode (<i>Capra hircus</i>)					
ATHL2	Bactenecin-5	Leucócitos	Potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas: <i>S.typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> .	(Shamova <i>et al.</i> , 1999)	P82018
Porco da índia (<i>Cavia porcellus</i>)					
CAP11	Polipeptídeo antimicrobiano catiônico de neutrófilos	Grânulos de neutrófilos	Informação ausente	(Nagaoka <i>et al.</i> , 1997)	Q91X12
Veado (<i>Cervus elaphus hispanicus</i>)					
	Bactenecina	Neutrófilos e medula óssea	Alta atividade contra bactérias Gram-negativas	(Scocchi <i>et al.</i> , 1997; Fernandez De Mera <i>et al.</i> , 2008)	A8QJ91
Cavalo (<i>Equus caballus</i>)					

eCATH-1	Catelicidinamielóide 1	Medula óssea	Informação ausente	(Scocchi <i>et al.</i> , 1999)	O62840
Frango (<i>Gallus gallus domesticus</i>)					
CATHL3	Catelicidina-3	Fígado, medula óssea e pulmão	Potente atividade antimicrobiana	(Xiao <i>et al.</i> , 2006)	Q2IAL6
Humanos (<i>Homo sapiens</i>)					
LL-37	Peptídeo antimicrobiano LL-37	Medula óssea	Atividade antimicrobiana	(Gudmundsson <i>et al.</i> , 1996)	P49913
Primata (<i>Macaca mulatta</i>)					
CAMP (CAP18, FALL39)	Peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAP-18, rhCAP-18)	Epitélio de vários órgãos do trato respiratório e gastrointestinal	Atividade antibacteriana	(Bals <i>et al.</i> , 2001)	Q9GLV5
Rato (<i>Mus musculus</i>)					
Camp (Cramp)	Peptídeo antimicrobiano <i>Cathelin-related</i>	Testículos, baço, estômago e intestino	Potente peptídeo antimicrobiano	(Gallo <i>et al.</i> , 1997)	P51437
Peixe (<i>Myxine glutinosa</i>)					
CATH29	Peptídeo-29 antimicrobiano hematopoiético	Tecidos intestinais	Atividade contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativas	(Uzzell <i>et al.</i> , 2003)	Q71MD5
Coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)					
CAP18	Peptídeo antimicrobiano CAP18	Neutrófilos	Atividade antimicrobiana	(Hirata <i>et al.</i> , 1994)	P25230
Ovelha (<i>Ovis avies</i>)					
CATHL3 (BAC7)	Catelicidina-3 (Bactenecin-7)	Medula óssea	Potente atividade antimicrobiana	(Bagella <i>et al.</i> , 1995)	P50415
Suíno (<i>Sus scrofa domestica</i>)					
PMAP23	Peptídeo antimicrobiano PMAP-23	Medula óssea e fígado	Atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	(Zanetti <i>et al.</i> , 1994)	P49930

A função das catelicidinas não está limitada unicamente à ação antimicrobiana mas estende-se a outros aspectos da imunidade e reparação de tecidos (Nizet e Gallo, 2003). A PR-39 isolada de suínos promove a cicatrização de feridas na pele, estimulando a produção de angiogênese (Gallo *et al.*, 2002). A LL-37 se liga e neutraliza o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), prevenindo a indução de mediadores inflamatórios a partir de monócitos e células endoteliais e inibe o desenvolvimento de endotoxemia letal *in vivo* (Sawa *et al.*, 1998; Ciornei *et al.*, 2003). A LL-37 também pode influenciar a reparação de feridas e tem sido demonstrado que possuem efeitos adicionais relevantes sobre o hospedeiro para a defesa imunológica. A catelicidina humana regula positivamente a expressão de genes epiteliais de quimiocinas e seus receptores (Scott, M. G. *et al.*, 2002), e a própria ainda atua como um quimioatraente para os neutrófilos, monócitos, linfócitos T e mastócitos (Niyonsaba *et al.*, 2002).

Desta forma, a LL-37 atua na orientação da resposta imune do hospedeiro através do recrutamento de leucócitos para o local da infecção (Scott, M. G. *et al.*, 2002). A morte microbiana pode ser efetuada, assim, por fagocitose e amplificada por uma produção robusta de catelicidinas adicionais pelos neutrófilos ativados (Turner *et al.*, 1998) e mastócitos (Di Nardo *et al.*, 2003). Pelo fato das catelicidinas serem amplamente distribuídas dentro da pele e tecidos epiteliais da mucosa, bem como das secreções, tais como saliva e suor (Murakami *et al.*, 2002), elas estão idealmente situadas para servir a um papel de sentinelas multifuncionais efetores da imunidade inata.

Por possuírem ação pró-inflamatória significativa, bem como propriedades antimicrobianas, as catelicidinas representam um papel importante para o hospedeiro na regulação e produção de uma resposta apropriada a estímulos (Nizet e Gallo, 2003). Por exemplo, a produção de catelicidina basal pode ser muito baixa em queratinócitos de pele normal, mas pode ser drasticamente aumentada em resposta a ferimentos ou desafios com o agente patogênico bacteriano *Streptococcus pyogenes* (Dorschner *et al.*, 2001). A produção de catelicidinas em células mielóides podem ser similarmente induzidas em resposta a LPS e infecção bacteriana (Tomasinsig *et al.*, 2002). Recentemente, a função do pró-domínio altamente conservado foi esclarecida em experiências com catelina humana recombinante (Nizet e Gallo, 2003). Essa molécula foi demonstrada com um funcionamento de inibidor de protease de cisteína e por possuir uma atividade antimicrobiana independente que provavelmente é complementar a LL-37 (Zaiou *et al.*, 2003). As porções de catelina podem, simultaneamente, atuar para potenciar a morte bacteriana enquanto limita a injúria tecidual causada por microrganismos e proteases derivadas de neutrófilos (Nizet e Gallo, 2003). Por

fim, a regulação adicional da resposta inflamatória pode ser fornecida por efeitos citotóxicos ou pro-apoptóticos das catelicidinas sobre a proliferação dos linfócitos (Risso *et al.*, 1998).

Catelicidinas de répteis

Como dito anteriormente, catelicidinas vem sendo encontradas em diversos vertebrados, tais como peixes, aves e mamíferos. Entretanto, até o ano de 2008, nenhuma catelicidina havia sido descoberta em répteis. A primeira catelicidina descoberta em répteis foi encontrada na peçonha de uma serpente da china da espécie *B. fasciatus* (Wang *et al.*, 2008). Essa catelicidina foi isolada e caracterizada por Wang e colaboradores (Wang *et al.*, 2008), a partir de uma série de cromatografias com colunas Sephadex G-50 de gel filtração e CM-Sephadex C-25 de troca catiônica, seguida por RP-HPLC. O peptídeo isolado foi denominado de catelicidina-BF, possuindo uma massa de 3637.5 Da (Wang *et al.*, 2008). A catelicidina-BF possui 30 resíduos de aminoácidos e um ponto isoelétrico (PI) de 11.79. Além disso, diferentemente de outras catelicidinas, esta contém um domínio ácido entre o domínio catelina e o peptídeo catelicidina no precursor -BF (Wang *et al.*, 2008). Curiosamente, a catelicidina-BF aponta uma relação evolutiva com a catelicidina descrita em ornitorrinco, podendo indicar provas de características reptilianas no ornitorrinco (Wang *et al.*, 2008). Espectros de dicroísmo circular e RMN demonstraram uma conformação de alfa hélice dessa catelicidina, demonstrando assim uma característica conservada em vários peptídeos que se ligam à membrana bacteriana. Sendo assim, esse peptídeo foi testado contra mais de 40 cepas de microrganismos onde, em 15 delas, foi vista uma atividade antimicrobiana com valores menores que 0,6 μM , indicando uma atividade bactericida, sobretudo sobre bactérias Gram-negativas com concentração inibitória mínima (MIC) de 2,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo muito menor que o controle representado pela ampicilina que apresentou valor de 13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, testes hemolíticos demonstraram que essa catelicidina apresentou hemólise a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em hemácias humanas, entretanto na mesma concentração em testes com células RAW 264.7 não foi observada nenhuma citotoxicidade (Wang *et al.*, 2008).

Mais recentemente, Wei e colaboradores isolaram uma nova catelicidina de uma serpente marinha da espécie *Hydrophis cyanocinctus* (Wei *et al.*, 2015). Essa nova catelicidina denominada Hc-CATH também possui 30 resíduos de aminoácidos, assim como a BF, e também apresenta uma estrutura em alfa-hélice (Wei *et al.*, 2015). Hc-CATH demonstrou uma baixa citotoxicidade para células de mamíferos e sua atividade em bactérias ocorre por ruptura da membrana celular e lise bacteriana (Wei *et al.*, 2015). Em adição, essa

catelicidina exibiu uma potente atividade anti-inflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico (NO) induzida por LPS, assim como de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6. A Hc-CATH se liga diretamente ao LPS neutralizando sua toxicidade além de se ligar aos receptores *Toll-Like 4* (complexo TLR4/MD2) que, por sua vez, inibe a ligação do LPS ao TLR4/MD2, inibindo assim a ativação subsequente de vias de resposta inflamatórias induzidas pelo LPS (Wei *et al.*, 2015). Este estudo demonstra que a Hc-CATH, a primeira catelicidina de serpente marinha, apresenta atividade tanto antimicrobiana quanto anti-inflamatória, sendo um potente candidato para o desenvolvimento de antimicrobianos peptídicos (Wei *et al.*, 2015).

Por fim, Falcao e colaboradores (2014) identificaram a partir de bibliotecas de cDNA de glândulas de peçonha de quatro *pitvipers* (*B. atrox*, *B. lutzi*, *C. durissus terrificus* e *L. muta rhombeata*), além de um elapídeo (*Pseudonaja textilis*), diversos peptídeos antimicrobianos nomeados respectivamente, batroxidina, lutzidina, crotalicidina, lachesidina, Pt_CRAMP1^a e Pt_CRAMP2^a. Todas as espécies foram clonadas e sequenciadas, possuindo sequências variando de 570-585 nucleotídeos, codificados para peptídeos entre 189-194 resíduos de aminoácidos. Assim como outras catelicidinas de peçonhas de serpente, as estruturas primárias de todos os peptídeos apresentam um peptídeo sinal previsto (cerca de 20 AA), seguido pelo domínio catelina altamente conservado e dobrado por duas pontes dissulfeto, e uma região C-terminal com uma sequência dinâmica (Falcao *et al.*, 2014). Essa região C-terminal dos peptídeos consiste em uma fração aniônica variável (25-27 resíduos, ricos em Glu), seguida por uma sessão final de 34 resíduos fortemente catiônica (rica em Lys/Arg) onde se encontra a atividade antimicrobiana. Três PAMs (Batroxicidina, Crotalicidina e Pt_CRAMP1^a) foram escolhidos para síntese química e experimentos de validação, onde todos os três peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias ATCC e isolados clínicos Gram-negativas e positivas. Além disso, os peptídeos Batroxidina e Crotalicidina demonstraram uma moderada toxicidade contra eritrócitos. Falcao e colaboradores demonstraram ainda que parte do peptídeo Crotalicidina, sua porção C-terminal denominada Ctn [15-34], possuía intensa ação antimicrobiana. Em contrapartida sua porção N-terminal Ctn [1-14] não demonstrou nenhuma atividade antimicrobiana em sua concentração máxima de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e baixa toxicidade. Além disso, foi demonstrado por ressonância magnética nuclear que a porção ativa (Ctn [15-34]) possuía uma conformação predominantemente de α -hélice (Falcao *et al.*, 2015).

Sendo assim, baseados nas recém descobertas dos peptídeos acima listados, o presente estudo vem demonstrar, além da ação antimicrobiana dos peptídeos batroxidina e

crotalicidina contra bactérias de isolados clínicos, sua ação imunomodulatória contra células Raw 264.7. Foi utilizado também nesse estudo, o peptídeo Ctn [15-34] como modelo de estudo funcional de uma região própeptídica mimética ligada a região N-terminal. Por fim, tais peptídeos (batroxidina e crotalicidina) foram utilizado como modelo para o desenho racional de novos PAMs (BotrAMP14 e CrotAMP14).

Objetivos

Análise antimicrobiana, imunomodulatória, estrutural e biofísica das catelicidinas batroxidina e crotalicidina oriundas das peçonhas das espécies de serpentes *Botrops atrox* e *Crotallus durissus terrificus*, bem como avaliação de seus derivados Ctn [15-34], E₁₀-Ctn [15-34] e GS₄-Ctn [15-34], além dos desenvolvidos racionalmente BotrAMP14 e CrotAMP14.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos peptídeos acima citados contra diversas linhagens de bactérias ATCC, assim como contra isolados clínicos multirresistentes;
- Avaliar a atividade imunomodulatória *in vitro* dos peptídeos batroxidina e crotalicidina através da dosagem de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios;
- Avaliar a toxicidade dos peptídeos Ctn [15-34], E₁₀-Ctn [15-34], GS₄-Ctn [15-34], BotrAMP14 e CrotAMP14 contra células de linhagens de adenocarcinoma do cólon humano (Caco-2), bem como larvas do lepidóptero *Galleria mellonella*;
- Analisar a ação dos peptídeos BotrAMP14 e CrotAMP14 através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) contra células de *E.coli* ATCC 25922;
- Avaliar *in silico* peptídeos Ctn [15-34], E₁₀-Ctn [15-34], GS₄-Ctn [15-34], BotrAMP14 e CrotAMP14 através de modelagens e dinâmicas moleculares; assim como sua estrutura através de dicroísmo circular;
- Analisar a ação dos peptídeos Ctn [15-34], E₁₀-Ctn [15-34] e GS₄-Ctn [15-34] contra membranas lipídicas miméticas de DOPC/DOPG através da adsorção e reflectometria dos peptídeos.

Capítulo I
Artigo Científico submetido à Cytokines

Antimicrobial and proinflammatory effects of two viperacidins

Nelson Oliveira ^{a,b}, Mirna Freire ^{b,c}, Jeesser Almeida ^d, Taia Rezende ^{b,e,f}, Octávio Franco ^{a,b,g*}

^a Departamento de Medicina, Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil;

^b Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil;

^c Programa de Doutorado da Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brazil;

^d Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil;

^e Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Campus I, Águas Claras, Brasília, Distrito Federal, Brazil;

^f Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil;

^g S-Inova Biotech, Pos-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil.

Nelson Gomes de Oliveira Junior: juroyal@gmail.com

Mirna de Souza Freire: mirnasf@gmail.com

Jeesser Alves de Almeida: jeeser@gmail.com

Taia Maria Berto Rezende: taiambr@gmail.com

Octávio Luiz Franco: ocfranco@gmail.com

*Correspondence

Octávio Luiz Franco

Email: ocfranco@gmail.com

Universidade Católica Dom Bosco - Pós-Graduação em Biotecnologia - Coordinator of S-Inova - CEP: 79117-900

Campo Grande, Mato Grosso do Sul, - Brazil

Phone: +55 67 3312-3300

Abstract

Hospital infections allied to bacterial resistance to antibiotics have become a major worldwide problem. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) are presented as an alternative in the control of these resistant organisms. Besides antimicrobial effects, these molecules play a crucial role in immunity by acting as immunomodulators. These peptides can activate inflammatory cells to produce pro- and anti-inflammatory mediators. In this study we will show the activity against multi-drug resistant bacteria (MDRB) of two cathelicidins from South American pit vipers *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus*, named batroxicidin and crotalicidin. It was observed that both peptides showed activity against MDRB and presented no hemolytic or cytotoxic activity. In addition, the ability of peptides to modulate the production of cytokines TNF- α , IL-10 and IL-6 was analyzed using Raw 264.7 cells in the presence of IFN- γ stimuli, and multi-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* antigens. An up-expression or down-expression of TNF- α , as well as the IL-10 mediator, was observed. The cytokine IL-6, on the other hand, presented only a down-regulation for Raw 264.7 cell groups. In conclusion, the results demonstrate that both peptides presented a predominantly proinflammatory characteristic to the inflammatory mediators dosed. Overall, even presenting a proinflammatory characteristic, these peptides are still promising for future research and development of new potential antimicrobial molecules.

Keywords: antimicrobial peptides, cathelicidins, interleukins, heat killed bacterial antigens, Raw 264.7.

1. Introduction

Nosocomial infections have become one of the most common complications seen in hospitalized patients, increasing mortality and morbidity rates [1]. Concomitantly with nosocomial infections, the incidence of microorganisms resistant to conventional antibiotics has been shown to be an aggravating factor. In this context, where conventional antibiotics are becoming limited against resistant microorganisms, antimicrobial peptides (AMPs) represent an alternative for pathogen control. Antimicrobial peptides are short organic molecules (2-50 amino acids residues), which compose the innate immune system [2, 3]. Moreover, AMPs may also have immunomodulatory activity, which is complex and includes anti-infective immune modulation, such as the induction of cytokines and chemokines [4].

New approaches to treat infection like AMPs can involve the immunology system induction, to act against pathogens. The innate immunity can be responsible for preventing the host to succumb to infection, when it considers the frequent exposure to pathogens [5]. When stimulate the immune system to induce the production of chemokines, a regulation in the production of proinflammatory cytokines for the promotion of wound healing is one way in which infections can be controlled [5]. Since such a process has no direct action on pathogens, the chances of developing resistance are considered low [5]. In this context, several AMPs or host defense peptides demonstrated the ability to activate the host immune system.

Among the several AMP classes and host defense peptides, the cathelicidin-related antimicrobial peptides (CRAMPs) have been widely studied [6]. CRAMPs from several animals, such as pit vipers, present antimicrobial activity [7, 8]. Recently, two viperidins named batroxicidin and crotalicidin [9], isolated from South America pit vipers *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus*, demonstrated pronounced antimicrobial activity against several bacteria and presented a low hemolysis rate. Moreover, no incidences of immunomodulatory activity have been described for either of them. In addition to a

description of activity against multi-drug resistant bacteria (MDRB), this work shed some light on the immunomodulatory effects of two viperacidins, using heat-killed antigens from MDRB in Raw 264.7 cell line.

2. Material and methods

2.1. Peptide Purity Determination

The peptides batroxicidin (KRFKKFFKCLKNSVKKRVKKFFRKPRVIGVTFPF-NH₂) and crotalicidin (KRFKKFFKVKKSVKKRLKKIFKKPMVIGVTIPF-NH₂) used in this study were purchased from Aminotech Ltda (São Paulo, Brazil) (>95% of purity). The mass and sequence of the peptides were confirmed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-ToF) on mass spectrometer Autoflex Speed (Bruker Daltonics) [10]. The synthetic peptides' concentrations were determined using measurements of UV-spectroscopy at 205, 215 and 225 wavelength [11].

2.2. In vitro antimicrobial assays

Primarily, the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) for the American Type Culture Collection (ATCC) bacteria, *K. pneumoniae* 13883, *P. aeruginosa* 27853, *E. coli* 25922 and *S. aureus* 25923, besides the clinically isolated MDRBs, *K. pneumoniae* 1445333, *K. pneumoniae* 1410503, *E. coli* 2101123 and *E. coli* 1812446 were established. All strains were grown in Mueller-Hinton (Himedia) broth overnight at 37 °C. Minimum inhibitory concentration (MIC) measurements were performed using 5x10⁵ CFU per mL⁻¹ and serial dilution series of the peptides batroxicidin and crotalicidin starting at 30,8 µM, in a final volume of 200 µL. Following established protocols the MIC was determined after 24 h of incubation at 37 °C, and was taken to be the lowest peptide concentration with total inhibition of bacterial growth, as

assessed by absorbance measurements in a polystyrene 96 well plates at 600 nm using a microplate reader (Bio-Tek PowerWave HT, EUA). Bacteria in MH broth containing the antibiotics (gentamicin and imipenem at 1 mg.mL⁻¹) were used as negative and positive control respectively. Minimal bactericidal concentrations (MBCs) were determined by plating out 10 µl of the content on MH agar plates of the wells where no bacterial growth was observed. MBC was recorded as the lowest concentration at which no colonies were observed after 24 h incubation at 37 °C. In each case, three technical and biological replicates were used. MIC measurements were performed based on National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

2.3. Cell culture and experimental groups

In order to analyze the vipericidins' immunomodulatory effects, Raw 264.7 cell lineage was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ code 0212) [13]. Cell cultures were incubated (5×10^5 per well) in 96-well culture plates (200 µl of total volume), in supplemented minimum essential medium alpha medium (α -MEM) in a 5% [14] CO₂ incubator at 37 °C and 95% humidity. During cell experiments, cultures were submitted to different stimuli, such as the peptides batroxidin and crotalicidin (3.7 and 3.8 µM respectively), heat-killed (HK) from *K. pneumoniae* 1410503 and *E. coli* 1812446, with and without IFN- γ .

2.4. Preparation and testing of heat killed microbial antigens (HK)

Experimental groups determined for the cytotoxicity and immunomodulation experiments involved the use of stimuli with heat-killed antigens (HK) specific to the previously used microorganisms. The antigens were prepared from the same microorganisms used in the antimicrobial assays: *K. pneumoniae* 1410503 and *E. coli* 1812446, since these

showed a greater susceptibility to the tested AMP. The preparation of these microorganisms involved the collection of freshly picked colonies that were re-suspended in PBS buffer (separately) and quantified by O.D. with further counting in Neubauer's chamber (density 1×10^5 UFC.mL⁻¹) for the bacteria's. Subsequently, they were heated at 120 °C for 50 min and subsequently stored at -20 °C [118, 119]. The death of these microorganisms was confirmed from inoculation of an aliquot of each sample in liquid medium and incubation for more than 24 h. Antigens were tested prior to the cytotoxicity and immunomodulation assays. This test defined the concentration of antigen sufficient to stimulate the response of pre-osteoclast cells Raw 264.7 by analyzing nitrite production in the supernatant culture without promoting cell death. Thus, the concentration for cellular challenge of 1×10^6 UFC.mL⁻¹ was defined.

2.5. Cell viability

In order to assess cell viability after, 24h, cell viability was assessed by the colorimetric MTT assay (Sigma-Aldrich, USA). The MTT is a colorimetric method based on the ability of live cells to reduce the yellow salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) to formazan [16]. After an incubation period, 155 µl of the supernatant was removed and 10 µl of MTT (mg.mL⁻¹) per well was added to the plates. The plates were incubated for 3-4 h in 5% CO₂ at 37 °C and 95% humidity. Further, 60 µl of dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, USA) per well was added in order to block the reaction, followed by 595 nm absorbance reading (Bio-Tek Powerwave HT, USA). Cell viability was expressed as percentage, compared to positive control group, represented by 100% live Raw cells [15].

2.6. Cytokine and nitric oxide production

Nitrite production was evaluated in cell culture supernatant by Griess reaction, as described previously, with some adjustments [16]. The dosage of the inflammatory mediators in the Raw 264.7 cells, using only the IFN- γ and antigen stimuli (*E. coli* 1812446 and *K. pneumoniae* 1410503), was performed previously, aiming to observe the regular production of these mediators by the cells without the presence of the peptides under study. Cytokines produced from culture supernatants were assessed after 6h for MCP-1, 24 h for IL-6, TNF- α , GM-CSF and 72 h for IL-10 [17-19], by the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) method, using the respective murine ELISA development kit (Peprotech, USA). Cytokines levels were expressed as picograms per milliliter (pg.mL⁻¹).

2.7. Statistical analysis

Experimental groups were analyzed using three biological and technical replicates in 96-well culture plates, and the data were presented as mean and error deviation (mean \pm SEM). Before the analysis, the normality of the data was assessed by Kolmogorov-Smirnov test. An analysis of variance (one way ANOVA) was used for comparisons between the studied conditions. Additionally, a statistical post hoc Bonferroni test was applied. Statistical tests were performed in GraphPad Prisma 5.0 software (Instat California, USA), considering $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Antimicrobial activity

MIC and MBC for the viperidins were shown to be promising against ATCC bacteria, but most important against the MDRB, *K. pneumoniae* 1445333, *K. pneumoniae* 1410503, *E. coli* 2101123 and *E. coli* 1812446. As demonstrated in Table 1 the crotalicidin peptide is more active against ATCC bacteria *K. pneumoniae* 13883 (0.9 μ M) and *E. coli*

25922 (0.4 μM) than batroxicidin (1.8 μM both bacteria), but less active against *P. aeruginosa* 27853 (3.8 and 1.8 μM). On the other hand the peptide batroxicidin was shown to be as active as crotalicidin against both clinical isolated *K. pneumoniae* and *E. coli* 2101123 presenting a MIC of 3.7 μM and 1.8 μM respectively. For the clinical isolate *E. coli* 1812446, batroxicidin demonstrated to be more active in relation to crotalicidin (0.9 and 3.8 μM).

Table 1. Antimicrobial activity of the cathelicidins against bacteria, expressed as MIC and MBC. * Clinical isolates.

Microorganisms	Gram	Batroxicidin		Crotalicidin	
		μM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
		MIC	MBC	MIC	MBC
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	-	1.8 (8)	3.7 (16)	0.9 (4)	15.4 (64)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	1.8 (8)	3.7 (16)	3.8 (16)	7.7 (32)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	1.8 (8)	3.7 (16)	0.4 (2)	1.9 (8)
<i>K. pneumoniae</i> 1410503*	-	3.7 (16)	15.0 (64)	3.8 (16)	15.4 (64)
<i>K. pneumoniae</i> 1445333*	-	3.7 (16)	7.5 (32)	3.8 (16)	3.8 (16)
<i>E. coli</i> 2101123*	-	1.8 (8)	15.0 (64)	1.9 (8)	3.8 (16)
<i>E. coli</i> 1812446*	-	0.9 (4)	15.0 (64)	3.8 (16)	15.4 (64)

3.2. Cell viability and inflammatory mediators

Cell viability and inflammatory mediators were analyzed in experimental situations, mimicking inflammatory/infectious conditions in the presence of viperidins. Among several concentrations of peptides tested in the antimicrobial assays, the concentration of 3.7 and 3.8 μM was chosen for cytotoxicity and immune response analyses, to represent the best scenario for MIC results against the different MDRB. In this way, peptide concentrations were equalized in order to compare their activities. Despite their antimicrobial activity, the peptides batroxicidin and crotalicidin by itself was not able to induce cytotoxicity after 24h on Raw 264.7 cultures (Figure 1). However, after the inclusion of stimuli (HK- bacteria, IFN- γ), it's possible to observe that some viability was lost by the cell culture (Figure 1).

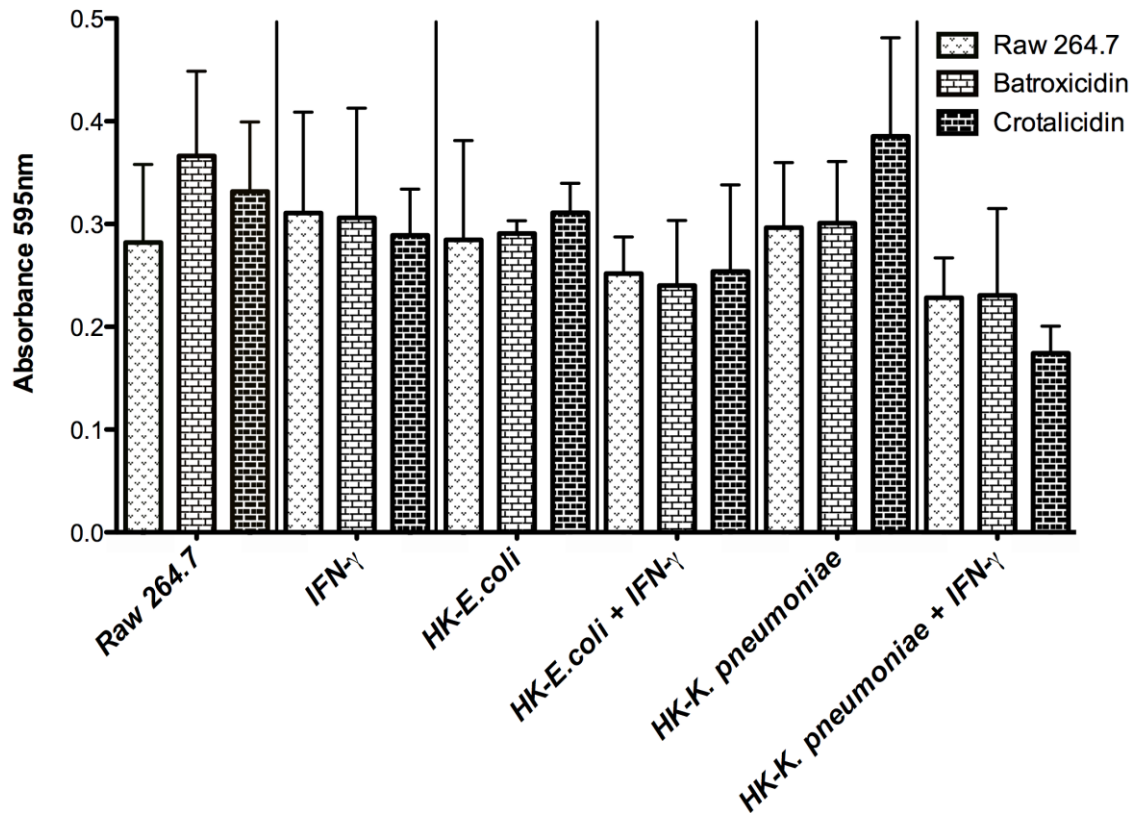


Figure 1. Cytotoxicity of the peptides assessed by MTT for the several experimental situations after 24h. Cell viability represented metabolically-active cells related to the control group (non-treated macrophages). Statistical differences by one-way ANOVA test and Bonferroni post hoc ($p < 0.05$) were represented by the bars. The experiment was conducted independently in technical and biological triplicates. Error bar represent standard deviation (SD).

3.3. Chemokine, proinflammatory cytokine and nitric oxide production

The viperacidins (batroxicidin and crotalicidin) effects, was measured after submitting Raw 264.7 cell culture to several stimuli such as IFN- γ and heat killed bacterial referent to *E. coli* 1812446 and *K. pneumoniae* 1410503. Analyzing the inflammatory mediators GM-CSF and MCP-1 production it was observed that both peptides did not change the Raw 264.7 cell culture behavior even when the cultures were HK and IFN- γ -stimulated (data not shown). As demonstrated in Figure 2A the batroxicidin was unable to stimulate the TNF- α production by itself. Nevertheless, crotalicidin stimulated a slight response in cells cultures (Figure 2A). When IFN- γ was included at the culture, the crotalicidin peptide promoted a down-regulation (42%) of TNF- α mediator, while batroxicidin did not (Figure 2B). Although, when cell

culture was exposed to HK-*E. coli* 1812446 antigen plus IFN- γ an up-regulation of TNF- α was measured for both peptides batroxicidin (91%) and crotalicidin (115%) (Figure 2D). In addition, the cell culture stimulated with Heat Killed of both microorganisms (*E. coli* 1812446 and *K. pneumoniae* 1410503), the peptide batroxicidin again did not show any stimuli, while the crotalicidin peptide decrease the regulation of TNF- α mediator (52%) (Figure 2E).

In relation to IL-6 production, there was only a short down regulation in this cytokine in the presence of batroxicidin (24%), and no response in the presence of crotalicidin (Figure 2G). Although, when the cell culture was treated with HK-*K. pneumoniae* 1410503 antigens plus IFN- γ , a considerable down regulation was observed in the presence of peptides batroxicidin (31.3%) and crotalicidin (37%) (Figure 2L). The production of NO, another inflammatory mediator, was accessed at the cultures with the same stimuli conditions. The crotalicidin presence promoted an up-regulation (43%) in cultures stimulated with HK-*E. coli* 1812446 plus IFN- γ (Figure 2P). No basal production of this mediator was found for the cells treated with other stimuli (IFN- γ , HK antigen of both bacteria and HK-*K. pneumoniae* 1410503 antigen plus IFN- γ) (Figure 2M-O, Q and R).

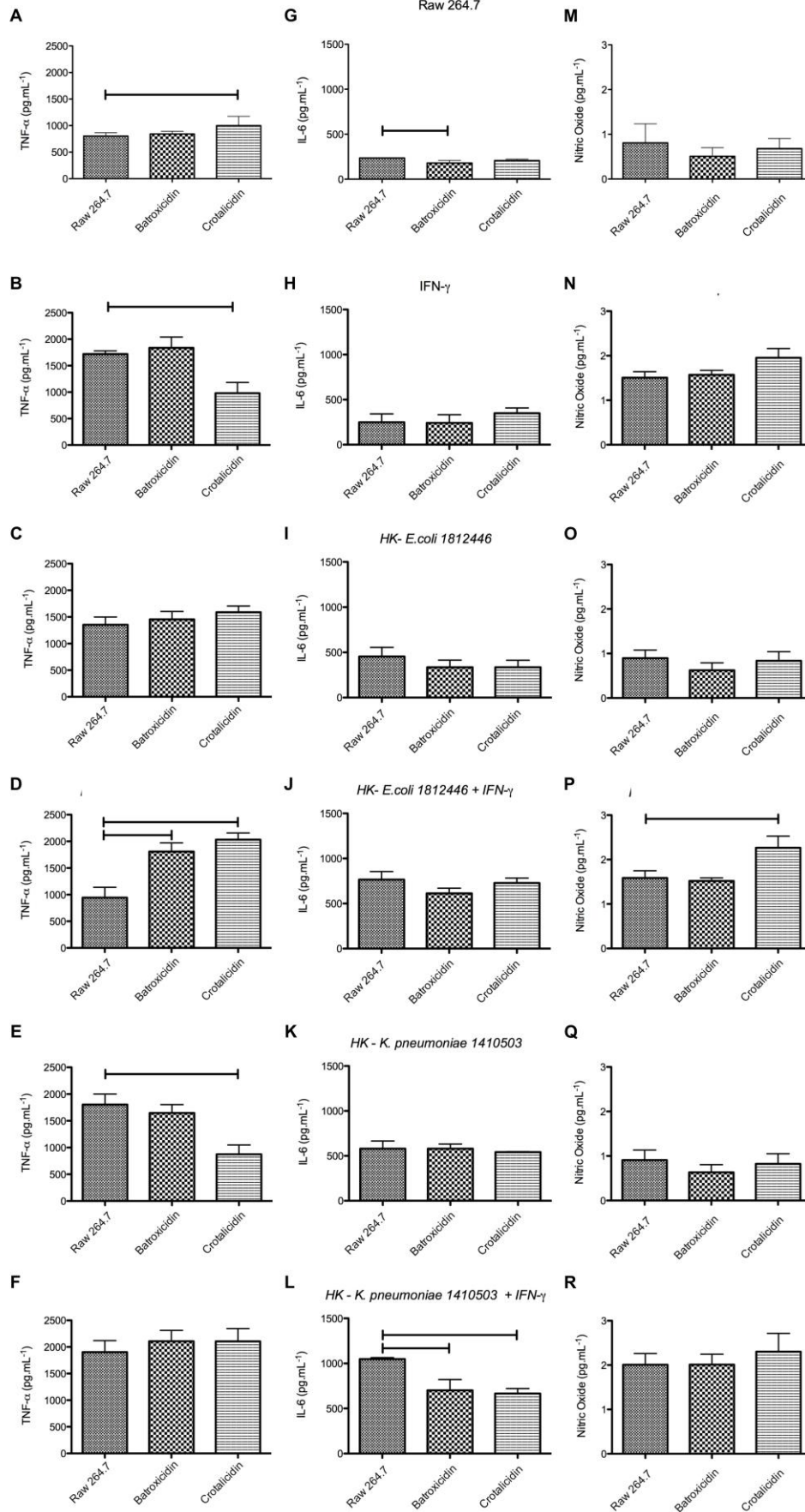


Figure 2. Effects of the peptides batroxicidin and crotalicidin on TNF- α , IL-6 and Nitric Oxide levels by Raw 264.7 (A,G and M) cells culture exposed to IFN- γ (B, H and N), HK-*E. coli* 1812446 (C, I and O), HK-*E. coli* 1812446 plus IFN- γ (D, J and P), HK-*K. pneumoniae* 1410503 (E, K and Q), and HK-*K. pneumoniae* 1410503 plus IFN- γ (F, L and R). Statistical differences by one-way ANOVA test and Bonferroni post hoc (<0.05) were represented by the bars. The experiment was conducted independently in technical and biological triplicates. Error bar represent standard deviation (SD).

