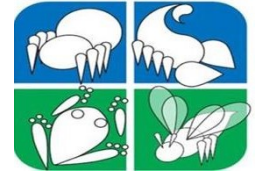




Fundação Universidade de Brasília - FUB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Caracterização química e biológica de Peptídeos
Antimicrobianos Curtos (SPAMs) associados a um Motivo de
Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel (ATCUN)**

Isadora Alves de Vasconcelos

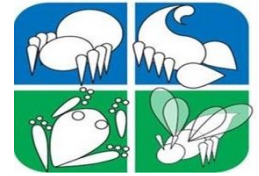
Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Brasília

2025



Fundação Universidade de Brasília - FUB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Caracterização química e biológica de Peptídeos
Antimicrobianos Curtos (SPAMs) associados a um Motivo de
Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel (ATCUN)**

Isadora Alves de Vasconcelos

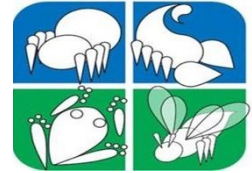
Orientador: Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado.

Brasília
2025



Fundação Universidade de Brasília - FUB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Caracterização química e biológica de Peptídeos
Antimicrobianos Curtos (SPAMs) associados a um Motivo de
Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel (ATCUN)**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior

Presidente

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Membro Titular

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Ludovico Migliolo

Membro Titular

Universidade Católica Dom Bosco

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Membro Titular

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Mariana de Souza Castro

Membro Suplente

Universidade de Brasília

Brasília

2025

Dedico essa tese a aqueles que defendem a ciência perante ao
negacionismo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Betânia e Mirabor, pela incansável dedicação à minha educação e crescimento pessoal; pelo carinho, o incentivo e a paciência ao longo desses 30 anos. Sem vocês eu nada seria.

Ao meu namorado e amigo, Vitor, pelo carinho e paciência nos meus momentos de desabafos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior, pelo incentivo, apoio, paciência e todos os ensinamentos sobre o trabalho e sobre a vida.

À Professora Dra. Mariana Castro do Laboratório de Bioquímica da Universidade de Brasília (UnB), pela colaboração no uso do MALDI e a atenção dispensada ao nosso trabalho.

À Professora Dra. Sonia Maria de Freitas e a Dra. Izadora Cristina Moreira de Oliveira do Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Brasília (UnB), pela colaboração nos ensaios de difração circular.

À Professora Dra. Jane Lima dos Santos e a doutoranda Julyana Oliveira Castro do Laboratório de Imunobiologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela colaboração nos ensaios de avaliação de viabilidade celular da cultura de macrófagos da linhagem macrophage-like RAW 264.7.

Aos amigos do laboratório, Ana Carolina, Carlos José, Jéssica Oliveira, Jéssica Schneider, Gabriel e Keven pela disposição em ajudar em todos os momentos, estando no laboratório ou até mesmo em outro continente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (PPG/BioAni), o Instituto de Biologia (IB) e a Universidade de Brasília (UnB), pelo apoio institucional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a FAP-DF, pelo apoio financeiro.

“Eu vivi mil vidas e amei mil amores. Andei por mundos distantes e vi o fim dos
tempos. Porque eu li.”
George R. R. Martin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Resistência bacteriana	10
1.2. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)	11
1.2.2. Descoberta dos peptídeos antimicrobianos e seu amplo espectro de ação	12
1.2.3. Vantagens dos peptídeos antimicrobianos sobre os antibióticos	13
1.2.4. Pequenos Peptídeos Antimicrobianos (SPAMs)	14
1.3. Motivo de Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel (ATCUN).....	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivos gerais.....	17
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1. Desenho racional e síntese de análogos de peptídeos antimicrobianos	18
4.2. Espectrometria de massa.....	19
4.3. Ensaio antimicrobianos	19
4.3.1. Ensaio antibacteriano	19
4.3.2. Ensaio antifúngico	20
4.4. Ensaio sobre células neoplásicas e células não neoplásicas	21
4.4.1. Manutenção da cultura de células.....	21
4.4.2. Tratamento das células com os peptídeos antimicrobianos	23
4.4.3. Avaliação da viabilidade celular da cultura de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e fibroblasto murino NIH-3T3 (MTT).....	23
4.4.4. Avaliação da viabilidade celular da cultura de macrófagos da linhagem <i>macrophage-like</i> RAW 264.7 (MTT)	24
4.5. Ensaio hemolítico	26
4.6. Dicroísmo circular.....	26
4.7. Ensaio antioxidante	27
4.7.1. Ensaio de Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC).....	27
4.8. Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS	29

5.1.	Desenho racional e síntese dos peptídeos.....	Erro! Indicador não definido.
5.2.	Espectrometria de massa.....	Erro! Indicador não definido.
5.3.	Ensaio antimicrobianos	Erro! Indicador não definido.
5.3.1.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) dos peptídeos contra bactérias.....	Erro! Indicador não definido.
5.3.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) dos peptídeos contra fungos.....	Erro! Indicador não definido.
5.4.	Ensaio sobre as linhagens de células MCF-7 e NIH-3T3.....	Erro! Indicador não definido.
5.4.1.	Viabilidade celular da cultura de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e fibroblasto murino NIH-3T3 (MTT).....	Erro! Indicador não definido.
5.4.2.	Determinação da Concentração Inibitória 50% (IC ₅₀) dos peptídeos contra MCF-7 e NIH-3T3	Erro! Indicador não definido.
5.5.	Ensaio hemolítico	Erro! Indicador não definido.
5.6.	Dicroísmo Circular	Erro! Indicador não definido.
5.7.	Ensaio antioxidantes	Erro! Indicador não definido.
5.7.1.	Ensaio de capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC)	Erro! Indicador não definido.
6.	DISCUSSÃO	30
7.	CONCLUSÃO	36
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. “Helical wheel” dos peptídeos análogos ssp1 (A), ssp2 (B), ssp3 (C), ssp4 (D), ssp1-ATCUN (E), ssp2-ATCUN (F), ssp3-ATCUN (G), ssp4-ATCUN (H), obtidas a partir da ferramenta Helical Wheel Projections. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2. Espectro de massa monoisotópica protonada (M^+H^+) dos peptídeos, de cima para baixo: ssp1 (1124,140 Da), ssp2 (1044,778 Da), ssp3 (1356,101 Da) e ssp4 (1200,976 Da). Espectros obtidos após plaqueamento os peptídeos com matriz HCCA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e análise no modo refletido positivo **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3. Espectro de massa monoisotópica protonada (M^+H^+) dos peptídeos, de cima para baixo: ssp2-ATCUN (1394,574 Da), ssp1-ATCUN (1473,565 Da), ssp3-ATCUN (1704,476 Da) e ssp4-ATCUN (1550,456 Da). Espectros obtidos após plaqueamento os peptídeos com matriz HCCA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e análise no modo refletido positivo **Erro! Indicador não definido.**

