



Universidade de Brasília

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Avaliação dos efeitos biológicos de análogos de
segunda geração do peptídeo antimicrobiano ocellatin 4**

LEONARDO MACIEL CUNHA

BRASÍLIA/DF

2023



Universidade de Brasília

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Avaliação dos efeitos biológicos de análogos de segunda geração do peptídeo antimicrobiano ocellatin 4

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Autor: Leonardo Maciel Cunha

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

BRASÍLIA/DF

2023



Universidade de Brasília

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

LEONARDO MACIEL CUNHA

**Avaliação dos efeitos biológicos de análogos de
segunda geração do peptídeo antimicrobiano ocellatin 4**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Daniela Mara de Oliveira

Presidente

Departamento de Genética e Morfologia/IB

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski

Membro Titular

Departamento de Morfologia/ICB

Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima

Membro Titular

Departamento de Biologia Celular/IB

Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que me acompanharam durante essa jornada, principalmente à minha mãe Denise que incentivou e me deu apoio incondicional por esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Denise que me acompanhou e apoiou por todos esses anos.

À minha avó Ariovalda e o meu pai Levino me ajudaram a correr atrás dos meus sonhos com segurança.

À Cynthia que me permitiu conhecer a Profa. Dra. Mariana S. Castro.

À Profa. Dra. Mariana S. Castro, minha orientadora, por ter me acolhido como seu aluno, mesmo não me conhecendo. Por ter me incentivado e acalmando nos momentos difíceis e por ter tido paciência comigo em função da minha falta de experiência.

Ao Dr. Carlos José Correia de Santana por ter uma imensa paciência em me ensinar e ajudar com tudo que precisei.

Ao Dr. Lúcio H. Freitas Júnior e à Dra, Carolina Borsoi Moraes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) pelo colaboração nos ensaios antivirais.

À minha namorada Vitória, que me acompanhou, incentivou e animou durante todo o percurso.

À Capes pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa de estudos que sem a qual a minha dedicação ao projeto não seria possível.

APOIO FINANCEIRO

A dissertação de mestrado intitulada “Avaliação dos efeitos biológicos de análogos de segunda geração do peptídeo antimicrobiano ocellatin 4” desenvolvida por Leonardo Maciel Cunha sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq, da FAPDF, da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos – mestrado), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

Diante do atual cenário de multirresistência das bactérias aos antibióticos comercialmente disponíveis, a busca por novas opções terapêuticas para enfrentar tal crise torna-se premente. Uma estratégia que vem se mostrando promissora para o desenvolvimento de novas drogas anti-infecciosas reside no desenho racional de análogos de peptídeos antimicrobianos identificados na natureza. Uma rica fonte de peptídeos antimicrobianos são as secreções cutâneas de anfíbios anuros. O presente trabalho teve como objetivo geral produzir por síntese química de fase sólida e avaliar os efeitos biológicos de análogos de segunda geração do peptídeo antimicrobiano ocellatin 4, usando como *template* o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20]. Com o emprego da síntese química em fase sólida foram produzidos o peptídeo *template* e nove análogos. De posse dos peptídeos sintéticos foram realizados ensaios de microdiluição seriada para se avaliar suas propriedades antimicrobianas sobre bactérias de interesse médico Gram-positivas e Gram-negativas e sobre o fungo *Candida albicans*. Também foi avaliada sua atividade sobre eritrócitos humanos e sobre células de melanoma murino B16F10 e seus efeitos na multiplicação do vírus SARS-COV-2 e na migração de neutrófilos humanos. Alguns dos análogos testados exibiram aumento de atividade sobre bactérias em relação ao *template*, além de demonstrarem atividade sobre células de melanoma murino da linhagem B16F10 e sobre a migração de neutrófilos. Três dos análogos testados merecem destaque e necessitam de estudos subsequentes principalmente com o objetivo de reduzir sua atividade hemolítica. Um dos análogos demonstrou grande potencial terapêutico e não apresentou toxicidade, sendo que testes adicionais devem ser realizados de modo a aprofundar os estudos sobre suas propriedades antimicrobianas e antitumorais.

Palavras-chave: anuros; secreção cutânea; peptídeos antimicrobianos; ocellatin 4; desenho racional; análogos; multirresistência.

ABSTRACT

Given the current scenario of multidrug resistance of bacteria to commercially available antibiotics, the search for new therapeutic options to face this crisis becomes urgent. A strategy that has shown to be promising for the development of new anti-infective drugs is found in the rational design of analogues of antimicrobial peptides identified in nature. A rich source of antimicrobial peptides are the skin secretions of anuran amphibians. The general objective of this work was to evaluate the biological effects of second-generation analogues of the antimicrobial peptide ocellatin 4 using the analogue K[1,4,8,15];A[12,16,20] as a template. With the use of chemical synthesis in solid phase, the template peptide and nine analogues were produced. With the synthetic peptides in hand, serial microdilution assays were carried out to evaluate their antimicrobial properties on Gram-positive and Gram-negative bacteria of medical interest and on the fungus *Candida albicans*. Its activity on human erythrocytes and B16F10 murine melanoma cells and its effects on the multiplication of the SARS-COV-2 virus and on the migration of human neutrophils were also evaluated. Some of the analogues tested showed increased activity against bacteria compared to the template, in addition to demonstrating activity against murine melanoma cells of the B16F10 lineage and on neutrophil migration. Three of the analogues tested are noteworthy and require further studies, mainly to reduce their hemolytic activity. One of the analogues demonstrates great therapeutic potential with no toxicity, and additional assays should be performed in order to evaluate in greater depth its antimicrobial and antitumor properties.

Keywords: anurans; skin secretion; antimicrobial peptides; ocellatin 4; rational design; analogues; multidrug resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos.	3
Figura 2. Representação esquemática das membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	5
Figura 3. Representação esquemática do fluxo de trabalho voltado ao desenho racional de peptídeos.	12
Figura 4. Atividade hemolítica (%) dos análogos da ocellatin 4.	25
Figura 5. Atividade antiviral (%) sobre SARS-CoV-2 dos análogos da ocellatin 4.	29
Figura 6. Avaliação da capacidade migratória de neutrófilos em tempo real por RTCA.	31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Atividade antimicrobiana (CIM, μM) dos análogos da ocellatin 4 sobre microrganismos patogênicos. 23**
- Tabela 2. Atividade antiproliferativa (IC_{50} , μM) dos análogos da ocellatin 4 sobre células de melanoma murino B16F10. 24**
- Tabela 3. Atividade hemolítica (HC_{50} , μM) dos análogos de ocellatin 4 sobre eritrócitos humanos. 24**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC – Coleção Americana de Culturas Típicas, do inglês *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina trifosfato

BHI – Infusão cérebro-coração, do inglês *brain heart infusion*

CMI – Concentração mínima inibitória, do inglês *minimum inhibitory concentration*

Da – Dalton

Fmoc – 9-fluorenil-metoxicarbonil

HCCA – Ácido-alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*

LPS- Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de voo, do inglês *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*.

nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

p/v – Peso/volume

PAM – Peptídeo antimicrobiano

RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês *reversed-phase high-performance liquid chromatography*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TFA – Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

UFC – Unidade formadora de colônia, do inglês *colony-forming unit*

PBS- solução salina tamponada com fosfato

MOI - Multiplicidade de Infecção, do inglês *Multiplicity of Infection*

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES	1
1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	1
1.3. BACTÉRIAS	4
1.4. FUNGOS.....	6
1.5. VÍRUS	7
1.6. NEUTRÓFILOS	8
1.7. CÂNCER.....	9
1.8. ANFÍBIOS	10
1.9. DESENHO RACIONAL E SÍNTESE DE PEPTÍDEOS	11
1.10. OCELLATIN 4 E ANÁLOGOS	13
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVO GERAL	15
4. METAS ESTABELECIDAS	15
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
5.1. DESENHO DOS ANÁLOGOS E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS.....	15
5.2. ANÁLISES COMPUTACIONAIS.....	16
5.3. QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	16
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	17
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10.....	18
5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	19
5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE SARS-CoV-2.....	20
5.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO.....	31
8. PERSPECTIVAS	32
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

O recente aumento de bactérias multirresistentes é responsável por uma crise mundial de saúde que vem aumentando as taxas de morbidade e mortalidade. Essa resistência a medicamentos foi listada pela Organização Mundial da Saúde entre as dez principais ameaças globais à saúde pública que a humanidade enfrenta^{[1][2]}. Além disso, existe uma grande demanda para tratamentos de outros tipos de doenças que não possuem tratamentos seguros e consistentes. Câncer por exemplo, outra doença emergente, não é mais a sentença de morte que costumava ser, mas seus tratamentos demonstram-se longe de ideais. A quimioterapia de longo prazo em pacientes com câncer, por exemplo, não só leva à resistência aos tratamentos convencionais de câncer, mas também resulta na suscetibilidade à infecções patogênicas^{[3][4][5]}.

A dificuldade de se encontrar novas classes de antibióticos e o rápido surgimento de resistência a novos antibióticos mostram a necessidade de novas alternativas terapêuticas^[1]. Peptídeos antimicrobianos (PAMs) foram sugeridos como muito promissores há mais de 20 anos, pois existem na natureza há milhões de anos com quase nenhum desenvolvimento de resistência^[1].

Além das atividades antibacterianas, os PAMs possuem uma variedade de atividades, como cicatrização de feridas, antiproliferativa, antiparasitária, antiviral e, embora a maioria dos estudos envolvendo PAMs visem sua atividade antimicrobiana, já existem diversos estudos explorando sua atividade imunorreguladora e antitumoral^{[3][4][5][6][7]}.

1.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos antimicrobianos são moléculas multifuncionais que muitas vezes combinam atividades antimicrobianas diretas com funções imunomoduladoras ou de

sinalização^{[8][4]}.

Na década de 1920, Alexander Fleming descobriu a primeira proteína antibacteriana, a *lisozima*, dando início a uma série de pesquisas e descobertas até que, em 1939, Dubos isolou agentes antimicrobianos de *Bacillus* spp, descrevendo os primeiros PAMs^[9]. Este grupo de moléculas pode ser encontrado em diversas espécies na natureza e são bem presentes em espécimes da ordem Anura^{[10][5]}.

PAMs costumam ser relativamente pequenos contendo, em geral, menos de 50 resíduos de aminoácidos e são, em sua maioria, catiônicos e anfipáticos, o que os ajuda a se ligarem às membranas de microrganismos de forma seletiva graças às diferenças nas cargas das membranas de eucariotos e procariotos^{[4][9]}. Também exercem inúmeras propriedades imunomoduladoras, como a modulação da expressão de citocinas e quimiocinas e a ativação de leucócitos^[9].

PAMs apresentam atividade antimicrobiana direta através da lise membranar de microrganismos e demonstram capacidade de modular processos imunológicos e inflamatórios do hospedeiro^[8]. Podem estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a ativação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a fagocitose^[11].

Os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos que envolvem a interação com a membrana plasmática são:

- 1- modelo *barrel-stave* pelo qual tem-se a ligação dos peptídeos à membrana; inserção na membrana para formação de poros e recrutamento de monômeros para aumentar o diâmetro do poro^[12](Figura 2a);
- 2- modelo do poro toroidal com recrutamento de monômeros. Os PAMs podem atuar junto com os lipídios presentes na membrana, facilitando a estabilização

dos poros devido à interação de resíduos hidrofóbicos dos peptídeos e resíduos hidrofóbicos da membrana^[13](Figura 2b);

3- modelo *carpet-like* no qual os peptídeos interagem com a membrana celular de forma eletrostática: a parte carregada positivamente se liga a regiões negativas da membrana. Os peptídeos se orientam paralelamente à superfície da membrana, de modo a recobri-la como um tapete. Desta forma, a região hidrofóbica fica em contato com a região lipídica e a face polar em contato com os grupos carregados dos fosfolípidios, ocasionando uma curvatura na camada^[12](Figura 2d);

4- modelo de agregação, segundo o qual os peptídeos se ligam aos constituintes da membrana e agregam-se de forma desordenada, levando a uma desestabilização da bicamada lipídica^[12](Figura 2d).