To reach a more thorough understanding of batroxicidin and crotalicidin effects on anti-inflammatory mediators, the IL-10 cytokine was measured. The crotalicidin peptide promoted an increase in IL-10 production for unstimulated cells (42.3%) (Figure 3A), in addition to a slight increase when stimulated by the HK-*K. pneumoniae* 1410503 antigen (23%) (Figure 3E). However, the same peptide decreases IL-10 production by 26% only for the HK-*E. coli* 1812446-stimulated group (Figure 3C).

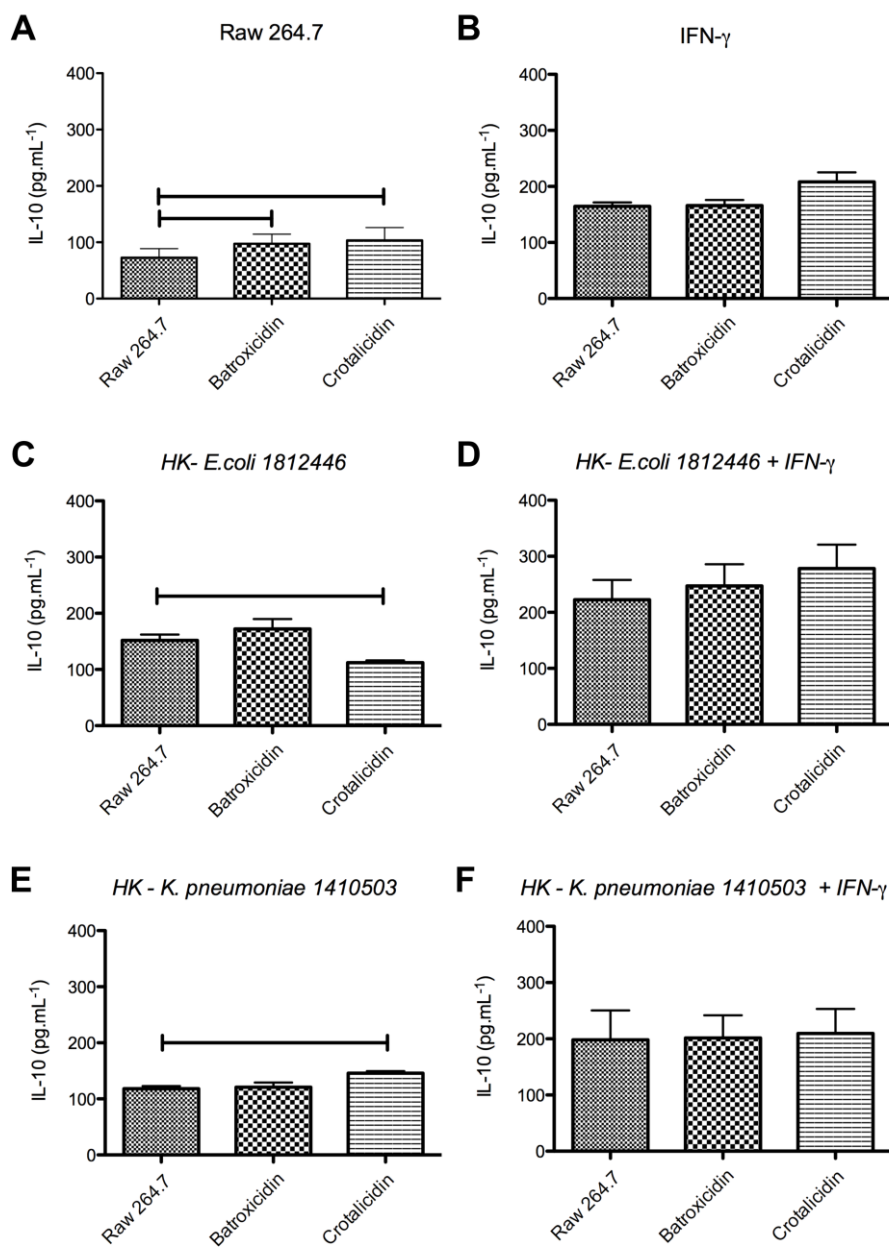


Figure 3. Effects of the peptides batroxicidin and crotalicidin on IL-10 levels at Raw 264.7 cells culture exposed to different stimuli. A. Cell culture with no stimuli. B. Cell culture stimulated with IFN- γ . C. Cell culture stimulated with HK-*E. coli* 1812446. D. Cell culture stimulated with HK-*E. coli* 1812446 plus IFN- γ . E. Cell culture stimulated with HK-*K. pneumoniae* 1410503. F. Cell culture stimulated with HK-*K. pneumoniae* 1410503 plus IFN- γ . Statistical differences by one-way ANOVA test and Bonferroni post hoc ($p < 0.05$) were represented by the bars. The experiment was conducted independently in technical and biological triplicates. Error bar represent standard deviation (SD).

Based on the analyses presented, the batroxicidin peptide appears to have a poorer immunomodulatory potential in the Raw 264.7 cells when compared to crotalicidin (Figure 4). These characteristics can be observed when analyzing the number of stimulated groups in

the monocytes, besides the percentage of modulation that each peptide promoted for the inflammatory and anti-inflammatory mediators TNF- α , IL-6, NO and IL-10.

Experimental groups	Batroxicidin	Crotalicidin
Raw 264.7		
Nitric oxide	-	-
TNF- α	-	↑
IL-6	↓	-
IL-10	↑	↑
IFN-γ		
Nitric oxide	-	-
TNF- α	-	↓
IL-6	-	-
IL-10	-	-
HK- <i>E.coli</i> 1812446		
Nitric oxide	-	-
TNF- α	-	-
IL-6	-	-
IL-10	-	↓
HK- <i>K. pneumoniae</i> 1410503		
Nitric oxide	-	-
TNF- α	-	↓
IL-6	-	-
IL-10	-	↑
HK- <i>E.coli</i> 1812446 + IFN-γ		
Nitric oxide	-	↑
TNF- α	↑	-
IL-6	-	-
IL-10	-	-
HK- <i>K. pneumoniae</i> 1410503 + IFN-γ		
Nitric oxide	-	-
TNF- α	-	↑↓
IL-6	↓	↓
IL-10	-	-

Figure 4. Summary of immunomodulatory potential results for AMPs batroxicidin and crotalicidin. Arrows represent a down-regulation an up-regulation mediators

4. Discussion

AMPs have the ability to modulate innate immune pathways therefore, it is not surprising that they have selective effects on inflammatory processes depending on the related agonists. As has been shown for cathelicidin LL-37 that acts on different agonists of Toll-like receptors (TLR), where one can observe the inhibition of some inflammatory responses together with the induction of others [20]. Based on *in vitro* and *in vivo* analysis, the immunomodulatory AMPs effects have been widely studied with cathelicidins and defensins being the best-characterized [21]. Standard experiments which are performed to evaluate the immunomodulatory response of AMPs, include measurements *in vitro* of inflammatory and antiinflammatory mediators from immune cells [22]. AMPs are usually co-administered with immune ligands, such as lipopolysaccharide (LPS) or even heat-killed microorganisms mimicking situations of immune-inflammatory response resulting on changes in cytokines productions that are measured [23]. Based on scientific literature, it is clear that AMPs are intricate in activating both proinflammatory and antiinflammatory immune responses, and do so through divergent mechanisms that vary on biological context [23]. AMPs that induce immunomodulation are very common: Early study using mice, demonstrated that the cathelicidin LL-37 have a potent antiseptis activity inhibiting macrophage stimulus by bacterial endotoxins like LPS, protecting the mice from endotoxemia [24]. LL-37 up-regulated production of MCP-1, IL-8, but not TNF- α , leading to employment of immune components to the site of infection [25]. More specifically, LL-37 chemoattracts leukocytes via the formyl peptide receptor-like 1 [26].

The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of two cathelicidins (batroxicidin and crotalicidin) in a mimetic infection model on Raw 264.7 cell line. Although initially, some MIC analysis was performed in order to select the concentration used for the immunomodulatory assays. The antimicrobial results presented here are in agreement with other

studies that showed snake venom cathelicidins' activity against clinically isolated bacteria, as well as low hemolytic effects, which can be related to alpha-helical structure [9, 27, 28]. MIC for batroxidin and crotalicidin peptides, achieved in this study for ATCC bacteria, presented to be a little difference from Falcao *et al.* [9]. Maybe this divergence may be due the quantification methods. On the other hand, MIC values for clinical isolated bacteria, was quite similar. Regarding cytotoxic effects, interestingly the high antimicrobial activity for both peptides at 3.7 and 3.8 μM , was complemented by their low toxicity in the same concentration, when alone with the Raw 264.7 cells after 24h. Even in the presence of several stimuli, the cell viability was higher than 50%. The absence of cytotoxic effects or soft cytotoxic effects using cell line Raw 264.7 has been described previously for several different cathelicidins in concentrations higher than those used in this study, including cathelicidins from snakes and mammals [28-30].

Cathelicidin-related AMPs have a crucial role at innate immune defense [31, 32]. Thus, the effect of batroxidin and crotalicidin on Heat killed bacteria-induced immune response of Raw 264.7 cell was investigated. The data indicated that the CRAMP crotalicidin, in the presence only of the IFN- γ and HK-*K. pneumoniae* stimuli, down-regulated TNF- α expression on macrophages Raw 264.7 culture. However, when both stimuli are presented, the peptide up-regulated TNF- α expression. Regarding IFN- γ stimuli. IFN- γ cytokine has one of the most important functions of sensitizing macrophages to activation by challenge with pathogenic products [33]. IFN- γ stimulates macrophages by mediating the signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) [34]. STAT1 are modulated by the phosphorylation of tyrosin 701 (Y701) and serine 727 (S727) [35], which depends at mitogen-activated protein kinase (MAPK) [36, 37]. By saying that, Nijnik *et al.* (2009) demonstrate that the cathelicidin LL-37 (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) significantly inhibited TNF- α production in response to IFN- γ stimulation. The same study demonstrate that the cathelicidin LL-37, at least in monocytes,

was not associated to inhibition of the STAT1 signaling pathway, but instead, the peptide was related to p38 MARK inhibition. In the innate immunity modulation of LL-37 on IFN- γ , it can be a set of the system that softens the initial immune responses, especially involving intracellular pathogens, preventing an excess of inflammation [32]. Due these results we can associate the TNF- α suppression to p38 MARK inhibition by LL-37.

Regarding HK-*K. pneumoniae* stimuli. The innate immune response, which provides the first phase of protection against infection, requires macrophages to recognize and respond to pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) as well as host-derived factors [33]. The PAMPs are ligands for “pattern recognition receptors” (PRRs) expressed on immune cells [38]. Gram-negative bacteria and LPS activate and are sensed by the PRR Toll-like receptor 4 (TLR-4) [39]. The TLRs recognize several pathogen components including bacterial cell wall constituents, dsRNA and bacterial flagellin [40], being the LPS (TLR-4 ligand) the major component of gram-negative bacteria, representing critical actor in the pathogenesis of gram-negative sepsis [41, 42]. Extensively studies have been demonstrating the ability of cathelicidins to bind LPS of gram-negative bacteria, inactivating their binding to TLR-4 receptors [30, 43, 44]. Recently, Horibe et al. (2013) demonstrate the effects of CRAMP (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) on TNF- α secretion in bone marrow macrophage BMMs cell culture, observing the inhibition of this cytokine by CRAMP preventing LPS stimuli [44]. In the same study, CRAMP (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) was able to down-regulates TNF- α expression on Raw 264.7 cells stimulated with flagellin. Wei et al. (2013) also demonstrated that cathelicidin-PY (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) highly inhibit the expression of TNF- α in the presence of LPS in Raw 264.7 cell culture. Most recently, Coorens et al. (2017) demonstrated that seven different cathelicidins (20 μM) have the ability to bind LPS inhibiting TLR4 activation, and other six cathelicidins have the ability to bind LTA inhibiting TLR2 activation [45]. Coorens *et al.* (2017) still demonstrated by confocal microscopy and flow cytometry, the ability of the cathelicidins CATH-2 and LL-

37 to inhibit *E. coli*-induced macrophage activation when *E. coli* O78 was heat killed. Moreover, demonstrated the ability of LL-37 to inhibits TLR-4 activation in HEK-TLR cells, by LPS and *E. coli* O78 heat killed at same level. Given the literature presented, we can correlate the decrease in TNF- α expression for the cells stimulated with HK-*K pneumoniae*, with the interaction of the peptide crotalicidin with the LPSs that constituted the cell wall of the bacteria killed by heat. Finally, regarding batroxicidin and crotalicidin peptide up-regulated TNF- α in the presence of HK-*E.coli* plus IFN- γ and HK-*K. pneumoniae* plus IFN- γ stimuli, respectively. Given the literature presented above. This may be due to the fact that, peptides of the cathelicidin class, as mentioned above, have the ability to bind to the major component of the bacterial membranes (LPS), preventing their stimulation in macrophages [30, 44, 45]. This binding between LPS and cathelicidins may leave IFN- γ groups free, allowing them to stimulate STAT1 [33] causing an inflammatory response in Raw 264.7 cells, up-regulating TNF- α expression.

Furthermore, the data for the proinflammatory mediator IL-6, illustrated the opposite effect as demonstrated for TNF- α , presenting a down-regulation for the groups stimulated with HK-*K. pneumoniae* plus IFN- γ for both peptides. The inflammatory mediator IL-6 can be classified as a pro- and anti-inflammatory cytokine, depending on the receptor used by it, Th1 or Th2. IL-6 may have the ability to suppress TNF- α production during the infectious process rather than acting against infections in the regulation of immune reactions [46]. In our study, during the mimetic infection caused by the treatment with *K. pneumoniae* 1410503 plus IFN- γ antigens, the inflammatory mediator IL-6 was unable to cause TNF- α mediator suppression, since the cytokine IL-6 production was down-regulated by crotalicidin peptide. It was recently demonstrated that, cathelicidin-WA (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was able to suppress mRNA relative expression of IL-6 in *E.coli* K88-induced Raw 264.7 cells, in contrast, up-regulated IL-10 mRNA relative expression [47]. IL-10 is an anti-inflammatory mediator with a crucial

role in the prevention of inflammatory pathologies, limiting the immune response to pathogens [48]. This can be observed for the crotalicidin peptide when stimulated with antigens of *K. pneumoniae* 1410503. In contrast, the opposite effect is observed when stimulated with antigen of *E. coli* 1812446. Nevertheless, the production of IL-10 can also incorrectly restrict protective immune responses, which can contribute to chronic infection [49].

5. Conclusion

In conclusion, the peptides batroxicidin and crotalicidin presented antimicrobial activity with no cytotoxic effects, although they demonstrated mostly inflammatory characteristics when tested in Raw 264.7 culture in the presence of MDRB heat-killed antigens and IFN- γ . In spite of their predominantly proinflammatory characteristics in the presence of Raw 264.7 cells, these peptides still show promise in the fight against MDRB, and consequently diseases like pneumonia, urinary infection and nosocomial infections associated with gram negative bacteria; therefore, further studies should be performed using these peptides as templates, aiming to improve their activities.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT) and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- [1] Y.Y. Chen, Y.C. Chou, P. Chou, Impact of nosocomial infection on cost of illness and length of stay in intensive care units, *Infect Control Hosp Epidemiol* 26(3) (2005) 281-7.
- [2] J.M. Ageitos, A. Sanchez-Perez, P. Calo-Mata, T.G. Villa, Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria, *Biochem. Pharmacol.* 133 (2017) 117-138.
- [3] E. Guani-Guerra, T. Santos-Mendoza, S.O. Lugo-Reyes, L.M. Teran, Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease, *Clin Immunol* 135(1) (2010) 1-11.
- [4] M. Hemshekhar, V. Anaparti, N. Mookherjee, Functions of Cationic Host Defense Peptides in Immunity, *Pharmaceuticals (Basel)* 9(3) (2016).
- [5] C. Ghosh, J. Haldar, Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides, *ChemMedChem* 10(10) (2015) 1606-24.
- [6] M. Pazgier, B. Ericksen, M. Ling, E. Toth, J. Shi, X. Li, A. Galliher-Beckley, L. Lan, G. Zou, C. Zhan, W. Yuan, E. Pozharski, W. Lu, Structural and functional analysis of the pro-domain of human cathelicidin, LL-37, *Biochemistry* 52(9) (2013) 1547-58.
- [7] R. Ramos, J.P. Silva, A.C. Rodrigues, R. Costa, L. Guardao, F. Schmitt, R. Soares, M. Vilanova, L. Domingues, M. Gama, Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37, *Peptides* 32(7) (2011) 1469-76.
- [8] Y. Wang, J. Hong, X. Liu, H. Yang, R. Liu, J. Wu, A. Wang, D. Lin, R. Lai, Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics, *PLoS One* 3(9) (2008) e3217.
- [9] C.B. Falcao, B.G. de La Torre, C. Perez-Peinado, A.E. Barron, D. Andreu, G. Radis-Baptista, Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers, *Amino Acids* 46(11) (2014) 2561-71.

- [10] J.A. Gutierrez, J.A. Dorocke, M.D. Knierman, V. Gelfanova, R.E. Higgs, N.L. Koh, J.E. Hale, Quantitative determination of peptides using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Biotechniques Suppl* (2005) 13-7.
- [11] P.J. Niebergall, A.M. Mattocks, A note on the use of multiple regression for spectrophotometric assays involving more than one component, *Drug Stand* 28 (1960) 61-4.
- [12] NCCLS, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, in: N.d.M.-A.I. 1-56238-486-4] (Ed.) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- [13] P. Ralph, I. Nakoinz, Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS, *J Immunol* 119(3) (1977) 950-54.
- [14] A.A. van de Loosdrecht, R.H. Beelen, G.J. Ossenkoppele, M.G. Broekhoven, M.M. Langenhuijsen, A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia, *J Immunol Methods* 174(1-2) (1994) 311-20.
- [15] B.T. Kurien, R.H. Scofield, Western blotting, *Methods* 38(4) (2006) 283-93.
- [16] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126(1) (1982) 131-8.
- [17] C. Lee, J.W. Lee, J.Y. Seo, S.W. Hwang, J.P. Im, J.S. Kim, Lupeol inhibits LPS-induced NF-kappa B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates acute and chronic murine colitis, *Life Sci.* 146 (2016) 100-8.
- [18] M.F. Shih, L.C. Chen, J.Y. Cherng, Chlorella 11-peptide inhibits the production of macrophage-induced adhesion molecules and reduces endothelin-1 expression and endothelial permeability, *Mar Drugs* 11(10) (2013) 3861-74.

- [19] Y. Song, X. Liu, H. Yue, J. Ji, H. Dou, Y. Hou, Anti-inflammatory effects of benzenediamine derivate FC-98 on sepsis injury in mice via suppression of JNK, NF-kappaB and IRF3 signaling pathways, *Mol Immunol* 67(2 Pt B) (2015) 183-92.
- [20] N. Mookherjee, K.L. Brown, D.M. Bowdish, S. Doria, R. Falsafi, K. Hokamp, F.M. Roche, R. Mu, G.H. Doho, J. Pistic, J.P. Powers, J. Bryan, F.S. Brinkman, R.E. Hancock, Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37, *J Immunol* 176(4) (2006) 2455-64.
- [21] D.M.E. Bowdish, D.J. Davidson, R.E.W. Hancock, Immunomodulatory Properties of Defensins and Cathelicidins, in: W.M. Shafer (Ed.), *Antimicrobial Peptides and Human Disease*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006, pp. 27-66.
- [22] D.M. Bowdish, D.J. Davidson, M.G. Scott, R.E. Hancock, Immunomodulatory activities of small host defense peptides, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(5) (2005) 1727-32.
- [23] E.Y. Lee, M.W. Lee, G.C.L. Wong, Modulation of toll-like receptor signaling by antimicrobial peptides, *Semin Cell Dev Biol* (2018).
- [24] N. Mookherjee, K.L. Brown, D.M.E. Bowdish, S. Doria, R. Falsafi, K. Hokamp, F.M. Roche, R. Mu, G.H. Doho, J. Pistic, J.-P. Powers, J. Bryan, F.S.L. Brinkman, R.E.W. Hancock, Modulation of the TLR-Mediated Inflammatory Response by the Endogenous Human Host Defense Peptide LL-37, *The Journal of Immunology* 176(4) (2006) 2455-2464.
- [25] M.G. Scott, D.J. Davidson, M.R. Gold, D. Bowdish, R.E.W. Hancock, The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses, *The Journal of Immunology* 169(7) (2002) 3883-3891.
- [26] K. Kurosaka, Q. Chen, F. Yarovinsky, J.J. Oppenheim, D. Yang, Mouse Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Chemoattracts Leukocytes Using Formyl Peptide Receptor-Like 1/Mouse Formyl Peptide Receptor-Like 2 as the Receptor and Acts as an Immune Adjuvant, *The Journal of Immunology* 174(10) (2005) 6257-6265.

- [27] C.B. Falcao, C. Perez-Peinado, B.G. de la Torre, X. Mayol, H. Zamora-Carreras, M.A. Jimenez, G. Radis-Baptista, D. Andreu, Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity, *J. Med. Chem.* 58(21) (2015) 8553-63.
- [28] D. Kim, N. Soundrarajan, J. Lee, H.S. Cho, M. Choi, S.Y. Cha, B. Ahn, H. Jeon, M.T. Le, H. Song, J.H. Kim, C. Park, Genome wide analysis of the antimicrobial peptides in *Python bivittatus* and characterization of cathelicidins with potent antimicrobial activity and low cytotoxicity, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2017).
- [29] K. Thivierge, S. Cotton, D.A. Schaefer, M.W. Riggs, J. To, M.E. Lund, M.W. Robinson, J.P. Dalton, S.M. Donnelly, Cathelicidin-like helminth defence molecules (HDMs): absence of cytotoxic, anti-microbial and anti-protozoan activities imply a specific adaptation to immune modulation, *PLoS Negl Trop Dis* 7(7) (2013) e2307.
- [30] L. Wei, J. Yang, X. He, G. Mo, J. Hong, X. Yan, D. Lin, R. Lai, Structure and function of a potent lipopolysaccharide-binding antimicrobial and anti-inflammatory peptide, *J. Med. Chem.* 56(9) (2013) 3546-56.
- [31] R.E. Hancock, G. Diamond, The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends Microbiol* 8(9) (2000) 402-10.
- [32] A. Nijnik, J. Pistic, A. Wyatt, S. Tam, R.E. Hancock, Human cathelicidin peptide LL-37 modulates the effects of IFN-gamma on APCs, *Journal of Immunology* 183(9) (2009) 5788-98.
- [33] K. Schroder, M.J. Sweet, D.A. Hume, Signal integration between IFN-gamma and TLR signalling pathways in macrophages, *Immunobiology* 211(6-8) (2006) 511-24.
- [34] M.A. Meraz, J.M. White, K.C. Sheehan, E.A. Bach, S.J. Rodig, A.S. Dighe, D.H. Kaplan, J.K. Riley, A.C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R.N. DuBois, R. Clark,

- M. Aguet, R.D. Schreiber, Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway, *Cell* 84(3) (1996) 431-42.
- [35] L. Varinou, K. Ramsauer, M. Karaghiosoff, T. Kolbe, K. Pfeffer, M. Muller, T. Decker, Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity, *Immunity* 19(6) (2003) 793-802.
- [36] K. Ramsauer, I. Sadzak, A. Porras, A. Pilz, A.R. Nebreda, T. Decker, P. Kovarik, p38 MAPK enhances STAT1-dependent transcription independently of Ser-727 phosphorylation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20) (2002) 12859-64.
- [37] A.H. Dalpke, S. Eckerle, M. Frey, K. Heeg, Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine signaling, *Eur J Immunol* 33(7) (2003) 1776-87.
- [38] P.N. Moynagh, TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway, *Trends Immunol* 26(9) (2005) 469-76.
- [39] M.J. Paul-Clark, S.K. McMaster, E. Belcher, R. Sorrentino, J. Anandarajah, M. Fleet, S. Sriskandan, J.A. Mitchell, Differential effects of Gram-positive versus Gram-negative bacteria on NOSII and TNFalpha in macrophages: role of TLRs in synergy between the two, *Br. J. Pharmacol.* 148(8) (2006) 1067-75.
- [40] T. Kawai, S. Akira, TLR signaling, *Cell Death Differ* 13(5) (2006) 816-25.
- [41] B. Beutler, E.T. Rietschel, Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin, *Nat Rev Immunol* 3(2) (2003) 169-76.
- [42] A. Aderem, R.J. Ulevitch, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature* 406(6797) (2000) 782-7.
- [43] I. Nagaoka, S. Hirota, F. Niyonsaba, M. Hirata, Y. Adachi, H. Tamura, D. Heumann, Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of

TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells, *J Immunol* 167(6) (2001) 3329-38.

[44] K. Horibe, Y. Nakamichi, S. Uehara, M. Nakamura, M. Koide, Y. Kobayashi, N. Takahashi, N. Udagawa, Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis, *Immunology* 140(3) (2013) 344-51.

[45] M. Coorens, M.R. Scheenstra, E.J. Veldhuizen, H.P. Haagsman, Interspecies cathelicidin comparison reveals divergence in antimicrobial activity, TLR modulation, chemokine induction and regulation of phagocytosis, *Sci Rep* 7 (2017) 40874.

[46] R. Schindler, J. Mancilla, S. Endres, R. Ghorbani, S.C. Clark, C.A. Dinarello, Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF, *Blood* 75(1) (1990) 40-7.

[47] S. Chen, Z. Lu, F. Wang, Y. Wang, Cathelicidin-WA polarizes E. coli K88-induced M1 macrophage to M2-like macrophage in RAW264.7 cells, *Int Immunopharmacol* 54 (2018) 52-59.

[48] L. Gabrysova, A. Howes, M. Saraiva, A. O'Garra, The regulation of IL-10 expression, *Curr Top Microbiol Immunol* 380 (2014) 157-90.

[49] K.W. Moore, R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, A. O'Garra, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor, *Annu Rev Immunol* 19 (2001) 683-765.

Capítulo II
Artigo Científico aceito pela Scientific
Reports

An acidic model pro-peptide affects the secondary structure, membrane interactions and antimicrobial activity of a crotalacidin fragment

Nelson G. O. Júnior^{1,2,3}, Marlon H. Cardoso^{1,3,4}, Elizabete S. Cândido^{1,4}, Daniëlle van den Broek², Niek de Lange², Nadya Velikova⁵, J. Mieke Kleijn², Jerry M. Wells⁴, Taia M. B. Rezende^{1,6}, Octávio Luiz Franco^{1,3,4}, Renko de Vries^{2*}.

¹*Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, Brazil*

²*Physical Chemistry and Soft Matter, Wageningen University, Stippeneng 4, 6708 WE Wageningen, the Netherlands*

³*Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil*

⁴*S-inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, Brazil*

⁵*Host-Microbe Interactomics, Wageningen University, P.O. Box 338, 6700AH Wageningen, the Netherlands*

⁶*Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, Brazil.*

* *corresponding author, renko.devries@wur.nl*

Abstract – In order to study how acidic pro-peptides inhibit the antimicrobial activity of antimicrobial peptides, we introduce a simple model system, consisting of a 19 amino-acid long antimicrobial peptide, and an N-terminally attached, 10 amino-acid long acidic model pro-peptide. The antimicrobial peptide is a fragment of the crotalidicin peptide, a member of the cathelidin family, from rattlesnake venom. The model pro-peptide is a deca (glutamic acid). Attachment of the model pro-peptide only leads to a moderately large reduction in the binding to- and induced leakage of model liposomes, while the antimicrobial activity of the crotalidicin fragment is completely inhibited by attaching the model pro-peptide. Attaching the pro-peptide induces a conformational change to a more helical conformation, while there are no signs of intra- or intermolecular peptide complexation. We conclude that inhibition of antimicrobial activity by the model pro-peptide might be related to a conformational change induced by the pro-peptide domain, and that additional effects beyond induced changes in membrane activity must also be involved.

KEYWORDS: ANTIMICROBIAL PEPTIDE, PRO-PEPTIDE, MEMBRANE ACTIVE PEPTIDES, ELECTROSTATIC COMPLEXATION

1. Introduction

Many proteins are synthesized as zymogens, precursor proteins that are inactive due to the presence of pro-peptide domains [1]. This also holds for antimicrobial peptides and proteins such as mammalian defensins [2], cathelicidins [3] and RegIII family proteins [4,5]. These are often synthesized and stored in inactive form, to protect host cells from potential cytotoxic effects as well as protecting the peptides and proteins and protected them from enzymatic degradation [6,7,8]. Understanding how pro-peptides control the activity of antimicrobial peptides is not only important in biology, but also for applications of antimicrobial peptides as pharmaceutical compounds. Biotechnologists have exploited fusion of antimicrobial peptides with pro-peptides to allow for the efficient production of antimicrobial peptides in bacterial hosts [9]. Pro-peptides can also be part of a pro-drug strategy for antimicrobial peptides, for example by arranging pro-peptide removal to be induced by the presence of a specific bacterial pathogen [10].

Explicit demonstration that pro-peptides inactivate the biological activity of antimicrobial peptides has been given for a number of cases, such as for defensins [6,7,8] but molecular mechanisms for inactivation have not yet been investigated. Very often, pro-peptide domains of antimicrobial peptides are highly acidic, and have charge densities that precisely neutralize the positive charge of the antimicrobial peptides. This suggests that electrostatic neutralization somehow plays an important role in inactivation by pro-peptides, but is unclear in what way. Ganz and co-workers [6,7] go one step further by hypothesizing that (at least for defensins) inactivation is due to intramolecular interaction of the pro-domain with the antimicrobial peptide domain, but again, no structures have been presented yet from which this is apparent.

Inactivation of antimicrobial and cytotoxic activity are by no means the only possible functions of pro-domains. For example, Ganz and co-workers [11] have shown that the acidic

pro-peptide is necessary for the precise sub-cellular trafficking and sorting of proHNP1. The role of pro-peptide domains for cathelicidins is less clear than for the defensins. Cathelicidins [3,12,13] are characterized by their highly conserved cathelin-like domain (CLD), a small folded domain with cystatin-like fold [14], which is followed by a highly variable domain containing the antimicrobial peptide. One group has reported that the full-length precursor protein for the sole human cathelicidin, LL-37 (known as hCAP18) has no antimicrobial activity [15], but a more recent report suggests that the antimicrobial activity of hCAP18 is practically identical to that of LL-37 [16]. Hence, at this stage it is not yet clear whether for LL-37, its pro-sequence acts as an inhibitor of its antimicrobial activity or not.

Given the importance of acidic pro-peptides in controlling the activity of antimicrobial activity both in biology and in possible pharmaceutical applications of antimicrobial peptides, we here study the impact of acidic pro-peptides on the secondary structure, membrane interactions and antimicrobial activity in a simple model system. As an antimicrobial peptide, we use a fragment of crotalicidin (Ctn), an antimicrobial peptide from the venom of the rattlesnake (*Crotalus durissus*). Falcao et al. [17] have studied the two fragments Ctn[1-14] and Ctn[15-34], that would be theoretically expected upon digestion with elastase. It was found that the short fragment Ctn[15-34] of full-length crotalicidin has a high antimicrobial activity, whereas the fragment Ctn[1-14] has no antimicrobial activity even though it is polycationic. The Ctn[15-34] peptide was also found to have a lower toxicity than full-length Ctn for human cells and was therefore suggested to be a potentially interesting antimicrobial peptide for further development as a pharmaceutical compound. Recently the mechanisms of membrane permeabilization for both model liposomes and bacterial membranes by Ctn and Ctn[15-34] were characterized in detail by Pérez-Peinado et al. [18]

In the crotalicidin precursor protein, at the N-terminal side, the antimicrobially active Ctn peptide is preceded by a pro-domain, which is a highly negatively charged stretch of

amino acids, rich in glutamic acids, that has a negative charge (24 negatively charged residues, 6 positively charged residues) that approximately compensates the positive charge (15 positively charged residues) of the antimicrobial peptide. We here study the effect of N-terminally attaching a simple deca (glutamic acid) pro-piece (E_{10}) to the crotalicidin fragment Ctn[15-34].

While neither the Ctn[15-34] peptide nor the E_{10} -Ctn[15-34] peptide occurs naturally, we believe that on the one hand these simple peptide can be a simple model for how pro-peptides modulate the physical and biological properties of much longer natural antimicrobial peptides. On the other hand the Ctn[15-34] peptide has favorable activities to be further developed for therapeutic applications [17] and it is interesting to study how to different types of model pro-peptides modulate its activity, both for pro-drug strategies [10], and for the biosynthetic production of such peptides [9].

We find that attaching the E_{10} model pro-peptide leads to a significant change in the secondary structure of the peptide in solution and to a full inactivation of its antimicrobial activity. Surprisingly however, physical properties typically associated with antimicrobial activity, viz. adsorption to lipid bilayers and the induction of liposome leakage are only moderately affected.

2. Material and Methods

2.1 Materials

Ctn[15-34] (KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF-NH₂), E_{10} -Ctn[15-34], and (GS)₄-Ctn[15-34] were synthesized by Pepscan (Lelystad, the Netherlands). Ion-exchange chromatography was used to replace all counter ions by Na⁺. The peptides have a reported purity of more than 94%. Molecular masses for all peptides (2371.2 Da for Ctn[15-34], 3662.3 Da for E_{10} -Ctn[15-34], and 2947.8 Da for (GS)₄-Ctn[15-34]) were confirmed using mass-spectrometry by

Pepscan. The full-length crotalicidin peptide (Ctn) was obtained from *Aminotech* Ltda (São Paulo, Brazil) (>95% of purity). This molecular mass of this peptide was also confirmed using mass-spectrometry. Concentrations of peptides in solution were determined using UV-spectroscopy. Micro centrifuge filters with a cut-off of 300 kDa were obtained from Pall Life Sciences Benelux (Mijdrecht, the Netherlands). The lipids 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DOPG) were purchased from Avanti Lipids (Alabaster, AL, USA). The fluorescent dye calcein was purchased in powder-form from Sigma-Aldrich. All other chemicals were of analytical grade, and were obtained from Sigma-Aldrich.

2.2 Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) was performed using a Malvern Nano ZS equipped with a 10 mW He-Ne laser with a wavelength of 632.4 nm. Measurements were done at a fixed scattering angle of 173°. Peptide solutions were filtered to remove dust particles and possible peptide aggregates that might interfere with the DLS measurements using 300 kDa cut-off micro centrifuge filters. For each sample, 20 μ L of filtered peptide solution was transferred into a clean low-volume quartz cuvette. For each sample, 3 size measurements were done, with run times and number of run repetitions being determined by the Malvern DTS software version 7.12. In all cases, a distribution analysis performed using the Malvern DTS Software showed a single dominant diffusion peak. Hydrodynamic radii reported correspond to this dominant peak, standard deviations are for the 3 replicates of the size measurements.