Figura 4. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio MTT nas concentrações de 0,1 a 100 μM após incubação por 24 h dos peptídeos ssp3 (A), ssp3-ATCUN (B) e ssp4-ATCUN (C) sobre a linhagem de adenocarcinoma mamário (MCF-7) em meio DMEM suplementado. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: # $P < 0,05$ em relação aos peptídeos..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 5. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio MTT nas concentrações de 0,1 a 100 μM após incubação por 24 h dos peptídeos ssp1 (A), ssp1-ATCUN (B), ssp2 (C), ssp2-ATCUN (D) e ssp4 (E) sobre a linhagem de adenocarcinoma mamário (MCF-7) em meio DMEM suplementado. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio MTT nas concentrações de 0,1 a 100 μM após incubação por 24 h dos peptídeos ssp1 (A), ssp1-ATCUN (B), ssp2 (C), ssp2-ATCUN (D), ssp4 (E) e ssp4-ATCUN sobre a linhagem de fibroblasto murino (NIH-3T3) em meio DMEM suplementado. Os ensaios foram

realizados em triplicatas e os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão **Erro! Indicador não definido.**

Figura 7. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio MTT nas concentrações de 0,1 a 100 μ M após incubação por 24 h dos peptídeos ssp3 (A) e ssp3-ATCUN (B) sobre a linhagem de fibroblasto murino (NIH-3T3) em meio DMEM suplementado. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: # $P < 0,05$ em relação aos peptídeos. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 8. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio MTT nas concentrações de 1 a 100 μ M após incubação por 24 h dos peptídeos ssp3 (A), ssp3-ATCUN (B) e ssp4-ATCUN (C) sobre a linhagem de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e suas respectivas concentrações inibitórias 50% (IC_{50}). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 9. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio MTT nas concentrações de 1 a 100 μ M após incubação por 24 h dos peptídeos ssp3 (A) e ssp3-ATCUN (B) sobre a linhagem de fibroblasto murino (NIH-3T3) e suas respectivas concentrações inibitórias 50% (IC_{50}). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 10. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio MTT nas concentrações de 1,0 a 66,6 μ M após incubação por 24 h dos peptídeos ssp2 (A), ssp2-ATCUN (B), ssp1-ATCUN (C) e ssp3-ATCUN (D) sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: # $P < 0,05$ em relação aos peptídeos. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 11. Porcentagem de células viáveis pelo ensaio MTT nas concentrações de 1,0 a 66,6 μ M após incubação por 24 h dos peptídeos ssp1 (A), ssp3 (B), ssp4 (C) e ssp4-ATCUN (D) sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão **Erro! Indicador não definido.**

Figura 12. Produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 tratadas com os peptídeos antimicrobianos ssp1 (A), ssp2 (B), ssp3 (C), ssp4 (D), ssp1-ATCUN (E), ssp2-ATCUN (F), ssp3-ATCUN (G), ssp4-ATCUN (H). Os ensaios

foram realizados em triplicatas e os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão **Erro! Indicador não definido.**

Figura 13. Porcentagem de hemólise após incubação por 1 h dos peptídeos ssp1 e ssp1-ATCUN (**A**), ssp2 e ssp2-ATCUN (**B**), ssp3 e ssp3-ATCUN (**C**) e, ssp4 e ssp4-ATCUN (**D**) nas concentrações entre 0,1 e 100 μM , com 100 μL de suspensão de eritrócitos humanos..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 14. Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 a 260 nm) dos peptídeos ssp2 (**A**), ssp2-ATCUN (**B**), ssp4 (**C**) e ssp4-ATCUN (**D**), em água (linha preta), SDS (linha vermelha) e TFE (linha azul) a 25 °C..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 15. Espectros de dicroísmo na região distante do UV (190 a 260 nm) dos peptídeos ssp1 (**A**) e ssp1-ATCUN (**B**), em água (linha preta), SDS (linha vermelha) e TFE (linha azul) a 25 °C..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 16. Espectros de dicroísmo na região distante do UV (190 a 260 nm) dos peptídeos ssp3 (**A**) e ssp3-ATCUN (**B**), em água (linha preta), SDS (linha vermelha) e TFE (linha azul) a 25 °C..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 17. Gráficos de regressão linear para trolox e os peptídeos ssp1 (**A**), ssp2 (**B**), ssp3 (**C**) e ssp4 (**D**) e os seus análogos contendo o motivo oxidante, ssp1-ATCUN (**E**), ssp2-ATCUN (**F**), ssp3-ATCUN (**G**) e ssp4-ATCUN (**H**). Em azul está representada a linha de calibração de trolox (100 μM) com oito pontos calculados. Em laranja está representada a média da absorbância dos peptídeos em razão da concentração, com oito pontos calculados. A leitura foi realizada a 734 nm. Os resultados são expressos pelo R^2 **Erro! Indicador não definido.**