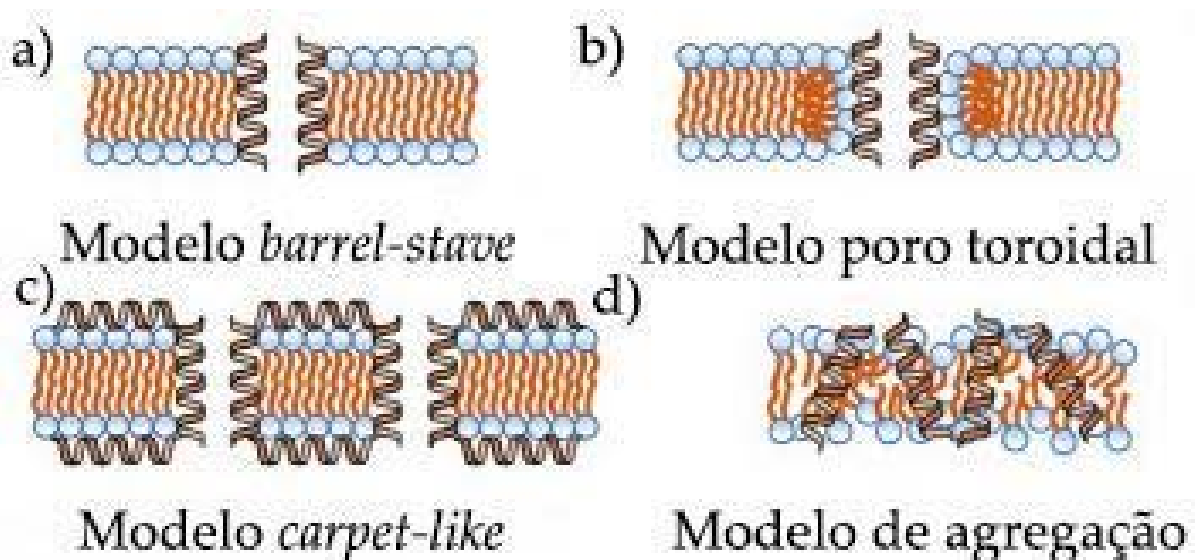


Figura 1. Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos. a) modelo *barrel-stave*; b) modelo do poro toroidal; c) modelo *carpet-like* e d) modelo de agregação. (Figura adaptada de ^[3]).

A atividade antimicrobiana dos PAMs os torna candidatos promissores para usos terapêuticos, onde vários PAMs demonstraram atividade contra infecções complicadas de pele e tecidos moles. Até o momento apenas alguns PAMs foram aprovados para uso clínico, sendo as polimixinas as mais bem caracterizadas^{[8][14][5][15][16]}.

O surgimento da resistência bacteriana aos PAMs tem sido geralmente considerado improvável devido ao mecanismo de ação dos PAMs ao interagirem com vários alvos de baixa afinidade, ao invés de um alvo definido e de alta afinidade, mecanismos característico dos antibióticos convencionais, o que torna mais difícil para o organismo se defender por um único mecanismo de resistência^{[8][4]}.

PAMs podem exibir baixa toxicidade, alta especificidade e um amplo espectro de ação. Sua baixa massa molecular permite boa permeabilidade e uma ação rápida. Isso os leva a serem alvos de grande interesse na pesquisa farmacêutica na luta contra microrganismos resistentes a drogas^[9].

Os peptídeos possuem tamanho pequeno, facilidade de síntese e modificação, capacidade de penetração tumoral e boa biocompatibilidade, o que os torna um alvo de pesquisa interessante na luta contra o câncer. Muitos PAMs desempenham atividade imunorreguladora em concentrações muito mais baixas do que as necessárias para apresentarem atividade antimicrobiana^[17]. Os peptídeos podem ser utilizados de várias maneiras diferentes como no tratamento do câncer, isso inclui o seu uso diretamente como drogas, ou como veículos para drogas citotóxicas e radioterápicas^{[18][4]}.

1.3. BACTÉRIAS

As bactérias são organismos procarióticos e suas membranas têm características peculiares que permitem a sua divisão em dois grandes grupos por meio da coloração de Gram. As bactérias que são denominadas Gram-positivas possuem uma parede celular

geralmente composta por mureína e peptideoglicanos com alternâncias de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, que ao se ligar ao ácido teicóico apresenta uma cor azulada^[19]. Já as bactérias Gram-negativas apresentam uma coloração vermelha no teste de Gram. A coloração avermelhada se deve ao fato da camada ser muito mais fina, não permitindo a agregação dos cristais de violeta. A bicamada lipídica das bactérias Gram-negativas apresenta uma camada interna formada por fosfolipídios e uma externa formada por fosfolipídios e lipopolissacarídeos. Em meio às duas camadas, no espaço periplasmático é possível encontrar peptideoglicanos e grupos de proteínas que estão associados a troca de íons, ligação com ATP e transporte de pequenas moléculas^{[20][21]} (Figura 2).

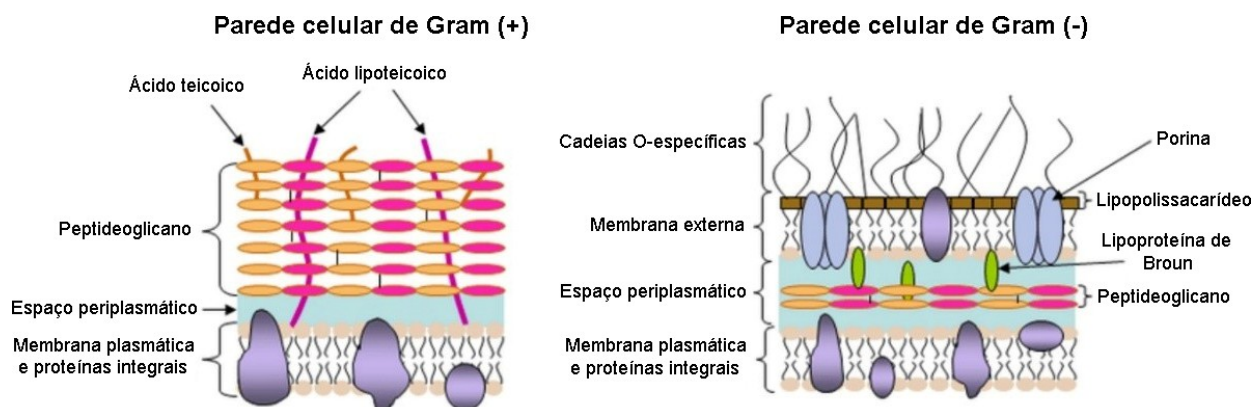


Figura 2. Representação esquemática das membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (Figura adaptada de <https://microbiologynote.com/difference-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>).

Infecções causadas por bactérias têm representado um problema para a humanidade desde seu início, mas desenvolvemos ferramentas capazes de lidar com elas: os antibióticos. Contudo, as bactérias vem exibindo resistência aos antibióticos comercialmente disponíveis, como resultado do uso indevido dos agentes antimicrobianos levando à seleção de bactérias resistentes^{[22][8]}, onde a pressão de seleção no microbioma ambiental termina favorecendo a disseminação de formas resistentes dos microrganismos^{[23][24]}.

Foram descritos na literatura diversos PAMs com um grande espectro antibacteriano ou com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) comparáveis a medicamentos no mercado. Além disso, já existem alguns PAMs com uso clínico, sendo alguns exemplos são: Bacitracin, Boceprevir, Dalbavancin, Daptomycin, Enfuvirtide, Oritavancin, Teicoplanin, Telaprevir, Telavancin e Vancomycin^[25].

1.4. FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos, variando entre indivíduos pluricelulares e unicelulares. Diferentemente das plantas, os fungos são heterotróficos, alimentando-se de carcaças de animais ou até mesmo de plantas mortas. Sua estrutura celular é composta por uma parede celular grossa responsável pela sua defesa e interação com o meio extracelular. A parede celular fúngica protege contra danos à célula além de prevenir o desequilíbrio osmótico. A parede celular deles é composta por uma camada interior e uma exterior. A exterior apresenta uma camada de glicoproteínas onde polímeros de manose associados com proteínas e a camada interna auxilia na estabilidade e proteção celular por se apresentar como uma estrutura esquelética de polissacarídeos, quitina e β -1,3-glucano que mantém a estrutura da célula^{[26][27][28]}.

A maioria dos PAMs com propriedades antifúngicas interagem diretamente com parede celular ou com compostos intracelulares^{[14][29]}. Diversos mecanismos foram propostos, entre eles a quebra da estrutura da membrana celular^{[30][31][32]}, promoção de danos à parede celular^[30], interação com mitocôndrias^[33] e a despolarização do citoesqueleto^[34].

Alguns PAMs são capazes de se ligarem à quitina presente na parede celular dos fungos, por exemplo, a histatina 5^[35]. Já a iturina A se mostrou eficaz contra fungos filamentosos, como *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*^{[36][37]}.

O interesse da comunidade científica em relação às doenças fúngicas é menor que para outros tipos de infecções que causam mortalidade semelhante. A resistência aos medicamentos é um problema ainda maior se tratando de fungos, pois atualmente temos apenas três classes de antifúngicos disponíveis, sendo que quando um fungo não responde a uma delas a chance de responder às outras é baixa e isso limita muito as opções de tratamento^{[38][39]}. *Aspergillus fumigatus* e *Candida glabrata*, por exemplo, são resistentes aos tratamentos disponíveis e, mais recentemente, *Candida auris* que não só demonstrou resistência aos tratamentos hospitalares, como demonstrou resistência à esterilização usada em aparelhos e equipamentos hospitalares aumentando sua taxa de disseminação e transmissão^[40]. Além disso, alguns medicamentos antifúngicos causam efeitos colaterais graves e se mostram potencialmente tóxicos^[41].

A resistência microbiana contra PAMs foi relatada^{[42][43]}, no entanto, peptídeos sintéticos podem superar a resistência, a partir de modificações pontuais é possível aumentar a atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos e diminuir os possíveis efeitos adversos^[44].

1.5. VÍRUS

Os vírus são causadores de doenças infecciosas e foram descobertos no final do século XIX. Sua patogenicidade e capacidade de sofrer rápidas mutações evolutivas desencadearam um grande volume de pesquisas. O interesse pela distribuição dos vírus se expandiu na última década e agora os virologistas reconhecem o papel dos vírus na regulação do hospedeiro e na manutenção dos ecossistemas naturais^[45].

O surgimento e a rápida disseminação do coronavírus SARS-CoV-2, que promove o quadro clínico da síndrome respiratória aguda grave (SARS), causou um grande impacto na saúde e economia global. Até o momento, o SARS-CoV-2 infectou mais de 600 milhões

de pessoas e causou mais de 6 milhões de mortes (ourworldindata.org/coronavirus). Muitos pacientes com SARS-CoV-2 sofrem de doença prolongada. O SARS-CoV-2 evita a vigilância imunológica humana de forma mais eficaz do que o SARS-CoV. Quando os vírus evoluem para escapar da vigilância imunológica, eles geralmente se tornam menos infecciosos, no entanto, SARS-CoV-2 permanece altamente infeccioso e essa combinação levou a sua ampla disseminação^[46]

A comunidade científica enfrenta novos desafios com relação à vigilância, tratamento e prevenção de viroses emergentes. Embora as propriedades antibacterianas dos peptídeos sejam as mais estudadas, suas propriedades anti-virais já foram observadas e merecem ser exploradas. O mecanismo de ação de peptídeos que exibem atividade antiviral é pouco compreendido, com relatos de que alguns peptídeos podem atuar como agentes virucidas ou como inibidores da multiplicação do vírus^[47].

1.6. NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são células do sistema imune responsáveis pela primeira linha de defesa. Sua atividade pode ser deletéria, muitas vezes resultando em dano ao tecido hospedeiro quando não controlada^[48]. Vários elementos do neutrófilo são expressos por outras células, no entanto, sua capacidade de adentrar tecidos, abundância e mecanismos de ação, que formam a base de todas as funções efetoras de neutrófilos estudadas até o momento^[49]. Os neutrófilos adultos maduros não se dividem, contêm núcleos lobulados, têm vida curta de 12 a 24 horas e são constantemente repostos pela medula óssea^[50].