2.3 Circular Dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were obtained using a Jasco-715 spectro-polarimeter equipped with a Peltier element for temperature control. Spectra were obtained in the far-UV

range, from 190 to 260 nm. Spectra reported have been obtained by averaging 20 single scans and were obtained at a peptide concentration of 0.2 mg.mL⁻¹, in a 10 mM K₂HPO₄ 50mM Na₂SO₄ buffer pH 7.4 at 25°C. For a quantitative interpretation of the spectra in terms of a percentage of α -helical structure, spectra were fitted using the CONTIN algorithm as implemented in the DICHROWEB [19,20] webserver, using basis set #7.

2.4 *In vitro* antimicrobial assays

For the *in vitro* antimicrobial assays, strains of *Eschericia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used. Additionally, we tested clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) positive strains of *E. coli* (KPC+ 001812446) and *K. pneumoniae* (KPC+ 001825971). All strains were grown overnight in Mueller Hinton (MH) broth at 37°C. Minimum inhibitory concentration (MIC) measurements were performed using 1x10⁶ CFU per mL⁻¹ and serial 2-fold dilution series of the peptides Ctn[15-34], E₁₀-Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34] starting at 128 μ g.mL⁻¹. Following established protocols [21-23] the MIC was determined after 24 h of incubation at 37 °C, and was taken to be the lowest peptide concentration with total inhibition of bacterial growth, as assessed by absorbance measurements in a polystyrene 96 well plates at 600 nm using a microplate reader (Bio-Tek PowerWave HT, EUA). Bacteria in MH broth containing the antibiotics (chloramphenicol, gentamicin and imipenem at 1 mg.mL⁻¹) were used as negative and positive control respectively. Minimal bactericidal concentrations (MBCs) were determined by plating out 10 μ l of the content on MH agar plates of the wells where no bacterial growth was observed. MBC was recorded as the lowest concentration at which no colonies were observed after 24 h incubation at 37 °C. In each case, three technical and biological replicates were used.

2.5 Neutral-red (NR) *in vitro* toxicity assay with Caco-2 cells

Viability of Caco-2 cells at increasing peptide concentrations was determined using a Neutral-red (NR) assay as described previously [24]. After overnight incubation of the cells with the peptides Ctn[15-34], E₁₀-Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34] at peptide concentrations from 2-128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10 μL of a 33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NR solution was added to the wells containing the peptide-incubated cells. After 3 more hours of incubation, the supernatant was removed and the cells were washed with PBS. Next, 150 μL of 1% acetic acid-50% ethanol was added and shaken for 10 min at room temperature. Finally, the absorbance was measured at 540 nm and 690 nm (background absorbance) using a SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices). Readings were expressed as NR uptake relative to the uptake of the cells exposed to the negative control (medium or DMSO).

2.6 *Galleria mellonella* *in vivo* toxicity assay

An *in vivo* toxicity assay was performed using *Galleria mellonella* [25]. *G. mellonella* larvae in their final instar stage were purchased (UK Waxworms Ltd, Sheffield, UK), and stored in the dark at 15 °C, and used within 14 days. Larvae were separated by weight, and only larvae between 0.2 and 0.3 g were used for experiments. Larvae were injected with 20 μL of peptide solutions, or controls in the left posterior proleg using Terumo Myjector 29G insulin syringes (VWR International). The syringes were changed between different treatments. Two negative control groups were included in every experiment; one group was not injected to control for background larval mortality (no manipulation control) and the other group (uninfected control) was injected with PBS to control for the possible effect of physical trauma on mortality. After injection, larvae were stored in Petri dishes in the dark at 37 °C with 5% CO₂ for up to 144 h post-infection (p.i.) and inspected every 24 h for survival; larvae were considered dead if they did not move after shaking of the petri dish. For each sample (non-

manipulated control, water control, peptides) fifteen randomly chosen larvae were used. The peptide concentration was 10 mg per kg of body weight.

2.7 Liposome leakage assay

Following earlier work [26], lipids DOPC and DOPG were dissolved in chloroform at a concentration of 25 mg.mL⁻¹, mixed in a molar ratio of 7:3, and subsequently diluted further to 10 mg.mL⁻¹ using chloroform. The chloroform was evaporated using rotary evaporation (350 mbar, 313 K, 100 rpm). The lipid film was then dried in vacuum for at least 2 h after which the lipids were re-suspended in calcein-containing buffer (70 mM calcein in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) to get a 30 mM lipid suspension by hydration for 1 h in a rotary evaporator (no vacuum, 323 K, 100 rpm). Multilamellar vesicles thus formed were freeze-thawed four times using liquid nitrogen and a 310 K water bath to get unilamellar vesicles. A mini-extruder (Avanti Lipids) equipped with a 200 nm pore size polycarbonate membrane was used to perform 21 extrusions to homogenize the size of the lipid vesicles. Vesicles were separated from free calcein on a gravity driven Sephadex G-50 size exclusion column and eluted with a 10 mM Tris-HCl buffer containing 100 mM NaCl (pH=7.5). The vesicles were characterized using dynamic light scattering, for which an ALV instrument equipped with an ALV5000/60X0 external correlator and a 300 mW Cobolt Samba-300 DPSS laser operating at a wavelength (λ) of 532 nm was applied. A cumulant analysis showed the vesicles to be monodisperse, and to have an average diameter of 190±5 nm. The degree of dilution of the vesicles during size exclusion chromatography was estimated by comparing the intensity of scattered light (count rate) before and after size-exclusion chromatography. For this scattering angles θ ranging from 20° to 140° were used with steps of 5°, five measurements of 30 s were recorded for each scattering angle and the average was taken over all measurements. A fluorescence filter was applied that only transmits the laser light, to prevent the fluorescence

light emitted by calcein from disturbing the measurements. Vesicles used for the leakage assay were diluted with a 10 mM Tris-HCl buffer containing 100 mM NaCl (pH=7.5) to a final lipid concentration of 50 μM . Peptides were dissolved in the same buffer, at a concentration of 6.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The calcein leakage caused by the AMPs was measured by following the fluorescence intensity of the liposome solutions over time in a Cary Eclipse cuvette fluorimeter using an excitation wavelength of 490 nm and an emission wavelength of 520 nm. The widths of the excitation and emission slits were 2.5 nm. The fluorescence measurements were started with 588 μL of the vesicle solution without AMPs. After two minutes the fluorescence intensity signal was stable and 12 μL of 6.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ AMP solution was added, to achieve a final peptide concentration of 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, equal to the highest peptide concentration used in the MIC assays. In total, the measurements lasted 10 minutes. At the end of the experiments, 10 μL of a 10% (v/v) Triton X-100 solution was added, which is a surfactant that disrupts the liposomes. The signal after Triton addition was taken to correspond to 100% liposome leakage. For all peptides, the liposome leakage assays was repeated four times with freshly prepared liposomes and results were found to be reproducible.

2.8 Reflectometry of peptides adsorbing on supported lipid bilayers

Adsorption measurements were performed using an optical reflectometer with a stagnation-point flow cell and an oxidized silicon surface as a substrate, as described by Dijt *et al.* [27]. The laser beam reflects from the surface at exactly the point where the jet flow reaches the surface. The reflectometer signal can be directly converted into an adsorbed amount (Γ) if the refractive index increment of the adsorbing species is known [27, 28]. The refractive index increment for lipids is $dn/dc \approx 0.145 \text{ } \square\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [29, 30] that of proteins is $dn/dc \approx 0.185 \text{ } \square\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [31]. Clean oxidized silicon strips (with a silica layer of $\sim 62 \text{ nm}$) were prepared as

follows. Silica strips were washed with demiwater, sonicated for 1 min in 2-propanol, washed in milliQ water, dried under a nitrogen stream and plasma cleaned for 2 min before being stored in milliQ water. The strips were used in the experiment within 5 h of cleaning. A supported lipid bilayer (SLB) was formed on top of the silica surface by means of vesicle adsorption and subsequent rupture and SLB formation at high surface coverage [32]. Vesicles were prepared as described for the liposome leakage assay, except for the fact that no calcein was used. For preparing the SLB, vesicles were diluted in 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 4 to a final concentration of 200 μ M of lipids. To promote adsorption of the negatively charged vesicles, the silica substrates were first equilibrated against a low pH buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 4). At this low pH, the silica is less negatively charged as opposed to neutral pH. After a steady baseline was obtained, the flow was switched to the 200 μ M vesicle solution for a few minutes, until the signal stabilized again. Next, the flow was switched back to the low pH buffer and rinsed for some minutes until the signal stabilized again and finally, flow was switch to a neutral pH buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5). This finalized the procedure to attach the SLB. Next, flow was switched to a solution of peptides at a concentration of 16 μ g-mL⁻¹ in 10 mM Tris 100 mM NaCl, pH 7.5. Reproducibility of these measurements was typically found to be around 10%.

2.9 Molecular Modelling

First, Blastp [33] was used to find the best template structure for the molecular modeling of the solution structure of the peptides Ctn[15-34], E₁₀-Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34]. The solution nuclear magnetic resonance (NMR) structure of crotalicidin in DPC micelles (PDB entry: 2MWT) isolated from the Rattlesnake (*Crotalus durissus*) venom [17] was selected for the construction of a set of 100 tridimensional theoretical models using Modeller v. 9.17 [34]. For each of the three peptides, the lowest free-energy theoretical model from the set was then

selected and used for validation procedures: PROCHECK [35] was used to evaluate peptide geometry, stereochemistry and energy distributions, as well for calculating average scores (G-factor) for dihedral angles and bond lengths. ProSA-web [36] was used to evaluate the fold quality of the selected models.

2.10 Molecular dynamics

Molecular dynamics simulations for Ctn[15-34], E₁₀-Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34] were carried out in explicit water, using the single point charge (SPC) water model. All simulations were performed using the GROMOS96 43a1 force field from the computational package GROMACS v.5.0.4 [37]. The validated tridimensional theoretical models for the peptides obtained as described above were used as initial structures in all simulations. Chloride and sodium ions were also added to neutralize the system's charge. The geometry of water and molecules was constrained using the SETTLE algorithm [38]. Moreover, the LINCS algorithm was used to link all the atom bond length. Particle Mesh Ewald (PME) was also used for electrostatic corrections, with a radius cut-off of 1.4 nm to minimize the computational simulation time. The same radius cut off was also used for van der Waals interactions. The list of neighbours of each atom was updated every 10 simulation steps of 2 fs each. Before the start of the MD simulations, a steepest descent algorithm (50,000 steps) was applied for energy minimization. After that, the system underwent a normalization of temperature and pressure to 300 K and 1 bar, using the velocity rescaling thermostat (NVT) and the Parrinello-Rahman barostat (NPT), respectively, for 100 ps. The system with minimized energy and balanced temperature and pressure was submitted to molecular dynamics simulation during 100 ns, in triplicate.

Results

Peptide sequences

The domain structure of the Ctn precursor protein is shown in Fig 1a. On the N-terminal side of the Ctn peptide, the Ctn precursor protein has a pro-peptide that is 142 residues long. The C-terminal 35 residues of the pro-peptide, that connect to the Ctn peptide, is extremely rich in glutamic acid residues and has a very high net negative charge (21 negatively charged residues and 6 positively charged residues). The net negative charge of this part of the pro-peptide approximately compensates for the net positive charge of full length Ctn (15 positively charged residues, no negatively charged residues). Pro-peptides with long oligo (glutamic acid) stretches are found for many other AMPs [9]. As a model pro-peptide for the short but highly antimicrobially active Ctn[15-34] fragment, mimicking the glutamic acid-rich domain of the crotalicidin pro-peptide, we here choose a simple deca(glutamic acid), E₁₀. As a control for the effect of losing the free N-terminal on the activity of Ctn[15-34], we use a glycine/serine sequence: such sequences are often used in fusion proteins as inert, hydrophilic flexible linkers. Additionally and important for the case of AMPs, the glycine and serines have uncharged side chain, and therefore do not change the net AMP charge. Thus we arrived at the three peptide sequences (Fig. 1b) that we study here: Ctn[15-34], E₁₀- Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34]. For N-terminal glutamic acid residues, pyroglutamination may be a concern, therefore we performed MALDI-TOF MS and MS/MS to demonstrate the absence of pyroglutamination of the N-terminal glutamic acid for the E₁₀- Ctn[15-34] peptide (Supplementary Information Fig. SI-1-2).

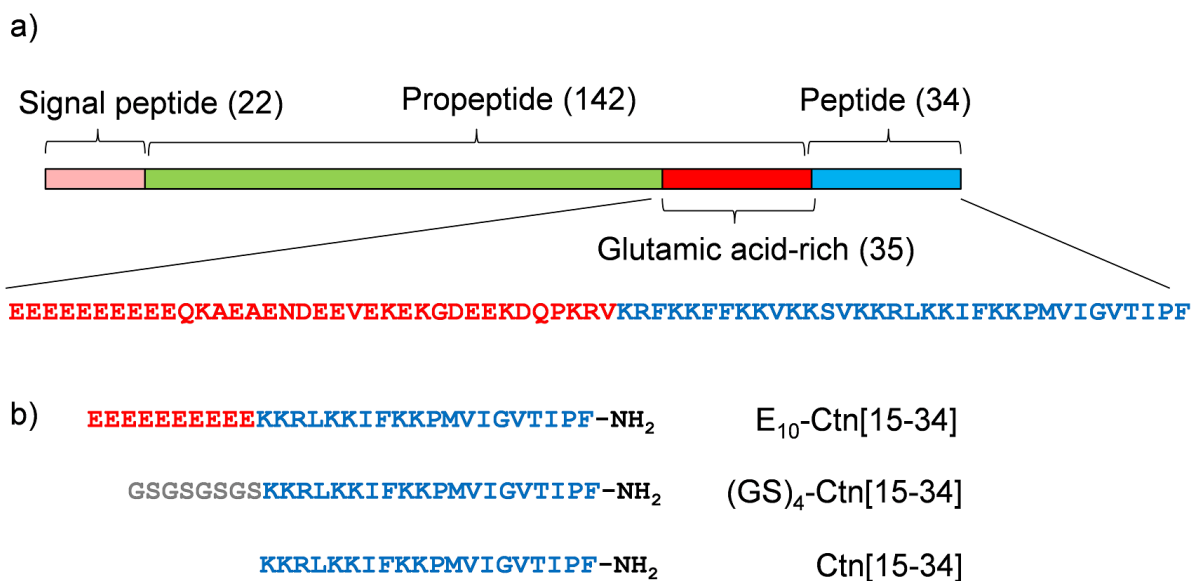


Figure 1. Crotalictidin-derived peptides used in this study. a) Domain structure of crotalictidin pre-pro-peptide (Uniprot U5KJM4) in brackets: length of domains in numbers of amino acids. Flanking the peptide, the pro-peptide features a 35 amino acids long glutamic acid rich domain, whose sequence is also given in red (21 negatively charged residues, 6 positively charged residues), together with that of the full-length crotalictidin peptide in blue (15 positively charged residues). b) Short model peptides inspired by full-length crotalictidin peptide and pro-peptide, used in this study. The Ctn[15-34] fragment has 7 positively charged residues.

Characterization of peptides in solution

We first explored the solubility and aggregation state of the peptides, using dynamic light scattering (DLS), in both a low and high ionic strength buffer, at neutral pH. Results are shown in Table 1. All peptides dissolved well and did not appear to aggregate or self-assemble in solution, even at high concentrations employed for the DLS experiment (10 mg.mL⁻¹). There is a clear difference between the small solution sizes of Ctn[15-34] (2.2±0.1 nm) and (GS)₄-Ctn[15-34] (2.4±0.1 nm), and the larger solution sizes of E₁₀-Ctn[15-34] (4.0±0.1 nm). Also, the solution sizes of Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34] increase by 45% and 33% respectively with ionic strength, whereas that of E₁₀-Ctn[15-34] remains constant. Although the sizes most likely reflect the solution sizes of individual peptides, we cannot completely exclude that a small degree of self-association contributes to the measured sizes. Being a block-polyampholyte, at low ionic strength, one might have expected the E₁₀-Ctn[15-34] to aggregate or coacervate as a consequence of electrostatic interactions, but this was not

observed: this should have resulted in much larger solution sizes as measured in DLS. Presumably, the lengths of the charged blocks were still too short, or the charged blocks were too asymmetric in (in terms of numbers charges) for coacervation to occur. Instead, we observe that at 100 mM of added NaCl the E₁₀-Ctn[15-34] the peptide is no longer fully soluble at 10 mg.mL⁻¹.

Table 1. Hydrodynamic diameter as determined using dynamic light scattering of 10 mg.mL⁻¹ of the peptides in the indicated buffers: PB (10 mM Pi pH 7.4) and PBS (10 mM Pi pH 7.4 + 100mM NaCl). For 10 mg.mL⁻¹ E₁₀-Ctn[15-34] in PBS we observed phase separation, therefore the experiment was done at the lower concentration of 2 mg.mL⁻¹ where the system was in a one-phase region.

buffer	10 mM Pi pH 7.4	10 mM Pi pH 7.4 + 100mM NaCl
	D_H (nm)	D_H (nm)
Ctn[15-34]	2.2±0.1	3.2±0.1
(GS) ₅ -Ctn[15-34]	2.4±0.1	3.2±0.1
E ₁₀ -Ctn[15-34]	4.0±0.3	4.1±0.3

The larger solution size of the E₁₀-Ctn[15-34] peptide possibly reflects a different secondary structure, therefore we next performed circular dichroism (CD) measurements for each of the peptides. Spectra were acquired for 2 μg.mL⁻¹ peptide solutions in a 10 mM potassium phosphate buffer at pH 7.4 (Fig. 2). We find that the E₁₀-Ctn[15-34] spectrum is notably different from that of (GS)₄-Ctn[15-34] and Ctn[15-34], which essentially overlap with each other. A qualitative comparison with typical CD spectra for random coil versus α-helical configurations shows that the (GS)₄-Ctn[15-34] and Ctn[15-34] spectra are characteristic of predominantly random coil configurations, whereas that of E₁₀-Ctn[15-34] is indicative for a substantial contribution from α-helices. For a more quantitative assessment we have used a CONTIN algorithm to fit the CD spectrum and extract percentages of α-helical structure. The estimated percentages of α-helical structure are 21% for E₁₀-Ctn[15-34], and, respectively,

3% and 4% for Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34]. This confirms the qualitative interpretation that the deca(glutamic acid) pro-peptide significantly increases the overall α -helicity of the Ctn[15-34], whereas the addition of the flexible hydrophilic (GS)₄ sequence does not. The increased helicity of E₁₀-Ctn[15-34] could be related to the well-known propensity of glutamic acid residues to stabilize α -helices. Similarly, the more unfolded structure of (GS)₄-Ctn[15-34] could be related propensity of the glycines to form loops and destabilize α -helices, as previously demonstrated by Shingate and Showdhani [39]. A more helical structure for E₁₀-Ctn[15-34] also matches well with the observation of larger solution sizes by DLS for this peptide.

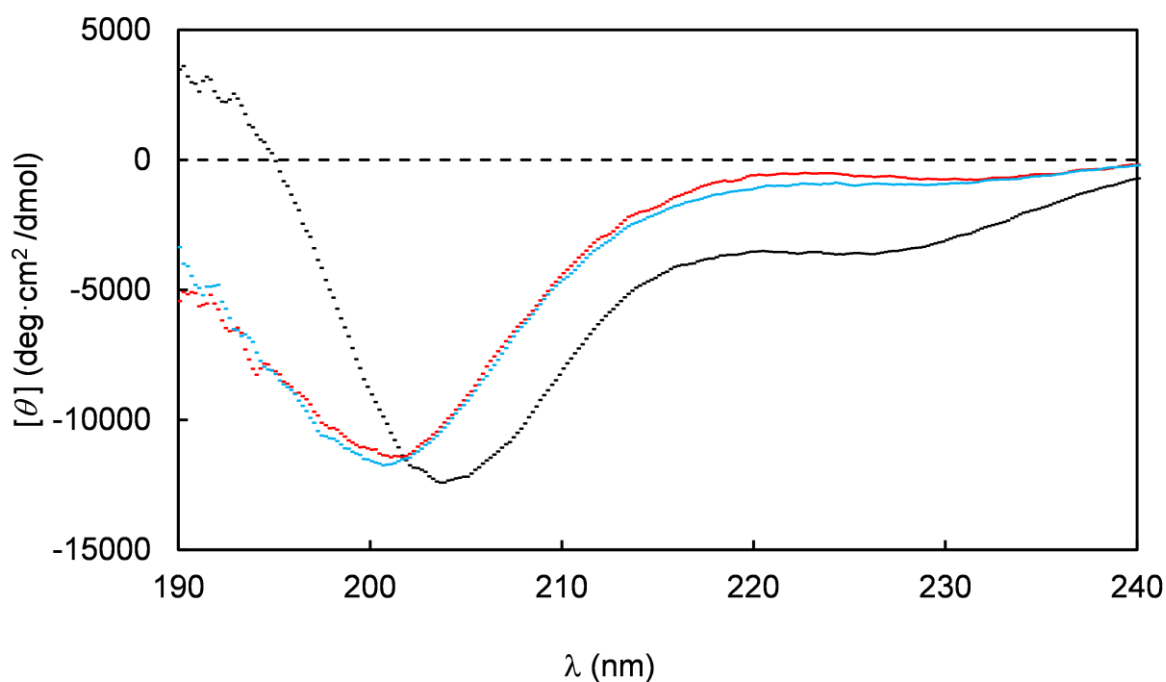


Figure 2. Circular dichroism spectra of the peptides Ctn[15-34] (red), E₁₀-Ctn[15-34] (black) and (GS)₄-Ctn[15-34] (blue). Residue molar ellipticity $[\theta]$ in $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ is plotted versus the wavelength λ in nm. Measurements were performed at a peptide concentration of $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in a $10 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4$ $50\text{mM Na}_2\text{SO}_4$ buffer, pH 7.4.

For an indication as to where helicity could be induced by the E₁₀ model pro-peptide we have performed molecular dynamics (MD) simulations, starting from initial theoretical structures generated by molecular modelling studies (Supplementary Information Fig. SI-3 and Table

SI-1) and which are based on the solution NMR structure of full-length crotalicidin in DPC micelles [17]. The micellar environment typically induces a high α -helical content of antimicrobial peptides, so it may be expected that the MD runs for the peptides in water show at least partial unfolding. Indeed, during the 100 ns runs, all peptides develop large root mean square deviations (RMSD) as compared to the initial (Fig. 3a). A root mean square fluctuation (RMSF) analysis (Fig. 3b) for the equilibrated configurations indicates that for Ctn[15-34] and E₁₀-Ctn[15-34] it is especially the C-terminus that exhibits the largest flexibility, whereas for (GS)₄-Ctn[15-34] the largest flexibility is exhibited by the N-terminal residues. For all peptides, the loss of α -helicity is accompanied by a decrease of ~ 0.2 nm in their radius of gyration (R_g) (Fig. 3c). Representative snapshots of conformations of the peptides at simulation times of 0, 50 and 100 ns are shown in Fig. 4.

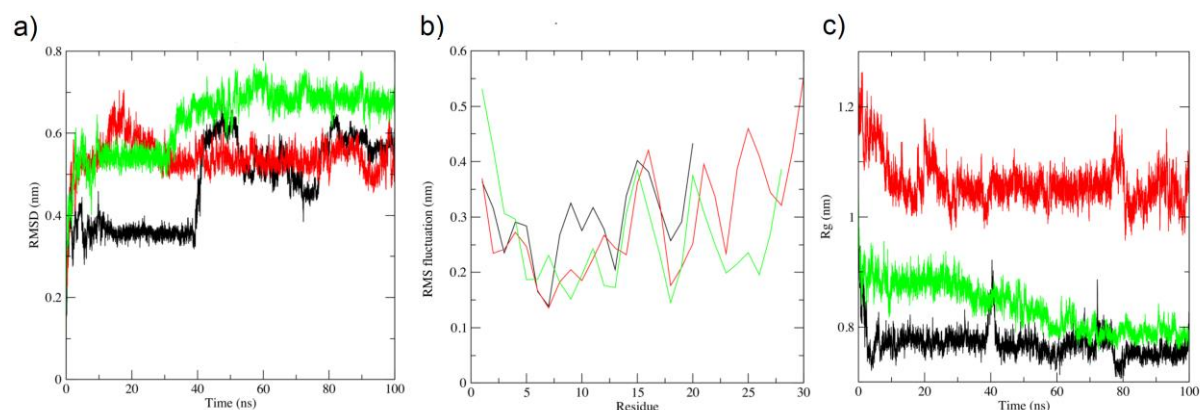


Figure 3. Molecular dynamics simulations in water (100 ns) for the peptides Ctn[15-34] (black curves), E₁₀-Ctn[15-34] (red curves) and (GS)₄-Ctn[15-34] (green curves), yielding the parameters a) Root mean square deviation (RMSD) of single run, b) root mean square fluctuations (RMSF) and c) radius of gyration (R_g). Results are for single runs, three runs were done, for each peptide, with similar results.

Trends observed in the MD simulations agree with the experimental observations using DLS and CD: the E₁₀-Ctn[15-34] peptide has a larger gyration radius and larger α -helicity, as compared to both the Ctn[15-34] and the (GS)₄-Ctn[15-34] peptides. The current level of simulations however is not yet good enough to quantitatively compare experimental to theoretical α -helicities. For example, from the CD we find an almost no α -helicity for the

(GS)₄-Ctn[15-34] peptide in solution (4%), but the simulation snapshots show that significant α -helicity remains after 100 ns (Fig. 4c). Taking the simulations therefore as a qualitative indication for structural changes induced by attaching the acidic E₁₀ and the control (GS)₄ “pro-peptides” to Ctn[15-34], we conclude that the hydrophobic C-terminal part Ctn[15-34] (colored orange in Fig. 4) remains largely unstructured irrespective of the attachments at the N-terminal side. When attaching E₁₀, it is the E₁₀ peptide itself that presumably contributes mostly to the additional helicity that we observe in CD, and hence also to the increase in the solution size observed in DLS.

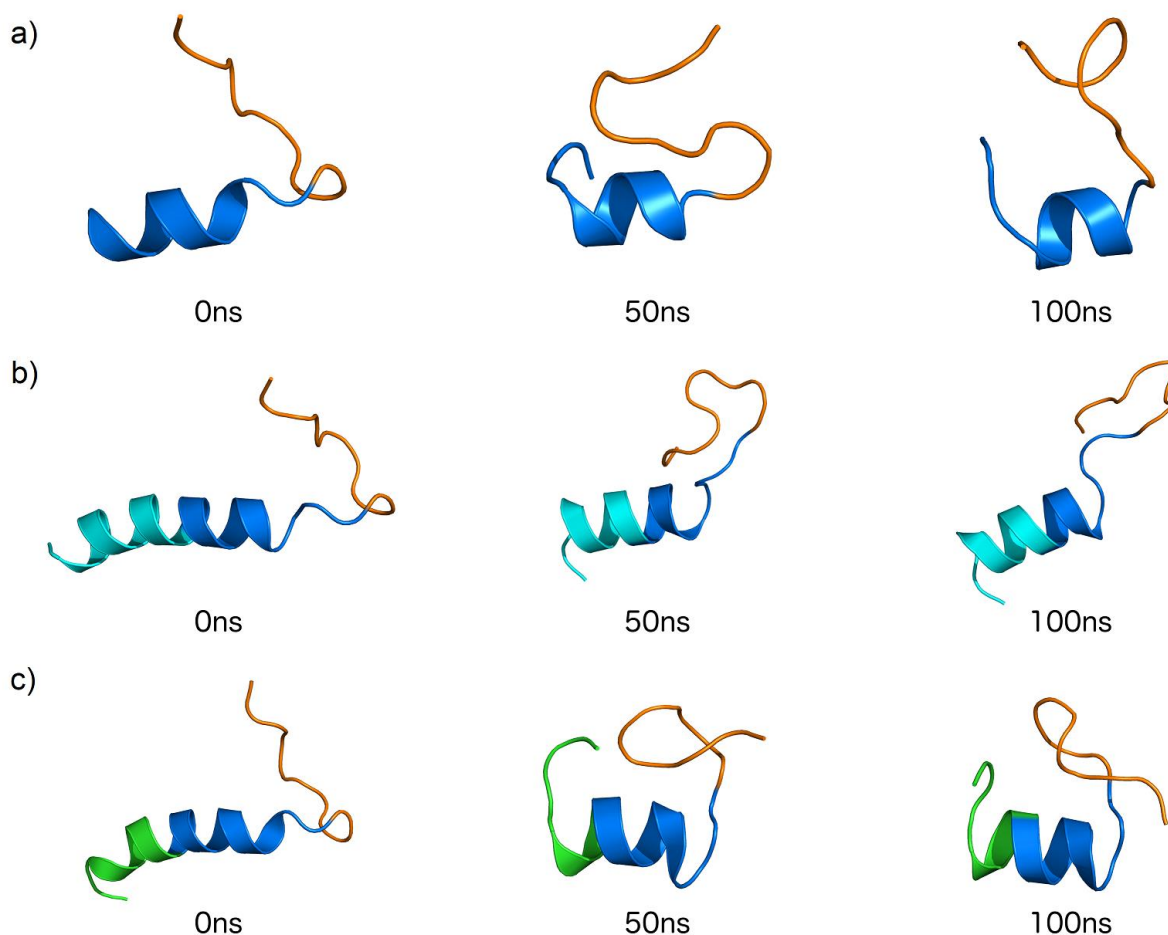


Figure 4. Theoretical structure snapshots of a) Ctn[15-34], b) E₁₀-Ctn[15-34] and c) (GS)₄-Ctn[15-34] during 100 ns of dynamics simulations (50 ns intervals). Domain colors: basic domain Ctn[15-34] – dark blue, hydrophobic domain Ctn[15-34] – orange, acidic E₁₀ domain – light blue, control pro-peptide domain (GS)₄ – green.

Antimicrobial activity and toxicity

All three peptides were tested against different bacterial strains, both Gram negative and Gram positive, in order to determine their *in vitro* antibacterial activity: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883 and *S. aureus* ATCC 25923. Additionally, we considered Gram-negative clinical isolates from KPC positive *E. coli* (KPC+ 001812446) and *K. pneumoniae* (KPC+ 001825971) due the medical relevance related to KPC strains by their resistance to conventional antibiotics. MIC and MBC results are given in Table 2.

Table 2. MIC and MBC for the peptides Ctn[15-34], E₁₀-Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34] against Gram-negative and -positive bacteria. MIC and MBC determinations were carried out in triplicate, with no difference in outcome.

Microorganism	Gram	MIC*(MBC) mg.mL ⁻¹		
		Ctn[15-34]	E ₁₀ -Ctn[15-34]	(GS) ₄ -Ctn[15-34]
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	2(2)	>128 (>128)	2(2)
<i>E. coli</i> (KPC+ 001812446)	-	2(2)	>128 (>128)	2(2)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	-	2(2)	>128 (>128)	2(16)
<i>K. pneumoniae</i> (KPC+ 001825971)	-	8(8)	>128 (>128)	16(32)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	16(>128)	>128 (>128)	64(>128)

Results for Ctn[15-34] confirm those previously obtained by Falcao [17]: the peptide is very active against Gram-negative bacteria presenting all the MIC values less than 8 µg.mL⁻¹, and somewhat less against Gram-positive *S. aureus*. Additionally, We find that Ctn[15-34] is also active against a clinical isolate (see Table 2). In stark contrast, for E₁₀-Ctn[15-34] we find an absence of any antimicrobial activity up to 128 µg.mL⁻¹. Hence the E₁₀ sequence is indeed a very good model for an inhibitory pro-peptide. Inhibition of activity is not due to the absence of a free N-terminus: the activity of the control peptide (GS)₄-Ctn[15-34] is identical to that of

Ctn[15-34] except for *K. pneumoniae* KPC and *S. aureus*, in which cases the MIC values are 16 and 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively.

We have also studied the effect of the attachment of the pro-peptide on the toxicity of the peptides to eukaryotic cells *in vitro*, and on the toxicity of the peptides *in vivo* using *Galleria mellonella* larvae. A neutral red uptake (NRU) assay was used to assess viability of the mammalian cell line Caco-2. Monolayers of this cell mimic the human intestinal epithelium and are widely used as a model of human intestinal absorption. Results are shown in Figure 5a. The NRU assay indicates complete cell viability after overnight incubation over the entire concentration range studied for all the peptides. To confirm this result a more sensitive test was used, the *in vivo* toxicity of the peptides for *G. mellonella* larvae. Following incubation with 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of body weight of the peptides, survival of the larvae was measured up to 144 h (Figure 5b). The Ctn[15-34] peptide is more toxic than the other peptides: larvae treated with this peptide have the lowest fraction of survival (Figure 5b). Within the experimental margin of error, survival curves for the peptides E₁₀-Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34] were identical to those of the two controls, indicating that the addition of the (GS)₄ sequence appears to reduce the *in vivo* toxicity but not the antimicrobial activity of Ctn[15-34].

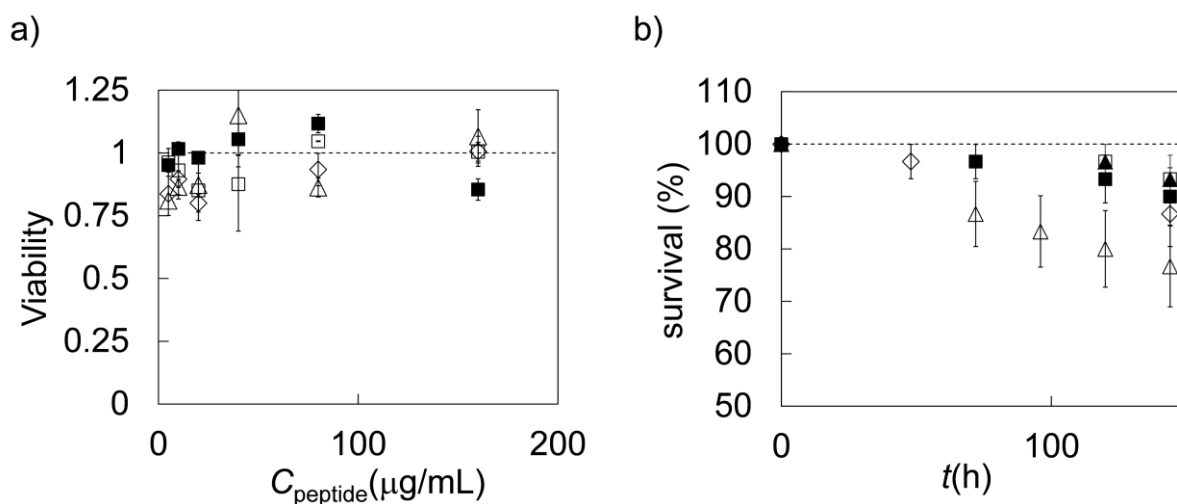


Figure 5. Toxicity of peptides Ctn[15-34], E₁₀-Ctn[15-34] and GS₄-Ctn[15-34]. a) *In vitro* neutral red uptake assay for Caco-2 cells. Viability (fraction of viable cells) as compared to untreated Caco-2 cells as a function of peptide concentration. Diamonds: filled squares: PBS control, open squares: Ctn[15-34], open diamonds: E₁₀-Ctn[15-34], open triangles: (GS)₄-Ctn[15-34]. Error bars are standard deviations of replicate measurements b) *In vivo* toxicity of the peptides for *Galleria mellonella* larvae. Percentage surviving larvae as a function of time. Filled squares: H₂O control, filled triangles: no treatment control, open triangles: Ctn[15-34], open diamonds: E₁₀-Ctn[15-34], open squares: (GS)₄-Ctn[15-34]. For each peptide a group of n = 15 larvae were used, error bars are standard deviations within the group.