Figura 18. Gráfico de diluição seriada (100 – 0 μM) de trolox e dos peptídeos ssp1 (**A**), ssp2 (**B**), ssp3 (**C**) e ssp4 (**D**), bem como dos seus análogos contendo o motivo oxidante, ssp1-ATCUN (**E**), ssp2-ATCUN (**F**), ssp3-ATCUN (**G**) e ssp4-ATCUN (**H**). A leitura foi realizada a 734 nm e os resultados são expressos pela média das triplicatas e suas concentrações. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados estão expressos pela média e seu respectivo desvio padrão. Significância pelo teste de Anova fator único seguido do teste de Tukey: # $P < 0,05$ em relação aos peptídeos..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos análogos obtidos a partir da síntese e seus respectivos peptídeos utilizados como modelo. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2. Peptídeos análogos obtidos a partir da síntese e seus respectivos modelos e parâmetros definidos pelo aplicativo Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3. Predição da atividade antimicrobiana dos peptídeos análogos obtidos a partir da síntese **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos peptídeos análogos, obtidos a partir da síntese, contra as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*) após incubação por 24 h nas concentrações de 0 a 100 µM.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos peptídeos análogos contra as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*) após incubação por 24 h, nas concentrações de 0 a 100 µM, em meio Müller-Hinton suplementado com 32 µM de nitrato de cobre.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6. Concentração Bactericida Mínima (MBC) dos peptídeos análogos contra as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*) após incubação por 24 h nas concentrações de 0 a 100 µM em meio ágar Müller-Hinton..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos peptídeos análogos contra os fungos *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* após incubação por 24 h nas concentrações de 0 a 100 µM em meio BHI. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 8. Concentração Fungicida Mínima (MFC) dos peptídeos análogos contra os fungos *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* após incubação por 24 h nas concentrações de 0 a 100 µM em meio ágar BHI.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 9. Conteúdo de estrutura em α -hélice dos peptídeos análogos, obtidos a da síntese, em água, SDS e TFE..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCUN – Motivo de Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel (do inglês, *Amino Terminal Copper and Nickel Binding Motif*)

ATCUN-Cu – Motivo de Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel em meio contendo cobre (Cu)

BHI – Caldo Cérebro Coração (do inglês, *Brain Heart Infusion*)

CO₂ – Dióxido de carbono

Cu²⁺ – Íon de cobre

Cu-ssp – Pequeno peptídeo sintético em meio contendo cobre

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, *Eagle's Minimal Essential Medium*)

DMSO – Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de dimetilo

HCCA – Alpha-ciano-4-hidroxycinnamico

LPS – Lipopolissacarídeo

MBC – Concentração Bactericida Mínima (do inglês, *Minimum Bactericidal Concentration*)

MFC – Concentração Fungicida Mínima (do inglês, *Minimum Fungicidal Concentration*)

MHB – Meio Müller Hinton

NO – Óxido Nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*)

PAMs – Peptídeo Antimicrobiano (do inglês, *Antimicrobial Peptides - AMPs*)

AMP-ATCUN – Peptídeo Antimicrobiano associado a um motivo ATCUN

SPAMs – Peptídeos Antimicrobianos Curtos (do inglês, *Short Antimicrobial Peptides - SAMPs*)

RBC – Glóbulos vermelhos humanos (do inglês, *Red Blood Cells*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

TFE – Trifluoroetanol

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos surgiram como um potencial novo tratamento devido a sua capacidade de explorar as fraquezas presentes nos mecanismos de resistência aos antibióticos observados nas bactérias. Somado a isso, estudos recentes demonstraram que quando conjugados a um Motivos de Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel (ATCUN) os peptídeos antimicrobianos apresentam uma atividade antimicrobiana aprimorada. No presente trabalho, análogos dos peptídeos antimicrobianos confeccionados com e sem adição de um motivo ATCUN foram caracterizados química e biologicamente. Todos os peptídeos foram capazes de inibir o crescimento das espécies bacterianas avaliadas com concentrações inibitórias mínimas (MICs) relativamente baixas, e os quatro peptídeos conjugados ao motivo ATCUN, quando testados quanto ao aprimoramento de sua eficiência sobre as mesmas bactérias, demonstraram um aumento da atividade antimicrobiana de até oito vezes. Os oito peptídeos também foram capazes de inibir o crescimento de pelo menos uma das três cepas do gênero *Candida* testadas e, um deles, foi capaz de aumentar a atividade fungicida contra as cepas de *C. albicans* e *C. krusei* quando comparado ao seu análogo sem o motivo. Os peptídeos demonstraram ser pouco citotóxicos, com um preferencia pela linhagem celular neoplásica, e não demonstraram atividade hemolítica. Quanto as estruturas secundárias, os peptídeos foram capazes de se estruturarem em α -hélice quando na presença de SDS e TFE. Entende-se então, a partir desse trabalho, que os análogos dos peptídeos antimicrobianos descritos possuem potente atividade bactericida contra os microrganismos e que a associação desses peptídeos a um motivo ATCUN é capaz de aumentar sua atividade bactericida de duas até oito vezes, dependendo do peptídeo e do patógeno analisados. Além disso, também pode-se observar que os peptídeos possuem atividade antifúngica e antiproliferativa sobre células neoplásicas, com um possível aprimoramento dessas atividades por parte dos peptídeos contendo o motivo oxidante.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides have emerged as a potential new treatment due to their ability to exploit weaknesses present in antibiotic resistance mechanisms observed in bacteria. In addition, recent studies have demonstrated that when conjugated to an Amino Terminal Copper and Nickel Binding Motif (ATCUN), antimicrobial peptides exhibit enhanced antimicrobial activity. In the present work, analogues of antimicrobial peptides with and without the addition of an ATCUN motif were chemically and biologically characterized. All peptides were able to inhibit the growth of the bacterial species evaluated with relatively low minimum inhibitory concentrations (MICs), and the four peptides conjugated to the ATCUN motif, when tested for improving their efficiency on the same bacteria, demonstrated an increase in activity antimicrobial up to eight times. The eight peptides were also able to inhibit the growth of at least one of the three strains of the genus *Candida* tested and, one of them, was able to increase the fungicidal activity against strains of *C. albicans* and *C. krusei* when compared to its analogue without the motif. The peptides demonstrated little cytotoxicity, with a preference for neoplastic cell lines, and did not demonstrate hemolytic activity. Regarding their secondary structures, the peptides were able to structure themselves into a α -helix when in the presence of SDS and TFE. It is understood, from this work, that the analogues of the described antimicrobial peptides have potent bactericidal activity against microorganisms and that the association of these peptides with an ATCUN motif is capable of increasing their bactericidal activity by two to eight times, depending on the peptide. Furthermore, it can also be observed that the peptides have antifungal and antiproliferative activity on neoplastic cells, with a possible enhancement of these activities by peptides containing the oxidizing motif.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência bacteriana

Nos anos que antecedem a comercialização dos antibióticos, a pneumonia, a gripe, a tuberculose e as infecções gastrointestinais eram as principais causas de morte no mundo (1). Somado a isso, durante a Primeira Guerra Mundial, as doenças infecciosas, obtidas a partir de ferimentos de guerra, acometeram milhares de pessoas a mais (2). Com base neste cenário, a descoberta ao acaso da penicilina em 1928 marcou uma nova era da medicina moderna (3).