Durante um processo infeccioso, por exemplo, neutrófilos migram por quimiotaxia para o local da injúria ou infecção e quando atingem o tecido-alvo empregam uma série de estratégias para a neutralização dos patógenos invasores, incluindo a secreção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a produção e liberação de armadilhas extracelulares

constituídas por DNA eucromático, histonas e grânulos de proteínas citoplasmáticas e o estímulo à atividade fagocítica, todas funções neutrofílicas voltadas ao combate e eliminação de microorganismos invasores^{[51][52][53][54]}.

Os neutrófilos são responsáveis pelo reconhecimento e subsequente morte de patógenos invasores. Eles podem atacar patógenos de diversas formas como mieloperoxidase (MPO), ROS, citocinas, fagocitose, formação de NETs, degradação e produção de exossomos^[49]. Embora seus mecanismos sejam pouco conhecidos, alguns peptídeos podem estimular a atividade de neutrófilos a partir do recrutamento de células apresentadoras de antígeno para o local da infecção, direta ou indiretamente, pela indução de quimiocinas para aumentar os efeitos antimicrobianos, facilitando a ativação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, alterando vias de sinalização mediadas por endotoxinas, supressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a fagocitose e respostas pró-inflamatórias aos ácidos nucleicos^[11].

1.7. CÂNCER

O câncer é caracterizado pela divisão descontrolada das células e pela capacidade dessas células de invadir outros tecidos, podendo levar à formação de massa tumoral, vascularização e metástase^[55]. Essa doença é um grande problema de saúde pública em todo o mundo, representando uma das maiores causas de mortalidade e seus índices vêm aumentando com o passar dos anos^[56]. A quimioterapia, um dos principais tratamentos para o câncer, se baseia em aplicar um agente citotóxico às células cancerígenas, mas existem dificuldades em se entregar a quantidade correta de droga ao tumor sem afetar o restante do organismo^[56].

A pandemia da doença de SARS-CoV-2 (COVID-19) causou atrasos no diagnóstico e tratamento do câncer devido ao fechamento de estabelecimentos de saúde, interrupções

no emprego e seguro de saúde e medo da exposição ao vírus e, até hoje, a prestação de cuidados de saúde não se recuperou totalmente. Esses atrasos no diagnóstico e tratamento podem levar a um aumento na presença de câncer em estágio avançado e na sua mortalidade^[57].

Peptídeos oferecem uma abordagem multifuncional, além de serem biologicamente ativos e influenciarem em processos imunológicos, são excelentes no transporte de Princípio ativos para os alvos desejados. Seu uso na terapêutica direcionada demonstra um futuro promissor^[58].

1.8. ANFÍBIOS

Os anfíbios são vertebrados de quatro membros e ectotérmicos da classe Amphibia, sendo divididos em três ordens: Urodela ou Caudata (salamandras), Gymnophiona (cecílias ou cobras cegas) e Anura (sapos, rãs e pererecas)^[59]. Os anfíbios têm uma vasta distribuição pelo planeta, com exceção das zonas extremas como na Antártida e mais ao norte na Groenlândia, sendo mais presentes em regiões neotropicais e ecozonas de clima tropicais e de floresta até os desertos^[59].

Os anfíbios se caracterizam por apresentarem uma fase aquática e outra terrestre em seu ciclo de vida. Em sua fase aquática, possuem brânquias e na terrestre sua respiração é cutânea^[60].

A pele dos anfíbios não tem somente o papel de respiração, mas também é responsável pela primeira linha de defesa do organismo. O muco presente na pele desses animais tem moléculas bioativas responsáveis pela proteção contra microrganismos^[60]. Geralmente na secreção de anfíbios são encontrados glicoproteínas e peptídeos com propriedades antibacterianas, antioxidante, antitumoral potencializando os efeitos do sistema imunológico^[61].

As secreções da pele de muitos anuros contêm uma variedade de peptídeos bioativos que frequentemente exibem atividade contra microrganismos multirresistentes^[10]. Os PAMs da secreção de pele dos anuros em geral apresentam cerca de 8 a 46 resíduos de aminoácidos, com carga positiva e uma porção hidrofóbica. A expressão dos peptídeos antimicrobianos pode ser constitutiva ou induzida por estímulos infecciosos ou inflamatórios^[62].

Já foram isolados 1.196 peptídeos antimicrobianos de anfíbios demonstrando sua elevada importância como uma fonte natural de PAMs, uma vez que esse número representa cerca de 33.5% do total de peptídeos antimicrobianos já descritos (<https://aps.unmc.edu/>). PAMs já foram identificados em diversas famílias de anuros incluindo Leiopelmatidae, Alytidae, Bombinatoridae, Pipidae, Dicroglossidae, Hylidae, Hyperoliidae, Leptodactylidae, Myobatrachidae e em Ranidae^[10].

1.9. DESENHO RACIONAL E SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Os peptídeos vem ganhando grande notoriedade na medicina graças às suas propriedades terapêuticas relevantes na produção de novos medicamentos^[63].

Peptídeos antimicrobianos têm boas perspectivas de aplicação, porém, podem ser hemolíticos, sensíveis ao pH, apresentar atividade reduzida na presença de ferro e certos soros e serem hidrolisados por proteases^[64]. Tais problemas podem ser minimizados com o desenho racional de PAMs.

O desenho racional de peptídeos antibacterianos deve se concentrar no comprimento da cadeia, estrutura secundária, carga líquida, hidrofobicidade e anfifilicidade para alcançar baixa toxicidade para membranas de mamíferos, alta estabilidade, baixa capacidade de ligação do soro, facilidade de acesso e baixo custo de produção^[64].

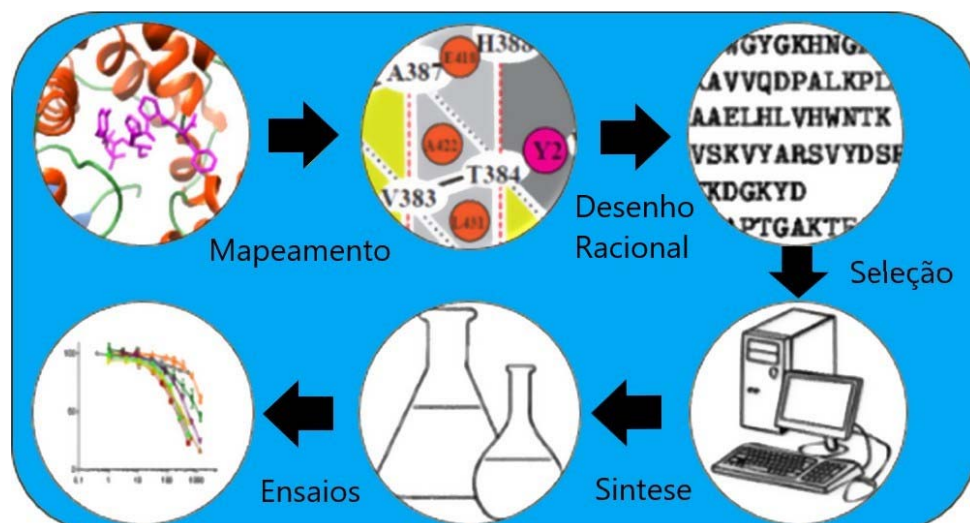


Figura 3. Representação esquemática do fluxo de trabalho voltado ao desenho racional de peptídeos (Figura adaptada de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.8b03421>).

O método de configuração envolve identificação de padrões de sequência, resíduos cruciais, posições e frequências de aminoácidos de PAMs conhecidos. Estas informações podem ser usadas para desenvolver novos PAMs. Também é possível fazer substituições/truncamentos no peptídeo com auxílio de algoritmos altamente sensíveis o que pode levar a desenhos de PAMs mais potentes com toxicidade reduzida [65].

Os estudos de relação estrutura-atividade (SAR) de PAMs podem ser usados para abordar maneiras de modificar sistematicamente moléculas de ocorrência natural ou peptídeos sintéticos projetados e determinar sua estrutura e suas atividades biológicas^[66].

Descritores, vetores computacionais que fornecem informações sobre parâmetros físico-químicos de aminoácidos, podem ser usados para adquirir informações sobre os peptídeos^[66]. A síntese de peptídeos pode ser feita tanto em solução quanto em fase sólida. Tal produção de peptídeos é feita por uma ligação de forma selecionada e direcionada com auxílio da proteção do aminoácido no seu N-Terminal^[67].

O método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) é o método mais comumente utilizado, devido à praticidade e rapidez. A SPFS se dá através da adição de

resíduos de aminoácidos sequencialmente, com cadeias de aminoácidos laterais protegidos usando um suporte de um aminoácido ou peptídeo ligado a um polímero insolúvel^[67].

O método de proteção utilizado é o de N- α -proteção utilizado no grupo de Boc sustentável a ácidos (Boc-SPFS) ou o grupo Fmoc (Fmoc-SPFS). No método de ativação do peptídeo é retirado o grupo protetor e adicionado e acoplado um reagente ou derivado de aminoácido protegido pré-ativado. Os grupos de aminoácidos laterais tendem a ser clivados no momento do desprendimento do peptídeo com a resina^[67].

1.10. OCELLATIN 4 E ANÁLOGOS

O PAM ocellatin 4, um peptídeo de 21 aminoácidos (GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI), foi isolado da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus latrans* e demonstrou, em estudos anteriores, uma baixa atividade antimicrobiana^[68], mas com potencial para ser empregada como *template* para a geração de novos PAMs. Nesse sentido, vários análogos do PAM ocellatin 4 foram produzidos e suas propriedades antimicrobianas e antivirais foram avaliadas, observando-se ganho de potência e de especificidade em alguns desses análogos^[65]. Nesse estudo, mereceu destaque o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20], que demonstrou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse terapêutico e efeito e seletividade contra o vírus da dengue^[69].

Ocellatin 4 possui carga de +1 devido a sua amidação na porção C-terminal e essa baixa carga positiva pode ter limitado sua atividade antimicrobiana. O análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20] é fortemente catiônico, cujo desenho visou eliminar as cargas negativas da estrutura primária da ocellatin 4 na forma de resíduos de aspartato (D) e pela substituição das glicinas (G), fracamente hidrofílica e com potencial desestabilizador de

hélices, por lisinas (K), as quais são positivamente carregadas, fortemente hidrofílicas e propiciadoras de hélices^[69].

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil apresenta uma grande variedade de animais em sua fauna e se destaca por possuir a mais diversa anurofauna do mundo. A secreção cutânea dos anuros é rica em proteínas e peptídeos com propriedades antimicrobianas com potenciais empregos terapêuticos em humanos, em especial no combate aos organismos multirresistentes, cuja presença vem crescendo nos últimos anos devido ao uso indiscriminado de antibióticos. Isso tem limitado os tratamentos disponíveis, o que representa uma grave ameaça à saúde pública mundial^[70]. Estima-se que até 2050 o número de mortes por infecções resistentes a antimicrobianos ultrapasse as mortes por câncer^[71].

O isolamento de vários peptídeos antimicrobianos presentes na secreção cutânea de anuros associado ao desenho racional de análogos por meio do qual é possível maximizar seus efeitos antimicrobianos e diminuir eventuais efeitos colaterais abriu um leque de opções terapêuticas para o tratamentos de infecções causadas por bactérias e fungos multirresistentes. Isso junto com sua capacidade de associação a outras tecnologias possibilitando melhoria da permeação, estabilidade e farmacocinética, têm destacado o potencial clínico de PAMs^[11].

O presente projeto insere-se dentro desse cenário, onde pretendeu-se explorar o potencial terapêutico do peptídeo K[1,4,8,15];A[12,16,20], análogo do PAM ocellatin 4, por meio da proposição de nove novos análogos peptídicos, cujas propriedades antimicrobianas e antitumorais foram avaliadas.

3. OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve como objetivo geral produzir análogos de segunda geração do peptídeo ocellatin 4, usando como *template* o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20], e avaliar seus efeitos sobre agentes infecciosos (bactérias, fungos e o vírus SARS-CoV-2) e sobre células de melanoma murino, eritrócitos e neutrófilos humanos.