Interaction of the peptides with model membranes

The peptide physical-chemical properties that have been suggested to correlate most strongly with antimicrobial activity are their affinity towards model membranes, and their ability to induce leakage in model liposomes. Therefore, we have tested whether the E₁₀ model pro-peptide prevents adsorption of the peptides on model membranes, and whether it prevents leakage from model liposomes. As a model for the predominantly negatively charged bacterial membranes, we use a 7:3 mixture (molar ratio) of the lipids DOPC and DOPG. Liposomes were prepared with an average diameter of 190 ± 5 nm, as determined using DLS. In a first experiment, supported lipid bilayers (SLB) were prepared on a silica wafer by adsorbing the liposomes to the silica at low pH. Subsequently, the amount of peptide (mg/m^2) adsorbing to the SLB was monitored using reflectometry, as a function of time (Figure 6). Note that in these experiments, we have also included the full-length crotalicidin peptide (Ctn). The reflectometry experiments demonstrated that, under the conditions of the experiment (10mM Tris 100mM NaCl, pH 7.5, and a peptide concentration of $16 \mu\text{g/mL}^{-1}$)

both full length Ctn and the fragment Ctn[15-34] adsorb to the model membranes at the same surface density of approximately $0.5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$. Attaching the $(\text{GS})_4$ sequence reduces the adsorbed amount to approximately $0.3 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$. Attaching the E_{10} model pro-peptide sequence leads to a further reduction of the adsorbed but the E_{10} model pro-peptide sequence by no means completely prevents adsorption: the adsorbed amount remains significant at approximately $0.15 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$.

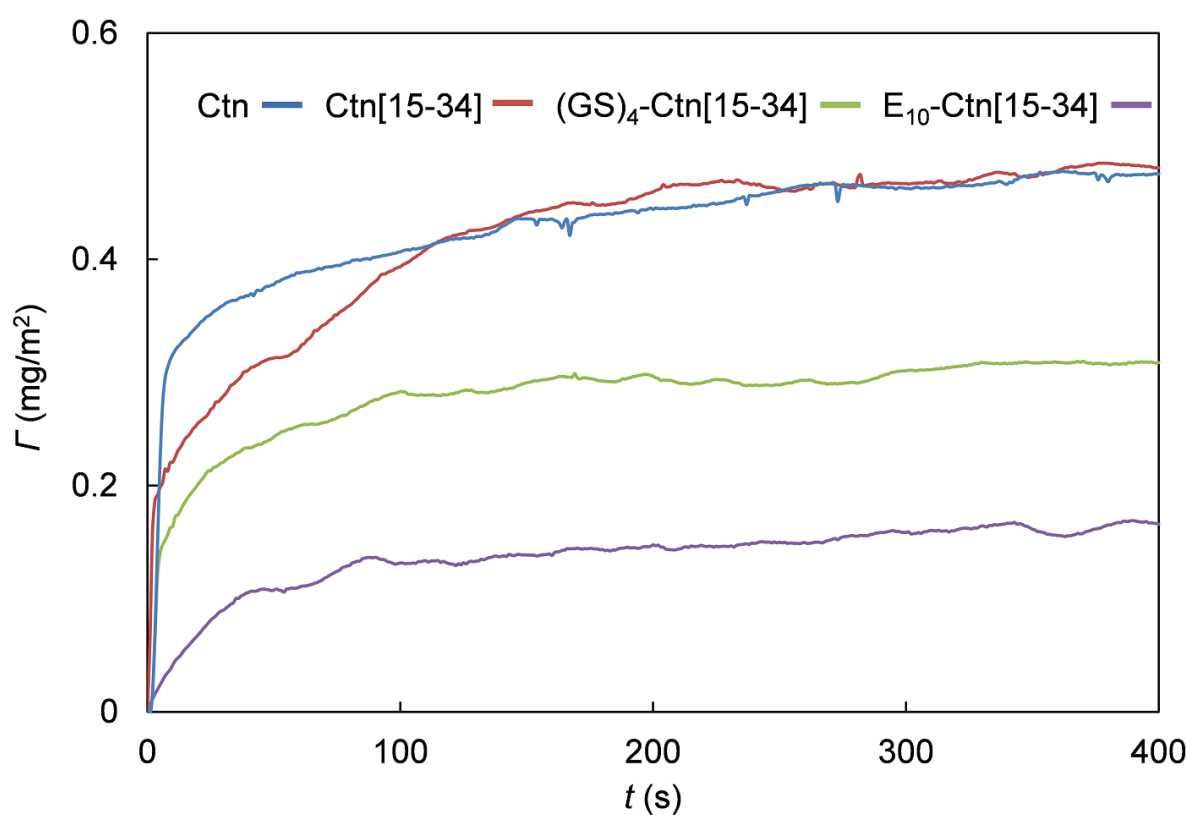


Figure 6. Adsorption of the peptides Ctn, Ctn[15-34], E_{10} -Ctn[15-34] and GS_4 -Ctn[15-34] to mixed DOPC:DOPG (7:3 molar ratio) supported lipid bilayers (SLB). Peptide mass Γ (mg/m^2) adsorbing to the SLB as a function of time. Curves from top to bottom are for Ctn, Ctn[15-34], GS_4 -Ctn[15-34] and E_{10} -Ctn[15-34]. Peptide concentrations are $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 10 mM Tris 100mM NaCl, pH 7.5.

Next we measured liposome leakage induced by the various peptides. DOPC/DOPG liposomes filled with 70 mM of calcein (internal concentration) were exposed to $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the peptides, and the fluorescence increase due to liposome leakage was monitored over time. Results for the percentage of liposome leakage induced by full length Ctn, Ctn[15-34],

E_{10} -Ctn[15-34] and $(GS)_4$ -Ctn[15-34] as a function of time are shown in Figure 7. Leakage is greatest for the full length Ctn peptide (30% after 8 min.). The induced leakage for the Ctn[15-34] fragment and the $(GS)_4$ -Ctn[15-34] is the nearly the same (around 20% after 8 min.). Finally, the leakage induced by the E_{10} -Ctn[15-34] peptide is the lowest of all peptides tested, but the E_{10} pro-peptide by no means completely prevents induced leakage (which is around 12% after 8 min.). Note that the absolute values of the induced leakage that we find for the Ctn and Ctn-derived peptides are similar to those found for other AMPs at similar conditions [40,41].

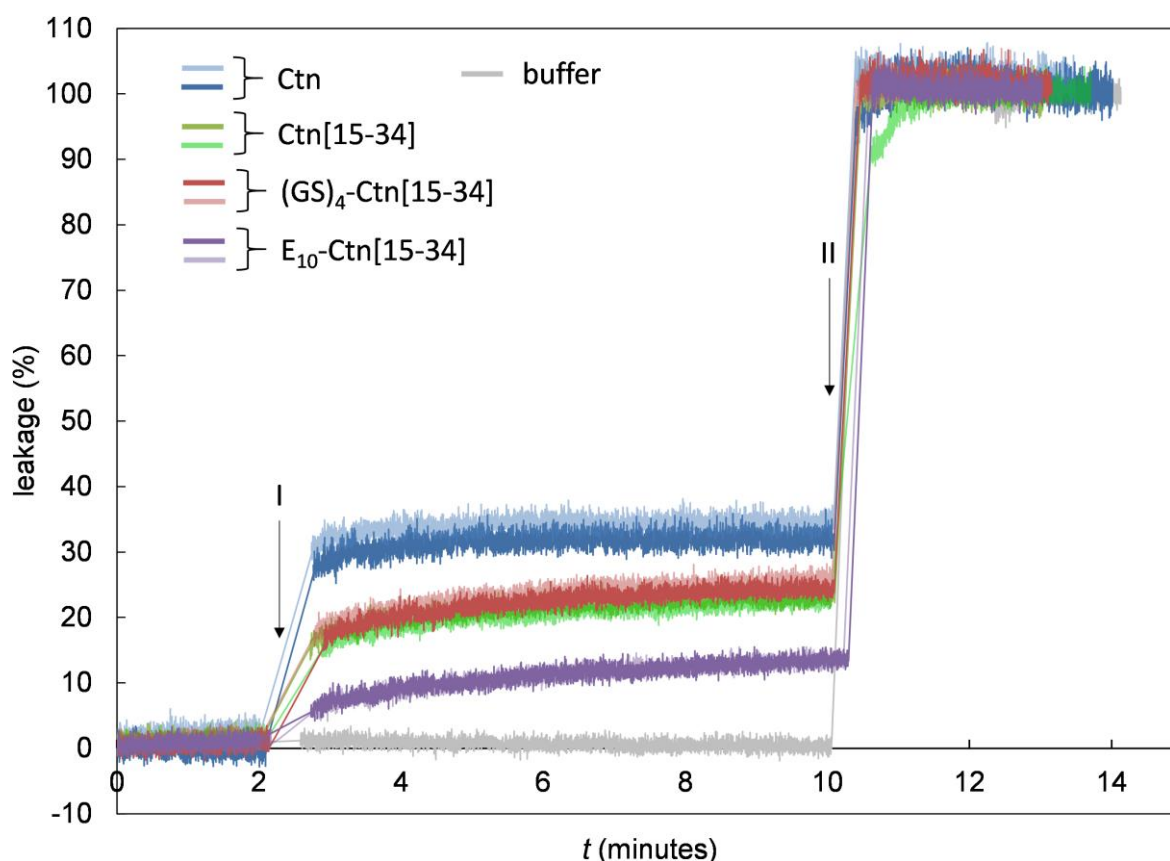


Figure 7. Liposome leakage assay for the peptides Ctn, Ctn[15-34], E_{10} -Ctn[15-34] and $(GS)_4$ -Ctn[15-34]. Percentage of leakage as a function of time t (s). Mixed DOPC:DOPG (7:3 molar ratio) liposomes with a diameter of 190 nm filled with calcein (70 mM inside the liposomes), at a lipid concentration of 50 μ M, were exposed to 128 μ g.mL⁻¹ of the peptides. Peptides were injected at $t = 2$ min (I). At $t = 10$ min (II) a small amount of 10% (v/v) Triton X-100 was added to release all of the calcein. Two replicates are shown for each peptide with different colors as indicated in the figure.

Both experiments on model membranes therefore present results that do not correlate precisely with the observed antimicrobial activities: the addition of the (GS)₄ leads to a significantly lower adsorption, but leakage and antimicrobial activity are not affected. Most strikingly, the addition of the E₁₀ model pro-peptide leads to a complete inactivation of the antimicrobial activities, but only to a somewhat lower adsorption on model membranes, and to a only a somewhat lower induced leakage of model liposomes, in contrast to other studies [8] where the presence of a pro-peptide was shown to lead not only to inhibition of antimicrobial activity, but also to a much lower adsorption on- and leakage of model liposomes.

Concluding Remarks

We have found for a crotalicidin-derived antimicrobial peptide, Ctn[15-34], that the N-terminal addition of a deca(glutamic acid) model “pro-peptide” (E₁₀) very effectively inhibits the antimicrobial activity. Earlier suggestions in the literature were that inhibition of antimicrobial activity is caused by charge neutralization and intra-molecular complexation of the antimicrobial peptide with its acidic pro-region [6,7], leading to a reduction in membrane activity [8]. For the model system introduced here however, we find no indications for intra- or intermolecular (electrostatic) complexation at the solution conditions that we have tested here. Also, while there is complete inhibition of antimicrobial activity, there is only a moderate reduction in membrane binding and induced liposome leakage when N-terminally attaching the E₁₀ model pro-peptide to the Ctn[15-34] antimicrobial peptide. The N-terminal attachment of the E₁₀ model pro-peptide significantly increases the α -helicity of the peptide in solution, and for now we can only speculate that this conformational change might play a role in the inhibition of the antimicrobial activity.

In summary, our peptide model for the inhibition of antimicrobial activity by acidic pro-peptides partly calls into question mechanisms for the inhibition suggested earlier (charge neutralization, inter- and intramolecular complexation, leading to loss of membrane activity and hence loss of antimicrobial activity). We suggest that conformational changes induced by attaching the pro-peptides may be an additional factor determining the loss of antimicrobial activity.

For further progress in elucidating how acidic pro-peptides inhibit activity of antimicrobial peptides, it will be necessary to probe the activity and mechanism of various antimicrobial peptides with and without their pro-peptides in still more detail, for example by using a membrane potential assay [42]. Additionally, it will be necessary to obtain more detailed structural information for complete precursor proteins and the corresponding antimicrobial peptides.

Acknowledgements

RdV, NGOJ and OLF acknowledge financial support from the Dutch Polymer Institute (DPI, project #770), FAPDF, FUNDECT, CNPq and CAPES. JW and NV acknowledge financial support from the EU (H2020 project AND 659–121) and the Dutch Organization for Scientific Research NWO (ZonMw grant 541001008).

Supplementary Information

Initial configurations for MD simulations (Fig. SI-1 and Table SI-1).

Author contributions

RdV and OLF obtained funding. Antimicrobial activity assays and toxicity assays were designed by OLF, TMBR and JMW and carried out by NGOJ, MHC, ESC, and NV. Light

Scattering and Circular Dichroism experiments were designed, performed and analyzed by NGOJ and RdV. Membrane activity experiments were designed by JMK and RdV and carried out by DvdB and NdL. Molecular Dynamics simulations were designed and performed by MHC. RdV, NGOJ and MHC wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests

References

1. H. Neurath, K.A. Walsh, *Oroc. Natl. Acad. USA* 73 (1976) 3825-3832.
2. N. H. Salzman, K. Hung, D. Haribhai, H. Chu, J. Karlsson-Sjöberg, E. Amir, P. Tegatz, M. Barman, M. Hayward, D. Eastwood, M. Stoel, Y. Zhou, E. Sodergren, G. M. Weinstock, C.L. Bevins, C.B. Williams, N.A. Bos. *Nature Immunology* 11 (2010) 76–82.
3. A. E. Shinnar, K.L. Butler, H.J. Park. *Bioorg Chem.* 31(2003) 425-436
4. M.T.J. van Ampting, L.M.P. Loonen, A. J. Schonewille, I. Konings, C. Vink, J. Iovanna, M. Chamailard, J. Dekker, R. van der Meer, J. M. Wells, I.M.J. Bovee-Oudenhoven. *Infect Immun.* 80 (2012) 1115-1120.
5. H. L. Cash, C. V. Whitham, C.L. Behrendt, L.V. Hooper. *Science* 313 (2006) 1126-1130.
6. D. Michaelson, J. Rayner, M. Couto, T. Ganz, *J Leukoc Biol.* 51(1992) 634-639.
7. E.V. Valore, E. Martin, S.S Harwig, T. Ganz, *J Clin Invest.* 97(1996) 1624-1629.
8. D.P. Satchell, T. Sheynis, Y. Shirafuji, S. Kolusheva, A.J. Ouellette, R. Jelinek, J. *Biol.Chem.* 278 (2003) 13838-13846
9. A.A. Vassilevski, S.A. Kozlov, E.V. Grishin, *Recent Patents Inflamm. & Allergy Drug Disc.* 2 (2008) 58-63.
10. E. Forde, M. Devocelle, *Molecules* 20 (2015) 1210-1227.
11. L. Liu, T. Ganz, *Blood* 85 (1995) 1095-1103.
12. M. Zanetti, R. Gennaro, M. Scocchi, B. Skerlavaj, *Adv. Exp. Med. Biol.* 479 (2000) 203-218.
13. L. Tomasinsig, M. Zanetti. *Curr. Opin. Prot. Pept. Sci.* 6 (2005) 23-34.
14. Y. Yang, J.F. Sanchez, M.P. Strub, B. Brutscher, A. Aumelas, *Biochemistry.* 42 (2003)

15. M. Zaiou, V. Nizet, R.L. Gallo, *J. Invest. Dermatol.* 120 (2003) 810-816.
16. M. Pazgier, B. van Ericksen, M. Ling, E. Toth, J. Shi, X. Li, A. Galliher-Beckley, L. Lan, G. Zou, C. Zhan, W. Yuan, E. Pozharski, W. Lu, *Biochemistry* 52(2013) 1547–1558.
17. C. B. Falcao, C. Perez-Peinado, B.G. de la Torre, X. Mayol, H. Zamora-Carreras, M.A. Jimenez, G. Rádis-Baptista, D. Andreu, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 8553-8563.
18. C. Pérez-Peinado, S.A. Dias, M.M. Domingues, A.H. Benfield, J.M. Freire, G. Rádis-Baptista, D. Gaspar, M.A.R.B. Castanho, D.J. Craik, S.T. Henriques, A.S. Veiga, D. Andreu, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 1536-1549.
19. L. Whitmore, B.A. Wallace, *Biopolymers* 89 (2008) 392-400.
20. L. Whitmore, B.A. Wallace, *Nucleic Acids Research* 32 (2004) W668-673.
21. I. Wiegand, K. Hilpert, R.E. Hancock. *Nature protocols* 3 (2008) 163-175
22. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement; 12nd ed. CLSI Supplement M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017
24. G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, *Nat Protoc.* 3 (2008) 1125-1131.
25. N. Velikova, K. Kavanagh, J.M. Wells, *BMC Microbiology*, 16 (2016) 291.
26. H. Pera, T.M. Nolte, F.A.M. Leermakers, J.M. Kleijn, *Langmuir* 30 (2014) 14581–14590.
27. J.C. Dijt, J.E. Hofman, G.J.Fleer, *Coll. Surf.* 51 (1990) 141-158.
28. J.C. Dijt, M.A. Cohen Stuart, G. J. Fleer, *Adv. Coll. Int. Sci.* 50 (1994) 79-101.
29. J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle, *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Biomem.* 1469 (2000) 159-195.

30. H. Lang, C. Duschl, M. Gratzel, H. Vogel, *Thin Solid Films* 210 (1992) 818-821.
31. *Light Scattering From Polymer Solutions* (Ed. M.B. Huglin; Academic Press: New York, 1972).
32. C. A. Keller, K. Glasmästar, V.P. Zhdanov, B. Kasemo *Phys. Rev. Lett* 84 (2000) 5443-5446.
33. S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J.H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman. *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389-3402.
34. A. Sali, T.L. Blundell. *J. Mol. Biol.* 243 (1993) 779-815.
35. R.A. Laskowski, M.W. Macarthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J Appl Crystallogr.* 26 (1993) 283-291.
36. M. Wiederstein, M.J. Sippl. *Nucl. Ac. Res.* 35 (2007):W407-410.
37. E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Model.* 7 (2001) 306-317.
38. S. Miyamoto S, P.A. Kollman, *J. Comput. Chem.* 13 (1992) 952-962.
39. P. Shingate, R. Sowdhamini, *PLoS ONE* 7 (2012) e39305.
40. L. Hugonin, V. Vukojević, G. Bakalkin, A. Gräslund, *FEBS Letters* 580 (2006) 3201–3205.
41. V. Balhara, R. Schmidt, S.-U. Gorr, C. DeWolf, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 2193–2203.
42. W. Li, N. M. O'Brien-Simpson, J. Tailhades, N. Pantarat, R.M. Dawson, L. Otvos Jr., E.C. Reynolds, F. Separovic, M. A. Hossain, J.D. Wade, *Chemistry & Biology* 22 (2015) 1250–1258.

Supplementary Information

Maldi MS and MS/MS analysis of E₁₀ Ctn[15-34] peptide

MALDI MS analysis revealed that 30 min after dissolving the peptide E₁₀ Ctn[15-34] in 10 mM Tris 100 mM NaCl, pH 7.5 and 10 mM K₂HPO₄ 50mM Na₂SO₄, pH 7.4 buffer, no modification of its mass (3662 Da) could be detected (Fig. SI-1A and B). For further confirmation, MS/MS analysis for the peptide was also performed, indicating the presence of 10 glutamic acids at the N-terminal portion, without the loss of a water molecule (18 Da loss). This means no pyroglumatization (cyclization) occurred for the first glutamic acid residue (Fig. SI-1C and D). The same analysis performed after keeping the peptide in the buffer at 37 °C for 24h, gave an identical result (Fig SI-2).

Initial configurations for MD simulations

In silico studies were carried out as described in the Materials and Methods section, to arrive at three dimensional structures for the peptides Ctn[15-34], E₁₀-Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34] to be used as initial configurations for the MD simulations. Molecular modeling simulations revealed that all peptides show three to four turns of α -helix at the N-terminus, and have a highly disordered coil conformations at the C-terminus (PMVIGVTIPF-NH₂) (Fig. SI-3). From the modeling it also appears that the addition of pro-peptides (E₁₀ and (GS)₄) at the N-terminus seems (not taking in account any biomimetic environment) to enhance the helical content of Ctn[15-34] (Fig. SI-3B and C). Theoretical models for Ctn[15-34], E₁₀-Ctn[15-34] and (GS)₄-Ctn[15-34] were validated according to their fold quality, the models had z-scores in agreement to those observed for solution NMR structures deposited on PDB (Table SI-1). In addition, for all validated models, >90% of amino acid residues had angles within the most favorable regions in the Ramachandran plot, as well as overall g-factors

above -0.5, suggesting they are indeed reliable structures to be used as initial configurations for our Molecular Dynamics simulations (Table SI-1).

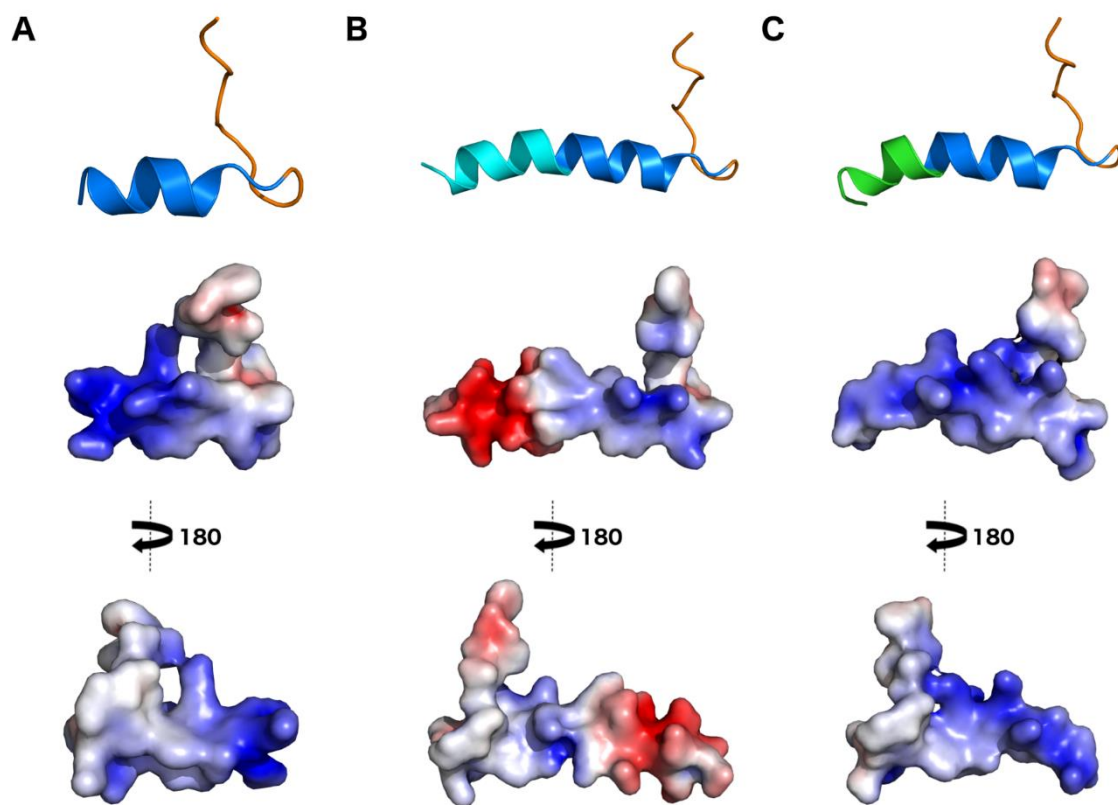


Fig SI-3 - Lowest free-energy three-dimensional theoretical models for (A) Ctn[15-34], (B) E₁₀-Ctn[15-34] and (C) (GS)₄-Ctn[15-34]. Adaptive Poisson-Boltzmann solver (APBS) electrostatic potential of (A) Ctn[15-34], (B) E₁₀-Ctn[15-34] and (C) (GS)₄-Ctn[15-34] ranging from -5 kT/e (red) to $+5$ kT/e (blue).

Table SI-1

Peptide	ProSA-web (z-score)	PROCHECK (G-factor)	Ramachandran plot (most favorable region)%
Ctn[15-34]	-0.79	0.14	100
E ₁₀ -Ctn[15-34]	-1.07	-0.07	96
(GS) ₄ -Ctn[15-34]	-0.9	0.09	90

Table SI- 1 - Folding quality and stereochemical validation of the three-dimensional theoretical models of Ctn[15-34] and its analogues

Capitulo III
Artigo Científico submetido à BBA
Biomembranes

Rational design of snake cathelicidin-derivate with bactericidal potential

Nelson G. O. Júnior^{1,2,3}, Marlon H. Cardoso^{1,3,7}, Nadya Velikova⁴, Marcel Giesbers⁵, Jerry M. Wells⁴, Taia M. B. Rezende^{1,6}, Renko de Vries², Octávio L. Franco^{1,3,7*}

¹Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, Brazil

²Physical Chemistry and Soft Matter, Wageningen University, Stippeneng 4, 6708 WE Wageningen, the Netherlands

³Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil

⁴Host-Microbe Interactomics, Animal Science Department, Wageningen, the Netherlands

⁵Wageningen Electron Microscopy Centre, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen, the Netherlands

⁶Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Campus I, Águas Claras, Brasília, Distrito Federal, Brazil;

⁷S-inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, Brazil

Nelson Gomes de Oliveira Júnior: juroyal@gmail.com

Marlon Henrique Cardoso: marlonhenrique6@gmail.com

Nadya Velikova: nadya.velikova@wur.nl

Marcel Giesbers: marcel.giesbers@wur.nl

Jerry Wells: jerry.wells@wur.nl

Taia Maria Berto Rezende: taiambr@gmail.com

Renko de Vries: renko.devries@wur.nl

Octávio Luiz Franco: ocfranco@gmail.com

*Correspondence

Octávio Luiz Franco

Email: ocfranco@gmail.com

Universidade Católica Dom Bosco - Pós-Graduação em Biotecnologia - Coordinator of S-
Inova - CEP: 79117-900

Campo Grande, Mato Grosso do Sul, - Brazil

Phone: +55 67 3312-3300

Abstract

The spread of multi-drug resistance and slow speed at which new antibiotics come onto the market are undermining our ability to treat human infections. The cathelicidins are a class of antimicrobial peptides being explored as novel antimicrobial agents, through sequence modifications to enhance activity and stability while lowering cytotoxicity. In this study, we describe the antimicrobial activity and structural characteristics of two new rationally designed AMPs, named BotrAMP14 and CrotAMP14, which are based on the snake viperidins batroxidin and crotalidin respectively. Peptides BotrAMP14 and CrotAMP14 showed broad-spectrum antimicrobial activity against type strains and clinical isolates of pathogenic bacteria (MIC in the range 4-32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), with a low in vitro and in vivo toxicity against Caco-2 cell lines and larvae of the *Galleria mellonella* moth. In silico predictions and circular dichroism showed both peptides form α -helices, capable of disrupting *E.coli* membranes. Based on our findings, we concluded that BotrAMP14 and CrotAMP14 form pores in bacterial membranes leading to cell death as proposed for the natural AMP crotalidin.

Keywords: Antimicrobial peptides, cathelicidins, rational design, bacterial resistance

1. Introduction

The discovery of penicillin and streptomycin during the golden age of antibiotics heralded a revolution in medical treatment of infections, but the spread of antibiotic resistance has made these antibiotics ineffective against many common pathogens [1]. Overuse and misuse of antibiotics select for microbial resistance through a variety of mechanisms [1]. Horizontal transfer of resistance determinants within and between species has led to the emergence of pathogens which are resistant to multiple drugs [2], reducing our capacity to treat infections with multi-drug resistant bacteria [1].

Research on the development of new strategies to combat antibiotic-resistance has intensified, including research on the use of antimicrobial peptides (AMPs), which represent one of the oldest innate defense mechanisms of eukaryotic organisms [3-5]. The composition and biological effects of AMPs found in nature are diverse; they were initially studied because of their antimicrobial activity, and it was discovered that they possess a rich spectrum of other biological activities, such as immunomodulatory, wound healing, and anticancer [5-9].

The number of potent antimicrobial AMPs available in various species of living beings provides a remarkable resource for the development of improved synthetic variants [10]. AMPs can range in length from 2-50 amino acid residues, and have a great diversity of amino acid composition, structure and size. The rational (re)design of antimicrobial peptides provides further possibilities to enhance their activity and increase stability. Sequence modifications of natural peptides that have been explored may increase helicity, or alter the net charge. Such modifications have been reported for cationic host AMPs such as cecropins, magainin, melittin and also cathelicidins [10-15]. AMPs have also been designed de novo based on amphipathic α -helical structures limiting the changes to one basic amino acid residue (lysine or arginine), and one or two hydrophobic amino acids (alanine,

leucine/isoleucine, phenylalanine, or tryptophan) [16]. AMPs typically have a positive net charge allowing an electrostatic interaction with negatively charged membranes of bacteria [17-20]. Besides the positive net charge, hydrophobicity is one of the most striking features related to AMPs, which allows penetration and disruption of the cell membrane [5]. Furthermore, an increase of hydrophobic amino acids in the peptide sequence has been correlated with low toxicity for mammalian cells [5]. The conformational flexibility of AMPs is related in part to their amphipathic nature, which makes them able to adopt varied structures, such as α -helices, β -sheets or a mixture of both, which are formed after interaction with the microbial membrane [5].

Among the several classes of antimicrobial peptides, the cathelicidin related antimicrobial peptides (CRAMPs) produced by several vertebrates, including mammals and snakes, have been widely studied [21]. Cathelicidins are often expressed and secreted by epithelial cells lining animal glands or mucosa. The N-terminal domain is a highly conserved region composed of its signal peptide and the cathelin domain. On the other hand, its C-terminal domain, where the mature peptide is located, is highly variable in length and sequence, both interspecies and intraspecies [22, 23]. Cathelicidins found in reptiles, particularly lizards and snakes, produce the molecules that have a broad spectrum of antimicrobial activity against a huge variety of bacterial fungi and viruses [24]. In addition to their antimicrobial effect, cathelicidins have been reported to have other effects, such as triggering immunogenic responses in the host, representing a large source of peptides with therapeutic potential [24, 25]. In this study we present the antimicrobial activity and structural characteristics of two new rationally designed AMPs, BotrAMP14 and CrotAMP14, derived from the snake viperacidin peptides batroxidicin and crotalicidin [26].

2. Material and Methods

2.1. Peptide synthesis and preparation

The peptides botrAMP14 (KKRVKKFFRKPRVIGVTFFP-NH₂) and crotAMP14 (KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF-NH₂) were purchased from Pepscan (Lelystad, the Netherlands) and had a reported purity of >95%. The molecular mass for the peptides was confirmed using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-ToF) on mass spectrometer Ultraflex MALDI-TOF III (Bruker Daltonics) [27]. The concentration of the synthetic peptides was determined using measurements of absorbance at 205, 215 and 225 as described by Niebergall and co-workers [28].

2.2. In vitro antimicrobial assays

Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) determinations were performed for the ATCC strains *Escherichia coli* 25922 and *Staphylococcus aureus* 25923, and for the clinical isolates, *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *Klebsiella pneumoniae* 1445333 and *E. coli* 1812446. Mueller-Hinton (Himedia) broth was used to grow the strains overnight at 37 °C. MIC measurements were performed using 5x10⁵ CFU and dilution of the peptides BotrAMP14 and CrotAMP14 starting from 128 µg.ml⁻¹. The MIC was determined after 24h of incubation at 37°C, assessed as the minimal 100% inhibitory concentration. The absorbance was measured in a 96-well plate at 600 nm. Bacteria cultured only in Mueller-Hinton and containing the antibiotics (chloramphenicol, gentamicin and imipenem) were used as negative and positive control, respectively. MBCs were determined by plating out 10 µl of the contents of the wells where no bacterial growth was observed on MH agar plates. MBC was recorded as the lowest concentration at which no colonies were observed after 24h incubation at 37°C.

2.3. Neutral-red (NR) *in vitro* toxicity assay

Toxicity of the peptides to Caco-2 cells, at increasing peptide concentrations, was determined using a neutral-red (NR) assay as described previously [29]. After overnight incubation of Caco-2 cells with the peptides BotrAMP14 and CrotAMP14 at concentrations from 2-128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10 μL of a 33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ NR solution was added to the wells containing the peptide-incubated cells. After 3 more hours of incubation, the supernatant was removed and the cells were washed with PBS. Next, 150 μL of 1% (v/v) acetic acid-50% (v/v) ethanol was added and shaken for 10 min at room temperature. Finally, the absorbance was measured at 540 nm and 690 nm (background absorbance) using a SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices). Readings were expressed as NR uptake relative to the uptake of the cells exposed to the negative control (medium or DMSO).

2.4. *Galleria mellonella* *in vivo* toxicity assay

In vivo toxicity was assayed using *Galleria mellonella* larvae [30] in their final instar stage. The larvae were purchased (UK Waxworms Ltd, Sheffield, UK), and acclimatized in the dark at 15 °C, and used within 14 days. Only larvae between 0.2 and 0.3 g were used for experiments. Larvae were injected with 20 μL of BotrAMP14 and CrotAMP14 peptide solutions, or controls in the left posterior proleg using Terumo Myjector 29G insulin syringes (VWR International). Two negative control groups were included in every experiment; one group was not injected to control for background larval mortality (no manipulation control) and the other group (uninfected control) was injected with PBS to control for the possible effect of physical trauma on mortality. After injection, larvae were acclimatized in Petri dishes in the dark at 37 °C with 5% CO₂ for up to 144 h post-inoculation, and inspected every 24 h for survival. For each sample (non-manipulated control, water control, peptides) fifteen randomly chosen larvae were used. The peptide concentration was 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of body weight.

2.5. Circular Dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were obtained using a Jasco-715 spectro-polarimeter equipped with a Peltier element for temperature control. CD spectra were obtained in the far-UV range, from 190 to 260 nm using a quartz cuvette with 0.1cm optical path. An averaging of 20 single scans was obtained for the peptide concentration of 0.2 mg.mL⁻¹, for demi water, 10 mM potassium phosphate buffer at pH 7.4, and SDS 30%. All the spectra were fitted using the CONTIN algorithm as implemented in the DICHROWEB [31, 32] webserver, using the data basis set #7 for a quantitative interpretation of the spectra in terms of a percentage of α -helical structure.

2.6. Molecular modeling

Initially, BLASTp [33] was performed in order to find the best template structures for the molecular modeling of BotrAMP14 and CrotAMP14. Further, 100 theoretical three-dimensional models were constructed using Modeller v. 9.12 [34], based on the nuclear magnetic resonance (NMR) structure of a crotalicidin isolated from venom of the rattlesnake (*Crotallus durissus*) (PDB code: 2MWT). The lowest free-energy theoretical models (DOPE score) for both peptides were then selected and used for validation procedures according to their fold (ProSA-web) [35] and stereochemistry (PROCHECK) [36]. Structure visualization was done in PyMOL (<http://www.pymol.org>).