Em 1928, Fleming (3) publicou pela primeira vez seus achados referentes a penicilina que, em seguida, tornou-se um agente antimicrobiano usado de forma significativa contra muitas doenças infecciosas. No entanto, pouco tempo depois, Abraham e Chain (4), descreveram a penicilinase, uma betalactamase capaz de degradar a benzilpenicilina, conferindo assim resistência à penicilina.

Outro antibiótico, a meticilina, foi desenvolvido logo em seguida, mas dentro de 3 anos após a sua introdução ao mercado a cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi observada na Europa e nos Estados Unidos (5). Para conter as novas infecções causadas por essa cepa resistente, as fluoroquilonas foram então introduzidas. No entanto, a resistência bacteriana a esse agente também surgiu (6). Atualmente, os glicopeptídeos são reservados ao tratamento de último recurso e, mesmo possuindo um monitoramento cuidadoso sob a sua implantação, múltiplas cepas de MRSA demonstraram sensibilidade reduzida a esse agente (7).

Estima-se que em 2050 o número de mortes atribuídas a resistência bacteriana será de aproximadamente 10 milhões de pessoas por ano; mais do que acidentes de carro, diabetes e até mesmo câncer (8). E, de fato, um relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde em 2017 mostra que 12 bactérias representam uma grande ameaça a saúde humana devido a sua alta resistência à antibióticos, sendo as bactérias Gram-negativas as mais frequentemente encontradas nas infecções humanas (9).

A resistência bacteriana é definida como a capacidade dos microrganismos de sobreviverem, isto é, permanecerem viáveis, mesmo sob a influência de agentes antimicrobianos (10). Inicialmente, a resistência bacteriana surgiu como uma resposta aos antibióticos de ocorrência natural, como resultado de mutações ou transferência de genes

entre os microrganismos. No entanto, a medicina moderna acelerou ainda mais esse processo, removendo competidores sensíveis aos medicamentos e deixando as bactérias resistentes se reproduzirem e se espalharem por meio da seleção natural devido a prescrição de medicamentos menos eficazes que aqueles de primeira linha, ou ainda através da automedicação (11–14).

Outro fator que contribui para o surgimento e a propagação da resistência bacteriana é a estagnação na pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Em meados da década de 1980, uma grande quantidade de pedidos de novos medicamentos antimicrobianos foi aprovada, mas logo nas décadas seguintes houve uma constante diminuição no número de novos antibióticos colocados no mercado (15,16). Somado a isso, o pouco medicamento aprovado nos últimos anos trata-se dos mesmos antibióticos já existentes, com apenas algumas pequenas modificações, e que por fim apresentam um mesmo mecanismo de ação (17).

Dessa forma, à medida que mais antibióticos são usados em todo o mundo, mais oportunidades são dadas para as bactérias desenvolverem uma resistência mais complicada contra esses agentes. O resultado são novas cepas modificadas, capazes de reduzir a chance de o tratamento adequado ser eficaz para os pacientes acometidos por infecções devido a esses patógenos e, eventualmente, levá-los a complicações clínicas, ou até a morte (18–20).

1.2. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs, do inglês *Antimicrobial Peptides* - AMPs) são um grande grupo de peptídeos de ocorrência natural, encontrados em todos os organismos vivos; desde bactérias, fungos e plantas, até animais invertebrados e vertebrados. Esses peptídeos desempenham um papel na resposta imune inata e atuam como a primeira linha de defesa do hospedeiro, direcionando e inibindo o crescimento de bactérias, fungos e leveduras (21–27).

Os PAMs são geralmente formados por cerca de 12 a 50 aminoácidos, com uma abundância de resíduos de lisina, arginina e histidina que conferem a eles uma carga líquida positiva variando de +2 a +9; e uma grande porção de resíduos hidrofóbicos (>50%) (28–34). Frequentemente, devido a presença de pontes dissulfeto ou contato com membranas,

os AMPs adotam estruturas anfífilas tridimensionais nas quais os domínios hidrofílicos carregados positivamente são bem separados do domínio hidrofóbico (35).

As propriedades antimicrobianas dos PAMs estão relacionadas a essas duas características inter-relacionadas. A natureza anfipática dos peptídeos antimicrobianos contribui para a sua capacidade de interagir com membranas, especialmente membranas bacterianas, com suas cabeças hidrofílicas e núcleos hidrofóbicos (35,36).

Além disso, devido a sua carga positiva, os PAMs se ligam preferencialmente aos componentes presentes na membrana bacteriana que são carregados negativamente (por exemplo: lipopolissacarídeos e ácidos teicóicos nas superfícies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente) criando assim ligações eletroestáticas estáveis (36–39). Posteriormente, a membrana bacteriana é rompida, levando à inserção dos peptídeos antimicrobianos nas membranas e, frequentemente, à formação de poros.

Com o surgimento e o constante crescimento da resistência de bactérias patogênicas aos antibióticos disponíveis, o número de pesquisas que buscam alternativas aos antibióticos atuais aumentaram ao longo dos anos. Tendo em vista esse cenário, os PAMs passaram a ser considerados candidatos promissores para o tratamento de infecções causadas por bactérias (40). Até o momento mais de 3500 peptídeos antimicrobianos já foram descritos, com uma pesquisa prospera de pelo menos um novo PAM sendo descoberto a cada ano desde 1985 até 2017 (41,42).

1.2.2. Descoberta dos peptídeos antimicrobianos e seu amplo espectro de ação

A descoberta dos PAMs, assim como a descoberta da penicilina, é atribuída ao trabalho pioneiro de Alexander Fleming. No início da década de 1920, ao observar secreções e tecidos de humanos e animais, Fleming descreveu uma substância bacteriolítica, denominada por ele como lisozima, capaz de realizar a lise de células bacterianas (59).