4. METAS ESTABELECIDAS

- I. Propor e produzir por síntese química em fase sólida nove análogos do peptídeo K[1,4,8,15];A[12,16,20];
- II. Determinar as propriedades antimicrobianas dos análogos sobre bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas;
- III. Determinar as propriedades antifúngicas dos análogos sobre fungos patogênicos;
- IV. Avaliar os efeitos antiproliferativos dos análogos sobre a linhagem de melanoma murino B16F10;
- V. Avaliar os efeitos hemolíticos dos análogos sobre eritrócitos humanos;
- VI. Avaliar possíveis efeitos dos análogos sobre o vírus SARS-CoV-2;
- VII. Avaliar possíveis efeitos dos análogos sobre a migração de neutrófilos humanos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. DESENHO DOS ANÁLOGOS E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

A estrutura primária do peptídeo K[1,4,8,15];A[12,16,20] foi analisada por meio de métodos computacionais com vistas a se produzir modificações nas faces polares e apolares da molécula visando à obtenção de análogos cujas atividades biológicas sejam

otimizadas^{[72][73][74]}. Os análogos propostos foram produzidos (em quantidades suficientes para realização dos estudos de avaliação de atividade biológica) por síntese em fase sólida com estratégia química Fmoc, empregando-se síntese manual ou automática, os quais foram purificados por RP-HPLC e analisados por espectrometria de massas de modo a confirmar a correção na síntese dos peptídeos produzidos. A síntese foi realizada pela empresa especializada GenOne (<https://www.genone.com.br/#main-slider-wrap>) mediante contrato de confidencialidade.

5.2. ANÁLISES COMPUTACIONAIS

O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado com o emprego do programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). As projeções em roda helicoidal foram obtidas com uso do software NetWheels (<https://neutrophil-proteome.shinyapps.io/netwheels/>). As propriedades físico-químicas dos análogos foram obtidas com o emprego das ferramentas Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor (<https://aps.unmc.edu/prediction>) e ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

5.3. QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos foram quantificados por espectrofotometria no ultravioleta em espectrofotômetro Bel Photonics UV/Vis M51. A leitura das absorbâncias foi realizada nos comprimentos de onda 205 nm, 215 nm e 225 nm, seguindo protocolo proposto por AITKEN e LEARMONTH (2002)^[75] e pela EXPERIMENTAL BIOSCIENCE (Quantifying protein using absorbance at 205 nm - <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs205.html>) em relação aos métodos de dosagem de proteínas. O cálculo que permitiu obter a concentração protéica em µg/mL a partir das medidas de absorbância está descrito abaixo:

$$\text{Concentração}_1 = \frac{\text{Abs}_{(205\text{nm})} \times 1000}{31} \qquad \text{Concentração}_2 = 144 \times [\text{Abs}_{(215\text{nm})} - \text{Abs}_{(225\text{nm})}]$$

$$\frac{\text{Concentração}_1 + \text{Concentração}_2}{2} = \text{Concentração da alíquota analisada}$$

Os peptídeos foram aliquotados, secos em concentrador à vácuo (SpeedVac Modelo SC 100, Savant) e armazenados a -20 °C até o momento de sua utilização.

5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Inóculos de cinco microrganismos, sendo duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228), duas Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) e um fungo (*Candida albicans* ATCC 14053), foram preparados em dois meios: Mueller-Hinton Líquido para as bactérias e BHI para os fungos; ambos cultivados a 37 °C, *overnight*, e sob agitação constante em incubadora *shaker* de bancada (Cientec, CT-712). Em seguida, a densidade óptica dos meios de cultivo foi ajustada para valores entre 0,08 e 0,1 a 625 nm em espectrofotômetro (Bel Photonics UV/Vis M51). Os microrganismos, em fase logarítmica de crescimento, foram diluídos em seus respectivos meios de crescimento nas proporções de 1:200 para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e 1:2000 para o fungo. Amostras peptídicas foram esterilizadas em filtro Millex GV 0,22; a partir do material filtrado de cada amostra foram preparadas diluições seriadas em placa de microtitulação estéril (96 poços, fundo chato), resultando em um volume de 50 µL de amostra por poço. Os peptídeos foram então incubados com 50 µL de suspensão bacteriana/fúngica, com concentrações finais de amostra de 128 µM a 1 µM, seguida de incubação em estufa por 24 horas a 37 °C.

Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído na concentração final de 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados também com 50 µL das suspensões microbianas. O crescimento foi determinado pela leitura da densidade óptica a 620 nm em uma leitora de placas (Multiskan[®]FC, Thermo Scientific, EUA). A concentração inibitória mínima (CIM) para cada peptídeo foi assumida como sendo a menor concentração onde não houve crescimento

detectável espectrofotometricamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10

Células tumorais de melanoma murino da linhagem B16F10 foram rapidamente descongeladas por homogeneização com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) completo, preparado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de antibiótico. A solução resultante foi centrifugada, por 5 minutos a 2000 rpm, a fim de se eliminar o DMSO, presente no sobrenadante, que foi descartado em seguida.

O sedimento de células obtido foi ressuspensionado em meio e transferido para garrafas de cultura de células. As células foram incubadas em estufa (incubadora de CO₂ TE-399, Tecnal) em condições padrão, a 37°C e com saturação de CO₂ de 5%. Trocas de meio e passagens foram realizadas sempre que necessário.

Ao atingir o estágio de confluência, as células foram removidas das garrafas de cultura por tripsinização, sendo centrifugadas em seguida. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Para a determinação do número de células, 10 µL da suspensão obtida foram adicionadas a 90 µL de solução de azul tripan. Uma alíquota de 10 µL dessa mistura foi depositada em uma câmara de Neubauer, onde células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio óptico. O número de células por mL foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados (=4)}}$$

Sabendo-se que o número de células/poço necessário para ensaios com essa linhagem é de 7×10^3 células, calculou-se a correta proporção em que células e meio de cultura devem ser misturados. A suspensão celular resultante foi incubada *overnight* em estufa, almejando-se completa adesão celular no fundo da microplaca.

Amostras a 512 μM passaram por filtração estéril em filtro Millex GV 0,22. A partir desse material filtrado foram feitas as diluições seriadas em microplaca estéril. Depois disso, todos os poços receberam meio de cultura, resultando em concentrações de peptídeo de 128 μM a 1 μM e em controles compostos apenas por água Milli-Q e meio.

Todo o volume existente nos poços da microplaca de células preparadas no dia anterior foi retirado e substituído pelas diluições seriadas de peptídeo em meio e controles, situados em outra placa. Dessa forma, as células permanecem aderidas no fundo dos poços e foram incubadas com as amostras e controles em estufa por 24 horas.

Após ser completado o período de incubação, as placas tiveram novamente todo o volume de seus poços retirado e substituído, fileira por fileira, agora por uma solução de MTT 10% (p/v) preparado em meio de cultura. Um volume de 150 μL dessa solução foi colocado em cada poço e as placas retornaram à estufa por 1 hora e meia. Concluído esse intervalo, o conteúdo líquido das placas foi descartado e substituído por 100 μL de DMSO em cada poço, de modo que alguns minutos depois avaliou-se por espectrofotometria a 595 nm (Multiskan[®]FC, Thermo Scientific, EUA).

Os dados espectrofotométricos obtidos foram convertidos em percentuais de viabilidade celular por meio do software GraphPad Prism. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média.

5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O sangue humano O⁺ foi coletado de doador saudável mediante consentimento firmado em termo. As células foram separadas do plasma por meio de três lavagens sucessivas, realizadas com tampão 1x (Tris-HCL 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M) e centrifugações a 3.000 rpm por 2 minutos. Tanto a solubilização e diluição seriada das

amostras quanto o preparo da solução a 1% (v/v) de hemácias foram efetuadas com este tampão. Alíquotas de cada um dos peptídeos foram reconstituídas em tampão.

A partir dessa solução-estoque de peptídeos, foram realizadas diluições sucessivas em microplaca de fundo em "U". Em seguida, foram adicionados 100 µL da suspensão de hemácias a 1% (v/v) em cada poço, de modo que a faixa de concentrações peptídicas analisadas foi de 128 µM a 0,0625 µM. As amostras foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 3000 rpm por 2 min em centrífuga de placa. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada peptídeo foram transferidas para uma microplaca de 96 poços de fundo chato (TPP, Thermo Scientific, USA) e a leitura da absorbância foi realizada a 405 nm em leitora de microplacas (Multiskan®FC, Thermo Scientific, USA).

Para as amostras de referência, utilizou-se 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de solução 1% (v/v) Triton X-100 como controle positivo de lise e 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) com tampão salino como controle negativo de hemólise. O ensaio foi realizado em triplicata. A porcentagem de hemólise foi calculada a partir dos valores de absorbância e de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = 100 (\text{Abs}_{\text{peptídeo}} - \text{Abs}_{\text{Tris-salina}}) / (A_{\text{Triton}} - A_{\text{Tris-salina}})$$

5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SOBRE SARS-CoV-2

Os peptídeos foram dissolvidos em PBS 1X estéril, em uma concentração inicial de 120 µM. Antes de realizar o tratamento das células, os peptídeos foram diluídos em série (1:1) em PBS 1X, em uma placa de 384 poços. Como composto referência foi utilizado 6-Azauridina a 300 µM em DMSO 3%. Em seguida, 10 µL de cada poço foram transferidos para as placas de ensaio, visando um fator de diluição final de 6x na placa. Os peptídeos foram testados em concentração-resposta, sendo 20 µM a primeira concentração testada. Em uma placa preta de 384 poços, foram plaqueadas 3000 células Huh-7 por poço, em

meio DMEM F12 (com 10% de soro bovino fetal e 100 unidades/ mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24h, as células receberam os compostos e em seguida o vírus foi adicionado em um MOI de 0,05. Após 48h, as placas foram fixadas, e marcadas por imunofluorescência para adquirir as imagens foram adquiridas e analisadas no equipamento *High Content Screening Operetta*. Os parâmetros medidos em cada um dos poços foram: número total de células e número total de células infectadas. A partir dos controles infectados e não infectados, a atividade antiviral de cada um dos compostos em cada concentração foi normalizada aos controles, assim como a taxa de sobrevivência celular.

5.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

A avaliação da capacidade de migração de neutrófilos humanos foi feita em RTCA (do inglês, *Real Time Cell Analyzer*) como descrito por Cano e Vargas^[75]. A montagem das placas CIM (CIM-Plate 16; ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA) foi feita para permitir avaliar duas quimioatrações distintas: na placa 1, células ativadas por peptídeos migram em direção ao fMLP; enquanto que na placa 2, células em tampão migram em direção aos peptídeos. Na câmara superior das duas placas foram adicionados 25 µL de tampão HBSS em todos os poços. Na câmara inferior da placa 1, os poços receberam 160 µL de fMLP 100 nM para atuar como quimioatraente/controlado positivo e 160 µL de tampão HBSS para controle negativo em um dos poços. Já na câmara inferior da placa 2, foram adicionados em cada poço 160 µL dos peptídeos em tampão a 16 µM. Ambas as placas foram então incubadas a temperatura ambiente por, pelo menos, 60 minutos, antes dos neutrófilos serem adicionados, para formação do gradiente quimiotático entre as câmaras. Após esse período, para a placa 1 preparou-se a suspensão de neutrófilos em HBSS dividida entre os 4 tratamentos peptídicos (16 µM na concentração final) e separou-se células em tampão,

para serem usadas nos controles positivo e negativo. Para a placa 2, apenas células em tampão foram reservadas. Uma alíquota de 60 µL de cada um desses sistemas foi então imediatamente adicionada aos poços superiores de cada placa. A análise foi programada para medição do índice celular a cada 60 segundos, durante um período de 3 horas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os PAMs de anuros são moléculas extremamente versáteis que não se ligam a alvos específicos como fármacos convencionais, dificultando assim a seleção de mecanismos de resistência^[76]. Com o auxílio do desenho racional podem ser feitas modificações buscando melhorar a atividade de PAMs e reduzir sua toxicidade, tornando o campo de pesquisa voltado ao desenho racional de análogos de peptídeos uma área promissora^[64].

No presente estudo, foram produzidos e caracterizados dez peptídeos antimicrobianos análogos da ocellatin 4: K[1,4,8,15];A[12,16,20] e seus nove análogos.