2.7. Molecular dynamics in water and mimetic vesicles POPC/POPG

Molecular dynamics (MD) simulations for BrotAMP and CrotAMP were carried out in water, using the single point charge (SPC) water model. The simulations were performed using the GROMOS96 43A1 force field from the computational package GROMACS v.5.0.4 [37]. The validated tridimensional theoretical models for both peptides were used as initial

structures in the simulations and further immersed in 3,237 and 2,817 water molecules, respectively, in cubic boxes. Chloride ions were added to neutralize the systems' charge. MD simulations in SDS were carried out in dodecahedron boxes, where both peptides were put in contact with SDS micelles constituted of 100 detergents. SDS micelles were built, and their topologies generated using the CHARM-GUI server [38]. Geometry of water molecules was constrained using the SETTLE algorithm [39]. Moreover, the LINCS algorithm was used to link all the atom bond length. Particle Mesh Ewald (PME) was used for electrostatic corrections with a radius cut-off of 1.4 nm to minimize the computational simulation time. The same radius cut-off was used for van der Waals interactions. The list of neighbors of each atom was updated every 10 simulation steps of 2 fs each. The steepest descent algorithm (50,000 steps) was applied for energy minimization. The systems underwent a normalization of temperature and pressure to 300 K and 1 bar using the velocity rescaling thermostat (NVT) and the Parrinello-Rahman barostat (NPT), respectively, for 100 ps. The systems with minimized energy and balanced temperature and pressure were submitted to molecular dynamics simulation for 100 ns. Molecular dynamics (MD) studies were also performed in membrane environment using a 50 Å² 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC)/1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (POPG) bilayer, in a molar ratio of 1:1. The CHARMM-GUI server [38] was used to place BotrAMP14 and CroAMP14 in the bilayers using the insertion method. The topology files for POPC and POPG were obtained from ATB [40], and the assembled system was simulated using the GROMOS96 53a6 force field. Similarly to the simulation in water, the peptide/bilayer systems underwent a normalization of temperature and pressure to 300 K and 1 bar using the velocity rescaling thermostat (NVT) and the Parrinello-Rahman barostat (NPT), respectively, for 100 ps. The systems with minimized energy and balanced temperature and pressure were submitted to molecular dynamics simulation for 100 ns, using the leap-frog algorithm.

2.8. Scanning Electronic Microscope

Scanning electronic microscope (SEM) analysis was performed by the Adherence of Cells to Poly-L-Lysine-Coated Slides analysis technique. Prior to SEM analysis, *E. coli* ATCC 25922 was grown in Mueller-Hinton (Himedia) broth overnight at 37°C, and the concentration of 5×10^5 CFU was used to the analysis. The bacterial cultures were centrifuged, and phosphate buffer was used to replace the MH broth. The bacterial culture was increased by $16 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ and $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ for BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides respectively, for 0, 5, 30 and 60 minutes of incubation. Samples for SEM were prepared by leaving microscopes slide coated with poly-L-lysine in a 10 mL suspension of the cells incubated with the peptides and allowing the cells to settle at room temperature for 60 min, for the cells to adhere to the surface of the slides. Next, 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer was used for fixation. Finally, water was removed using critical point drying: first, the samples were immersed in a graded series of increasing ethanol: 25%, 50%, 75%, and two x 100% each for 10 min. This was followed by transferring the samples to absolute ethanol, and by critical point drying.

3. Results

3.1. Rational design of peptides

The sequences of the new BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides were based on subsequences of two pit-viper cathelicidins: the subsequence Btn[15-34] of batroxicidin ($^{15}\text{KKRVKKFFRKPRVIGVTFPF}^{34}$) and the subsequence Ctn[15-34] of crotalicidin ($^{15}\text{KKRLKKIFKKPMVIGVTIPF}^{34}$) (Figure 1A).

Table 1. Physicochemical properties of the peptide templates and the final peptides.

Peptides	Residues	Net charge^a (pH7)	pI^b	Hydrophobicity^c <H>	Hydrophobic moment^c <μH>	Molecular mass
Batroxicidin	34	+16	12.50	0.207	0.473	4258.29
Crotalicydin	34	+16	12.09	0.263	0.440	4151.33
Btn[15-34]	20	+9	12.32	0.317	0.306	2478.08
Ctn[15-34]	20	+8	11.43	0.455	0.311	2371.07
BotrAMP14	14	+8	12.04	0.390	0.888	1957.46
CrotAMP14	14	+8	11.43	0.354	0.849	1820.43

^a Determined for C-terminal amidated (NH₂) peptides

^b Determined by the compute_pi algorithm (http://web.expasy.org/compute_pi/)

^c Determined by the Heliquest server (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>)

These analogues were first mapped onto a helical wheel diagram [41], in order to identify, respectively, the cationic and hydrophobic faces of the BotAMP14 and CrotAMP14 peptides when folded into an α -helix. (Figure 1B). In order to arrive at the BotrAMP14 and CrotAMP14 sequences, we applied a number of mutations that enhance the amphipathic nature of the peptides. For Btn[15-34] we replaced residues (K^1 , V^4 , P^{11} , R^{12} , G^{15} , V^{16} , T^{17} and P^{19}), by residue W^3 and K^{12} to arrive at BotrAMP14. Similarly, for Ctn[15-34] replaced residues (K^1 , P^{11} , V^{13} , G^{15} , V^{16} , T^{17} and P^{19}), by residue K^{12} to arrive at CrotAMP14.

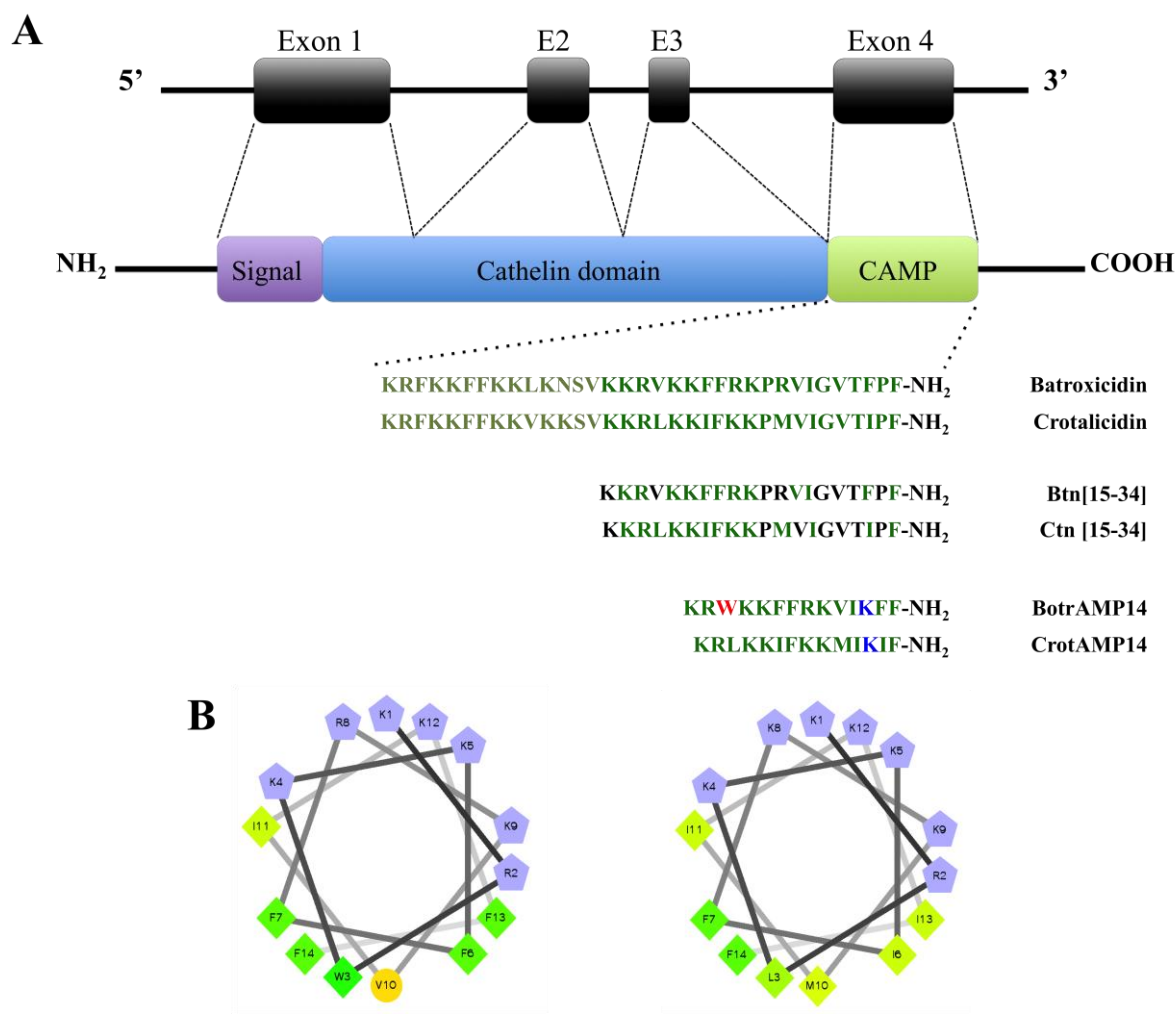


Figure 1. A. Domain structure of crotalicidins in general followed by the sequence of the natural occurring viperidins (Batroxicidin and Crotalicidin), the sequence of the intermediate peptides (Btn[15-34] and Ctn[15-34]) and the rational designed peptides BotrAMP14 and CrotAMP14. The green letters represent the original amino acid sequence. The black letters represent the discarded amino acid. The red letters represent hydrophobic amino acids included, and the blue letters represent the cationic amino acids included. B. Helical-wheel projections for BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides.

3.2. Antimicrobial properties

For both peptides, the *in vitro* antimicrobial activity was tested against different bacterial strains, both gram-negative and gram-positive. As shown in Table 2, the peptides BotrAMP14 and CrotAMP14 exhibited a pronounced activity against Gram-negative bacteria both for ATCC and multi-resistant clinical isolates. As shown in Table 2, the peptide BotrAMP14 was shown to be less active against *E.coli* ATCC 25922 than CrotAMP14, presenting a MIC of 16 and 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. However, both of the peptides exhibit the same MIC of 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the clinical isolate *E.coli* 1812446 (Table 2). On the other hand, for the clinical isolate *K.pneumoniae* 1445333, the activity of BotrAMP14 was higher than CrotAMP14, respectively 4 and 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, and slightly better for *P. aeruginosa* P14, 32 and 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Table 2). Finally, for Gram-positive *S.aureus* ATCC 25923, both peptides presented the same MIC activity of 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Table 2).

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal bactericidal concentration (MBC) of BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides against ATCC and clinical isolated bacteria.

Microorganisms	Gram	BotrAMP14		CrotAMP14	
		$\mu\text{g.mL}^{-1}$			
		MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	16	32	4	4
<i>E.coli</i> KPC+ 1812446	-	4	4	4	4
<i>K. pneumoniae</i> KPC+ 144533	-	4	32	32	32
<i>P. aeruginosa</i> PA14	-	32	64	64	64
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	32	32	32	32

3.3. Toxicity of peptides for Caco-2 cells and Galleria mellonella

We studied toxicity of the peptides *in vitro* against eukaryotic cells and *in vivo* using *G. mellonella* larvae. A neutral red uptake (NRU) assay was used to determine the viability of mammalian Caco-2 cells as a function of peptide concentration. For BotrAMP14 peptides we observed a viability of 100% at the maximum concentration (160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figure 2A). CrotAMP14 peptides were somewhat toxic for Caco-2 cells, and resulted in viability higher

than 60% for the maximum concentration used ($160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figure 2A). For a measure of *in vivo* toxicity, both peptides were tested on the greater wax moth *G. mellonella* larvae for a period of 144 h, at a peptide concentration of $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of body weight (Figure 2B). Survival curves indicated that both peptides are weakly toxic. For the BotrAMP14 peptide, the survival percentage of the larvae was higher than 85% on the last day of the experiment, after 144h. The peptide CrotAMP14 was somewhat more toxic, and after 144 h presented a percentage of survival higher than 70% for the *G. mellonella* larvae (Figure 2B).

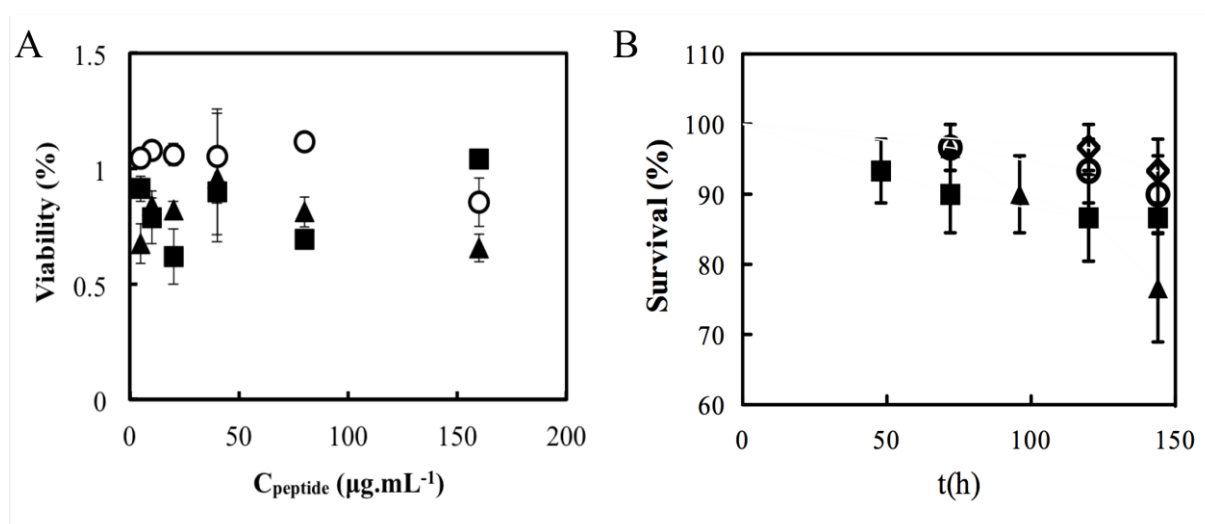


Figure 2. Toxicity of the peptides BotrAMP14 and CrotAMP14. In vitro neutral red uptake assay for Caco-2 cells. A. Viability as compared to untreated Caco-2 cells as a function of peptide concentration. Empty circle: PBS buffer control, filled square: BotrAMP14, filled triangle: CrotAMP14. B. In vivo toxicity of the peptides for *Galleria mellonella* larvae. Percentage surviving larvae as a function of time. Empty circle: H₂O control, empty diamond: non-manipulated, filled square: BotrAMP14, filled triangle: CrotAMP14.

3.4. Structural evaluation

In order to elucidate the secondary structure for the novel BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides, measurements of circular dichroism allied to molecular modeling were performed in several environments. Circular dichroism spectra were acquired in demi water, 10 mM potassium phosphate buffer at pH 7.4 and in 30% SDS. Results are shown in Figure 3. Spectra for BotrAMP14 and CrotAMP14 in demi water and in 10 mM potassium phosphate buffer (Figure 3A-B) were indicative of a random coil secondary structure in these solvents.

However, in a membrane mimetic environment (30% SDS) the spectra were clearly indicative of an α -helical structure for both peptides (Figure 3C). Model fits of the CD-spectra were used to obtain a more quantitative assessment of the secondary structure of the peptides in the different solvents. As also indicated in Figure 3A-B, from fitting the spectra for the BotrAMP14 peptide, we estimated a percentage random coil structure in demi water and 10 mM potassium phosphate buffer of 38.8% and 61.6% respectively. For CroAMP14, the percentages were very similar, viz. 48.7% and 66.9%. On the other hand, the dominant type of secondary structure in SDS 30% solutions for both peptides was the α -helical secondary structure. By fitting the spectra, we found percentages of α -helical secondary structure of 65.5% and 69.1%, respectively, for BotrAMP14 and CroAMP14.

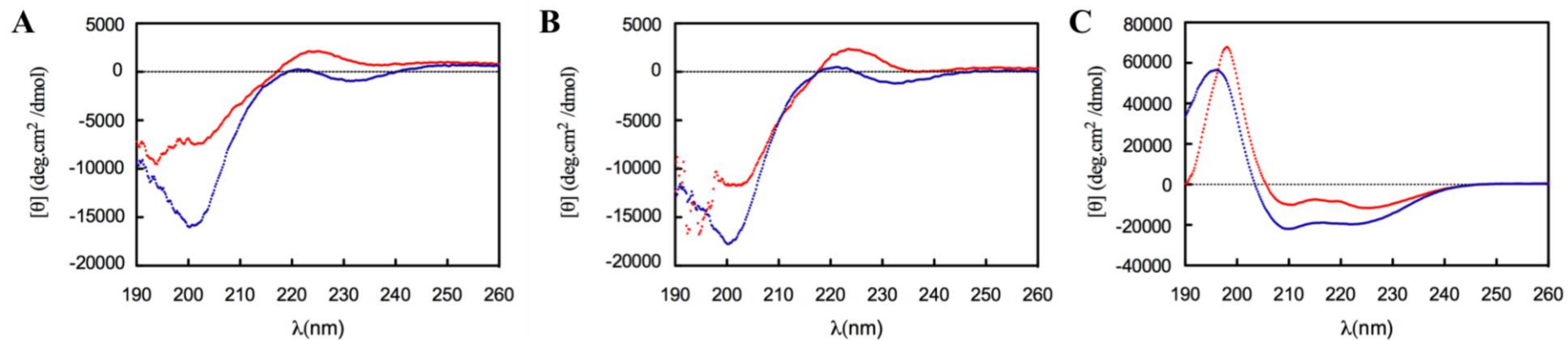


Figure 3. Circular dichroism spectra of the peptides BotrAMP14 (red) and CrotAMP14 (Blue). Residue molar ellipticity $[\theta]$ in $\text{deg.cm}^2/\text{dmol}^{-1}$ is plotted versus the wavelength λ in nm. Measurements were done at a peptide concentration of 0.2 mg.mL^{-1} in demi water (A) $10\text{mM K}_2\text{HPO}_4$ $50\text{mM Na}_2\text{SO}_4$ buffer, pH 7.4 (B) and SDS 30% (C).

Molecular modeling of BotrAMP14 and CrotAMP14 also indicated that both peptides may adopt an α -helical conformation (Figure 4A and 5A), as a consequences of their rationally designed strongly amphipathic nature, with hydrophobic and positively charged faces in a helical wheel representation (Figure 1B). The MD simulations in water (Figure 4B, 5B) corroborated that in this solvent both BotrAMP14 and CrotAMP14 adopted a random coil configuration: after 100 ns of simulation time, both peptides were largely unfolded. In contrast, for the MD simulations in SDS it was found that the α -helical structure remained stable for the 100 ns of simulation time (Figure 4C and 5C). Unfolding to a random coil configuration in water and preservation of α -helical structure in 30% SDS was also evident from the time development of the Root-mean-square-deviations (RMSD) as compared to the initial configurations (Figure 4D, 5D).

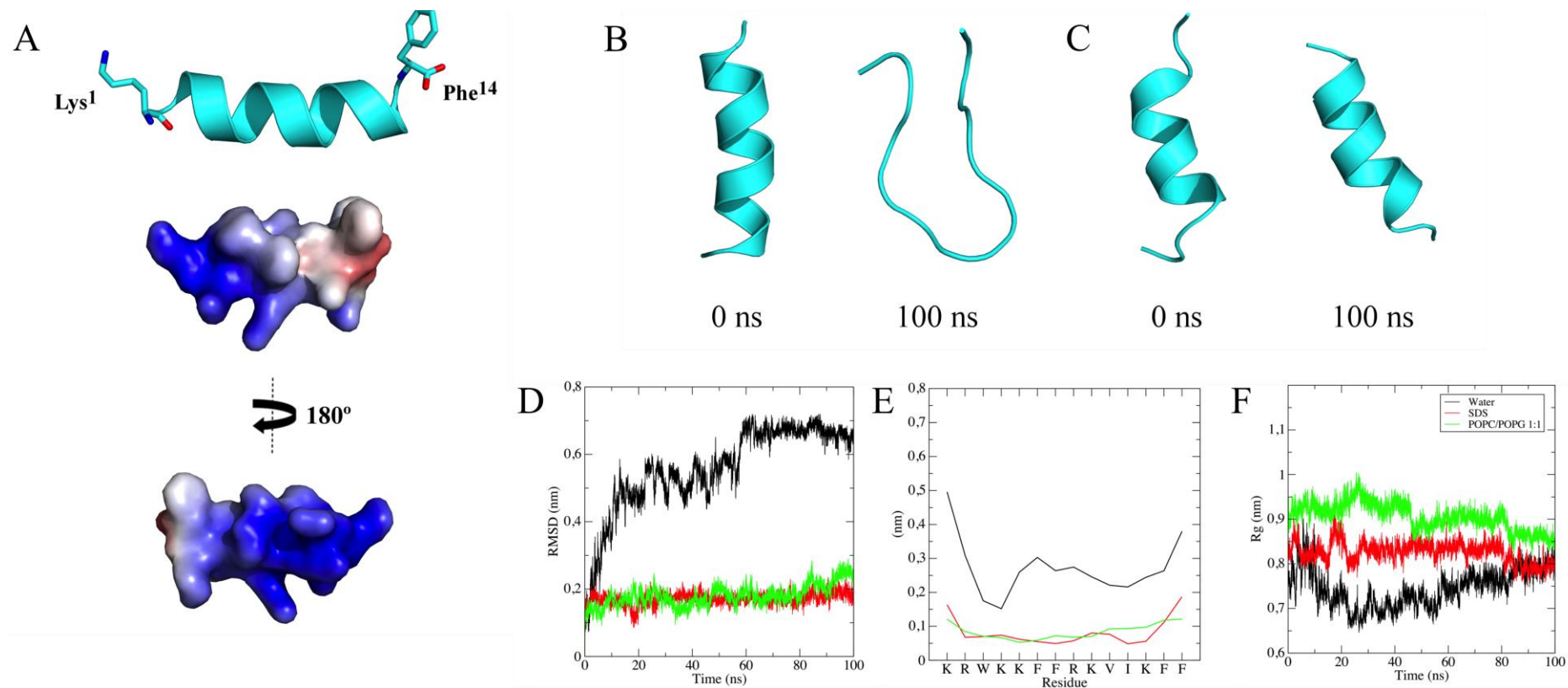


Figure 4. A. Lowest free energy theoretical model for BotrAMP14. Adaptive Poisson-Boltzmann solver (APBS) electrostatic potential of BotrAMP14; potential ranges from -5 kT/e (red) to $+5$ kT/e (blue). B. Structural snapshots of BotrAMP14 in water after 100 ns of molecular dynamics (MD) simulations. C. Structural snapshots of BotrAMP14 in SDS after 100 ns of molecular dynamics (MD) simulations. MD analyses, including root mean square deviation (RMSD) (A), root mean square fluctuation (RMSF) (B) and radius of gyration (Rg) (C) are also shown.

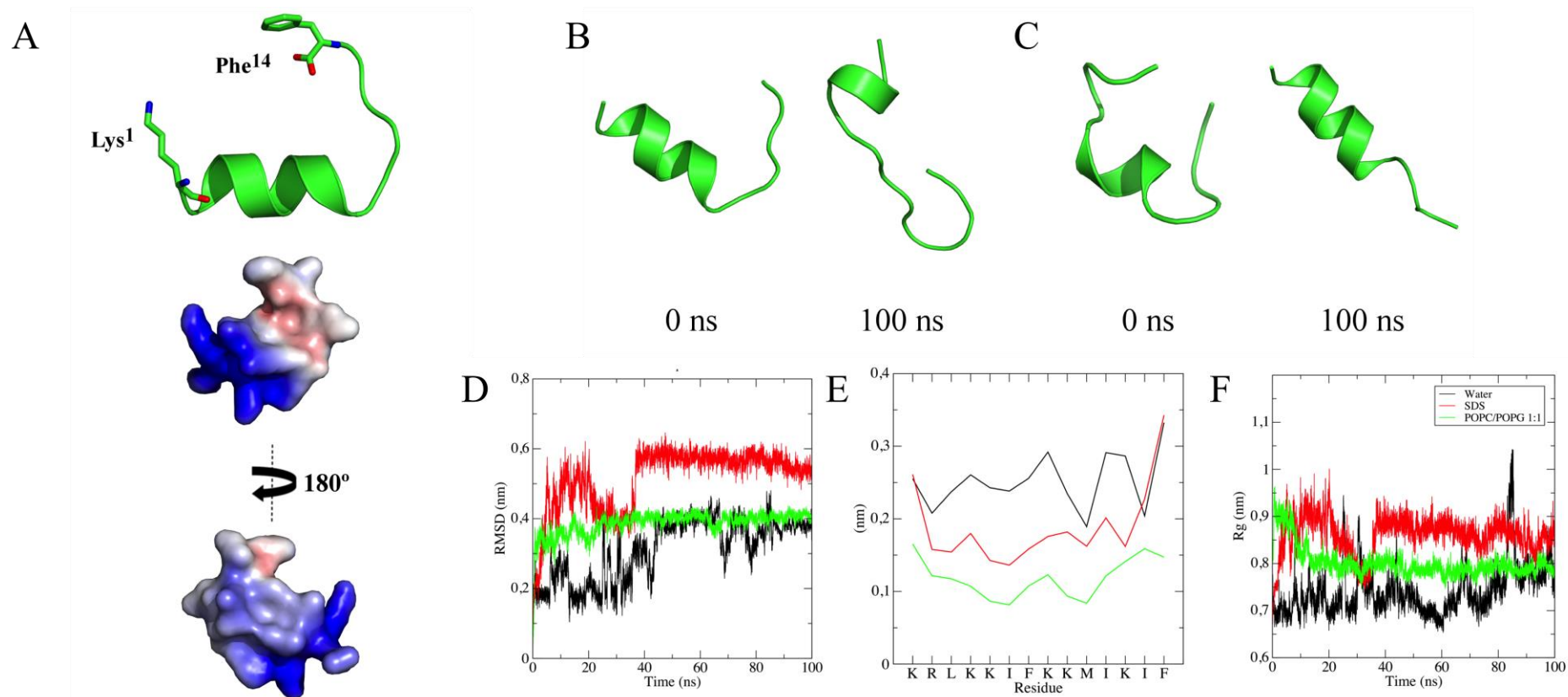


Figure 5. A. Lowest free energy theoretical model for CrotAMP14. Adaptive Poisson-Boltzmann solver (APBS) electrostatic potential of BotrAMP14; potential ranges from -5 kT/e (red) to $+5$ kT/e (blue). B. Structural snapshots of CrotAMP14 in water after 100 ns of molecular dynamics (MD) simulations. C. Structural snapshots of CrotAMP14 in SDS after 100 ns of molecular dynamics (MD) simulations. MD analyses, including root mean square deviation (RMSD) (A), root mean square fluctuation (RMSF) (B) and radius of gyration (Rg) (C) are also shown.

3.5. Membrane interaction analyses

Scanning electron microscope analysis was performed to clarify the mechanism of bacterial death at MIC concentrations for BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides at different incubation times. The high-resolution images showed that both peptides induced damage to *E.coli* ATCC 25922 bacterial cells (Figure 6). Results for the BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides were similar. At time 0h (control), no damage to the bacterial cells (Figure 6A-B) was observed, but after 5 min of exposure of the *E.coli* cells to the peptides, holes in the bacterial outer membranes started to appear (Figure 6C-D). The number of these holes was larger at 30 min incubation time (Figure 6E-F). Finally, after 1 h of incubation larger-scale damage to the cells was observed (Figure 6G-H).

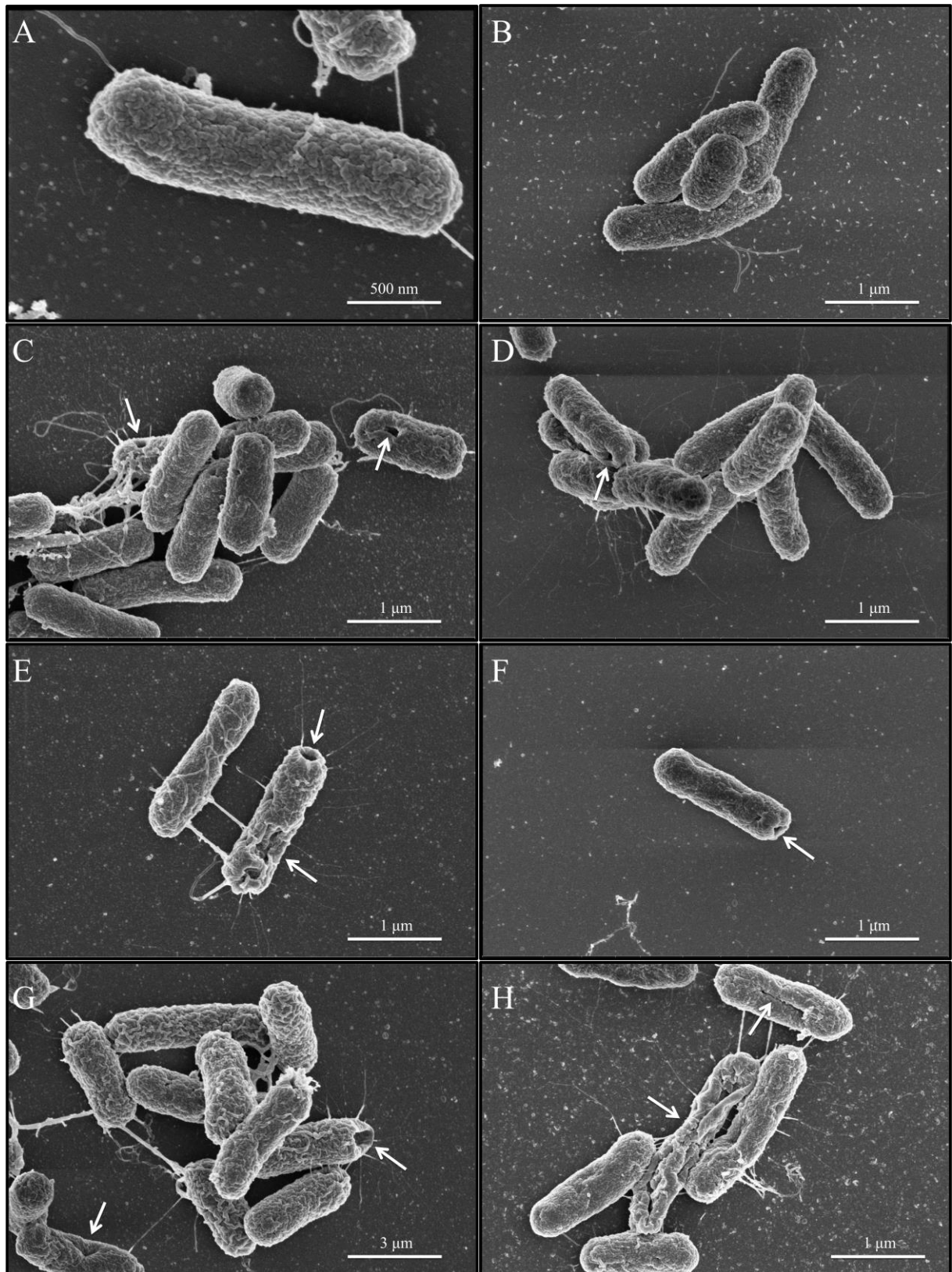


Figure 6. Scanning electronic microscope (SEM) high resolution images of *E.coli* ATCC 25922 in the presence of BotrAMP14 and CrotAMP14 peptides after 0 min (A-B), 5 min (C-D), 30 min (E-F) and 60 min (G-H) of incubations. Arrows indicate cell damage.

To further strengthen the hypothesis that antimicrobial activity is due to membrane disruption, MD simulations were also performed in a more realistic membrane-mimetic environment, viz., a mixed bilayer of POPC/POPG. Indeed, in this case, the α -helical initial structures were almost completely preserved during the 100 ns of simulation time, for both BotrAMP14 and CrotAMP14 (Figure 7A and B).

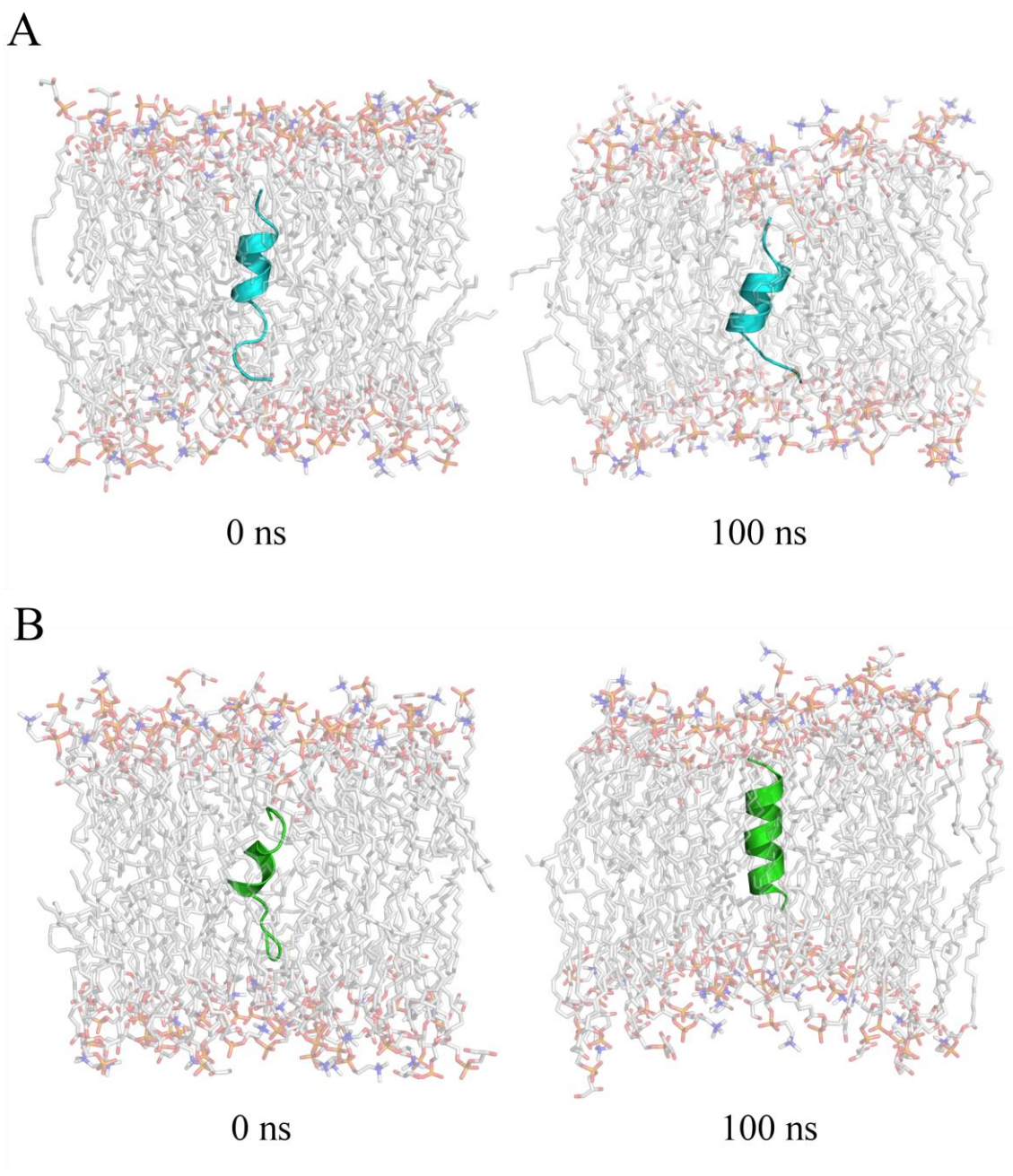


Figure 7. A. Structural snapshots of BotrAMP14 in POPC/POPG 1:1 (C) after 100 ns of molecular dynamics (MD) simulations. B. Structural snapshots of CrotAMP14 in POPC/POPG 1:1 (C) after 100 ns of molecular dynamics (MD) simulations.