Mais tarde, em 1939, René Dubos foi o responsável por isolar o agente antibacteriano gramicidina da bactéria Gram-positiva *Bacillus brevis* e avaliar suas propriedades antibacterianas contra infecções em camundongos (60). Já em 1948, a bacilomicina, outra família de peptídeos de *Bacillus brevis*, foi isolada e descrita com baixos efeitos antimicrobianos mas notável atividade antifúngica (61).

Posteriormente, funções imunomoduladores dos PAMs foram descritas e, juntamente a sua atividade contra uma ampla gama de microrganismos, despertaram o interesse de pesquisadores nas suas potenciais aplicações terapêuticas (62). E embora os PAMs sejam amplamente conhecidos por sua ação contra bactérias, são diversos os relatos referentes às suas propriedades antifúngicas, antiproliferativas e até mesmo antioxidantes.

O peptídeo Skin-PYY, por exemplo, é um peptídeo antimicrobiano que também apresenta atividade antifúngica. Encontrado no extrato da pele da rã arbórea *Phylomedusa bicolor*, esse peptídeo demonstra grande eficácia tanto contra as bactérias *E. coli* e *Enterococcus faecalis* quanto contra os fungos *C. albicans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* e *Arthroderma simii* (63,64).

Por sua vez, o peptídeo Figainina 1, isolado da secreção cutânea do anuro *Boana ranicipes*, além de demonstrar atividade contra bactérias patogênicas Gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae* e bactérias patogênicas Gram-positivas *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. casseliflavus*, também possui efeitos antiproliferativos em linhagens de células de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e células HeLa (65).

Já os PAMs pBD-1 e pBD-2, β -defensinas expressadas em órgãos e tecidos do sistema imune de suínos, após serem submetidas a estudos *in vitro* demonstraram atividade antimicrobiana moderada a alta sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e atividade antioxidante forte em concentrações na faixa entre 0 ~ 256 $\mu\text{g/mL}$ (66).

1.2.3. Vantagens dos peptídeos antimicrobianos sobre os antibióticos

Em comparação com os antibióticos convencionais, os peptídeos antimicrobianos apresentam diferentes vantagens. Primeiramente, os antibióticos normalmente possuem um espectro estreito, agindo apenas sobre as bactérias, enquanto os PAMs têm um amplo espectro de atividades que incluem antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária e anticâncer (16).

A respeito de sua atividade antimicrobiana, quando comparados aos antibióticos, os PAMs apresentam uma ação mais direta e rápida, sendo capazes de matar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com intervalos que vão de 3 horas, a 30 minutos ou ainda 5 minutos (67–72). Além disso, eles atuam contra bactérias clinicamente resistentes a medicamentos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (73).

Outra vantagem é a baixa propensão dos peptídeos para o desenvolvimento de resistência. Algo que pode ser atribuído a sua capacidade de atuar por meio de diversos mecanismos e vias distintas (36,74). Além disso, os PAMs não provocam vias de estresse bacteriano, como SOS e rpoS e, portanto, não são capazes de aumentar a mutagênese bacteriana (75). Muitas vezes esses peptídeos podem ativar a imunidade inata do hospedeiro sem exibir imunogenicidade, sendo alguns deles capazes de neutralizar aspectos mais prejudiciais da inflamação (73,76).

1.2.4. Pequenos Peptídeos Antimicrobianos (SPAMs)

Em meados da década de 90, peptídeos contendo apenas unidades de Leu e Lys foram relatados como ativos contra cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto peptídeos consistindo apenas em Leu, Lys e Trp foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana a partir de uma abordagem *de novo* (77,78).

Tais peptídeos ficaram conhecidos como Peptídeos Antimicrobianos Curtos (SPAMs, do inglês *Short Antimicrobial Peptides - SAMPs*), e suas versões artificiais ou sintéticas variam normalmente de 2 a 10 resíduos de aminoácidos.

Atualmente, sabe-se que as versões mais curtas dos análogos de peptídeos de ocorrência natural podem ter efeitos modulatórios nas propriedades terapêuticas, bem como foi observado a partir da lipidação da vancomicina, que podem transformar peptídeos não ativos em promissores novos agentes bioativos, o que torna os SPAMs mais interessantes em uma possível configuração clínica (79).

O modo de ação dos peptídeos antimicrobianos curtos ainda não é bem compreendido, no entanto, verificou-se que esses peptídeos interagem com o ATP e inibem diretamente as ações de certas enzimas dependentes de ATP (27). Além disso, eles também causam deslocamento de proteínas de membrana periféricas (80). Dessa forma, seu modo de ação pode ser classificado como um tipo de ruptura de membrana, o que se assemelha ao dos peptídeos antimicrobianos comuns.

1.3. Motivo de Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel (ATCUN)

O Motivo de Ligação Amino Terminal Cobre e Níquel (motivo ATCUN) nada mais é do que uma sequência curta de peptídeo que pode ser encontrada no N-terminal da albumina presente no soro humano, bem como em outras proteínas (81).

O motivo ATCUN consiste em um tripeptídeo de sequência H₂N-Xaa-Xaa-His, que coordena os íons Cu (II) e Ni (II) em uma geometria quadrada plana. Diversos estudos têm demonstrado que a histidina é necessária para a ligação firme e a geometria quadrada plana (82,83).

No entanto, décadas de pesquisa mostram que a atividade do motivo ATCUN não se limita apenas ao transporte de metais, mas também pode ter outras funções biológicas potenciais. Diversos estudos demonstram a atividade nucleasse e protease do complexo ATCUN-Cu (II) devido a sua capacidade de formar espécies reativas de oxigênio (84–88).

Mais de 40 peptídeos de ocorrência natural com atividade antimicrobiana contendo o motivo ATCUN já foram relatados. A presença do motivo em muitos desses PAMs indica o seu potencial como modelo para o desenvolvimento de compostos antimicrobianos (89).

O motivo ATCUN mostra alta afinidade para os íons Cu (II) e Ni (II). A alta afinidade do motivo ATCUN para íons cobre lábeis em bactérias sugere que a inserção desse motivo no N-terminal dos AMPs cria uma estrutura molecular que catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS); que esta ausente no PAM original (82,90–95).

O complexo ATCUN-Cu (II), na presença de peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico, gera ROS por meio de uma reação semelhante à de Fenton à medida que o cobre ligado circula entre seus estados de oxidação +2 e +3 (96). Isso leva ao acúmulo de ROS em uma alta taxa de renovação, que pode degradar irreversivelmente alvos terapêuticos como ácidos nucleicos e proteínas, mesmo quando o AMP está em doses subterapêuticas (82,84).