Os análogos propostos foram postulados com modificações estruturais buscando aumentar seu efeito antimicrobiano e diminuir sua capacidade hemolítica. Por motivos de proteção intelectual, os análogos serão apresentados a seguir como Análogo 1 a Análogo 10, ou apenas pelos números, sendo que Análogo 1 corresponde ao peptídeo K[1,4,8,15];A[12,16,20] usado como template, e os demais, Análogo 2 a Análogo 10, seus análogos.

O análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20] e seus derivados tiveram seus efeitos antimicrobianos avaliados. Na tabela 1 estão indicados os valores de CIMs (em µM) para os análogos testados.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana (CIM, μM) dos análogos da ocellatin 4 sobre microrganismos patogênicos.

Análogos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Eschechia coli</i> ATCC 25922	16	128	2	128	16	32	32	16	8	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	4	32	2	32	4	4	8	4	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32	128	4	>128	16	16	16	16	32	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	8	32	2	32	4	4	8	8	4	4
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128

A análise dos resultados dos ensaios antimicrobianos permite inferir que os análogos 3, 9 e 10 exibiram uma maior atividade antimicrobiana enquanto os análogos 2 e 4 demonstraram piora. Infelizmente, assim como no caso do peptídeo *template*, seus derivados não demonstraram atividade contra o fungo testado *C. albicans*.

Os resultados dos ensaios contra bactérias patogênicas se mostram promissores quando comparados com outras pesquisas na área, onde temos estudos mostrando atividade antibacteriana por volta de $8 \mu\text{M}$ ^[77] e $2 \mu\text{M}$ ^{[78][79]}. Cabe destacar o comportamento do análogo 3 que exibiu melhora na sua atividade sobre todas as bactérias avaliadas em comparação com o peptídeo *template*. Os análogos 5, 8, 9 e 10 também demonstraram leves melhorias em comparação ao peptídeo *template*.

A tabela 2 exhibe os resultados obtidos na avaliação dos efeitos antiproliferativos sobre células de melanoma murino B16F10 dos peptídeos testados. Pode-se observar ganho de potência no caso dos análogos 2, 3 e 4, sendo que o análogo 9 exibiu atividade semelhante ao peptídeo *template* e, no caso dos análogos 5, 6, 7, 8 e 10, houve perda na capacidade antiproliferativa sobre as células B16F10.

Tabela 2. Atividade antiproliferativa (IC₅₀, µM) dos análogos da ocellatin 4 sobre células de melanoma murino B16F10.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B16F10	10,12	1,94	7,1	1,44	87,6	33,45	>128	58,43	9,23	37,79

Um dos principais entraves ao uso clínico de peptídeos antimicrobianos reside em seus efeitos tóxicos sobre as células do hospedeiro^[80] e um dos ensaios mais simples e amplamente utilizados envolve a análise direta dos efeitos citolíticos de PAMs sobre eritrócitos por meio do monitoramento espectrofotométrico da liberação de hemoglobina^[81].

A tabela 3 exibe os resultados obtidos na avaliação de hemólise sobre eritrócitos humanos dos peptídeos testados. Os gráficos apresentados na figura 4 apresentam o comportamento entre dose e atividade hemolítica de cada um dos análogos testados. Um dos objetivos originais para a produção de análogos da ocellatin 4 envolvia a redução da sua atividade hemolítica. Observa-se que os análogos 3, 4, 5, e 9 alcançaram uma melhora em relação ao análogo *template*. Os análogos 3, 4 e 5 também apresentaram melhora significativa em relação à ocellatin 4 que apresentou um valor de HC₅₀ igual a 14,3 µM^[68].

Tabela 3. Atividade hemolítica (HC₅₀, µM) dos análogos de ocellatin 4 sobre eritrócitos humanos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hemólise	4,97	5,67	>128	23,65	>128	3,51	2,18	1,63	6,94	3,98

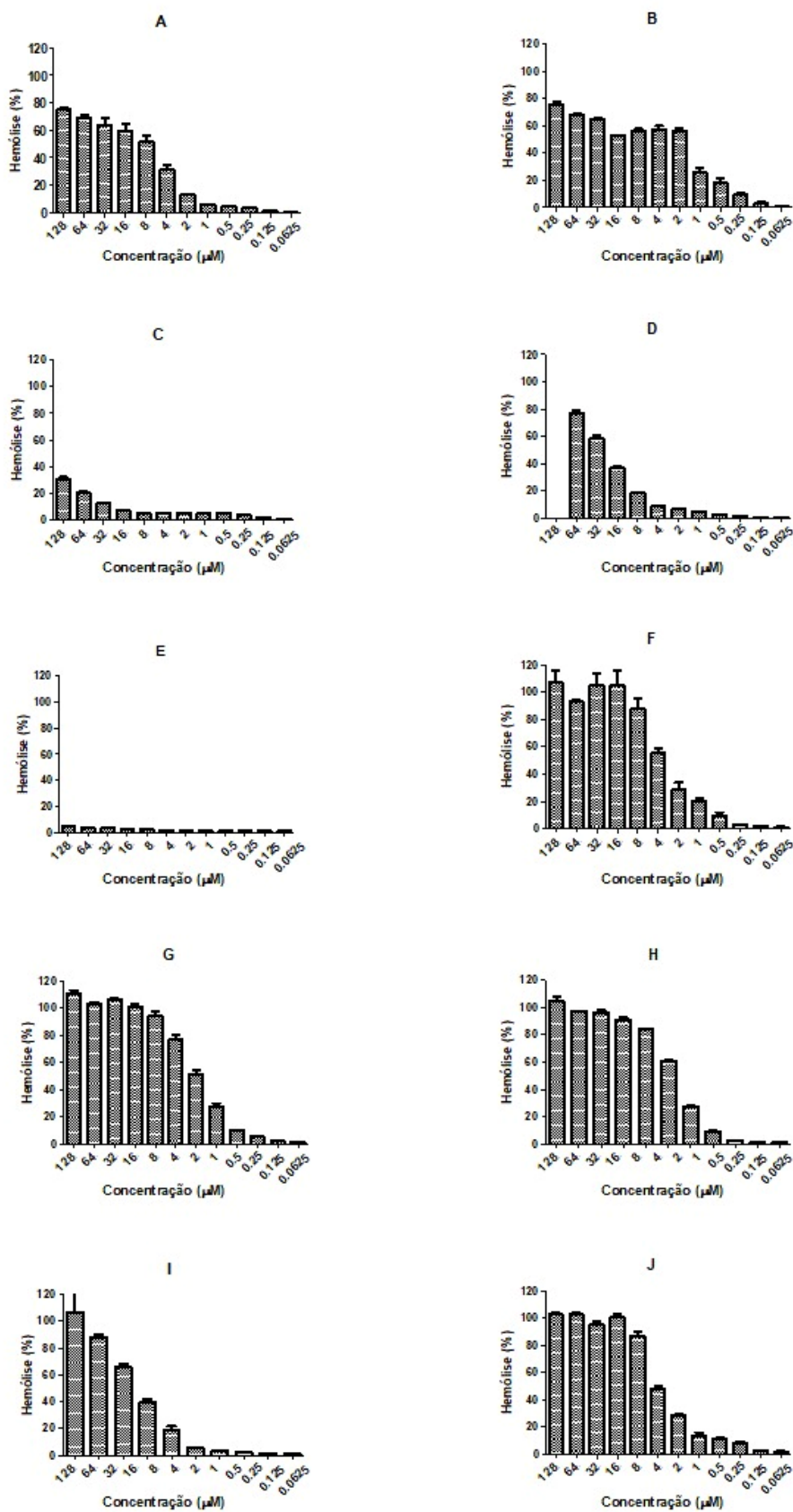
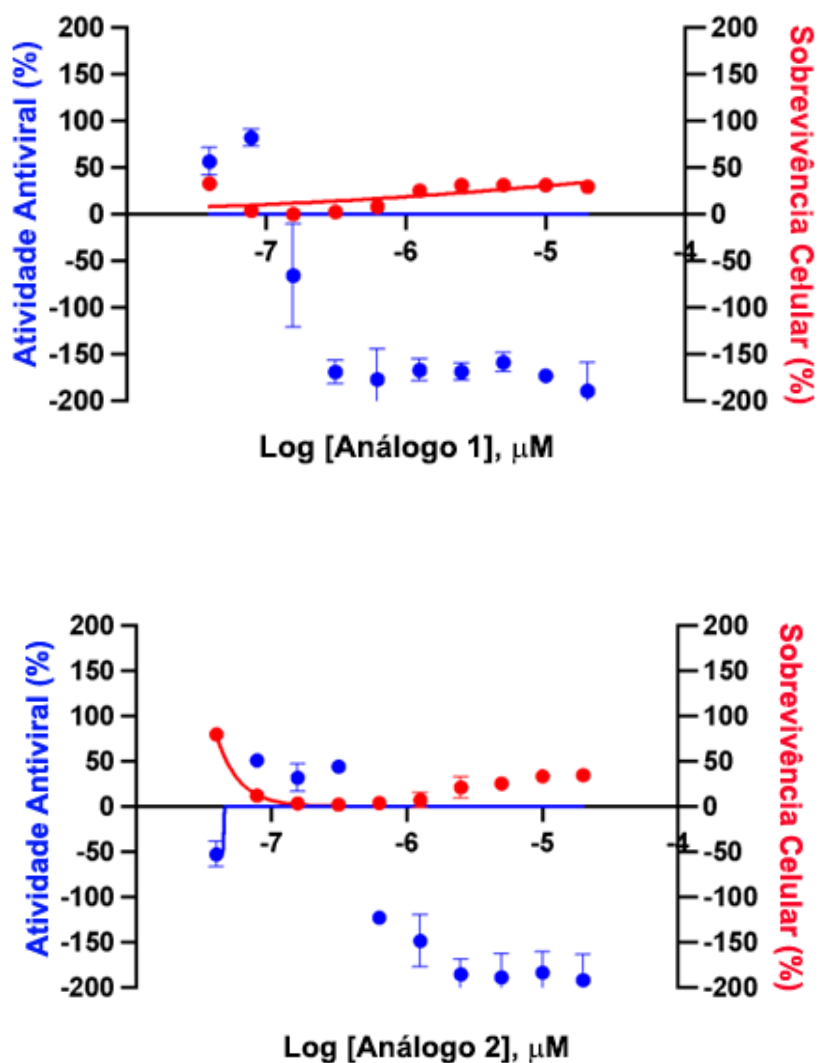
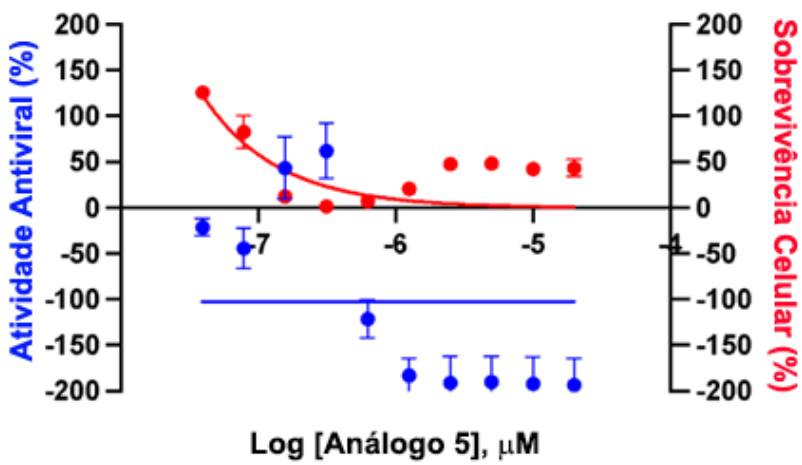
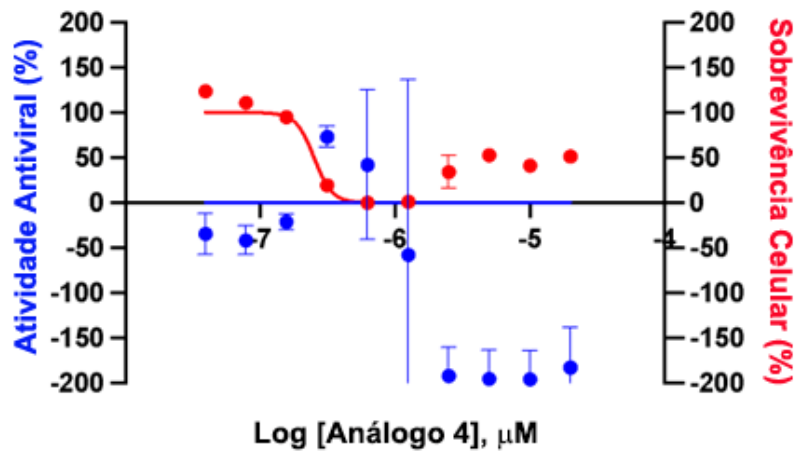
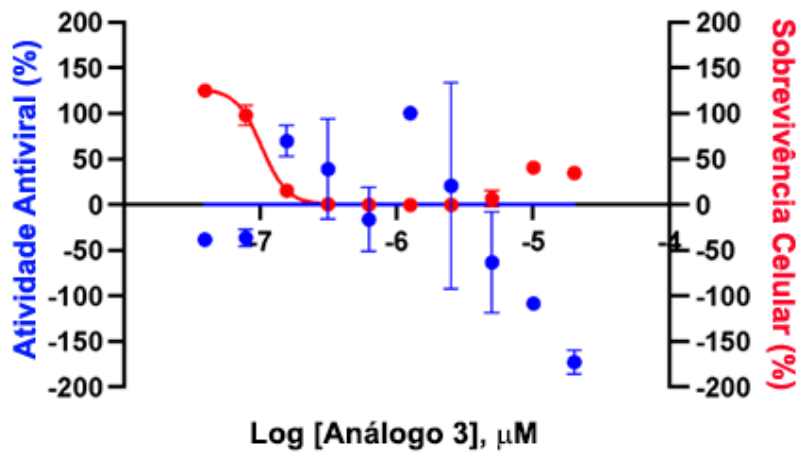