4. Discussion and conclusions

The worldwide increase in antibiotic-resistant bacteria is driving the search for new compounds to fight these bacteria. AMPs are a potential alternative to traditional antibiotics, with attractive features such as their broad spectrum activity and slow development of

resistance [42]. However, in order for AMPs to be useful as medicines, adjustments need to be made to optimize these compounds with respect to their antimicrobial activity, stability and size. Cathelicidin related antimicrobial peptides (CRAMPs) are an attractive class of broad-spectrum AMPs that have other possibly interesting biological activities as well, such as being effectors of the immune system, and their ability to interact with nucleic acids, causing cell death [43, 44]. Rational redesign of their amino acid sequence, to tune amphipaticity, degree of helicity, charge, etc. [10], can be used to further improve their usefulness as future antimicrobial medicines. We here present two new AMPs derived from two snake cathelicidins. Previously, Falcao and colleagues [26] reported the discovery of two new viperidins, Crotalicidin and Batroxicidin, with very similar sequences and high antimicrobial capacity. Subsequently, Falcao and coworkers [45] showed that just a small part of the C-terminal Crotalicidin sequence (15-34 amino acid residues), named Ctn [15-34], was highly active against several microorganisms, while the N-terminal sequence showed low antimicrobial activity. Following the same rationale used for the peptide crotalicidin, where only its C-terminal region has been described as active against microorganisms, the C-terminal sequence (named Btn[15-34] by us) of the peptide batroxicidin (15-34 amino acid residues) was also used as a template for the creation of another peptide called BotrAMP14.

Cationic AMPs presenting α -helices (cecropins, lactoferrin, cathelicidins and magainins), and β -sheets (defensins, gramicidins and protegrins) are commonly modified using a rational design strategy which allows a shorter motif to be obtained, decreasing the cost of producing synthetic peptides for therapeutic applications [10]. In addition, removal of specific residues with undesired properties may also produce peptide analogues with a lower toxicity and immunogenic response, which may be related to the use of longer parental sequences [10]. This minimalist design was used here to create the new smaller peptides,

BotrAMP14 and CrotAMP14. The amino acid Lys (K¹²) was inserted in the sequences aiming for an efficient initial electrostatic interaction with the bacterial membranes, performing efficient microbial activity. Furthermore, lysine-rich peptides have reduced toxicity against eukaryotic cells [46]. The Trp (W³) was inserted because of its ability to position itself more deeply into the bacterial membrane, having a distinct preference for the interfacial region of lipid bilayers, making the BotrAMP14 peptide more efficient in disrupting the bacterial cell membrane [10, 47, 48].

The efficient antibacterial activity described here (Table 2) for the new rational designed peptides BotrAMP14 and CrotAMP14, is consistent with work on previous cathelicidin related antimicrobial peptides (CRAMP) [49]. Mostly, the analogue peptide CrotAMP14, in comparison with the data published for the subsequence Ctn [15-34], shows to be more active against gram-positive bacteria *S.aureus* ATCC and also the clinical isolates *E. coli* and *P. aeruginosa* [45]. This improved activity may be due to the fact that the analogue presents a higher percentage of α -helical structure than its parental template, besides a high hydrophobic moment. The propensity to form structures in amphipathic α -helices in mimic membrane environments has been demonstrated by several studies, which is important for the disruptive activity of AMPs [50]. More recently, Pérez-Peinado and coworkers [51] demonstrated that the zeta potential observed in the bacterial cell membrane would suggest that the cationic and α -helical peptides crotalycin and its analogue Ctn[15-34] accumulate and interact with the negative charges on the bacterial surface. In addition, the results of flow cytometry confirmed that both the peptide crotalycin and Ctn [15-34] could permeate the bacterial cell membrane, suggesting that its mechanisms of action are different from each other [51]. Once the results obtained by Perez-Peinado and coworkers [51] have been analyzed, it can be inferred that both the redesigned peptides used in our study can act in a

similar way to those described for crotalicidin and Ctn [15-34]. Indeed, the peptides BotrAMP14 and CrotAMP14 maintained many of the characteristics presented by the templates used (batroxicidin and crotalicidin), even after their reduction in size.

In relation to other CAMPs, Chen and coworkers [52] also demonstrated the activity of several peptides derived from the cathelicidin BF-30 (Bf-CRAMP), demonstrating that an oligopeptide of 15 amino acid residues (¹⁵⁷VKRFKKFFRKLKKS¹⁷²) maintained its minimal helical alpha structure required for an antimicrobial activity. Another study on cathelicidins focused on the use of short synthetic peptides of sequences incorporated into *Ophiophagus hannah* peptides (Oh-CRAMP and Oh-CATH), and distinct microbial activity and hemolysis were demonstrated relative to human erythrocytes in comparison with their original parent sequence [53]. Finally, Latour and coworkers showed the antimicrobial activity of peptides derived from *Naja atra*, composed of the ATRA motif, i.e., KR(F/A)KKFFKK(L/P)K. Moreover, the peptide showed insignificant toxicity to erythrocytes [54]. Cationic peptides sometimes show a high toxicity due to the increase in their net charges [55], and it is well known that the propensity for helical structuring plays a dominant role in determining AMP cytotoxicity [56]. Studies have shown that helicity related to AMPs may play a greater role for toxicity than for antimicrobial activity [57]. Contrary to what was demonstrated here, Wang and coworkers [58] showed that derivate crotalicidin EVP50 presented the highest toxicity activity against zebrafish larvae in comparison to the original viperidin sequences. On the other hand, other works performed with analogues/derivatives of cathelicidins indicated that such peptides had low toxicity of hemolysis [52-54].

In conclusion, it was possible to observe that the simple rational design of natural antimicrobial peptides can be a powerful tool in obtaining new active peptides, thus allowing

the manipulation of their most important characteristics to obtain activity. In addition, the peptides BotrAMP14 and CrotAMP14 seem to be reliable candidates for drug development, especially for the treatment of bacteria-related infections resistant to conventional antibiotics.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT); the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF); Dutch Polymer Institute (DPI) and the EU (H2020 project AND 659–121) and the Dutch Organization for Scientific Research NWO (ZonMw grant 541001008).

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- [1] E.D. Brown, G.D. Wright, Antibacterial drug discovery in the resistance era, *Nature*, 529 (2016) 336-343.
- [2] J. Davies, D. Davies, Origins and evolution of antibiotic resistance, *Microbiol Mol Biol Rev*, 74 (2010) 417-433.
- [3] J.M. Ageitos, A. Sanchez-Perez, P. Calo-Mata, T.G. Villa, Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria, *Biochemical pharmacology*, (2016).
- [4] E. Guani-Guerra, T. Santos-Mendoza, S.O. Lugo-Reyes, L.M. Teran, Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease, *Clin Immunol*, 135 (2010) 1-11.
- [5] H.K. Kang, C. Kim, C.H. Seo, Y. Park, The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review, *J Microbiol*, 55 (2017) 1-12.
- [6] M. Zaiou, Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases, *J Mol Med (Berl)*, 85 (2007) 317-329.
- [7] M.S. Baba, N.M. Zin, Z.A. Hassan, J. Latip, F. Pethick, I.S. Hunter, R. Edrada-Ebel, P.R. Herron, *In vivo* antimalarial activity of the endophytic actinobacteria, *Streptomyces* SUK 10, *J Microbiol*, 53 (2015) 847-855.
- [8] H. Kim, H.R. Kim, N.R. Kim, B.J. Jeong, J.S. Lee, S. Jang, D.K. Chung, Oral administration of *Lactobacillus plantarum* lysates attenuates the development of atopic dermatitis lesions in mouse models, *J Microbiol*, 53 (2015) 47-52.
- [9] S.D. Patil, R. Sharma, T. Bhattacharyya, P. Kumar, M. Gupta, B.S. Chaddha, N.K. Navani, R. Pathania, Antibacterial potential of a small peptide from *Bacillus sp.* RPT-0001 and its capping for green synthesis of silver nanoparticles, *J Microbiol*, 53 (2015) 643-652.

- [10] Z.Y. Ong, N. Wiradharma, Y.Y. Yang, Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials, *Adv Drug Deliv Rev*, 78 (2014) 28-45.
- [11] A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers*, 55 (2000) 4-30.
- [12] M. Dathe, H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, M. Bienert, Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Lett.*, 501 (2001) 146-150.
- [13] A. Tossi, M. Scocchi, B. Skerlavaj, R. Gennaro, Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes, *FEBS Lett.*, 339 (1994) 108-112.
- [14] B. Skerlavaj, R. Gennaro, L. Bagella, L. Merluzzi, A. Risso, M. Zanetti, Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 28375-28381.
- [15] D. Oh, S.Y. Shin, S. Lee, J.H. Kang, S.D. Kim, P.D. Ryu, K.S. Hahm, Y. Kim, Role of the hinge region and the tryptophan residue in the synthetic antimicrobial peptides, cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) and its analogues, on their antibiotic activities and structures, *Biochemistry*, 39 (2000) 11855-11864.
- [16] I. Zelezetsky, A. Tossi, Alpha-helical antimicrobial peptides-using a sequence template to guide structure-activity relationship studies, *Biochim. Biophys. Acta*, 1758 (2006) 1436-1449.

- [17] B.P. Ward, N.L. Ottaway, D. Perez-Tilve, D. Ma, V.M. Gelfanov, M.H. Tschop, R.D. Dimarchi, Peptide lipidation stabilizes structure to enhance biological function, *Mol Metab*, 2 (2013) 468-479.
- [18] H. Jenssen, P. Hamill, R.E. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin Microbiol Rev*, 19 (2006) 491-511.
- [19] R.M. Epand, H.J. Vogel, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 1462 (1999) 11-28.
- [20] R.E. Hancock, Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials, *Lancet Infect Dis*, 1 (2001) 156-164.
- [21] M. Pazgier, B. Ericksen, M. Ling, E. Toth, J. Shi, X. Li, A. Galliher-Beckley, L. Lan, G. Zou, C. Zhan, W. Yuan, E. Pozharski, W. Lu, Structural and functional analysis of the pro-domain of human cathelicidin, LL-37, *Biochemistry*, 52 (2013) 1547-1558.
- [22] M. Zanetti, The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals, *Curr Issues Mol Biol*, 7 (2005) 179-196.
- [23] M. Zanetti, R. Gennaro, D. Romeo, Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain, *FEBS Lett.*, 374 (1995) 1-5.
- [24] R. Perumal Samy, B.G. Stiles, O.L. Franco, G. Sethi, L.H.K. Lim, Animal venoms as antimicrobial agents, *Biochem. Pharmacol.*, 134 (2017) 127-138.
- [25] Y. Wang, J. Hong, X. Liu, H. Yang, R. Liu, J. Wu, A. Wang, D. Lin, R. Lai, Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics, *PloS one*, 3 (2008) e3217.
- [26] C.B. Falcao, B.G. de La Torre, C. Perez-Peinado, A.E. Barron, D. Andreu, G. Radis-Baptista, Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers, *Amino Acids*, 46 (2014) 2561-2571.

- [27] J.A. Gutierrez, J.A. Dorocke, M.D. Knierman, V. Gelfanova, R.E. Higgs, N.L. Koh, J.E. Hale, Quantitative determination of peptides using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Biotechniques*, Suppl (2005) 13-17.
- [28] P.J. Niebergall, A.M. Mattocks, A note on the use of multiple regression for spectrophotometric assays involving more than one component, *Drug Stand*, 28 (1960) 61-64.
- [29] G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nat Protoc*, 3 (2008) 1125-1131.
- [30] N. Velikova, K. Kavanagh, J.M. Wells, Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for studying the virulence of *Streptococcus suis*, *BMC Microbiol*, 16 (2016) 291.
- [31] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.*, 32 (2004) W668-673.
- [32] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers*, 89 (2008) 392-400.
- [33] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J.H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*, 25 (1997) 3389-3402.
- [34] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *Journal of molecular biology*, 234 (1993) 779-815.
- [35] M. Wiederstein, M.J. Sippl, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res.*, 35 (2007) W407-410.
- [36] R.A. Laskowski, M.W. Macarthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures, *J Appl Crystallogr*, 26 (1993) 283-291.

- [37] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, 1 (2015) 19-25.
- [38] E.L. Wu, X. Cheng, S. Jo, H. Rui, K.C. Song, E.M. Davila-Contreras, Y. Qi, J. Lee, V. Monje-Galvan, R.M. Venable, J.B. Klauda, W. Im, CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations, *Journal of computational chemistry*, 35 (2014) 1997-2004.
- [39] S. Miyamoto, P.A. Kollman, Settle - an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models, *J Comput Chem*, 13 (1992) 952-962.
- [40] A.K. Malde, L. Zuo, M. Breeze, M. Stroet, D. Poger, P.C. Nair, C. Oostenbrink, A.E. Mark, An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0, *J Chem Theory Comput*, 7 (2011) 4026-4037.
- [41] R. Gautier, D. Douguet, B. Antony, G. Drin, HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties, *Bioinformatics*, 24 (2008) 2101-2102.
- [42] A. Ahmad, E. Ahmad, G. Rabbani, S. Haque, M. Arshad, R.H. Khan, Identification and design of antimicrobial peptides for therapeutic applications, *Curr Protein Pept Sci*, 13 (2012) 211-223.
- [43] H. Zhao, T.X. Gan, X.D. Liu, Y. Jin, W.H. Lee, J.H. Shen, Y. Zhang, Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes, *Peptides*, 29 (2008) 1685-1691.
- [44] H. Wang, M. Ke, Y. Tian, J. Wang, B. Li, Y. Wang, J. Dou, C. Zhou, BF-30 selectively inhibits melanoma cell proliferation via cytoplasmic membrane permeabilization and DNA-binding in vitro and in B16F10-bearing mice, *Eur. J. Pharmacol.*, 707 (2013) 1-10.

- [45] C.B. Falcao, C. Perez-Peinado, B.G. de la Torre, X. Mayol, H. Zamora-Carreras, M.A. Jimenez, G. Radis-Baptista, D. Andreu, Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity, *J. Med. Chem.*, 58 (2015) 8553-8563.
- [46] H. Sato, J.B. Feix, Lysine-enriched cecropin-mellitin antimicrobial peptides with enhanced selectivity, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52 (2008) 4463-4465.
- [47] B.E. Haug, J.S. Svendsen, The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide, *J. Pept. Sci.*, 7 (2001) 190-196.
- [48] D.I. Chan, E.J. Prenner, H.J. Vogel, Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta*, 1758 (2006) 1184-1202.
- [49] M.A. Fox, J.E. Thwaite, D.O. Ulaeto, T.P. Atkins, H.S. Atkins, Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II, *Peptides*, 33 (2012) 197-205.
- [50] D. Takahashi, S.K. Shukla, O. Prakash, G. Zhang, Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity, *Biochimie*, 92 (2010) 1236-1241.
- [51] C. Perez-Peinado, S. Almeida Dias, M.M. Domingues, A.H. Benfield, J.M. Freire, G. Radis-Baptista, D. Gaspar, M. Castanho, D.J. Craik, S.T. Henriques, A.S. Veiga, D. Andreu, Mechanism of bacterial membrane permeabilization of crotalicidin (Ctn) and its fragment Ctn[15-34], antimicrobial peptides from rattlesnake venom, *J. Biol. Chem.*, (2017).
- [52] W. Chen, B. Yang, H. Zhou, L. Sun, J. Dou, H. Qian, W. Huang, Y. Mei, J. Han, Structure-activity relationships of a snake cathelicidin-related peptide, BF-15, *Peptides*, 32 (2011) 2497-2503.

- [53] Y. Zhang, H. Zhao, G.Y. Yu, X.D. Liu, J.H. Shen, W.H. Lee, Y. Zhang, Structure-function relationship of king cobra cathelicidin, *Peptides*, 31 (2010) 1488-1493.
- [54] F.A. de Latour, L.S. Amer, E.A. Papanastasiou, B.M. Bishop, M.L. van Hoek, Antimicrobial activity of the *Naja atra* cathelicidin and related small peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396 (2010) 825-830.
- [55] Z. Jiang, A.I. Vasil, J.D. Hale, R.E. Hancock, M.L. Vasil, R.S. Hodges, Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides, *Biopolymers*, 90 (2008) 369-383.
- [56] L.N. Irazazabal, W.F. Porto, S.M. Ribeiro, S. Casale, V. Humblot, A. Ladram, O.L. Franco, Selective amino acid substitution reduces cytotoxicity of the antimicrobial peptide mastoparan, *Biochim. Biophys. Acta*, 1858 (2016) 2699-2708.
- [57] M. Dathe, M. Schumann, T. Wieprecht, A. Winkler, M. Beyermann, E. Krause, K. Matsuzaki, O. Murase, M. Bienert, Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes, *Biochemistry*, 35 (1996) 12612-12622.
- [58] L. Wang, J.Y. Chan, J.V. Rego, C.M. Chong, N. Ai, C.B. Falcao, G. Radis-Baptista, S.M. Lee, Rhodamine B-conjugated encrypted viperidicin nonapeptide is a potent toxin to zebrafish and associated with in vitro cytotoxicity, *Biochim. Biophys. Acta*, 1850 (2015) 1253-1260.

Discussão Geral e conclusões

Durante séculos, os prestadores de cuidados em saúde e organizações governamentais preocuparam-se com as infecções nosocomiais, tanto nas comunidades como em ambientes de saúde. Entretanto, nas últimas décadas, o foco na prevenção e controle de infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS) aumentou. Estimativas globais da prevalência de IRAS não estão disponíveis, mas estima-se que mais de 4 milhões de pacientes na Europa e 1,7 milhão nos EUA desenvolvam pelo menos uma infecção a cada ano, com uma maior prevalência nos países em desenvolvimento (Allegranzi, Bagheri Nejad, *et al.*, 2011). IACS podem estar associadas ao maior tempo de hospitalização e excesso de mortalidade e morbidade, com o custo de bilhões de dólares em ambientes hospitalares associados e impacto psicossocial e econômico nas pessoas envolvidas, bem como em suas famílias e comunidades (Andersson *et al.*, 2010).

IACSs podem ocorrer quando pacientes suscetíveis são expostos a microrganismos infecciosos durante sua permanência em um ambiente de saúde. Pacientes de longa permanência em hospitais podem ser frequentemente mais suscetíveis a infecções do que aqueles em comunidade, devido a sua doença, uso de terapias imunossupressoras, exposição a procedimentos invasivos ou contato com outras pessoas que têm infecções. Agentes infecciosos podem ser frequentemente disseminados pelo contato direto com as mãos contaminadas, ou pelo contato indireto através de objetos contaminados, tais como equipamentos de atendimento ao paciente, uniformes de profissionais de saúde e superfícies ambientais (Siegel *et al.*, 2007).

Embora os agentes antimicrobianos tenham sido inicialmente bem sucedidos no tratamento dessas infecções, seu uso irrestrito em humanos e animais fez com que as taxas de resistência antimicrobiana aumentassem de forma alarmante, especialmente em países em desenvolvimento. Em um estudo de 2009, >50% das cepas de *E. coli* na China e >70% na Índia foram identificadas como produtoras de β -lactamases, indicativas de resistência (Hawser *et al.*, 2009). Estima-se agora que 100-200 milhões de pessoas na Índia podem abrigar bactérias Gram-negativas que carregam a enzima metalo- β -lactamase (NDM-1) de Nova Delhi, que torna a bactéria praticamente intratável (Walsh *et al.*, 2011), não sabendo quantas pessoas já sofreram infecções desses organismos. O saneamento deficiente e uso

excessivo de antimicrobianos descontrolados na saúde e na agricultura podem ser os principais culpados.

A resistência a antimicrobianos pode ser um problema de saúde global significativo, particularmente considerando a associação entre o aumento da mortalidade e o tempo de internação hospitalar para pacientes com infecções bacterianas resistentes a múltiplos medicamentos (MDR) (Satlin *et al.*, 2016). A disseminação global da resistência bacteriana aos antimicrobianos de última linha, como os carbapenêmicos e a colistina, ameaça o retorno de uma era pré-antibiótica (Looke *et al.*, 2013). Pode ser que esta questão se agrave ainda mais, dada a falta de novas classes de medicamentos antibacterianos que foram desenvolvidas nas últimas décadas e que podem tratar infecções causadas por patógenos MDR (Deak *et al.*, 2016). Dado que o processo de desenvolvimento de medicamentos pode levar décadas, a otimização do uso de antimicrobianos atualmente disponíveis deve ser considerada uma ferramenta essencial para minimizar a emergência de resistência a antimicrobianos.

Nesse cenário onde microrganismos MDR vêm crescendo ao longo dos anos, os PAMs se apresentam como importantes candidatos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Eles podem ser expressos pelo hospedeiro visando a eliminação de patógenos invasores, além de poder aumentar a resposta imunológica (Zaslhoff, 2002). Tais efeitos benéficos relacionados aos PAMs podem ser determinados por suas propriedades físico/químicas: sequências curtas (<50 aminoácidos), cationicidade (carga líquida média +3) e com um conteúdo hidrofóbico médio de 42% (Wang *et al.*, 2016). A cationicidade, bem como a hidrofobicidade desses peptídeos se apresentam como elementos importantes na geração de suas estruturas anfipáticas, que permitem que os PAMs catiônicos interajam preferencialmente com membranas bacterianas aniônicas ricas em fosfatidilgliceróis (PGs) (Wang *et al.*, 2016), o que contrasta com as membranas celulares humanas que podem ser constituídas por fosfolipídios zwitteriônicos (PCs) e colesterol. Acredita-se que tal diferença na composição da membrana seja uma das principais razões pelas quais os PAMs se mostram seletivos (Erand e Vogel, 1999). Os PAMs ligados à membrana parecem exercer seus efeitos através de múltiplos mecanismos. Por exemplo, os peptídeos LL-37 humanos da classe das catelicidinas, podem causar aglomeração lipídica aniônica, permeando as membranas bacterianas podendo causar sua ruptura (Wang *et al.*, 2012) através de modelos de poros/tapete (Henzler Wildman *et al.*, 2003). Além disso, diferentes PAMs podem funcionar através de diferentes mecanismos. A expressão de vários PAMs pode não ser redundante,

sendo que esses peptídeos podem funcionar sinergicamente para se alcançar ótimos resultados (Wang, 2010). Finalmente, os PAMs também podem aumentar a resposta imunológica a patógenos invasores (Hancock e Lehrer, 1998). Todos esses mecanismos podem dificultar o desenvolvimento de resistência pelos patógenos.

O sistema imunológico inato parece ser essencial para a sobrevivência humana, embora uma resposta imune extrema ou inapropriada possa resultar em sequelas (Hilchie *et al.*, 2013). O processo de inflamação atípica pode ser a chave de um grande número de doenças; incluindo infecção e doenças inflamatórias (Hilchie *et al.*, 2013). O motivo do por que as inflamações se tornam crônicas ainda não está claro, levando a um debate importante, uma vez que isso pode ser diferente para cada tipo de doença (Hilchie *et al.*, 2013). Sendo assim, o processo inflamatório não pode ser medido em uma única condição, sendo causada principalmente por algum distúrbio em redes regulatórias que gerenciam processos inflamatórios (imunológicos inatos), onde essas redes envolvem várias proteínas, vias, fatores de transcrição e elementos funcionais (Gardy *et al.*, 2009; Hancock *et al.*, 2012). Os peptídeos ligados ao hospedeiro (PLH) e PAMs possuem a capacidade de modular as vias imunológicas inatas, apresentando efeitos seletivos no processo inflamatório dependendo dos agonistas relacionados e dos resultados medidos, como foi demonstrado para a catelicidina LL-37 com diferentes agonistas dos receptores do tipo Toll (TLR), onde, podem ser inibidas algumas respostas e fortalecer outras (Mookherjee, N. *et al.*, 2006).

Com base na análise *in vitro* e *in vivo*, os efeitos imunomoduladores de PLHs e PAMs têm sido amplamente estudados, sendo as catelicidinas e defensinas as mais bem caracterizadas (Bowdish *et al.*, 2006). Experiências padrão que podem ser realizadas para avaliar a resposta imunomoduladora de PAMs, incluem medições *in vitro* de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios em células imunes (Bowdish *et al.*, 2005). Os PAMs podem ser co-administrados com ligantes imunes, como lipopolissacarídeos (LPS) ou mesmo com microrganismos mortos pelo calor como interferentes miméticos, resultando em alterações nas produções das citocinas analisadas (Lee *et al.*, 2018). Com base na literatura científica, fica claro que os PAMs podem ser intrincados na ativação de respostas imunes pró-inflamatórias e antiinflamatórias, e o fazem por meio de mecanismos divergentes que variam de acordo com o contexto biológico (Lee *et al.*, 2018). PAMs que possuem habilidades para induzir a imunomodulação podem ser muito comuns: estudos iniciais utilizando camundongos demonstraram que a catelicidina LL-37 tem uma potente atividade anti-séptica

inibindo o estímulo de macrófagos por endotoxinas bacterianas como o LPS, protegendo os camundongos da endotoxemia (Mookherjee, Neeloffer *et al.*, 2006). A LL-37 estimula a produção de MCP-1 e IL-8, mas não TNF- α , levando ao emprego de componentes imunes ao local da infecção (Scott, Monisha G. *et al.*, 2002). Mais especificamente, a LL-37 quimio atrai leucócitos através do receptor de peptídeo formilo do tipo 1 (Kurosaka *et al.*, 2005).

Os peptídeos antimicrobianos do tipo catelicidina (CAMPs) se apresentam como uma classe de grande interesse biotecnológico por possuírem um amplo espectro de atividades antimicrobianas, além de agirem como efetores do sistema imunológico e ainda por sua capacidade de interagir com os ácidos nucleicos, causando a morte celular. As catelicidinas podem ser peptídeos anfifílicos, catiônicos, consistindo de 12 a 97 aminoácidos. Essa família de peptídeos foi descoberta pela primeira vez em neutrófilos bovinos por Zanetti e colaboradores no início dos anos 90 (Zanetti, 2004). O termo catelicidina foi consolidado em 1995 para descrever essa família de peptídeos catiônicos. Essa família compartilha um DNA conservado e uma sequência pré-pro-peptídica em seu N- terminal, possuindo uma sequência altamente homóloga para a codificação da proteína catelina (CLD) (Zanetti, 2004). Assim, as catelicidinas são nomeadas paradoxalmente com base nessa homologia na parte do precursor envolvida na secreção e processamento, apesar do fato de que essa família tornou-se mais conhecida pelas propriedades antiinflamatórias da proteína madura (processada), sendo seu potencial inibitório da protease pouco investigados (Zanetti, 2004).

Embora a importância dos domínios antimicrobianos das catelicidinas na defesa imunológica tenham sido bem documentadas, a CLD tem atraído pouca atenção, apesar de sua conservação dentro dos mamíferos ao longo de pelo menos 100 milhões de anos de história evolutiva (Zhu, 2008). Tal conservação estrutural sugere uma possível similaridade funcional entre a CLD e as cistatinas (uma inibidora de protease), uma vez que ambos apresentam o mesmo padrão estrutural (Yang *et al.*, 2003), o que foi confirmado pelo trabalho de Zaiou e colaboradores (Zaiou *et al.*, 2003), que demonstraram que o hCAP-18/LL37 CLD humano foi capaz de inibir a atividade de protease da catepsina L. Inesperadamente, um trabalho recente demonstrou que o CLD de protegrina-3 (PG3) de suíno pode ativar a atividade de protease da catepsina L e este efeito de ativação pode ser associado a uma região de loop da estrutura da CLD (Zhu *et al.*, 2008).

Por muito tempo, a função da CLD do N-terminal foi teorizada para atuar apenas como um balanceador para neutralizar o domínio antimicrobiano catiônico da porção C-

terminal durante o transporte e armazenamento intracelular para evitar a potencial citotoxicidade intracelular (Martin *et al.*, 1995). No entanto, experiências *in vitro* identificaram funções imuno-relacionadas de CLDs de humanos e suínos (Zaiou *et al.*, 2003), enquanto nada é conhecido em relação aos seus efeitos *in vivo*. A detecção de seleção positiva das CLDs tem implicações para estabelecer sua importância biológica fundamental, uma vez que a seleção natural forneceu inovações evolutivas para a adaptação molecular (Anisimova e Liberles, 2007). A este respeito, CLDs de humanos e suínos nos oferecem informações valiosas: uma cópia única de CLD humana atua como um inibidor de catepsina L, enquanto a família multigênica de CLD de suínos, originada de duplicação e divergência subsequente, desenvolveu um efeito ativador na catepsina L em alguns membros (Zhu, 2008). Evidências de evolução adaptativa combinadas com dados funcionais *in vitro* indicam claramente que a diversificação funcional do CLD representa uma vantagem evolutiva para sofrer adaptação ecológica ao meio ambiente local (Zhu, 2008).

Do ponto de vista evolucionário, as proteases extrínsecas muitas vezes promovem mudança adaptativa de seus inibidores através da corrida armamentista do hospedeiro-patógeno (Hill e Hastie, 1987). No entanto, a força motriz responsável pela divergência das CLDs em linhagens de suínos parece não ser derivada da pressão evolutiva da catepsina L, pois esses membros possuem como alvo a mesma enzima. Neste caso, a pressão imune indireta pode ser uma força motriz que exerce o seu papel através da catepsina L na regulação da eficiência da apresentação antigênica (Zhu *et al.*, 2008). Dado que a seleção positiva frequentemente impulsiona a inovação funcional das famílias de proteínas (Zhu, 2008), é interessante estudar se a CLD também desenvolveu outras funções que não estão relacionadas aos moduladores da atividade da catepsina L.

Apesar de trabalhos descritos na literatura descreverem algumas funções relacionadas a região pró-peptídica de PAMs, nenhum trabalho foi descrito utilizando um modelo mimético simples de pró-peptídeo e sua possível função inibitória de atividade antimicrobiana. Sendo assim, aqui foram investigados os efeitos da adição de um pró-peptídeo modelo curto ligado ao análogo antimicrobialmente ativo Ctn [15-34], mimetizando o domínio rico em ácido glutâmico do pró-peptídeo crotalidina (Falcao *et al.*, 2015). A estrutura da proteína precursora de Ctn pode ser naturalmente flanqueada por um domínio pró-peptídico rico em ácido glutâmico com uma carga líquida aniônica que compensa aproximadamente a carga líquida positiva do peptídeo Ctn completo. A sequência deste

domínio rico em ácido glutâmico, assim como o do peptídeo crotalidina podem ser encontrados para muitos outros PAMs (Vassilevski *et al.*, 2008). Os dados obtidos por nós para o peptídeo Ctn [15-34] basicamente confirmam aqueles obtidos anteriormente por Falcao *et al.* (2015), onde o peptídeo se apresenta ativo contra bactérias Gram-negativas. Em contrapartida, para seu análogo E₁₀-Ctn [15-34], onde uma sequência de dez resíduos de ácidos glutâmicos foram adicionados na porção C-terminal do peptídeo Ctn [15-34]; visando mimetizar uma região pró-peptídica simples; foi possível observar um bloqueio da atividade antimicrobiana desse peptídeo devido a neutralização de sua carga, indicando que nosso modelo pode fornecer um maior entendimento no estudo de regiões pró-peptídicas em PAMs.

Em contrapartida ao pouco conhecimento que se tem sobre a diversidade de funções associadas à região pró-peptídica (catelina) das catelicidinas, a sua região madura, denominada pelo seu C-terminal pôde ser amplamente estudada, uma vez que esta possui uma ampla atividade antimicrobiana associada, além de sua capacidade de modular respostas imunes *in vivo* e *in vitro*. Além disso a região madura das catelicidinas foram utilizadas para os estudos relacionados ao desenho racional de peptídeos antimicrobianos, visando um melhoramento em suas atividades.

Apesar da promessa inicial de PAMs como as catelicidinas isoladas de fontes naturais serem vistas como alternativas aos antimicrobianos, muitos deles podem não ser ideais para aplicações terapêuticas devido às suas longas sequências, traduzindo-se em altos custos de produção, oferta limitada, baixa potência, suscetibilidade *in vivo*, degradação enzimática e inativação salina, bem como altas atividades hemolíticas e citotóxicas (Ong *et al.*, 2014). A riqueza de informações de sequências e estruturais fornecidas pelos PAMs que ocorrem naturalmente, entretanto, forneceu pistas significativas para a criação de uma nova geração de congêneres de PAMs sintéticos mais potentes e menos tóxicos em aplicações terapêuticas (Brogden e Brogden, 2011). Tem sido demonstrado que bactérias podem neutralizar os PAMs como resultado de diversos mecanismos moleculares, incluindo alteração na carga líquida da membrana, degradação proteolítica extracelular, remoção de PAMs da célula via transporte ativo e desenvolvimento de biofilme, entre outros (Maria-Neto *et al.*, 2012). Assim, se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias para superar os obstáculos no uso terapêutico dos PAMs. A este respeito, o desenho racional de PAMs surge como uma ferramenta importante para peptídeos de fármacos eficientemente produzidos (Chen, Y. *et al.*, 2005).

Os métodos de desenho racional utilizando seqüências modelo envolvem a geração de novos PAMs baseados em uma seqüência conhecida, seja de um peptídeo ativo ou inativo. Essas abordagens podem procurar reduzir o tamanho, adicionar seletividade e/ou aumentar a atividade. Em vários casos, as informações geradas pelos métodos físico-químicos podem ser utilizadas para atingir esses objetivos, trocando resíduos, alterando a carga líquida ou buscando peptídeos menores com as mesmas propriedades, sem realizar um estudo físico-químico em si (William F. Porto *et al.*, 2012).

Tendo em vista as abordagens de desenho racional, e utilizando como base metodologias de desenho minimalista de um peptídeo modelo, foram desenvolvidos também nesse estudo, o desenho de dois novos análogos de catelicidinas baseados em duas viperidinas de serpente (Falcao *et al.*, 2014), denominadas BotrAMP14 e CrotAMP14. Os peptídeos aqui elucidados apresentaram uma atividade antimicrobiana contra cepas do tipo ATCC e isolados clínicos de bactérias patogênicas além de apresentar uma baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo* contra linhagens celulares Caco-2 e larvas da mariposa *Galleria mellonella*. Tais resultados reforçam a eficiência do desenho onde a atividade e toxicidade dos peptídeos se mantiveram tão concisas quando seus peptídeos modelo previamente descobertos. Além disso, previsões *in silico* demonstraram que ambos os peptídeos mantiveram sua estrutura em α -hélices, sendo essas capazes de romper membranas de *E. coli*. Com base em nossos achados, concluímos que BotrAMP14 e CrotAMP14 formam poros em membranas bacterianas levando à morte celular como proposto para a crotalicidina.

Semelhanças com as pesquisas aqui realizadas, as ferramentas de desenho racional com foco no desenvolvimento de peptídeos com potencial para uso sistêmico, foram utilizadas por Sigurdardottir *et al.* (2006), onde, foram identificados um fragmento de 21 resíduos de aminoácidos da catelicidina humana LL-37 com atividades semelhantes ou mais acentuadas do que o peptídeo completo. A LL-37 pode ser um candidato atraente para o tratamento da sepse, devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, habilidades quimiotáticas em células do sistema imunológico e também à capacidade de se ligar e neutralizar lipopolissacarídeos bacterianos. Entretanto, a LL-37 também apresenta uma certa atividade citotóxica contra células eucarióticas. Portanto, usando uma predição de propensão de formação de hélices AGADIR (Lacroix *et al.*, 1998) e a preferência dos aminoácidos por terminais de α -hélice, foi identificado um fragmento a partir do resíduo Gly14 ao Arg34, denominado GKE. Para comparações, dois outros fragmentos de 21 aminoácidos foram

utilizados, um do N-terminal (LLG) e outro do C-terminal (FKR). O GKE se apresentou mais ativo que a LL-37 contra bactérias e fungos. Além disso, o GKE e a LL-37 demonstraram quimiotaxia e inibição similares das atividades de produção de óxido nítrico. Os mesmos padrões não foram observados para os fragmentos LLG e FKR. Curiosamente, todos os fragmentos apresentaram 100% de identidade para LL-37. No entanto, diferiram do peptídeo LL-37 na propensão à α -hélice, embora GKE e FKR não apresentem muita diferença em seu conteúdo helicoidal, possuindo 85,7% de identidade. A preferência de aminoácidos pelos terminais de α -hélices pode explicar essas diferenças na atividade.