O peptídeo salivar histatina 5 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY), bem como outras histatinas, possuem um motivo ATCUN e, sabe-se que as histatinas 3 e 5 se ligam voluntariamente aos íons de metal de transição como Cu (II), Ni (II), Zn (II) e Fe (II). Sendo assim, foi demonstrado que a histatina 5 possui atividade antifúngica, e que essa atividade pode estar possivelmente relacionada a atividade geradora de ROS por meio do motivo Asp-Ser-His presente em sua sequência (97–100).

Da mesma forma, a mixinidina (GIHDILKYGKPS), um PAM derivado do muco epidérmico do peixe-bruxa, contém a sequência ATCUN Gly-Ile-His (101). Estudos demonstraram que a substituição do resíduo de histidina por um resíduo de lisina torna o peptídeo menos ativo contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (102).

Já a hepcidina 25 humana (DTHFPICIFCCGCCCHRSKCGMCKKT) é um peptídeo antimicrobiano e um hormônio produzido principalmente pelo fígado, onde é responsável pela regulação da reciclagem e homeostase do ferro (103–105). A presença do tripeptídeo DTH em sua sequência permite a hepcidina 25 assumir que a ligação do cobre ocorre de forma semelhante aos outros dois peptídeos mencionados (106). Na presença de íons de cobre (II) e de uma substância intracelular, como o arscorbato por exemplo, a hepcidina 25 pode gerar ROS que são capazes de clivar o DNA do plasmídeo e de proteínas bacterianas (97,107). Além disso, também é especulado que a ligação do cobre pode induzir alterações conformacionais no peptídeo que aumentam a sua atividade antimicrobiana contra alvos intracelulares (108).

2. JUSTIFICATIVA

O uso generalizado ou ainda, em alguns casos, o abuso no uso dos antibióticos convencionais, somados a estagnação na pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, são algumas das principais causas da aceleração da resistência bacteriana em todo o mundo atualmente. Conseqüentemente, a vida útil dos antibióticos comerciais torna-se limitada, o que resulta na procura de novos agentes antibacterianos eficazes (109,110).

A dificuldade de encontrar novas estruturas que apresentem baixa toxicidade para o hospedeiro e ampla ação contra patógenos bacterianos, como observado nos antibióticos convencionais, é uma grande limitação no desenvolvimento desses fármacos. Novas classes de antibióticos recentes, como as oxazolidinonas (linezolida), as estreptograminas (quinupristina/dalfopristina) e os glicolipídios (daptomicina), são todas limitadas no seu espectro de atividade a agentes Gram-positivos patogênicos (111). Portanto, é um desafio para a pesquisa conceber antibióticos com novas estruturas e/ou modos de ação.

Como parte essencial da imunidade inata, os peptídeos antimicrobianos representam um bom modelo para a geração de novos antimicrobianos, pois apresentam um amplo espectro de ação sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, além da capacidade de explorar as fraquezas presentes nos mecanismos de resistência aos antibióticos observados nas bactérias patogênicas. Os PAMs são capazes de atuar tanto como adjuvantes com fármacos convencionais, quanto como uma alternativa a esses medicamentos no tratamento e na prevenção das infecções microbianas (30,112–114).

E, embora os PAMs sejam mais conhecidos por inibir o crescimento de bactérias, são cada vez mais crescentes os relatos de peptídeos que além de exibirem atividade

antimicrobiana, também exibem propriedades antifúngica, antiproliferativa e até mesmo antioxidante. Tais atributos podem vir a ser uma importante contribuição para o combate de infecções fúngicas cada vez mais frequentes, bem como ao tratamento de determinadas células cancerígenas que tornam-se resistentes a agentes quimioterápicos ao longo da terapia (115–117).

No entanto, embora uma quantidade substancial de PAMs tenham sido descobertos nas últimas décadas, apenas uma pequena parte deles foi de fato utilizada, devido ao fato de grande parte dos PAMs normalmente possuírem sequências bastante longas, que podem comprometer sua aplicação como medicamento comercial devido a baixa estabilidade, ao alto preço de fabricação e a citotoxicidade (109,118). Portanto, é urgente encontrar PAMs eficientes, não tóxicos e de baixo custo na promoção das aplicações práticas dos peptídeos.

As versões naturais ou sintéticas dos peptídeos antimicrobianos curtos (SPAMs) surgem como uma solução a esse problema, pois possuem composição mais simples de aminoácidos (variam de 2 a 10 resíduos de aminoácidos), o que os tornam mais fáceis de fabricar; mais sintonizáveis sem esforço de acordo com requisitos de toxicidade, estabilidade, meia-vida ou especificidade; menos imunogênicos e, se alcançados no mercado, podem ser fabricados a granel (119).

Somado a isso, estudos recentes que tinham como objetivo associar motivos oxidantes ATCUN a peptídeos antimicrobianos mais curtos demonstraram que os novos peptídeos combinados apresentaram uma atividade antimicrobiana aprimorada. Ao avaliar o mecanismo de ação dos conjugados resultantes, foi indicado que o aumento da atividade normalmente decorre da capacidade adicional de gerar espécies reativas de oxigênio (82,120).

Dessa forma, a procura por peptídeos antimicrobianos cada vez mais eficazes e com um amplo espectro de atuação é uma proposta atual e necessária para a melhoria no tratamento de diferentes enfermidades, principalmente aquelas causadas por microrganismos patogênicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O presente trabalho propõe a caracterização química e biológica de peptídeos antimicrobianos curtos (SPAMs) associados a um motivo oxidante (Motivo de Ligação

Amino Terminal Cobre e Níquel – ATCUN) sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e células neoplásicas.