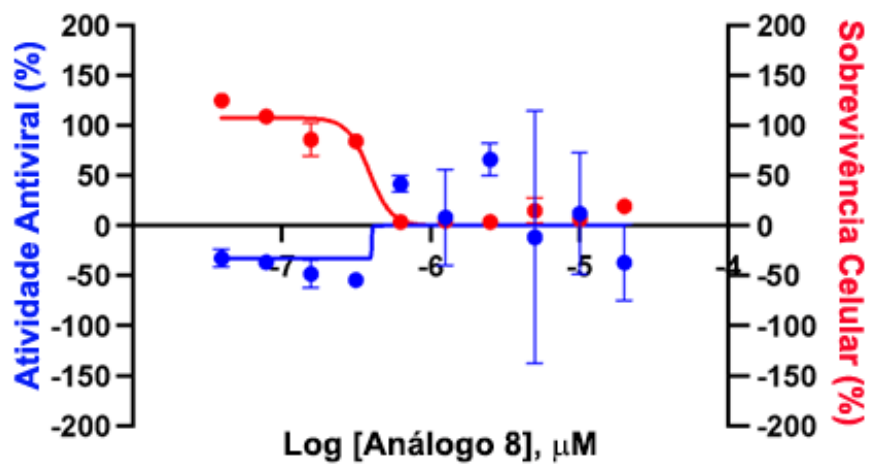
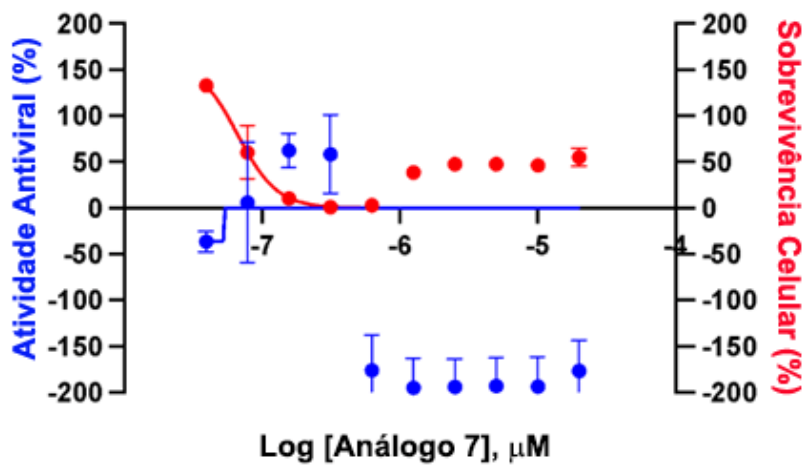
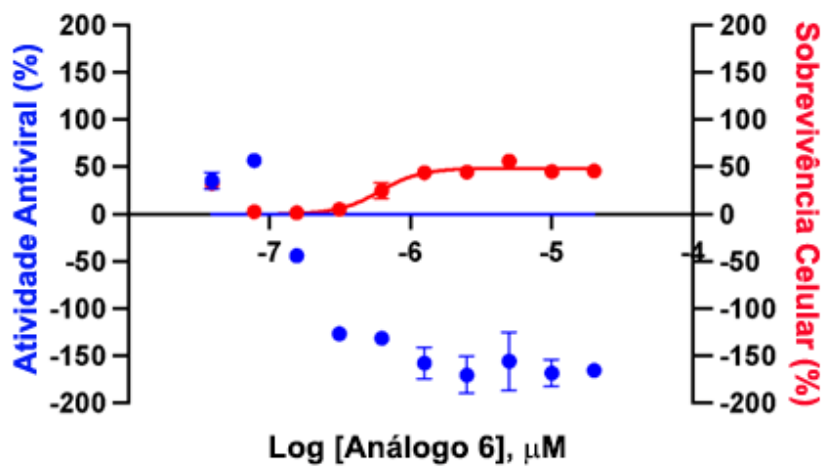
Figura 4. Atividade hemolítica (%) dos análogos da ocellatin 4. A) Análogo 1; B) Análogo 2; C) Análogo 3; D) Análogo 4; E) Análogo 5; F) Análogo 6; G) Análogo 7; H) Análogo 8; I) Análogo 9 e J) Análogo 10.

Diante das dificuldades enfrentadas em nível global com as ameaças representadas pela disseminação do vírus SARS-CoV-2 nos últimos anos, decidimos testar os análogos propostos sobre esse novo coronavírus, tendo em vista o fato de que o peptídeo usado como *template*, o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20] exibiu atividade antiviral sobre o vírus da dengue sorotipo 4^[69]. Além disso, existe um crescente interesse em se empregar peptídeos antimicrobianos como agentes antivirais^[2].

Infelizmente todos os peptídeos testados se mostraram tóxicos sobre as células hospedeiras empregadas (células imortalizadas derivadas de hepatoma humano Huh-7) levando a um resultado inconclusivo de seus testes antivirais que estão representados na figura 4.







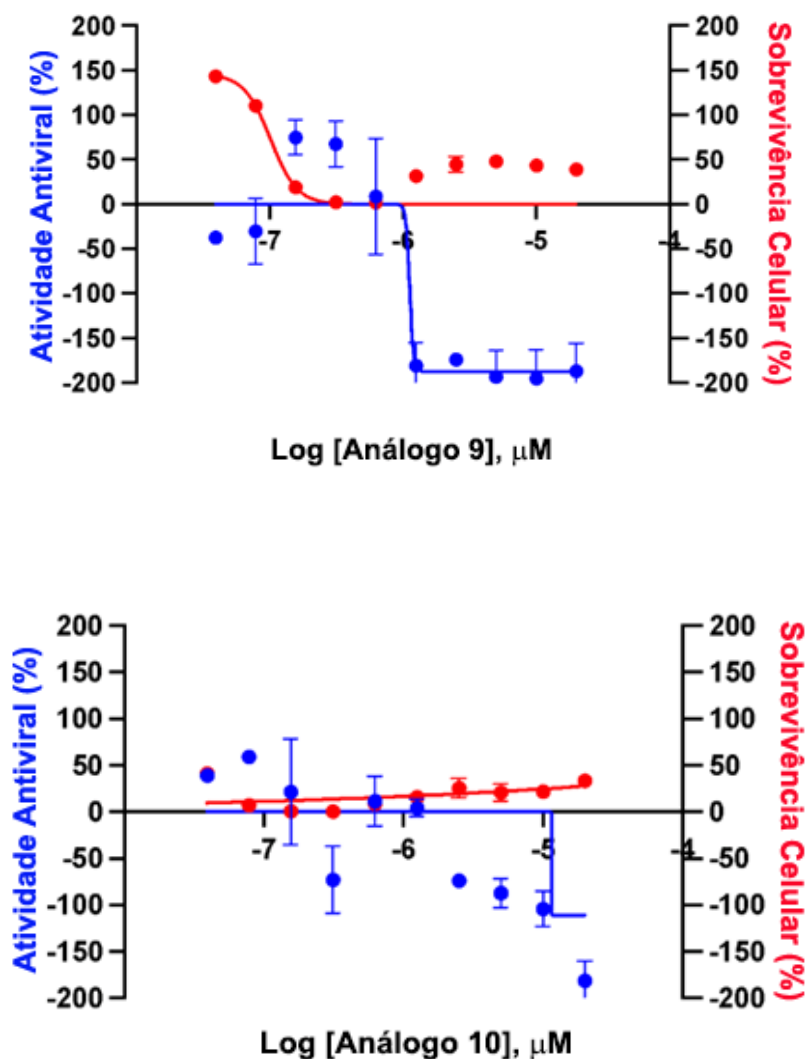
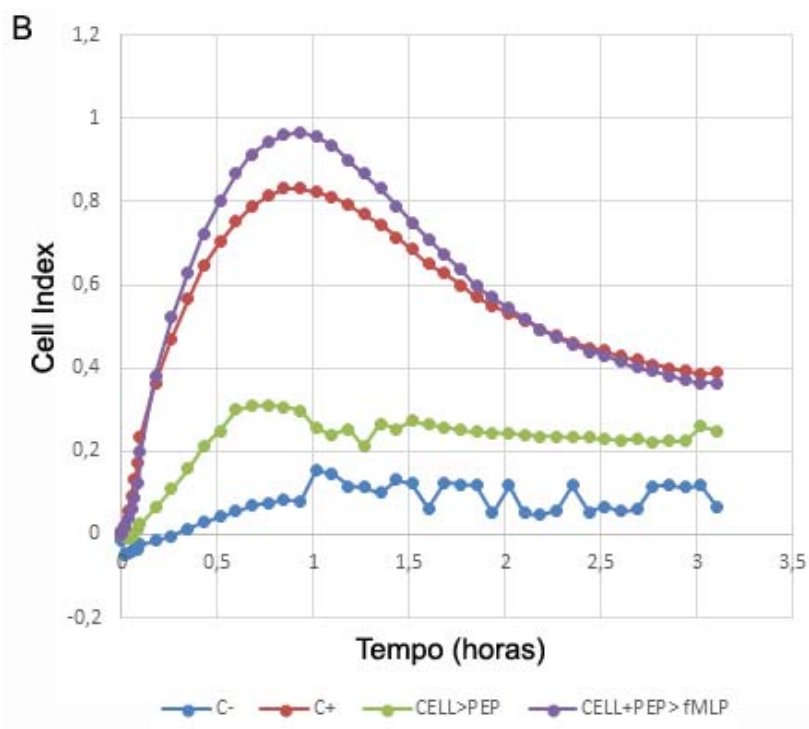
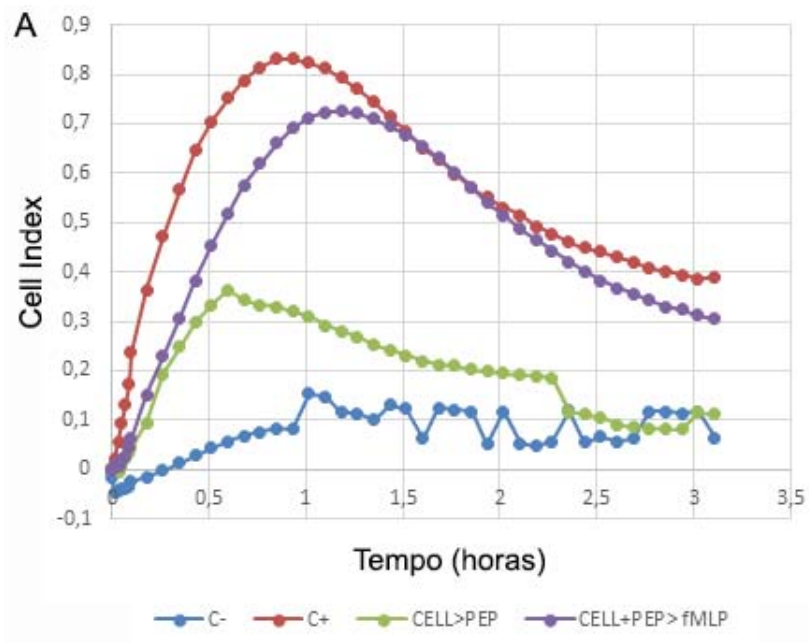


Figura 5. Atividade antiviral (%) sobre SARS-CoV-2 dos análogos da ocellatin 4.