Outros trabalhos utilizando análogos de catelicidinas, desta vez de peçonha de serpente, também foram realizados. A catelicidina-BF15 (BF-15) é um peptídeo com 15 resíduos de aminoácidos derivado da catelicidina-BF (BF-30), que pode ser encontrada na peçonha da serpente *Bungarus fasciatus* e apresenta ampla atividade antimicrobiana (Chen *et al.*, 2011). Foi demonstrado que a BF-15 retém a maior parte da atividade antimicrobiana do peptídeo BF-30 com uma reduzida atividade hemolítica além de um comprimento de sequência muito mais curto e com menor custo. Análises de dicroísmo circular demonstraram ainda um padrão típico de hélice do análogo BF-15, com conteúdo da estrutura hélice significativamente maior em comparação com BF-30, o que indica que a sequência peptídica do BF-15 pode fornecer uma contribuição importante para o conteúdo de hélice de toda a sequência BF-30 (Chen *et al.*, 2011).

A catelicidina da espécie *Ophiophagus hannah* (OH-CATH) é composta de 34 resíduos de aminoácidos com uma potente atividade antibacteriana e fraca atividade hemolítica. OH-CATH e seis de seus análogos foram sintetizados para explorar suas relações estrutura-função com base em suas atividades bactericidas e hemolíticas (Zhang *et al.*, 2010). Resultados experimentais de OH-CATH (3-34) e OH-CATH (5-34) indicaram que os 4 resíduos de aminoácidos N-terminais de OH-CATH desempenharam um papel importante na sua atividade hemolítica, mas apresentaram efeitos fracos em suas atividades bactericidas. Entre a OH-CATH e seus análogos, a OH-CATH (5-34) apresentou a menor atividade hemolítica, enquanto manteve forte atividade antimicrobiana. Para avaliar seu uso potencial, as atividades biológicas da OH-CATH (5-34) foram comparadas com as do pexiganan (análogo de magainina). A atividade bactericida da OH-CATH (5-34) se apresentou de 2 a 4 vezes mais potente que a do pexiganan, além de demonstrar uma menor toxicidade contra

células endoteliais ventriculares de coelho e quatro linhagens celulares de câncer humano (Zhang *et al.*, 2010).

Concluindo, PAMs envolvem um amplo grupo de moléculas e de amplo espectro que apresentam várias propriedades atraentes. Além de sua atividade direta e de amplo espectro contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, vírus e fungos, PAMs podem exercer imunomodulação, cicatrização e funções adjuvantes. Eles podem controlar a infecção e a inflamação, apresentar sinais quimiotáticos para células imunes, induzindo a secreção de citocinas e quimiocinas e podem neutralizar exotoxinas e endotoxinas. Desta forma, as catelicidinas e seus possíveis derivados, surgiram como novas ferramentas potenciais para combater infecções. De qualquer forma, essas novas estratégias também apresentam a vantagem de gerar adaptação microbiana de baixa propensão, provavelmente por causa de seus mecanismos de ação inespecíficos. Isso se tornou um fator-chave considerando o alerta de emergência atual em relação à falta de alternativas terapêuticas para bactérias MDR. Assim, o uso clínico potencial de PAMs e seus derivados representa uma estratégia promissora para o tratamento de infecções causadas por bactérias e vírus MDR. Este fato se reflete claramente no crescimento exponencial do número de pesquisas para a descoberta de PAMs nos últimos anos e no interesse de várias empresas em todo o mundo em seu desenvolvimento.

Perspectivas

Com a atual eminência do aumento das infecções hospitalares junto ao crescente aumento de organismos resistentes a antimicrobianos, novas terapias, e a descoberta de novas moléculas com potencial microbicida se tornam cada dia mais imprescindível. Como discutido amplamente no decorrer deste trabalho, o estudo dos peptídeos antimicrobianos como uma nova ferramenta visando frear esse avanço desses microrganismos vêm se mostrando sempre mais presentes no meio acadêmico. Visto que essas moléculas possuem grandes propriedades como efetoras dos sistemas imunes, além de possuírem mecanismos de ação diferenciados que dificultam o desenvolvimento de resistência a patógenos, novas abordagens visando um melhoramento dessas moléculas, bem como metodologias para sua produção, são de extrema importância. Apesar da necessidade urgente do uso de novos agentes anti-infecciosos, o caminho para a utilização desses novos compostos em clínica ainda pode ser conturbado, uma vez que tais moléculas ainda enfrentam várias barreiras a serem quebradas, tais como seu custo de produção, sua estabilidade sobretudo em organismos vivos, sua seletividade e sua possível toxicidade. Sendo assim, uma vez que dominarmos a capacidade de modificar eficientemente os PAMs visando garantir uma maior estabilidade dessas moléculas, fornecendo uma proteção à possíveis degradações enzimáticas, e ainda aumentar sua seletividade por células patogênicas, seremos também capazes de quebrar tais barreiras. Através destas abordagens, ou talvez uma combinação de várias, os PAM podem se tornar uma aposta segura de medicamentos, que podem vir a chegar ao mercado no decorrer das próximas décadas.

Referências Bibliográficas

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940.

Rev Infect Dis, v. 10, n. 4, p. 677-8, Jul-Aug 1988. ISSN 0162-0886 (Print)

0162-0886 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3055168> >.

AHMAD, A. et al. Identification and design of antimicrobial peptides for therapeutic

applications. **Curr Protein Pept Sci**, v. 13, n. 3, p. 211-23, May 2012. ISSN 1875-5550

(Electronic)

1389-2037 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22612781> >.

ALBRECHT, S. J. et al. Reemergence of gram-negative health care-associated bloodstream

infections. **Arch Intern Med**, v. 166, n. 12, p. 1289-94, Jun 26 2006. ISSN 0003-9926 (Print)

0003-9926 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801511> >.

ALLEGIANZI, B. et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing

countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 377, n. 9761, p. 228-41, Jan 15

2011. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21146207> >.

ALLEGIANZI, B. et al. **Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide**. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 2011

AMERICAN THORACIC, S.; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF, A. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 4, p. 388-416, Feb 15 2005. ISSN 1073-449X (Print)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699079> >.

ANDERSSON, A. E. et al. Patients' experiences of acquiring a deep surgical site infection: an interview study. **Am J Infect Control**, v. 38, n. 9, p. 711-7, Nov 2010. ISSN 1527-3296 (Electronic)

0196-6553 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034980> >.

ANDRÉ ANDERSON CARVALHO et al. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016**. ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária 2016.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415-33, 1998. ISSN 0006-3525 (Print)

0006-3525 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333735> >.

ANDREU, D. et al. Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. **FEBS Lett**, v. 296, n. 2, p. 190-4, Jan 20 1992. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733777> >.

ANISIMOVA, M.; LIBERLES, D. A. The quest for natural selection in the age of comparative genomics. **Heredity (Edinb)**, v. 99, n. 6, p. 567-79, Dec 2007. ISSN 0018-067X (Print)

0018-067X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848974> >.

AOKI, W.; KURODA, K.; UEDA, M. Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines. **J Biosci Bioeng**, v. 114, n. 4, p. 365-70, Oct 2012. ISSN 1347-4421 (Electronic)

1347-4421 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658802> >.

BAGELLA, L.; SCOCCHI, M.; ZANETTI, M. cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins. **FEBS Lett**, v. 376, n. 3, p. 225-8, Dec 4 1995. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498547> >.

BALS, R. et al. Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 2, p. 370-5, Mar 2001. ISSN 1071-412X (Print)

1071-412X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238224> >.

BALS, R.; WILSON, J. M. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 4, p. 711-20, Apr 2003. ISSN 1420-682X (Print)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12785718> >.

BARLOW, P. G. et al. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 43, n. 6, p. 692-702, Dec 2010.

ISSN 1535-4989 (Electronic)

1044-1549 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20097832> >.

BAROUD, M. et al. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n. 1, p. 75-9, Jan 2013. ISSN 1872-7913 (Electronic)

0924-8579 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142087> >.

BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, v. 351, n. 6268, p. aad3292, Jan 1 2016. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722002> >.

BENTLEY, R. The development of penicillin: genesis of a famous antibiotic. **Perspect Biol Med**, v. 48, n. 3, p. 444-52, Summer 2005. ISSN 0031-5982 (Print)

0031-5982 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16089021> >.

BLAIR, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 1, p. 42-51, Jan 2015. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25435309> >.

BOLINTINEANU, D. S.; KAZNESSIS, Y. N. Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: a review. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 188-201, Jan 2011. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946928> >.

BOMAN, H. G.; AGERBERTH, B.; BOMAN, A. Mechanisms of action on Escherichia coli of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. **Infect Immun**, v. 61, n. 7, p. 2978-84, Jul 1993. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8514403> >.

BOWDISH, D. M. et al. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1727-32, May 2005. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855488> >.

BOWDISH, D. M. E.; DAVIDSON, D. J.; HANCOCK, R. E. W. Immunomodulatory Properties of Defensins and Cathelicidins. In: SHAFER, W. M. (Ed.). **Antimicrobial Peptides and Human Disease**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p.27-66. ISBN 978-3-540-29916-5.

BRISSON-NOEL, A.; TRIEU-CUOT, P.; COURVALIN, P. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. **J Antimicrob Chemother**, v. 22 Suppl B, p. 13-23, Jul 1988. ISSN 0305-7453 (Print)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3053566> >.

BROGDEN, K. A. et al. The ovine cathelicidin SMAP29 kills ovine respiratory pathogens in vitro and in an ovine model of pulmonary infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 1, p. 331-4, Jan 2001. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120991> >.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **Int J Antimicrob Agents**, v. 38, n. 3, p. 217-25, Sep 2011. ISSN 1872-7913 (Electronic) 0924-8579 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21733662> >.

BURKE, J. P. Infection control - a problem for patient safety. **N Engl J Med**, v. 348, n. 7, p. 651-6, Feb 13 2003. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12584377> >.

CAI, Y. et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 7, p. 1607-15, Jul 2012. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22441575> >.

CHEN, W. et al. Structure-activity relationships of a snake cathelicidin-related peptide, BF-15. **Peptides**, v. 32, n. 12, p. 2497-503, Dec 2011. ISSN 1873-5169 (Electronic) 0196-9781 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22008732> >.

CHEN, Y. et al. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **J Biol Chem**, v. 280, n. 13, p. 12316-29, Apr 1 2005. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677462> >.

CHEN, Y. Y.; CHOU, Y. C.; CHOU, P. Impact of nosocomial infection on cost of illness and length of stay in intensive care units. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 26, n. 3, p. 281-7, Mar 2005. ISSN 0899-823X (Print)

0899-823X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15796281> >.

CHOI, H.; LEE, D. G. Antimicrobial peptide pleurocidin synergizes with antibiotics through hydroxyl radical formation and membrane damage, and exerts antibiofilm activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1820, n. 12, p. 1831-8, Dec 2012a. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921812> >.

_____. Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. **Res Microbiol**, v. 163, n. 6-7, p. 479-86, Jul 2012b. ISSN 1769-7123 (Electronic)

0923-2508 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705395> >.

CIORNEI, C. D.; EGESTEN, A.; BODELSSON, M. Effects of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release from rat aorta in vitro. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 47, n. 2, p. 213-20, Feb 2003. ISSN 0001-5172 (Print)

0001-5172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631052> >.

CONTI, S. et al. Structural and functional studies on a proline-rich peptide isolated from swine saliva endowed with antifungal activity towards *Cryptococcus neoformans*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1828, n. 3, p. 1066-74, Mar 2013. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274276> >.

COSGROVE, S. E. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. **Clin Infect Dis**, v. 42 Suppl 2, p. S82-9, Jan 15 2006. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355321> >.

DA COSTA, J. P. et al. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 5, p. 2023-40, Mar 2015. ISSN 1432-0614 (Electronic)

0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586583> >.

DAS, H.; SHARMA, B.; KUMAR, A. Cloning and characterization of novel cathelicidin cDNA sequence of *Bubalus bubalis* homologous to *Bos taurus* cathelicidin-4. **DNA Seq**, v. 17, n. 6, p. 407-14, Dec 2006. ISSN 1042-5179 (Print)

1026-7913 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17381041> >.

DATHE, M. et al. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. **FEBS Lett**, v. 501, n. 2-3, p. 146-50, Jul 20 2001. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470274> >.

DE LEEUW, E. et al. Selective arginines are important for the antibacterial activity and host cell interaction of human alpha-defensin 5. **FEBS Lett**, v. 583, n. 15, p. 2507-12, Aug 6 2009.

ISSN 1873-3468 (Electronic)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589339> >.

DE LUCCA, A. J.; WALSH, T. J. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 1, p. 1-11, Jan 1999. ISSN

0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869556> >.

DE VISSER, P. C. et al. Biological evaluation of Tyr6 and Ser7 modified drosocin analogues. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 15, n. 11, p. 2902-5, Jun 2 2005. ISSN 0960-894X

(Print)

0960-894X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911277> >.

DEAK, D. et al. Progress in the Fight Against Multidrug-Resistant Bacteria? A Review of U.S. Food and Drug Administration-Approved Antibiotics, 2010-2015. **Ann Intern Med**, v.

165, n. 5, p. 363-72, Sep 6 2016. ISSN 1539-3704 (Electronic)

0003-4819 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27239977> >.

DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future.

Antonie Van Leeuwenhoek, v. 75, n. 1-2, p. 5-19, Jan-Feb 1999. ISSN 0003-6072 (Print)

0003-6072 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10422578> >.

DESHPANDE, L. M. et al. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). **Microb Drug Resist**, v. 12, n. 4, p. 223-30, Winter 2006. ISSN 1076-6294 (Print) 1076-6294 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227206> >.

DI LUCA, M.; MACCARI, G.; NIFOSI, R. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. **Pathog Dis**, v. 70, n. 3, p. 257-70, Apr 2014. ISSN 2049-632X (Electronic) 2049-632X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24515391> >.

DI NARDO, A.; VITIELLO, A.; GALLO, R. L. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. **J Immunol**, v. 170, n. 5, p. 2274-8, Mar 1 2003. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594247> >.

DOLEJSKA, M. et al. Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 1, p. 34-9, Jan 2013. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22969080> >.

DORSCHNER, R. A. et al. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A Streptococcus. **J Invest Dermatol**, v. 117, n. 1, p. 91-7, Jul 2001. ISSN 0022-202X (Print)

0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11442754> >.

DOSS, M. et al. Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D. **J Immunol**, v. 182, n. 12, p. 7878-87, Jun 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494312> >.

DURR, U. H.; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1758, n. 9, p. 1408-25, Sep 2006. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716248> >.

EDWARDS, J. R. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. **Am J Infect Control**, v. 37, n. 10, p. 783-805, Dec 2009. ISSN 1527-3296 (Electronic)

0196-6553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004811> >.

EHRENSTEIN, G.; LECAR, H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. **Q Rev Biophys**, v. 10, n. 1, p. 1-34, Feb 1977. ISSN 0033-5835 (Print)

0033-5835 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/327501> >.

EISENBERG, D. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. **Annu Rev Biochem**, v. 53, p. 595-623, 1984. ISSN 0066-4154 (Print)

0066-4154 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6383201> >.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 11-28, Dec 15 1999. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590300> >.

EVANS, H. L. et al. Cost of Gram-negative resistance. **Crit Care Med**, v. 35, n. 1, p. 89-95, Jan 2007. ISSN 0090-3493 (Print)

0090-3493 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110877> >.

FAHRNER, R. L. et al. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. **Chem Biol**, v. 3, n. 7, p. 543-50, Jul 1996. ISSN 1074-5521 (Print)

1074-5521 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8807886> >.

FALCAO, C. B. et al. Viperacidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. **Amino Acids**, v. 46, n. 11, p. 2561-71, Nov 2014. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100358> >.

FALCAO, C. B. et al. Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. **J Med Chem**, v. 58, n. 21, p. 8553-63, Nov 12 2015. ISSN 1520-4804 (Electronic) 0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26465972> >.

FALLA, T. J.; HANCOCK, R. E. Improved activity of a synthetic indolicidin analog. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 4, p. 771-5, Apr 1997. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087487> >.

FALLA, T. J.; KARUNARATNE, D. N.; HANCOCK, R. E. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. **J Biol Chem**, v. 271, n. 32, p. 19298-303, Aug 9 1996. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702613> >.

FERNANDEZ DE MERA, I. G. et al. Differential expression of inflammatory and immune response genes in mesenteric lymph nodes of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. **Dev Comp Immunol**, v. 32, n. 2, p. 85-91, 2008. ISSN 0145-305X (Print) 0145-305X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604102> >.

FERNANDEZ, D. I. et al. The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. **Phys Chem Chem Phys**, v. 14, n. 45, p. 15739-51, Dec 5 2012. ISSN 1463-9084 (Electronic) 1463-9076 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23093307> >.

FERNANDEZ-AYALA, M. et al. Surgical site infection during hospitalization and after discharge in patients who have undergone cardiac surgery. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, n. 1, p. 85-8, Jan 2006. ISSN 0899-823X (Print)

0899-823X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418996> >.

FERNANDEZ-VIDAL, M. et al. Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. **J Mol Biol**, v. 370, n. 3, p. 459-70, Jul 13 2007. ISSN 0022-2836 (Print)

0022-2836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17532340> >.

FOURMY, D. et al. Structure of the A site of Escherichia coli 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1367-71, Nov 22 1996. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910275> >.

FRIEDRICH, C. L. et al. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. **J Biol Chem**, v. 276, n. 26, p. 24015-22, Jun 29 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294848> >.

FRITSCHÉ, T. R. et al. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America.

Antimicrob Agents Chemother, v. 52, n. 5, p. 1843-5, May 2008. ISSN 1098-6596
(Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347105> >.

GALLO, R. L. et al. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. **J Biol Chem**, v. 272, n. 20, p. 13088-93, May 16 1997. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9148921> >.

GALLO, R. L. et al. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **J Allergy Clin Immunol**, v. 110, n. 6, p. 823-31, Dec 2002. ISSN 0091-6749
(Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12464945> >.

GARCIA, A. E. et al. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring theta-defensin isoforms from baboon leukocytes. **Infect Immun**, v. 76, n. 12, p. 5883-91, Dec 2008. ISSN 1098-5522 (Electronic)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852242> >.

GARDY, J. L. et al. Enabling a systems biology approach to immunology: focus on innate immunity. **Trends Immunol**, v. 30, n. 6, p. 249-62, Jun 2009. ISSN 1471-4981 (Electronic)
1471-4906 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428301> >.

GENNARO, R.; SKERLAVAJ, B.; ROMEO, D. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. **Infect Immun**, v. 57, n. 10, p. 3142-6, Oct 1989. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2777377> >.

GENTILUCCI, L.; TOLOMELLI, A.; SQUASSABIA, F. Peptides and peptidomimetics in medicine, surgery and biotechnology. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 20, p. 2449-66, 2006. ISSN 0929-8673 (Print)

0929-8673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918365> >.

GESELL, J.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. **J Biomol NMR**, v. 9, n. 2, p. 127-35, Feb 1997. ISSN 0925-2738 (Print)

0925-2738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9090128> >.

GHOSH, A. et al. Indolicidin targets duplex DNA: structural and mechanistic insight through a combination of spectroscopy and microscopy. **ChemMedChem**, v. 9, n. 9, p. 2052-8, Sep 2014. ISSN 1860-7187 (Electronic)

1860-7179 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044630> >.

GISKE, C. G. et al. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of bla_{NDM-1} in India, Sweden, and the United Kingdom. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 5, p. 2735-8, May 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22354295> >.

GOPAL, R. et al. Effect of repetitive lysine-tryptophan motifs on the bactericidal activity of antimicrobial peptides. **Amino Acids**, v. 44, n. 2, p. 645-60, Feb 2013. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914980> >.

GRAVEL, D. et al. Point prevalence survey for healthcare-associated infections within Canadian adult acute-care hospitals. **J Hosp Infect**, v. 66, n. 3, p. 243-8, Jul 2007. ISSN 0195-6701 (Print)

0195-6701 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574304> >.

GUDMUNDSSON, G. H. et al. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. **Eur J Biochem**, v. 238, n. 2, p. 325-32, Jun 1 1996. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681941> >.

GUSMAN, H. et al. Salivary histatin 5 is a potent competitive inhibitor of the cysteine proteinase clostripain. **FEBS Lett**, v. 489, n. 1, p. 97-100, Jan 26 2001. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11231021> >.

HALLOCK, K. J. et al. Membrane composition determines pardaxin's mechanism of lipid bilayer disruption. **Biophys J**, v. 83, n. 2, p. 1004-13, Aug 2002. ISSN 0006-3495 (Print)

0006-3495 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124282> >.

HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. **Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 418-22, Feb 8 1997. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9033483> >.

HANCOCK, R. E.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 6, p. 1317-23, Jun 1999. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348745> >.

HANCOCK, R. E.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 2, p. 82-8, Feb 1998. ISSN 0167-7799 (Print)

0167-7799 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9487736> >.

HANCOCK, R. E.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D. J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 243-54, Mar 16 2012. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421877> >.

HANCOCK, R. E.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 8856-61, Aug 1 2000. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922046> >.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 64 Suppl 1, p. i3-10, Sep 2009. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19675017> >.

HAWSER, S. P. et al. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 8, p. 3280-4, Aug 2009. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19506060> >.

HENZLER WILDMAN, K. A.; LEE, D. K.; RAMAMOORTHY, A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. **Biochemistry**, v. 42, n. 21, p. 6545-58, Jun 3 2003. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767238> >.

HIDALGO, L. et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 7, p. 1543-50, Jul 2013. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23580560> >.

HIDRON, A. I. et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, Nov 2008. ISSN 1559-6834 (Electronic)

0899-823X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18947320> >.

HILCHIE, A. L.; WUERTH, K.; HANCOCK, R. E. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Nat Chem Biol**, v. 9, n. 12, p. 761-8, Dec 2013. ISSN 1552-4469 (Electronic)

1552-4450 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24231617> >.

HILL, R. E.; HASTIE, N. D. Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. **Nature**, v. 326, n. 6108, p. 96-9, Mar 5-11 1987. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3493437> >.

HILPERT, K. et al. Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. **Chem Biol**, v. 13, n. 10, p. 1101-7, Oct 2006. ISSN 1074-5521 (Print) 1074-5521 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052614> >.

HIRATA, M. et al. Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. **Infect Immun**, v. 62, n. 4, p. 1421-6, Apr 1994. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132348> >.

HIRATA, M. et al. Investigation of endotoxin binding cationic proteins from granulocytes; agglutination of erythrocytes sensitized with Re-LPS. **Adv Exp Med Biol**, v. 256, p. 287-99, 1990. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2183554> >.

HORAN, T. C.; ANDRUS, M.; DUDECK, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **Am J Infect Control**, v. 36, n. 5, p. 309-32, Jun 2008. ISSN 1527-3296 (Electronic) 0196-6553 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538699> >.

HSU, C. H. et al. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 13, p. 4053-64, 2005. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034027> >.

HUENGER, F. et al. Evaluation of postdischarge surveillance of surgical site infections after total hip and knee arthroplasty. **Am J Infect Control**, v. 33, n. 8, p. 455-62, Oct 2005. ISSN 0196-6553 (Print) 0196-6553 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216659> >.

HULTMARK, D. et al. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **Eur J Biochem**, v. 106, n. 1, p. 7-16, May 1980. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7341234> >.

HUO, L. et al. Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 9, p. 869-76, Sep 2011. ISSN 1879-1506 (Electronic)

0003-9969 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382611> >.

IMAMURA, Y.; WANG, P. L. Salivary histatin 3 inhibits heat shock cognate protein 70-mediated inflammatory cytokine production through toll-like receptors in human gingival fibroblasts. **J Inflamm (Lond)**, v. 11, n. 1, p. 4, Feb 4 2014. ISSN 1476-9255 (Print)

1476-9255 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495360> >.

JAFARI, M. et al. Identification of the Crucial Residues in the Early Insertion of Pardaxin into Different Phospholipid Bilayers. **J Chem Inf Model**, v. 57, n. 4, p. 929-941, Apr 24 2017. ISSN 1549-960X (Electronic)

1549-9596 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28301157> >.

JARCZAK, J. et al. Defensins: natural component of human innate immunity. **Hum Immunol**, v. 74, n. 9, p. 1069-79, Sep 2013. ISSN 1879-1166 (Electronic)

0198-8859 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23756165> >.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 491-511, Jul 2006. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847082> >.

JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 4, p. 499-513, Apr 2013. ISSN 1473-5644 (Electronic)

0022-2615 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329317> >.

JURETIC, D. et al. Magainin oligomers reversibly dissipate delta microH+ in cytochrome oxidase liposomes. **Biochemistry**, v. 33, n. 15, p. 4562-70, Apr 19 1994. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8161511> >.

KAI-LARSEN, Y.; AGERBERTH, B. The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. **Front Biosci**, v. 13, p. 3760-7, May 1 2008. ISSN 1093-9946 (Print)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508470> >.

KALLEN, A. J. et al. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 31, n. 5, p. 528-31, May 2010. ISSN 1559-6834 (Electronic)

0899-823X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334552> >.

KANG, S. J. et al. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 12, n. 12, p. 1477-86, Dec 2014. ISSN 1744-8336 (Electronic)

1478-7210 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25371141> >.

KASPAR, A. A.; REICHERT, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discov Today**, v. 18, n. 17-18, p. 807-17, Sep 2013. ISSN 1878-5832 (Electronic)

1359-6446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23726889> >.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 6, p. 1549-55, Jun 2000. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817707> >.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **J Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 3, p. 285-9, Mar 2004. ISSN 0022-3573 (Print)

0022-3573 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15025852> >.

KLOSS, P. et al. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. **J Mol Biol**, v. 294, n. 1, p. 93-101, Nov 19 1999. ISSN 0022-2836 (Print)

0022-2836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556031> >.

KNABE, J. **The Tetracyclines**. Berlin–Heidelberg–New York–Tokyo Springer-Verlag, 1985. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.19863190322> >.

KOJIMA, S.; NIKAIDO, H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 28, p. E2629-34, Jul 9 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798411> >.

KOKRYAKOV, V. N. et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. **FEBS Lett**, v. 327, n. 2, p. 231-6, Jul 26 1993. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335113> >.

KOSCIUCZUK, E. M. et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 12, p. 10957-70, Dec 2012. ISSN 1573-4978 (Electronic)

0301-4851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065264> >.

KOUNTOURAS, J. et al. A proposed role of human defensins in Helicobacter pylori-related neurodegenerative disorders. **Med Hypotheses**, v. 82, n. 3, p. 368-73, Mar 2014. ISSN 1532-2777 (Electronic)

0306-9877 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472867> >.

KUMAR, N. et al. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of Mycobacterium tuberculosis. **Protein Sci**, v. 23, n. 4, p. 423-32, Apr 2014. ISSN 1469-896X (Electronic)

0961-8368 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424575> >.

KUMARASAMY, K.; KALYANASUNDARAM, A. Emergence of Klebsiella pneumoniae isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 1, p. 243-4, Jan 2012. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990048> >.

KUMARASAMY, K. K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 9, p. 597-602, Sep 2010. ISSN 1474-4457 (Electronic) 1473-3099 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705517> >.

KUROSAKA, K. et al. Mouse Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Chemoattracts Leukocytes Using Formyl Peptide Receptor-Like 1/Mouse Formyl Peptide Receptor-Like 2 as the Receptor and Acts as an Immune Adjuvant. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 10, p. 6257-6265, 2005. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/174/10/6257.full.pdf> >.

LACROIX, E.; VIGUERA, A. R.; SERRANO, L. Elucidating the folding problem of alpha-helices: local motifs, long-range electrostatics, ionic-strength dependence and prediction of NMR parameters. **J Mol Biol**, v. 284, n. 1, p. 173-91, Nov 20 1998. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811549> >.

LAUTENBACH, E.; POLK, R. E. Resistant gram-negative bacilli: A neglected healthcare crisis? **Am J Health Syst Pharm**, v. 64, n. 23 Suppl 14, p. S3-21; quiz S22-4, Dec 1 2007. ISSN 1535-2900 (Electronic) 1079-2082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029939> >.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. The potential of antimicrobial peptides as biocides. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 10, p. 6566-96, 2011. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072905> >.

LAVIGNE, J. P. et al. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n. 2, p. 130-6, Feb 2013. ISSN 1872-7913 (Electronic)

0924-8579 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23280442> >.

LAXMINARAYAN, R. Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. **Science**, v. 345, n. 6202, p. 1299-301, Sep 12 2014. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25214620> >.

LEAVITT, A. et al. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4493-6, Oct 2010. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696875> >.

LEE, C. C. et al. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. **Biophys J**, v. 100, n. 7, p. 1688-96, Apr 6 2011. ISSN 1542-0086 (Electronic)

0006-3495 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21463582> >.

LEE, E. Y.; LEE, M. W.; WONG, G. C. L. Modulation of toll-like receptor signaling by antimicrobial peptides. **Semin Cell Dev Biol**, Feb 12 2018. ISSN 1096-3634 (Electronic)

1084-9521 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29432957> >.

LEHRER, R. I.; GANZ, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence.

Curr Opin Immunol, v. 11, n. 1, p. 23-7, Feb 1999. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10047545> >.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306-317,

2001. ISSN 0948-5023. Disponível em: < <Go to ISI>://000171053900002 >.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. **Clin Microbiol Infect**,

v. 14 Suppl 1, p. 3-10, Jan 2008. ISSN 1198-743X (Print)

1198-743X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154524> >.

LOOKE, D. F. et al. Gram-negative resistance: can we combat the coming of a new "Red Plague"? **Med J Aust**, v. 198, n. 5, p. 243-4, Mar 18 2013. ISSN 1326-5377 (Electronic)

0025-729X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23496385> >.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in Leishmania. **FASEB J**, v. 22, n. 6, p. 1817-

28, Jun 2008. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18230684> >.

MANDARD, N. et al. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 4, p. 1190-8, Feb 2002. ISSN 0014-2956

(Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856345> >.

MARIA-NETO, S. et al. Deciphering the magainin resistance process of Escherichia coli strains in light of the cytosolic proteome. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 1714-24, Apr 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290970> >.

MARTIN, E.; GANZ, T.; LEHRER, R. I. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. **J Leukoc Biol**, v. 58, n. 2, p. 128-36, Aug 1995. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7643008> >.

MATSUZAKI, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1376, n. 3, p. 391-400, Nov 10 1998. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804997> >.

_____. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 1-10, Dec 15 1999. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590299> >.

MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; MIYAJIMA, K. Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. **Biochemistry**, v. 34, n. 39, p. 12553-9, Oct 3 1995. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7548003> >.

MATSUZAKI, K. et al. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochim Biophys Acta**, v. 1327, n. 1, p. 119-30, Jul 5 1997. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9247173> >.

MAXWELL, A. DNA gyrase as a drug target. **Trends Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 102-9, Mar 1997. ISSN 0966-842X (Print)

0966-842X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9080608> >.

MCPHEE, J. B.; HANCOCK, R. E. Function and therapeutic potential of host defence peptides. **J Pept Sci**, v. 11, n. 11, p. 677-87, Nov 2005. ISSN 1075-2617 (Print)

1075-2617 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103989> >.

MECKE, A. et al. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. **Biophys J**, v. 89, n. 6, p. 4043-50, Dec 2005. ISSN 0006-3495 (Print)

0006-3495 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183881> >.

MELO, M. N.; FERRE, R.; CASTANHO, M. A. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 3, p. 245-50, Mar 2009. ISSN 1740-1534 (Electronic)

1740-1526 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219054> >.

MIHAJLOVIC, M.; LAZARIDIS, T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. **Biochim Biophys Acta**, v. 1798, n. 8, p. 1485-93, Aug 2010. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403332> >.

MISHRA, N. N. et al. Emergence of daptomycin resistance in daptomycin-naive rabbits with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection is associated with resistance to host defense cationic peptides and *mprF* polymorphisms. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71151, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990934> >.

MOJSOSKA, B.; JENSSEN, H. Peptides and Peptidomimetics for Antimicrobial Drug Design. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 8, n. 3, p. 366-415, Jul 13 2015. ISSN 1424-8247 (Print) 1424-8247 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26184232> >.

MOOKHERJEE, N. et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. **J Immunol**, v. 176, n. 4, p. 2455-64, Feb 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456005> >.

MOOKHERJEE, N. et al. Modulation of the TLR-Mediated Inflammatory Response by the Endogenous Human Host Defense Peptide LL-37. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 4, p. 2455-2464, 2006. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/176/4/2455.full.pdf> >.

MUNOZ-PRICE, L. S. Long-term acute care hospitals. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 3, p. 438-43, Aug 1 2009. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19548836> >.

MURAKAMI, M. et al. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. **J Dent Res**, v. 81, n. 12, p. 845-50, Dec 2002. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454100> >.

NAGAOKA, I. et al. Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa (CAP11) and evaluation of CAP11 mRNA expression during neutrophil maturation. **J Biol Chem**, v. 272, n. 36, p. 22742-50, Sep 5 1997. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278433> >.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE, S. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **Am J Infect Control**, v. 32, n. 8, p. 470-85, Dec 2004. ISSN 0196-6553 (Print) 0196-6553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573054> >.

NEUHAUSER, M. M. et al. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. **JAMA**, v. 289, n. 7, p. 885-8, Feb 19 2003. ISSN 0098-7484 (Print)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588273> >.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol**, v. 29, n. 9, p. 464-72, Sep 2011. ISSN 1879-3096 (Electronic)

0167-7799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680034> >.

NICOLAS, P.; EL AMRI, C. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1537-50, Aug 2009. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929530> >.

NIYONSABA, F. et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. **Immunology**, v. 106, n. 1, p. 20-6, May 2002. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972628> >.

NIZET, V.; GALLO, R. L. Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. **Scand J Infect Dis**, v. 35, n. 9, p. 670-6, 2003. ISSN 0036-5548 (Print)

0036-5548 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14620153> >.

NORDMANN, P. et al. How to detect NDM-1 producers. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 718-21, Feb 2011. ISSN 1098-660X (Electronic)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123531> >.

NORDMANN, P. et al. The emerging NDM carbapenemases. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 12, p. 588-95, Dec 2011. ISSN 1878-4380 (Electronic)

0966-842X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078325> >.

NORRIS, A. L.; SERPERSU, E. H. Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa. **Protein Sci**, v. 22, n. 7, p. 916-28, Jul 2013. ISSN 1469-896X (Electronic)

0961-8368 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640799> >.

NSEIR, S. et al. Accuracy of American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America criteria in predicting infection or colonization with multidrug-resistant bacteria at intensive-care unit admission. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 7, p. 902-8, Jul 2010. ISSN 1469-0691 (Electronic)

1198-743X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19694760> >.

OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, D. V. Postdischarge surveillance: the impact on surgical site infection incidence in a Brazilian university hospital. **Am J Infect Control**, v. 32, n. 6, p. 358-61, Oct 2004. ISSN 0196-6553 (Print)

0196-6553 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454895> >.

ONG, Z. Y.; WIRADHARMA, N.; YANG, Y. Y. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 78, p. 28-45, Nov 30 2014. ISSN 1872-8294 (Electronic)

0169-409X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453271> >.

OPPENHEIM, F. G. et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. **J Biol Chem**, v. 263, n. 16, p. 7472-7, Jun 5 1988. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3286634> >.