3.2. Objetivos específicos

- Confeccionar análogos dos peptídeos antimicrobianos, com e sem adição de um motivo oxidante, substituição de resíduos e diminuição do C-terminal;
- Identificar as massas e as estruturas dos diferentes peptídeos por meio de espectrometria de massa e dicroísmo circular;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos diferentes peptídeos contra bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*; e bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*;
- Determinar a atividade antifúngica dos diferentes peptídeos contra cepas dos fungos *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.
- Determinar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos dos diferentes peptídeos sobre células de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e fibroblasto murino (NIH-3T3) através do MTT;
- Determinar os efeitos antiproliferativos e citotóxicos dos diferentes peptídeos sobre macrófagos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 através do MTT;
- Determinar a dosagem de óxido nítrico (NO) em sobrenadante da cultura de macrófagos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7;
- Determinar a capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC) dos diferentes peptídeos;
- Determinar a atividade hemolítica dos diferentes peptídeos sobre eritrócitos murinos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho racional e síntese de análogos de peptídeos antimicrobianos

As alterações foram baseadas na leitura, comparação e compreensão dos análogos já descritos na literatura em relação aos seus peptídeos nativos (modelos). Foram realizadas substituições de resíduos de aminoácidos bem como a adição de 2/3 resíduos nas porções C- e N- terminais a fim de alterar sua cationicidade e hidrofobicidade.

Para auxiliar no desenho racional foram utilizadas como ferramentas de bioinformática o algoritmo ExPasy pl/Mv tool (https://web.expasy.org/compute_pi/) (121–123), para o cálculo da massa teórica monoisotópica dos peptídeos; o Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (124), para o alinhamento de múltiplas sequências; a ferramenta NetWheels (<http://lbqp.unb.br/NetWheels/>) (125), para a predição helicoidal dos peptídeos; a ferramenta I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (126–128), para a predição das estruturas secundárias; e o APD (APD3: Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor) (<https://aps.unmc.edu/prediction>) (129–131), para determinar o GRAVY (Grand Average Hydropathy).

Após a definição das estruturas os peptídeos foram encomendados.

4.2. Espectrometria de massa

Os peptídeos antimicrobianos foram analisados em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF modelo Autoflex 2™ (Bruker Billerica, Massachusetts, EUA) em modo refletido positivo, utilizando calibração externa, para certificar de que não haveria contaminantes em sua composição. Para isso, foi utilizada a matriz ácido alpha-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Os espectros foram adquiridos entre 1000 e 5000 m/z.

4.3. Ensaios antimicrobianos

4.3.1. Ensaio antibacteriano

Os peptídeos antimicrobianos foram empregados na determinação da sua Concentração Inibitória Mínima (MIC, do inglês *Minimal Inhibitory Concentration*), ou seja, a menor concentração do peptídeo, sobre bactérias patogênicas, onde nenhum crescimento celular é detectado por meio de leitura espectrofotométrica. Para isso, foi utilizado o protocolo da Clinical And Laboratory Standards Institutes – CLSI (132).

As bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27953); e as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) foram obtidas no banco de bactérias e fungos do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (UnB).

Primeiramente, a densidade óptica dos microrganismos foi avaliada através da leitura em espectrofotômetro a 625 nm após 24 h de incubação. Os microrganismos foram então

primeiramente diluídos em meio Müeller-Hinton (MHB) na proporção 1:10 (aproximadamente 1×10^7 células/ml) e, em seguida, essa solução foi diluída na proporção 1:20 (aproximadamente 5×10^5 células/ml) em MHB. Alíquotas de 50 μ l em diluições seriadas de cada peptídeo, feitas a partir de uma solução-estoque de 100 μ M e esterilizadas por filtração em filtro Millex gv 0,22 μ m, foram incubadas com 50 μ l da suspensão de bactérias em placa multiposços de fundo chato (TPP, Switzerland) em triplicata, por 24 h a 37 °C. Os controle para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril incubados com as suspensões bacterianas. Um controle de ausência de crescimento pleno contendo o antibiótico Ofloxacino incubado com a suspensão bacteriana também foi realizado.

Para os experimentos envolvendo os peptídeos que possuem o motivo oxidante ATCUN em sua estrutura, as mesmas diluições e manipulações foram realizadas, mas dessa vez utilizando MHB contendo 32 μ M de nitrato de cobre, adaptado de Libardo *et al.* (90), para observar se haveria alguma diferença em sua atividade antimicrobiana.

A densidade óptica dos microrganismos foi medida em uma leitora Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) a 620 nm após o tempo de incubação.

A partir dos resultados obtidos no ensaio para determinação do MIC, foi realizado o ensaio para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC, do inglês Minimal Bactericidal Concentration). Alíquotas de 10 μ l do poço contendo a concentração referente ao MIC, bem como dos poços anterior e posterior, foram retiradas e inoculadas, em triplicatas, na superfície de placas de petri contendo meio Müeller-Hinton Agar, e então incubadas por 24 h a 37 °C. Foi definido o MBC como a menor concentração do peptídeo antimicrobiano capaz de causar a morte do inóculo. Todos os ensaios antimicrobianos foram realizados com materiais esterilizados e em câmara de fluxo laminar.

4.3.2. Ensaio antifúngico

Os peptídeos antimicrobianos também foram empregados na determinação do MIC sobre as cepas de fungos patogênicos. Para isso, novamente foi utilizado o protocolo da Clinical And Laboratory Standards Institutes – CLSI (132).

As cepas dos fungos *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 34135) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) foram obtidas no banco de bactérias e fungos do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (UnB).

Primeiramente, a densidade óptica dos microrganismos foi avaliada através da leitura em espectrofotômetro a 530 nm após 24 h de incubação. Os microrganismos foram então primeiramente diluídos em Caldo Cérebro Coração (BHI, do inglês Brain Heart Infusion Broth) na proporção 1:100 (aproximadamente 1×10^4 células/ml) e, em seguida, essa solução foi diluída na proporção 1:20 (aproximadamente 5×10^2 células/ml) em BHI. Alíquotas de 50 μ l em diluições seriadas de cada peptídeo, feitas a partir de uma solução-estoque de 100 μ M e esterilizadas por filtração em filtro Millex gv 0,22 μ m, foram incubadas com 50 μ l da suspensão de leveduras em placa multiposos de fundo chato (TPP, Switzerland) em triplicata, por 24 h a 37 °C. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli Q estéril incubados com as suspensões das leveduras. Um controle de ausência de crescimento pleno contendo o antifúngico Anfotericina B incubado com a suspensão de levedura também foi realizado.

A densidade óptica dos microrganismos foi medida em uma leitora Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) a 530 nm após o tempo de incubação.