Finalmente, foram avaliados os efeitos dos análogos sobre a imunidade inata celular por meio da avaliação dos seus efeitos sobre a migração de neutrófilos humanos. Por limitação de material, os ensaios de migração de neutrófilos foram realizados apenas com os análogos Análogo 1, Análogo 3 e Análogo 10. Esses três peptídeos exibiram capacidade quimioatrativa para os neutrófilos, mas em níveis inferiores aos promovidos pelo FMLP, um composto reconhecidamente quimioatraente de neutrófilos (Figura 6). Os peptídeos testados também foram capazes de interferir com a taxa de migração dos neutrófilos na direção do FMLP quando incubados juntamente com as células (Figura 6). Tais resultados

são promissores e outros ensaios visando avaliar outras funções dos neutrófilos devem ser realizados de modo a avaliar o potencial dos análogos aqui testados na imunidade inata celular.



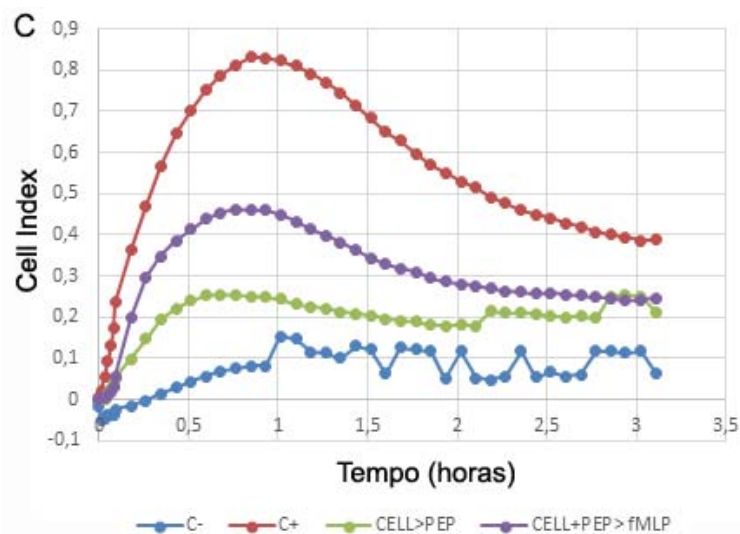


Figura 6. Avaliação da capacidade migratória de neutrófilos em tempo real por RTCA. Condições experimentais: controle negativo (C-, tampão HBSS); controle positivo (C+, fMLP); célula ativada pelo análogo em direção ao fMLP (CELL+PEP>fMLP); célula em direção ao análogo (CELL>PEP). A) Análogo 1, B) Análogo 3 e C) Análogo 10.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho envolveu a caracterização biológica de 9 peptídeos antimicrobianos análogos de segunda geração do PAM ocellatin 4 tendo como base o análogo K[1,4,8,15];A[12,16,20], previamente proposto para esse PAM. Os nossos resultados ressaltam a importância de se expandir os estudos acerca do potencial farmacológico dos peptídeos de anuros e a importância e potencial terapêutico de análogos propostos por desenho racional de modo a otimizar as propriedades biológicas desses peptídeos.

No presente estudo foi possível detectar que um dos análogos produzidos, o Análogo 3, exibiu melhora em vários dos parâmetros avaliados, com ganhos relevantes em termos de atividade antibacteriana, anticâncer e sobre a capacidade de migração de neutrófilos. Assim, podemos destacar a importância do desenho racional de análogos de peptídeos antimicrobianos como uma via para a otimização de suas propriedades biológicas.

8. PERSPECTIVAS

A partir dos achados do presente estudo espera-se:

- Avançar na caracterização das propriedades antimicrobianas desses análogos, principalmente do Análogo 3, por meio da realização de ensaios complementares de inibição avaliando seus efeitos sobre bactérias multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA);
- Analisar os efeitos dos análogos propostos sobre a morfologia de bactérias empregando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM);
- Avaliar eventuais efeitos sinérgicos com drogas antibióticas comercialmente disponíveis;
- Avaliar seu potencial antiparasitário sobre protozoários de interesse médico e veterinário, como *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
- Avaliar seus efeitos sobre arbovírus como os da Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela;
- Avaliar seus efeitos antiproliferativos e citotóxicos sobre diferentes linhagens de células tumorais;
- Fazer análises subsequentes das interações dos peptídeos com neutrófilos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Rima, M.; Rima, M.; Fajloun, Z.; Sabatier, J.-M.; Bechinger, B.; Naas, T. Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. *Antibiotics*, 2021, 10, 1095. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091095>.

[2] de Amaral, M.; Ienes-Lima, J. Anurans against SARS-CoV-2: A Review of the Potential Antiviral Action of Anurans Cutaneous Peptides. *Virus Research*, 2022, 315, 198769. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198769>

[3] Zhang, Q.-Y.; Yan, Z.-B.; Meng, Y.-M.; Hong, X.-Y.; Shao, G.; Ma, J.-J.; Cheng, X.-R.; Liu, J.; Kang, J.; Fu, C.-Y. Antimicrobial Peptides: Mechanism of Action, Activity and Clinical Potential. *Military Medical Research*, 2021, 8. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>.

[4] Zhang, C.; Yang, M.; Ericsson, A. C. Antimicrobial Peptides: Potential Application in Liver Cancer. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01257>.

[5] Pantic, J.; Jovanovic, I.; Radosavljevic, G.; Arsenijevic, N.; Conlon, J.; Lukic, M. The Potential of Frog Skin-Derived Peptides for Development into Therapeutically-Valuable Immunomodulatory Agents. *Molecules*, 2017, 22, 2071. <https://doi.org/10.3390/molecules22122071>.

[6] Tornesello, A. L.; Borrelli, A.; Buonaguro, L.; Buonaguro, F. M.; Tornesello, M. L. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules*, 2020, 25, 2850. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>.

[7] Ghaly, G.; Tallima, H.; Dabbish, E.; Badr ElDin, N.; Abd El-Rahman, M. K.; Ibrahim, M. A. A.; Shoeib, T. Anti-Cancer Peptides: Status and Future Prospects. *Molecules*, 2023, 28, 1148. <https://doi.org/10.3390/molecules28031148>

[8] Magana, M.; Pushpanathan, M.; Santos, A. L.; Leanse, L.; Fernandez, M.; Ioannidis, A.; Giulianotti, M. A.; Apidianakis, Y.; Bradfute, S.; Ferguson, A. L.; et al. The Value of Antimicrobial Peptides in the Age of Resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020, 20, e216–e230. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30327-3).

[9] Moravej, H.; Moravej, Z.; Yazdanparast, M.; Heiat, M.; Mirhosseini, A.; Moosazadeh Moghaddam, M.; Mirnejad, R. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 2018, 24, 747–767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>.

[10] Rončević, T.; Gerdol, M.; Spazzali, F.; Florian, F.; Mekinić, S.; Tossi, A.; Pallavicini, A. Parallel Identification of Novel Antimicrobial Peptide Sequences from Multiple Anuran Species by Targeted DNA Sequencing. *BMC Genomics*, 2018, 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5225-5>.

[11] Mookherjee, N.; Anderson, M. A.; Haagsman, H. P.; Davidson, D. J. Antimicrobial Host Defence Peptides: Functions and Clinical Potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19, 311–332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>.

[12] Wimley, W. C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chemical Biology*, 2010, 5, 905–917. <https://doi.org/10.1021/cb1001558>.

[13] Bechinger, B.; Lohner, K. Detergent-like Actions of Linear Amphipathic Cationic Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2006, 1758, 1529–1539. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.07.001>.

[14] Lei, J.; Sun, L.; Huang, S.; Zhu, C.; Li, P.; He, J.; Mackey, V.; Coy, D. H.; He, Q. The Antimicrobial Peptides and Their Potential Clinical Applications. *American Journal of Translational Research* 2019, 11 (7), 3919–3931.

[15] Chen, C. H.; Lu, T. K. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics*, 2020, 9, 24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>.

[16] Falagas, M. E.; Kasiakou, S. K.; Saravolatz, L. D. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 40, 1333–1341. <https://doi.org/10.1086/429323>.

[17] Martell, E. M.; González-García, M.; Ständker, L.; Otero-González, A. J. Host Defense Peptides as Immunomodulators: The Other Side of the Coin. *Peptides*, 2021, 146, 170644. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170644>.

[18] Thundimadathil, J. Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. *Journal of Amino Acids*, 2012, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/967347>.

[19] Kayser, F. H.; Bienz, K. A.; Eckert, J. *Medical Microbiology*; Thieme, 2011.

[20] Cordwell, S. J. Technologies for Bacterial Surface Proteomics. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.04.008>.

[21] Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. Antimicrobial Peptides: Key Components of the Innate Immune System. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 32, 143–171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>.

[22] Cho, I.; Blaser, M. J. The Human Microbiome: At the Interface of Health and Disease. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13, 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>.

[23] Ben, Y.; Fu, C.; Hu, M.; Liu, L.; Wong, M. H.; Zheng, C. Human Health Risk Assessment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment: A Review. *Environmental Research*, 2019, 169, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>.

[24] Woodford, N.; Ellington, M. J. The Emergence of Antibiotic Resistance by Mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, 13, 5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x>.

[25] Gomes, B.; Augusto, M. T.; Felício, M. R.; Hollmann, A.; Franco, O. L.; Gonçalves, S.; Santos, N. C. Designing Improved Active Peptides for Therapeutic Approaches against Infectious Diseases. *Biotechnology Advances*, 2018, 36, 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.004>.

[26] Gow, N. A. R.; van de Veerdonk, F. L.; Brown, A. J. P.; Netea, M. G. *Candida Albicans* Morphogenesis and Host Defence: Discriminating Invasion from Colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 10, 112–122. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2711>.

[27] Janbon, G.; Quintin, J.; Lanternier, F.; d'Enfert, C. Studying Fungal Pathogens of Humans and Fungal Infections: Fungal Diversity and Diversity of Approaches. *Microbes and Infection*, 2019, 21, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.06.011>.

[28] Fernández de Ullivarri, M.; Arbulu, S.; Garcia-Gutierrez, E.; Cotter, P. D. Antifungal Peptides as Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00105>.

[29] Lakshmaiah Narayana, J.; Chen, J.-Y. Antimicrobial Peptides: Possible Anti-Infective Agents. *Peptides*, 2015, 72, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.05.012>.

[30] Lee, D. G.; Kim, H. K.; Kim, S. A.; Park, Y.; Park, S.-C.; Jang, S.-H.; Hahm, K.-S. Fungicidal Effect of Indolicidin and Its Interaction with Phospholipid Membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 305, 305–310. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00755-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00755-1).

[31] Park, Y.; Lee, D. G.; Hahm, K.-S. HP(2–9)-Magainin 2(1–12), a Synthetic Hybrid Peptide, Exerts Its Antifungal Effect on *Candida albicans* by Damaging the Plasma Membrane. *Journal of Peptide Science*, 2004, 10, 204–209. <https://doi.org/10.1002/psc.489>.