OREN, Z. et al. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. **Biochem J**, v. 341 (Pt 3), p. 501-13, Aug 1 1999. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417311> >.

OREN, Z.; SHAI, Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. **Eur J Biochem**, v. 237, n. 1, p. 303-10, Apr 1 1996. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620888> >.

OTTE, J. M. et al. Effects of the cathelicidin LL-37 on intestinal epithelial barrier integrity. **Regul Pept**, v. 156, n. 1-3, p. 104-17, Aug 7 2009. ISSN 1873-1686 (Electronic) 0167-0115 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19328825> >.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 48, n. 6, p. 995-1001, Dec 2014. ISSN 1518-8787 (Electronic) 0034-8910 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26039403> >.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Crit Rev Biotechnol**, v. 32, n. 2, p. 143-71, Jun 2012. ISSN 1549-7801 (Electronic)

0738-8551 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22074402> >.

PATERSON, D. L. Impact of antibiotic resistance in gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. **Clin Infect Dis**, v. 47 Suppl 1, p. S14-20, Sep 15 2008. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18713045> >.

PATHAK, N. et al. Comparison of the effects of hydrophobicity, amphiphilicity, and alpha-helicity on the activities of antimicrobial peptides. **Proteins**, v. 22, n. 2, p. 182-6, Jun 1995. ISSN 0887-3585 (Print)

0887-3585 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7567965> >.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 382-402, Apr 2006. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614254> >.

PITTET, D. et al. Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 10, p. 641-52, Oct 2006. ISSN 1473-3099 (Print)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008173> >.

PITTET, D. et al. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme. **Lancet**, v. 356, n. 9238, p. 1307-12, Oct 14 2000. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11073019> >.

POKORNY, A.; ALMEIDA, P. F. Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by delta-lysine in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, alpha-helical peptides. **Biochemistry**, v. 43, n. 27, p. 8846-57, Jul 13 2004. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15236593> >.

POWERS, J. P.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681-91, Nov 2003. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019199> >.

PRADESS et al. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Revista do Controle de Infecção Hospitalar**, v. 2, p. 11-24, 1995.

PRONOVOST, P. et al. An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU. **N Engl J Med**, v. 355, n. 26, p. 2725-32, Dec 28 2006. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192537> >.

PURI, S.; EDGERTON, M. How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. **Eukaryot Cell**, v. 13, n. 8, p. 958-64, Aug 2014. ISSN 1535-9786 (Electronic)

1535-9786 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951439> >.

QI, Y. et al. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 2, p. 307-12, Feb 2011. ISSN 1460-2091 (Electronic)

0305-7453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131324> >.

QIAN, S. et al. Structure of the alamethicin pore reconstructed by x-ray diffraction analysis. **Biophys J**, v. 94, n. 9, p. 3512-22, May 1 2008. ISSN 1542-0086 (Electronic)

0006-3495 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18199659> >.

QIN, S. et al. Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 10, p. 5332-9, Oct 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869568> >.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 3, p. 440-58, table of contents, Jul 2007. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17630334> >.

RADHAKRISHNAN, K. et al. Quantitative understanding of cell signaling: the importance of membrane organization. **Curr Opin Biotechnol**, v. 21, n. 5, p. 677-82, Oct 2010. ISSN 1879-0429 (Electronic)

0958-1669 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829029> >.

RAMOS, R. et al. Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1469-76, Jul 2011. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693141> >.

RANDALL, C. P. et al. The target of daptomycin is absent from Escherichia coli and other gram-negative pathogens. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 1, p. 637-9, Jan 2013. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114759> >.

RIJNKELS, M. et al. Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. **Genomics**, v. 82, n. 4, p. 417-32, Oct 2003. ISSN 0888-7543 (Print)

0888-7543 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679022> >.

RISSO, A.; ZANETTI, M.; GENNARO, R. Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. **Cell Immunol**, v. 189, n. 2, p. 107-15, Nov 1 1998. ISSN 0008-8749 (Print)

0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790724> >.

ROZEK, A. et al. Structure-based design of an indolicidin peptide analogue with increased protease stability. **Biochemistry**, v. 42, n. 48, p. 14130-8, Dec 9 2003. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640680> >.

RYGE, T. S. et al. New indolicidin analogues with potent antibacterial activity. **J Pept Res**, v. 64, n. 5, p. 171-85, Nov 2004. ISSN 1397-002X (Print)

1397-002X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485555> >.

SABERWAL, G.; NAGARAJ, R. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. **Biochim Biophys Acta**, v. 1197, n. 2, p. 109-31, Jun 29 1994. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8031824> >.

SATLIN, M. J. et al. Bacteremia due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in neutropenic patients with hematologic malignancies. **J Infect**, v. 73, n. 4, p. 336-45, Oct 2016. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27404978> >.

SAWA, T. et al. Evaluation of antimicrobial and lipopolysaccharide-neutralizing effects of a synthetic CAP18 fragment against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 12, p. 3269-75, Dec 1998. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835525> >.

SAWYER, J. G.; MARTIN, N. L.; HANCOCK, R. E. Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun**, v. 56, n. 3, p. 693-8, Mar 1988. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3125111> >.

SCHWAB, F. et al. Reducing neonatal nosocomial bloodstream infections through participation in a national surveillance system. **J Hosp Infect**, v. 65, n. 4, p. 319-25, Apr 2007. ISSN 0195-6701 (Print)

0195-6701 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350730> >.

SCOCCHI, M. et al. Novel cathelicidins in horse leukocytes(1). **FEBS Lett**, v. 457, n. 3, p. 459-64, Sep 3 1999. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471829> >.

SCOCCHI, M.; WANG, S.; ZANETTI, M. Structural organization of the bovine cathelicidin gene family and identification of a novel member. **FEBS Lett**, v. 417, n. 3, p. 311-5, Nov 17 1997. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409740> >.

SCOTT, M. G. et al. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **J Immunol**, v. 169, n. 7, p. 3883-91, Oct 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244186> >.

SCOTT, M. G. et al. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3883-3891, 2002. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/169/7/3883.full.pdf> >.

SHAI, Y.; OREN, Z. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 22, n. 10, p. 1629-41, Oct 2001. ISSN 0196-9781 (Print) 0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587791> >.

SHAKIL, S. et al. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): an update. **J Chemother**, v. 23, n. 5, p. 263-5, Oct 2011. ISSN 1973-9478 (Electronic) 1120-009X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005056> >.

SHAMOVA, O. et al. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 4106-11, Aug 1999. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417180> >.

SHAW, J. E. et al. Mechanisms of antimicrobial peptide action: studies of indolicidin assembly at model membrane interfaces by in situ atomic force microscopy. **J Struct Biol**, v. 154, n. 1, p. 42-58, Apr 2006. ISSN 1047-8477 (Print) 1047-8477 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16459101> >.

SIEGEL, J. D. et al. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. **Am J Infect Control**, v. 35, n. 10 Suppl 2, p. S65-164, Dec 2007. ISSN 1527-3296 (Electronic)

0196-6553 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18068815> >.

SIGURDARDOTTIR, T. et al. In silico identification and biological evaluation of antimicrobial peptides based on human cathelicidin LL-37. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 2983-9, Sep 2006. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940092> >.

SILVA, P. I., JR.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **J Biol Chem**, v. 275, n. 43, p. 33464-70, Oct 27 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942757> >.

STEINER, H. et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246-8, Jul 16 1981. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7019715> >.

STONE, P. W.; BRACCIA, D.; LARSON, E. Systematic review of economic analyses of health care-associated infections. **Am J Infect Control**, v. 33, n. 9, p. 501-9, Nov 2005. ISSN 0196-6553 (Print)

0196-6553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16260325> >.

STORICI, P. et al. Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides. **Eur J Biochem**, v. 238, n. 3, p. 769-76, Jun 15 1996. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706679> >.

SUGIMOTO, J. et al. Relationship between salivary histatin 5 levels and Candida CFU counts in healthy elderly. **Gerodontology**, v. 23, n. 3, p. 164-9, Sep 2006. ISSN 0734-0664 (Print)

0734-0664 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16919097> >.

SYDNOR, E. R.; PERL, T. M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 1, p. 141-73, Jan 2011. ISSN 1098-6618 (Electronic) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233510> >.

TAMBER, S.; HANCOCK, R. E. On the mechanism of solute uptake in Pseudomonas. **Front Biosci**, v. 8, p. s472-83, May 1 2003. ISSN 1093-9946 (Print)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700103> >.

TANG, Y. Q. et al. Isolation, characterization, cDNA cloning, and antimicrobial properties of two distinct subfamilies of alpha-defensins from rhesus macaque leukocytes. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 6139-44, Nov 1999. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531277> >.

TERMEN, S. et al. Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 3, p. 536-49, Mar 2003.

ISSN 1420-682X (Print)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737313> >.

THAKER, H. D. et al. Role of Amphiphilicity in the Design of Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides with Gram-negative Activity. **ACS Med Chem Lett**, v. 4, n. 5, p. 481-485, May 9 2013. ISSN 1948-5875 (Print)

1948-5875 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23814644> >.

TING, C. H. et al. The mechanisms by which pardaxin, a natural cationic antimicrobial peptide, targets the endoplasmic reticulum and induces c-FOS. **Biomaterials**, v. 35, n. 11, p. 3627-40, Apr 2014. ISSN 1878-5905 (Electronic)

0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477193> >.

TOMASINSIG, L. et al. Inducible expression of an antimicrobial peptide of the innate immunity in polymorphonuclear leukocytes. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 5, p. 1003-10, Nov 2002. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429723> >.

TOMASINSIG, L.; ZANETTI, M. The cathelicidins--structure, function and evolution. **Curr Protein Pept Sci**, v. 6, n. 1, p. 23-34, Feb 2005. ISSN 1389-2037 (Print)

1389-2037 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15638766> >.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, n. 1, p. 4-30, 2000. ISSN 0006-3525 (Print)

0006-3525 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931439> >.

TRAN, D. et al. Microbicidal properties and cytotoxic selectivity of rhesus macaque theta defensins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 3, p. 944-53, Mar 2008. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160518> >.

TRAN, Q. T. et al. The translocation kinetics of antibiotics through porin OmpC: insights from structure-based solvation mapping using WaterMap. **Proteins**, v. 81, n. 2, p. 291-9, Feb 2013. ISSN 1097-0134 (Electronic)

0887-3585 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23011778> >.

TREFFERS, C. et al. Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, n. 2, p. 165-9, Aug 2005. ISSN 0924-8579 (Print)

0924-8579 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011891> >.

TURNER, J. et al. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 9, p. 2206-14, Sep 1998. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9736536> >.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 4, p. 682-707, Oct 2012. ISSN 1098-6618 (Electronic) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034326> >.

UZZELL, T. et al. Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1655-67, Nov 2003. ISSN 0196-9781 (Print) 0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019197> >.

VANDAMME, D. et al. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. **Cell Immunol**, v. 280, n. 1, p. 22-35, Nov 2012. ISSN 1090-2163 (Electronic) 0008-8749 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246832> >.

VASSILEVSKI, A. A.; KOZLOV, S. A.; GRISHIN, E. V. Antimicrobial peptide precursor structures suggest effective production strategies. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v. 2, n. 1, p. 58-63, Jan 2008. ISSN 1872-213X (Print) 1872-213X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075992> >.

VERJANS, E. T. et al. Molecular mechanisms of LL-37-induced receptor activation: An overview. **Peptides**, v. 85, p. 16-26, Nov 2016. ISSN 1873-5169 (Electronic) 0196-9781 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27609777> >.

VOLLMER, W.; BERTSCHE, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, n. 9, p. 1714-34, Sep 2008.

ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17658458> >.

VOULGARI, E. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 27-39, Jan 2013. ISSN 1746-0921 (Electronic)

1746-0913 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23252491> >.

WADE, D. et al. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 12, p. 4761-5, Jun 1990. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1693777> >.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775-81, Aug 17 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963607> >.

WALSH, T. R. et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study.

Lancet Infect Dis, v. 11, n. 5, p. 355-62, May 2011. ISSN 1474-4457 (Electronic)

1473-3099 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478057> >.

WANG, G. **Antimicrobial peptides : discovery, design and novel therapeutic strategies.**

Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA: CABI, 2010. xvii, 230 p. ISBN 9781845936570 (alk. paper)

1845936574 (alk. paper).

WANG, G. Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs.

Pharmaceuticals (Basel), v. 6, n. 6, p. 728-58, May 27 2013. ISSN 1424-8247 (Print)

1424-8247 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24276259> >.

WANG, G. et al. Decoding the functional roles of cationic side chains of the major antimicrobial region of human cathelicidin LL-37. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n.

2, p. 845-56, Feb 2012. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22083479> >.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. D1, p. D1087-93, Jan 4 2016. ISSN

1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26602694> >.

WANG, G. et al. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. **Biochim Biophys Acta**, v.

1838, n. 9, p. 2160-72, Sep 2014. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463069> >.

WANG, Y. et al. Snake cathelicidin from Bungarus fasciatus is a potent peptide antibiotics. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3217, 2008. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18795096> >.

WEI, G. et al. Through the looking glass, mechanistic insights from enantiomeric human defensins. **J Biol Chem**, v. 284, n. 42, p. 29180-92, Oct 16 2009. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640840> >.

WEI, L. et al. Identification and Characterization of the First Cathelicidin from Sea Snakes with Potent Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity and Special Mechanism. **J Biol Chem**, v. 290, n. 27, p. 16633-52, Jul 3 2015. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26013823> >.

WELKOS, S. et al. Humanized theta-defensins (retrocyclins) enhance macrophage performance and protect mice from experimental anthrax infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 9, p. 4238-50, Sep 2011. ISSN 1098-6596 (Electronic)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21768520> >.

WESSOLOWSKI, A.; BIENERT, M.; DATHE, M. Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization. **J Pept Res**, v. 64, n. 4, p. 159-69, Oct 2004. ISSN 1397-002X (Print)

1397-002X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357671> >.

WIEPRECHT, T. et al. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. **FEBS Lett**, v. 417, n. 1, p. 135-40, Nov 3 1997. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395091> >.

WILLIAM F. PORTO; OSMAR N. SILVA; FRANCO, O. L. Prediction and Rational Design of Antimicrobial Peptides, Protein Structure. In: FARAGGI, D. E. (Ed.): InTech, 2012.

WILLIAMS, D. H. The glycopeptide story--how to kill the deadly 'superbugs'. **Nat Prod Rep**, v. 13, n. 6, p. 469-77, Dec 1996. ISSN 0265-0568 (Print)

0265-0568 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8972102> >.

WIMLEY, W. C.; HRISTOVA, K. Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. **J Membr Biol**, v. 239, n. 1-2, p. 27-34, Jan 2011. ISSN 1432-1424 (Electronic)

0022-2631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21225255> >.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev**, v. 35, n. 5, p. 736-55, Sep 2011. ISSN 1574-6976 (Electronic)

0168-6445 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303394> >.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 10, p. 1451-70, Jul 29 2005. ISSN 0169-409X (Print)

0169-409X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950313> >.

XIAO, Y. et al. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity. **J Biol Chem**, v. 281, n. 5, p. 2858-67, Feb 3 2006. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16326712> >.

XIONG, Y. Q.; BAYER, A. S.; YEAMAN, M. R. Inhibition of intracellular macromolecular synthesis in *Staphylococcus aureus* by thrombin-induced platelet microbicidal proteins. **J Infect Dis**, v. 185, n. 3, p. 348-56, Feb 1 2002. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807717> >.

YANG, Y. et al. NMR structure of the cathelin-like domain of the protegrin-3 precursor. **Biochemistry**, v. 42, n. 16, p. 4669-80, Apr 29 2003. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12705830> >.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 1, p. 27-55, Mar 2003. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615953> >.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 1151-61, Apr 2001. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257029> >.

YIN, L. M. et al. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. **J Biol Chem**, v. 287, n. 10, p. 7738-45, Mar 2 2012. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253439> >.

ZAIYOU, M.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. **J Invest Dermatol**, v. 120, n. 5, p. 810-6, May 2003. ISSN 0022-202X (Print)

0022-202X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713586> >.

ZANETTI, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 1, p. 39-48, Jan 2004. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960280> >.

_____. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. **Curr Issues Mol Biol**, v. 7, n. 2, p. 179-96, Jul 2005. ISSN 1467-3037 (Print)

1467-3037 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16053249> >.

ZANETTI, M.; GENNARO, R.; ROMEO, D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. **FEBS Lett**, v. 374, n. 1, p. 1-5, Oct 23 1995. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7589491> >.

ZANETTI, M. et al. Cathelicidin peptides as candidates for a novel class of antimicrobials.

Curr Pharm Des, v. 8, n. 9, p. 779-93, 2002. ISSN 1381-6128 (Print)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11945171> >.

ZANETTI, M. et al. Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. **J Biol Chem**, v. 269, n. 11, p. 7855-8, Mar 18 1994.

ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132502> >.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 15, p. 5449-53, Aug 1987. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3299384> >.

_____. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-95, Jan 24 2002. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807545> >.

ZHANG, L.; BENZ, R.; HANCOCK, R. E. Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. **Biochemistry**, v. 38, n. 25, p. 8102-11, Jun 22 1999. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10387056> >.

ZHANG, Y. et al. Structure-function relationship of king cobra cathelicidin. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1488-93, Aug 2010. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576537> >.

ZHAO, C. et al. RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 10, p. 2695-702, Oct 2001. ISSN 0066-4804 (Print)

0066-4804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557457> >.

ZHU, S. Positive selection targeting the cathelin-like domain of the antimicrobial cathelicidin family. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 7-8, p. 1285-94, Apr 2008. ISSN 1420-682X (Print)

1420-682X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322645> >.

ZHU, S. et al. Activation of cathepsin L by the cathelin-like domain of protegrin-3. **Mol Immunol**, v. 45, n. 9, p. 2531-6, May 2008. ISSN 0161-5890 (Print)

0161-5890 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18289683> >.



An Immunomodulatory Peptide Confers Protection in an Experimental Candidemia Murine Model

Camila G. Freitas,^{a,c,d,e} Stella M. F. Lima,^{a,d,e,f} Mirna S. Freire,^{a,g,h}
Ana Paula C. Cantuária,^{a,g,i} Nelson G. O. Júnior,^{a,g,j} Tatiane S. Santos,^{a,k}
Jéssica S. Folha,^{a,k} Suzana M. Ribeiro,^{a,l} Simoni C. Dias,^{a,d,e}
Taia M. B. Rezende,^{a,d,e,f,g,i} Patrícia Albuquerque,^g André M. Nicola,^{o,g}
César de la Fuente-Núñez,^{m,n,o,p,q,r} Robert E. W. Hancock,^z
Octávio L. Franco,^{a,b,d,e,g,h,j} Maria Sueli S. Felipe^{a,b,d,e,g}

Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Brasília, Distrito Federal, Brazil^a; S-Inova Biotech—Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil^b; Instituto Federal de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil^c; Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil^d; Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil^e; Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil^f; Universidade de Brasília, Brasília, Brazil^g; Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade—Rede Centro-oeste, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil^h; Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazilⁱ; Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil^j; Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil^k; Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil^l; Synthetic Biology Group, MIT Synthetic Biology Center, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA^m; Research Laboratory of Electronics, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USAⁿ; Department of Biological Engineering, and Department of Electrical Engineering and Computer Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA^o; Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA^p; Harvard Biophysics Program, Harvard University, Boston, Massachusetts, USA^q; The Center for Microbiome Informatics and Therapeutics, Cambridge, Massachusetts, USA^r; Center for Microbial Diseases and Immunity Research, Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada^s

ABSTRACT Fungal *Candida* species are commensals present in the mammalian skin and mucous membranes. *Candida* spp. are capable of breaching the epithelial barrier of immunocompromised patients with neutrophil and cell-mediated immune dysfunctions and can also disseminate to multiple organs through the bloodstream. Here we examined the action of innate defense regulator 1018 (IDR-1018), a 12-amino-acid-residue peptide derived from bovine bacteriocin (Bac2A): IDR-1018 showed weak antifungal and antibiofilm activity against a *Candida albicans* laboratory strain (ATCC 10231) and a clinical isolate (CI) (MICs of 32 and 64 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectively), while 8-fold lower concentrations led to dissolution of the fungal cells from preformed biofilms. IDR-1018 at 128 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ was not hemolytic when tested against murine red blood cells and also has not shown a cytotoxic effect on murine monocyte RAW 264.7 and primary murine macrophage cells at the tested concentrations. IDR-1018 modulated the cytokine profile during challenge of murine bone marrow-derived macrophages with heat-killed *C. albicans* (HKCA) antigens by increasing monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and interleukin-10 (IL-10) levels, while suppressing tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1 β , IL-6, and IL-12 levels. Mice treated with IDR-1018 at 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of body weight had an increased survival rate in the candidemia model compared with phosphate-buffered saline (PBS)-treated mice, together with a diminished kidney fungal burden. Thus, IDR-1018 was able to protect against murine experimental candidemia and has the potential as an adjunctive therapy.

Received 25 November 2016 Returned for modification 29 January 2017 Accepted 21 May 2017

Accepted manuscript posted online 30 May 2017

Citation Freitas CG, Lima SMF, Freire MS, Cantuária APC, Júnior NGO, Santos TS, Folha JS, Ribeiro SM, Dias SC, Rezende TMB, Albuquerque P, Nicola AM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW, Franco OL, Felipe MSS. 2017. An immunomodulatory peptide confers protection in an experimental candidemia murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02518-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02518-16>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Address correspondence to Octávio L. Franco, ofranco@gmail.com.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Short communication

Anxiolytic-like effect of a novel peptide isolated from the venom of the social wasp *Synoecca surinama*



Flávia M.M. Gomes^a, Cássia K. Paniago^a, Daniel O. Freire^a, Adolfo C.B. Souza^a,
Marcos R. Lima^{a,b}, Nelson G. Oliveira-Júnior^{c,d}, Octavio L. Franco^{c,d}, Márcia R. Mortari^{a,*}

^aNeuropharmacology Laboratory, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

^bEvolutionary Ecology Laboratory, Department of Animal and Plant Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Brazil

^cS-Inova Biotech, Post-Graduation on Biotechnology, Dom Bosco Catholic University, Campo Grande, Brazil

^dCenter for Biochemical and Proteomics Analyses, Catholic University of Brasília, Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2016

Received in revised form

16 September 2016

Accepted 20 September 2016

Available online 21 September 2016

Keywords:

Wasp venom

Peptides

Pathological anxiety

Elevated plus maze

Anxiolytic activity

ABSTRACT

Pathological anxiety is among the most common psychiatric illnesses, but current treatment is highly limited. In this study, we investigated the potential anxiolytic-like effects of a peptide isolated from *Synoecca surinama* venom. Rats treated with this peptide spent more time exploring the open arms of elevated plus maze, which indicates an anxiolytic-like profile for this peptide. This study is the first to show the pharmacological use of *S. surinama* venom in the treatment of anxiety.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anxiety comprises a variety of emotional states involving subjective, behavioral, and physiological characteristics that maintain individuals alert during times of imminent and recurrent danger (Wiedemann, 2015). Despite being one of the most important emotional manifestations experienced by humans and several animal species, anxiety can be detrimental to human health. According to the current definition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases – DSM-5, anxiety may cause damage to individuals and become pathological when it is disproportional to the situation responsible for inducing the anxious response and/or when it persists for at least six months (American Psychiatric Association, 2014). Indeed, the occurrence of pathological anxiety has been considered a sizeable worldwide health problem and is currently an object of psychological and/or pharmacological

treatments (Beddington et al., 2008; Kessler et al., 2012).

Several anxiolytic drugs are used for the treatment of this disorder. The first line of available drugs used in the treatment of anxiety consists of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI) and Benzodiazepines. Despite notable advances in this area, many drugs are inefficient for some patients and/or can cause significant side effects (for review, see Ravindran and Stein, 2010). In this context, invertebrate venom is a rich source of natural bioactive components that have been identified and tested in several animal models of neurological disorders, particularly anxiety-related disorders (Mortari and Cunha, 2013; Silva et al., 2015). Data from these tests have shown interesting neuroactivity, which makes the molecules found in the venom excellent targets for the development of novel pharmacological tools (for review, see Monge-Fuentes et al., 2015). However, few studies have analyzed the neurobiological effects of venoms from Neotropical social wasps and their components separately; above all, studies focusing on the peptides, which make up the majority of this poison, are lacking (Mortari et al., 2012, 2005; Silva et al., 2016).

The aim of this study was to identify a compound isolated from the venom of the social wasp *Synoecca surinama* and to investigate its anxiolytic potential in rats submitted to the elevated plus maze

* Corresponding author. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília – Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Ciências Fisiológicas CEP: 70910-900 Brasília, Distrito Federal, Brazil.

E-mail addresses: flavia.medeiros@hotmail.com (F.M.M. Gomes), paniago.bio@gmail.com (C.K. Paniago), daniel.microbiologia@gmail.com (D.O. Freire), adolfo_quimica@hotmail.com (A.C.B. Souza), robalinho.lima@gmail.com (M.R. Lima), juroyal@gmail.com (N.G. Oliveira-Júnior), ocfranco@gmail.com (O.L. Franco), mmortari@unb.br (M.R. Mortari).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.015>

0041-0101/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Venom gland transcriptome analyses of two freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) from Brazil

Received: 13 August 2015
Accepted: 03 February 2016
Published: 26 February 2016

Nelson Gomes de Oliveira Júnior^{2,4}, Gabriel da Rocha Fernandes^{1,2},
Marlon Henrique Cardoso^{2,4,5}, Fabrício F. Costa¹, Elizabete de Souza Cândido^{1,2},
Domingos Garrone Neto⁶, Márcia Renata Mortari³, Elisabeth Ferroni Schwartz³,
Octávio Luiz Franco^{1,2,4,5} & Sérgio Amorim de Alencar^{1,2}

Stingrays commonly cause human envenoming related accidents in populations of the sea, near rivers and lakes. Transcriptomic profiles have been used to elucidate components of animal venom, since they are capable of providing molecular information on the biology of the animal and could have biomedical applications. In this study, we elucidated the transcriptomic profile of the venom glands from two different freshwater stingray species that are endemic to the Paraná-Paraguay basin in Brazil, *Potamotrygon amandae* and *Potamotrygon falkneri*. Using RNA-Seq, we identified species-specific transcripts and overlapping proteins in the venom gland of both species. Among the transcripts related with envenoming, high abundance of hyaluronidases was observed in both species. In addition, we built three-dimensional homology models based on several venom transcripts identified. Our study represents a significant improvement in the information about the venoms employed by these two species and their molecular characteristics. Moreover, the information generated by our group helps in a better understanding of the biology of freshwater cartilaginous fishes and offers clues for the development of clinical treatments for stingray envenoming in Brazil and around the world. Finally, our results might have biomedical implications in developing treatments for complex diseases.

The Potamotrygonidae family comprises the only group of Elasmobranchii restricted to freshwater environments, with their occurrence limited to some river systems of South America. This group is represented by four genera, among which *Potamotrygon* comprises the largest number of species with broad geographic distribution¹.

The *Potamotrygon* genus includes benthic freshwater stingrays that are known for their long tail appendage with the presence of one to four serrated bone stings covered by a glandular epithelium whose cells produce venom^{2,3} (Fig. 1). Injuries caused by stingrays have always been present in riverine communities of inland waters and in South American coasts. Indeed, envenomation by stingrays is quite common in freshwater and marine fishing communities. Although having high morbidity, such injuries are neglected because they have low lethality and usually occur in remote areas, which favor the use of folk remedies². Moreover, accidents are caused due to a reflex contact between stingrays and humans, yielding an animal tail whiplash and further leading to a sting introduction at the limb during direct contact, causing epithelial lining destruction and subsequent venom release^{2,4}. Clinical manifestations occur by triggering painful processes and injuries, even producing ulcers and necrosis of affected tissues². Erythema, edema and bleeding of different degrees around the sting site appear in the first

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, Brazil. ²Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, Brazil. ³Departamento de Ciências Fisiológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil. ⁴Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil. ⁵S-Inova Biotech, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Reitoria, Campo Grande, MS – Brazil. ⁶UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Experimental de Registro, Registro, SP – Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.L.F. (email: ocf Franco@gmail.com)

Characterization of a Bioactive Acyclotide from *Palicourea rigida*

Michelle F. S. Pinto,^{†,‡} Osmar N. Silva,[§] Juliane C. Viana,^{†,⊥} William F. Porto,[†] Ludovico Migliolo,[§] Nicolau B. da Cunha,[†] Nelson Gomes, Jr.,^{†,¶} Isabel C. M. Fensterseifer,^{†,¶} Michelle L. Colgrave,^{||} David J. Craik,[#] Simoni C. Dias,[†] and Octavio L. Franco^{*,†,§}

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

[‡]Faculdade Anhanguera de Ciências e Tecnologia de Brasília, Brasília-DF, Brazil

[§]S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, Brazil

[⊥]Universidade CEUMA, Laboratório de Biotecnologia, São Luís-MA, Brazil

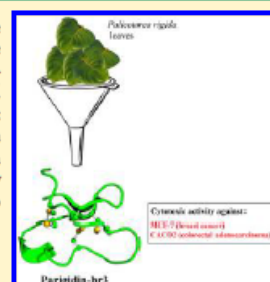
^{||}CSIRO Agriculture and Food, 306 Carmody Road, St Lucia, Queensland 4067, Australia

[#]Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, Brisbane, Queensland 4072, Australia

[¶]Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade De Brasília, Brasília-DF, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: The extraction and purification of parigidin-br3, a cyclotide analogue belonging to the "bracelet" subfamily, from *Palicourea rigida* leaves is discussed. Unlike conventional cyclotides, parigidin-br3 has free N- and C-termini, as identified by MALDI-TOF/TOF analysis and confirmed by gene structure elucidation, and is one of a small number of acyclotides discovered during recent years. Parigidin-br3 showed cytotoxic activity against MCF-7 (breast cancer) and CACO2 (colorectal adenocarcinoma) cells, with IC₅₀ values of ~2.5 μM and less than 10% hemolytic activity. Overall, parigidin-br3 is a promising new molecule with cytotoxic properties against tumor cell lines and, unlike many synthetic acyclic analogues, demonstrates that cytotoxic activity is not limited to conventional (i.e., cyclic) cyclotides.



Despite remarkable advances in biomedical research, cancer remains one of the major causes of mortality and morbidity worldwide.¹ Thus, there is a significant research focus on the discovery of molecules and the development of new treatments that are more selective and cause fewer side effects than conventional therapies.² Among molecules from natural sources, peptides are a promising class of drug leads.^{3,4} In particular, cyclotides have attracted attention due to their ability to kill cancer cells through mechanisms involving membrane disruption.^{5,6} These molecules have an ultra-stable structure resulting from a peptide link between their N- and C-termini and the presence of three highly conserved disulfide bonds, which together form a cyclic cystine knot (CCK) motif.⁷

Interestingly, several reports have recently described the discovery of backbone-linear cyclotide analogues^{8–10} also known as uncyclotides¹⁰ or acyclotides,¹¹ with the latter term being our preference.¹¹ Acyclotides share the cystine knot motif and have high sequence homology with conventional cyclotides, but are biosynthetically unable to cyclize.^{10–13} A common characteristic of acyclotides is the absence of an Asn or Asp residue at the C-terminal end of the mature peptide domain in the precursor protein; Asx residues are posited to be essential for recognition by asparaginyl endoproteinase enzymes implicated in backbone cyclization.⁸ Acyclotides are relatively

uncommon, with only 26 such sequences deposited in Cybase compared to more than 300 conventional cyclotides.^{14–16}

Investigations into their functional properties have revealed that many cyclotides possess cytotoxic activity, including some cycloviolacins isolated from *Viola* sp. and varv peptides.¹⁷ Moreover, vitri A, a cyclotide isolated from *V. tricolor*, showed toxic activity toward lymphomas and myeloma cells with similar potencies to doxorubicin-containing chemotherapeutic drugs.^{17,18} However, less is known about bioactivities of acyclotides.

Here, we report the identification and characterization of parigidin-br3 (PBR3), an acyclotide from *Palicourea rigida*. Elucidation of the partial gene structure encoding PBR3 revealed a premature stop codon at the position of the typically conserved Asn residue, which is essential for cyclization. The cytotoxic activity of PBR3 was evaluated against human breast cancer (MCF-7) and colorectal adenocarcinoma (CACO2) cell lines, and it was found to be a promising molecule with selective toxicity for cancer cells.

Received: March 27, 2016

Published: November 3, 2016



Pathophysiological effects caused by the venom of the social wasp *Synoecca surinama*



Juliana de Castro e Silva^a, Fagner Neves Oliveira^a, Karla Graziela Moreira^b,
 Andreia Biolchi Mayer^a, Daniel Oliveira Freire^a, Mariana Domelas Cherobim^c,
 Nelson Gomes de Oliveira Junior^c, Carlos Alberto Schwartz^a, Elisabeth Ferroni Schwartz^a,
 Márcia Renata Mortari^{a,*}

^a Laboratory of Toxicology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brazil

^b Department of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus Catalão, Goiás, Brazil

^c Center of Biochemical and Proteomic Analysis of Brasília, Catholic University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2015

Received in revised form

30 January 2016

Accepted 3 February 2016

Available online 5 February 2016

Keywords:

Envenomation

Hymenoptera

Oedematogenic

Nociceptive activity

Hemorrhagic

Toxicity

ABSTRACT

Envenomation by wasp stings is a public health preoccupation, and signals after stings have variable effects depending on the number of attacks and individual sensitivities. Even with the high rate of wasp sting cases, the study of pathophysiological effects of the envenomation is still very incipient. In this context, early and accurate assessment of this prognostic can aid in the reduction of the symptomatology and complete remission of the later symptoms. Then, the present study evaluated the toxicological effects caused by envenomation produced by *Synoecca surinama*, a wasp easily found in Neotropical regions. *In vivo* tests comprised the evaluation of LD₅₀ (OECD 423), nociception, edema, myotoxic lesion and hemorrhage induction, *in vitro* tests were realized to evaluate hemolysis, contractile and coagulation alteration. The envenomation effects observed were dose- and time-dependent; the LD₅₀ observed for *S. surinama* was 178 µg/kg, approximately 17 times more lethal than that of the honeybee. Moreover, a potent algic and oedema effect, and weak hemorrhagic signal were observed after injection of the venom wasp. Assays *in vitro* showed that this venom is able to prolong the clotting time of plasma and to increase creatine kinase levels. Our results demonstrated that this venom induced serious local and systemic effects in mammals and, so, to avoid permanent damage to the patient, health professionals should carefully investigate each accident. Moreover, due to its high occurrence in Neotropical regions, ecological management, particularly in areas with free access of children and elderly, should be performed.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hymenoptera accidents are very common in Neotropical regions and wasp stings are poorly reported to competent organizations, therefore being underestimated. Moreover, several Vespidae species are of medical importance with serious envenomation accidents, which may even cause fatalities in humans (Lai and Liu, 2010). World estimates of incidence of reactions to hymenopteran

sting range 0.3–3% of the population, resulting in 100 million cases per year with different degrees of envenomation (local wheal-and-flare reactions to deaths) (Diaz, 2009). However, this number is probably even greater, as it was already found high blood levels of specific IgE to hymenoptera venom in a portion of the population who had sudden death of unknown cause (Schwartz et al., 1988). In South America, the accidents in humans caused by wasp venom are also neglected and, unfortunately, pharmacological and epidemiological studies are lacking. Recent estimates show that more than 10,000 cases of stings by wasps occur, and 2000 cases of severe stings per year are presented to hospitals in Brazil (Medeiros and França, 2003).

* Corresponding author.

E-mail address: mmortari@unb.br (M.R. Mortari).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.02.005>

0041-0101/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.