[32] Jang, W. S.; Kim, H. K.; Lee, K. Y.; Kim, S. A.; Han, Y. S.; Lee, I. H. Antifungal Activity of Synthetic Peptide Derived from Halocidin, Antimicrobial Peptide from the

Tunicate, *Halocynthia aurantium*. FEBS Letters, 2006, 580, 1490–1496. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.041>.

[33] Kavanagh, K.; Dowd, S. Histatins: Antimicrobial Peptides with Therapeutic Potential. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2004, 56, 285–289. <https://doi.org/10.1211/0022357022971>.

[34] Koo, J. C.; Lee, B.; Young, M. E.; Koo, S. C.; Cooper, J. A.; Baek, D.; Lim, C. O.; Lee, S. Y.; Yun, D.-J.; Cho, M. J. Pn-AMP1, a Plant Defense Protein, Induces Actin Depolarization in Yeasts. Plant and Cell Physiology, 2004, 45, 1669–1680. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch189>.

[35] Helmerhorst, E. J.; Breeuwer, P.; van 't Hof, W.; Walgreen-Weterings, E.; Oomen, L. C. J. M.; Veerman, E. C. I.; Amerongen, A. V. N.; Abee, T. The Cellular Target of Histatin 5 on *Candida albicans* Is the Energized Mitochondrion. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274, 7286–7291. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7286>.

[36] Latoud, C.; Peypoux, F.; Michel, G.; Genet, R.; Morgat, J. L. Interactions of Antibiotics of the Iturin Group with Human Erythrocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1986, 856, 526–535. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90144-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90144-6).

[37] Moyne, A.-L.; Shelby, R.; Cleveland, T. E.; Tuzun, S. Bacillomycin D: An Iturin with Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90, 622–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x>.

[38] Wiederhold, N. Antifungal Resistance: Current Trends and Future Strategies to Combat. Infection and Drug Resistance, 2017, Volume 10, 249–259. <https://doi.org/10.2147/idr.s124918>.

[39] Friedman; Schwartz. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. Journal of Fungi, 2019, 5, 67. <https://doi.org/10.3390/jof5030067>.

[40] Eyre, D. W.; Sheppard, A. E.; Madder, H.; Moir, I.; Moroney, R.; Quan, T. P.; Griffiths, D.; George, S.; Butcher, L.; Morgan, M.; et al. A *Candida auris* Outbreak and Its Control in an Intensive Care Setting. *New England Journal of Medicine*, 2018, 379, 1322–1331. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1714373>.

[41] Rodrigues, M. L.; Albuquerque, P. C. Searching for a Change: The Need for Increased Support for Public Health and Research on Fungal Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12, e0006479. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006479>.

[42] Ouhara, K.; Komatsuzawa, H.; Kawai, T.; Nishi, H.; Fujiwara, T.; Fujiue, Y.; Kuwabara, M.; Sayama, K.; Hashimoto, K.; Sugai, M. Increased Resistance to Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 in Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61, 1266–1269. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn106>.

[43] Andersson, D. I.; Hughes, D.; Kubicek-Sutherland, J. Z. Mechanisms and Consequences of Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. *Drug Resistance Updates*, 2016, 26, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.002>.

[44] Pfalzgraff, A.; Brandenburg, K.; Weindl, G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00281>.

[45] Gorbalenya, A. E.; Krupovic, M.; Mushegian, A.; Kropinski, A. M.; Siddell, S. G.; Varsani, A.; Adams, M. J.; Davison, A. J.; Dutilh, B. E.; et al. The New Scope of Virus Taxonomy: Partitioning the Virosphere into 15 Hierarchical Ranks. *Nature Microbiology*, 2020, 5, 668–674. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0709-x>.

[46] Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Ye, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Cell Entry Mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117, 11727–11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>.

[47] Marcocci, M. E.; Amatore, D.; Villa, S.; Casciaro, B.; Aimola, P.; Franci, G.; Grieco, P.; Galdiero, M.; Palamara, A. T.; Mangoni, M. L.; et al. The Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin B Inhibits In Vitro *Herpes simplex* Virus 1 Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62. <https://doi.org/10.1128/aac.02367-17>.

[48] Castanheira, F. V. S.; Kubes, P. Neutrophils and NETs in Modulating Acute and Chronic Inflammation. *Blood*, 2019, 133, 2178–2185. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530>.

[49] Burn, G. L.; Foti, A.; Marsman, G.; Patel, D. F.; Zychlinsky, A. The Neutrophil. *Immunity*, 2021, 54, 1377–1391. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006>.

[50] Yvan-Charvet, L.; Ng, L. G. Granulopoiesis and Neutrophil Homeostasis: A Metabolic, Daily Balancing Act. *Trends in Immunology*, 2019, 40, 598–612. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.004>.

[51] Hellebrekers, P.; Vrisekoop, N.; Koenderman, L. Neutrophil Phenotypes in Health and Disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 2018, 48, e12943. <https://doi.org/10.1111/eci.12943>.

[52] Leiding, J. W. Neutrophil Evolution and Their Diseases in Humans. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01009>.

[53] Tabrizi, Z. A.; Khosrojerdi, A.; Aslani, S.; Hemmatzadeh, M.; Babaie, F.; Bairami, A.; Shomali, N.; Hosseinzadeh, R.; Safari, R.; Mohammadi, H. Multi-Facets of Neutrophil Extracellular Trap in Infectious Diseases: Moving beyond Immunity. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 158, 105066. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105066>.

[54] Dropulic, L. K.; Lederman, H. M. Overview of Infections in the Immunocompromised Host. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.dmih2-0026-2016>.

[55] Weinberg, R. A. *Biology of Cancer*.; Garland Science, 2014.

[56] Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *International Journal of Cancer*, 2021, 149, 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.

[57] Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Wagle, N. S.; Jemal, A. *Cancer Statistics, 2023*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2023, 73, 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.

[58] Cooper, B. M.; Iegre, J.; O' Donovan, D. H.; Ölwegård Halvarsson, M.; Spring, D. R. Peptides as a Platform for Targeted Therapeutics for Cancer: Peptide–Drug Conjugates (PDCs). *Chemical Society Reviews*, 2021, 50, 1480–1494. <https://doi.org/10.1039/d0cs00556h>

[59] Nekrasova, O.; Pupina, A.; Pupins, M.; Tytar, V.; Kozynenko, I.; Marushchak, O. Species Distribution Modelling: *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761) and Its Main Invasive Threat *Perccottus glenii* (Dybowski, 1877) in Latvia under Global Climate Change. *Environmental Research, Engineering and Management*, 2019, 74. <https://doi.org/10.5755/j01.erem.74.4.21093>.

[60] Feder, M. E.; Burggren, W. W. *Environmental Physiology of the Amphibians*; University Of Chicago Press: Chicago, Ill. ; London, 1992.

[61] Colombo, B. M.; Scalvenzi, T.; Benlamara, S.; Pollet, N. Microbiota and Mucosal Immunity in Amphibians. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00111>.

[62] Cunliffe, R. N.; Mahida, Y. R. Expression and Regulation of Antimicrobial Peptides in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 75, 49–58. <https://doi.org/10.1189/jlb.0503249>.

[63] Machado, A.; Liria, C. W.; Proti, P. B.; Remuzgo, C.; Miranda, M. T. M. Sínteses Química e Enzimática de Peptídeos: Princípios Básicos e Aplicações. *Química Nova*, 2004, 27, 781–789. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422004000500018>

[64] Huan, Y.; Kong, Q.; Mou, H.; Yi, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.

[65] Porto, W. F.; Pires, A. S.; Franco, O. L. Computational Tools for Exploring Sequence Databases as a Resource for Antimicrobial Peptides. *Biotechnology Advances*, 2017, 35, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.02.001>.

[66] Torres, M. D. T.; Sothiselvam, S.; Lu, T. K.; de la Fuente-Nunez, C. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431, 3547–3567. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>.

[67] Cilli, E. M.; Piccoli, J. P.; Ernandes, J. R.; Nakaie, C. R.; Jubilut, G. N. Reações de Clivagem Ácida de Aminoácidos e Peptídeos Ligados a Polímeros: Relevância Para a Metodologia de Síntese de Peptídeo. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4*, 2017, 175–196. <https://doi.org/10.5151/9788521211150-05>.

[68] Nascimento, A.; Chapeaurouge, A.; Perales, J.; Sebben, A.; Sousa, M. V.; Fontes, W.; Castro, M. S. Purification, Characterization and Homology Analysis of Ocellatin 4, a Cytolytic Peptide from the Skin Secretion of the Frog *Leptodactylus ocellatus*. *Toxicon*, 2007, 50, 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.014>.

[69] Silva, F. F. M. da. Avaliação dos Efeitos Antimicrobianos, Antivirais e Citolíticos de Análogos do PAM Ocelatina 4. Dissertação de Mestrado (Biologia Animal). Universidade de Brasília, 2018.

[70] Revie, N. M.; Iyer, K. R.; Robbins, N.; Cowen, L. E. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 45, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.005>.

[71] Browne, K.; Chakraborty, S.; Chen, R.; Willcox, M. D.; Black, D. S.; Walsh, W. R.; Kumar, N. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides.

International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21, 7047.
<https://doi.org/10.3390/ijms21197047>.

[72] Juretić, D.; Vukičević, D.; Tossi, A. Tools for Designing Amphipathic Helical Antimicrobial Peptides. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 23–34.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_2.

[73] Maccari, G.; Di Luca, M.; Nifosì, R. In Silico Design of Antimicrobial Peptides. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 195–219. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2285-7_9.

[74] Torres, M. D. T.; de la Fuente-Nunez, C. Toward Computer-Made Artificial Antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 51, 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.03.004>.

[75] Aitken, A.; Learmonth, M. P. Protein Determination by UV Absorption. *Protein Protocols Handbook, The*, 3–6. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:3>.

[76] Ladram, A. Antimicrobial Peptides from Frog Skin Biodiversity and Therapeutic Promises. *Frontiers in Bioscience*, 2016, 21, 1341–1371. <https://doi.org/10.2741/4461>.

[77] Serafim, M. S. M.; Lavorato, S. N.; Kronenberger, T.; Sousa, Y. V.; Oliveira, G. P.; dos Santos, S. G.; Kroon, E. G.; Maltarollo, V. G.; Alves, R. J.; Mota, B. E. F. Antibacterial Activity of Synthetic 1,3-bis(Aryloxy)Propan-2-amines against Gram-positive Bacteria. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8. <https://doi.org/10.1002/mbo3.814>.

[78] Marianantoni, G.; Meogrossi, G.; Tollapi, E.; Rencinai, A.; Brunetti, J.; Marruganti, C.; Gaeta, C.; Pini, A.; Bracci, L.; Ferrari, M.; et al. Antimicrobial Peptides Active in In Vitro Models of Endodontic Bacterial Infections Modulate Inflammation in Human Cardiac Fibroblasts. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 2081.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102081>.

[79] Alfei, S.; Caviglia, D.; Zorzoli, A.; Marimpietri, D.; Spallarossa, A.; Lusardi, M.; Zuccari, G.; biSchito, A. M. Potent and Broad-Spectrum Bactericidal Activity of a Nanotechnologically Manipulated Novel Pyrazole. *Biomedicines*, 2022, 10, 907. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040907>.

[80] Mahlapuu, M.; Björn, C.; Ekblom, J. Antimicrobial Peptides as Therapeutic Agents: Opportunities and Challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40, 978–992. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1796576>.

[81] Santana, C. J. C.; Magalhães, A. C. M.; Prías-Márquez, C. A.; Falico, D. A.; dos Santos Júnior, A. C. M.; Lima, B. D.; Ricart, C. A. O.; de Pilger, D. R. B.; Bonotto, R. M.; Moraes, C. B.; et al. Biological Properties of a Novel Multifunctional Host Defense Peptide from the Skin Secretion of the Chaco Tree Frog, *Boana raniceps*. *Biomolecules*, 2020, 10, 790. <https://doi.org/10.3390/biom10050790>.

[82] Uddin, M. Z.; Li, X.; Joo, H.; Tsai, J.; Wrischnik, L.; Jasti, B. Rational Design of Peptide Ligands Based on Knob–Socket Protein Packing Model Using CD13 as a Prototype Receptor. *ACS Omega*, 2019, 4, 5126–5136. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03421>.