A partir dos resultados obtidos no ensaio para determinação do MIC, foi realizado o ensaio para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (MFC, do inglês Minimum Fungicidal Concentration). Alíquotas de 10 μ l do poço contendo a concentração referente ao MIC, bem como dos poços anterior e posterior, foram retiradas e inoculadas, em triplicatas, na superfície de placas de petri contendo meio Brain-Heart Infusion Agar, e então incubadas por 24 h a 37 °C. Foi definido o MFC como a menor concentração do peptídeo antimicrobiano capaz de causar a morte do inóculo. Todos os ensaios antifúngicos foram realizados com materiais esterilizados e em câmara de fluxo laminar.

4.4. Ensaio sobre células neoplásicas e células não neoplásicas

4.4.1. Manutenção da cultura de células

Alíquotas de células de adenocarcinoma mamário (MCF-7, ATCC HTB-220) e células de fibroblasto murino (NIH-T3T, ATCC CRL-1658) obtidas no banco de células do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília (UnB) foram removidas de um estoque de nitrogênio líquido e descongeladas a 37 °C.

Para ambas as culturas, alíquotas de 500 μ l foram lentamente adicionadas em 3 ml de meio de cultura Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM) completo (suplementado com

0,01 mg/ml de insulina humana, 10% de soro fetal bovino e, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina). O mesmo foi utilizado em todos os outros procedimentos experimentais. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2000 RPM por 5 min, ressuspensas em 5 ml do meio de cultura, transferidas para um frasco de cultura de células e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Para assegurar a qualidade das células a serem utilizadas nos experimentos, a cada 48 h o meio de cultura foi substituído por um meio de cultura novo.

A cultura de células foi observada em microscópio de luz invertido e monitorada quanto ao crescimento celular, aspectos morfológicos e presença de contaminantes. Ao atingir o estágio de crescimento de confluência (elevada densidade de células em uma determinada área) de 80% as células foram removidas do frasco de cultura e divididas em outras garrafas para a manutenção da cultura seguindo o procedimento descrito a seguir.

O meio foi descartado e 2 ml de solução tripsina-EDTA (0,25% de tripsina contendo 0,53 mM de EDTA) foram adicionadas ao frasco de cultura para remoção da monocamada de células. Após 2 min de incubação em estufa a 37 °C, a remoção das células foi observada em microscópio de luz invertido. Em seguida, foram acrescentados 2 ml de meio de cultura para inativar a atividade da tripsina. As suspensões de células foram centrifugadas a 2000 RPM por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em meio de cultura. Aproximadamente 10% das células foram recultivadas em frascos de cultura e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. O restante foi utilizado em experimento ou recebeu a adição de hipoclorito de sódio e detergente e, após 24 h, foram descartadas.

Após o término dos experimentos, as células foram removidas dos frascos de cultura e centrifugadas (como descrito acima). Após o descarte do meio de cultura, as células foram ressuspensas em meio de congelamento (DMEM, 20% de soro fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, 5% de DMSO). As suspensões celulares foram rapidamente transferidas para criotubos, os quais foram identificados e envolvidos por uma espessa camada de papel toalha e mantidos a -80 °C por 24 h. Em seguida, os criotubos foram estocados imersos em nitrogênio líquido.

4.4.2. Tratamento das células com os peptídeos antimicrobianos

Ao atingir o estado de confluência, ambas as linhagens de células foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas a 2000 RPM por 5 min. O sobrenadante foram descartados e as células ressuspensas em 1ml de meio de cultura.

Para determinação do número de células, um volume de 10 µl de cada suspensão foi adicionada a 50 µl de solução azul de tripan (0,4% diluídos em PBS, p/v). Uma alíquota de 8 µl de cada mistura foi depositada gentilmente em uma câmara de Neubauer, onde as células presentes nos quatro quadrantes maiores laterais foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

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

As células contadas foram transferidas para placas de cultura de fundo chato (TPP, Switzerland), em triplicatas, com concentração inicial de 5×10^3 células/poço, e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h para a completa adesão das células no fundo da placa. Após o período de incubação, as células foram preparadas de maneira adequada para realização dos testes. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, nas concentrações de 0 a 100 µM, com materiais rigorosamente esterilizados e em câmara de fluxo laminar.

4.4.3. Avaliação da viabilidade celular da cultura de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e fibroblasto murino NIH-3T3 (MTT)

A viabilidade das células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e de fibroblasto murino NIH-3T3 foi analisada por ensaio MTT (tetrazólio de metiltiazol) de acordo com o protocolo estabelecido por Mosman (133).

Ambas as culturas de células foram cultivadas com os peptídeos antimicrobianos em placas de 96 poços como descrito no item acima. Após o período de incubação, os meios de cultura das placas foram removidos e 150 µl de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5 mg/ml diluídos em 135 µl de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. Ambas as células foram incubadas por 3 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, os meios

de cultura foram removidos e 200 μ l de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan. A quantificação do formazan para ambas as linhagens foi realizada pela medida da absorbância dos poços no comprimento de onda de 595 nm em uma leitora de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

A viabilidade celular para ambas as linhagens foi determinada pela média da triplicata de cada concentração testada. A Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) representa a concentração em que a viabilidade celular foi reduzida em 50% e foi calculada utilizando o software *GraphPad Prism 5*.

4.4.4. Avaliação da viabilidade celular da cultura de macrófagos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 (MTT)

A viabilidade dos macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 foi analisada por ensaio MTT (tetrazólio de metiltiazol) de acordo com o protocolo estabelecido por Mosman (133). O método também foi utilizado para detectar a viabilidade e avaliar a citotoxicidade dos peptídeos antimicrobianos sobre a linhagem.

Tais ensaios foram realizado em parceria com a Profa. Dra. Jane Lima dos Santos e a doutoranda Julyanna Oliveira Castro, no Laboratório de Imunobiologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

As células RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foram cultivadas em DMEM completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino e, 100 unidades/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina) a 37 °C e 5% de CO₂.

As células RAW 264.7 foram transferidas para placas de cultura de fundo chato (TPP, Switzerland), em triplicatas, com concentração inicial de 2x10⁴ células/poço, e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h para a completa adesão das células no fundo da placa.

Em seguida, as células foram então cultivadas com os peptídeos antimicrobianos (66,6/ 33,3/ 16,6/ 8,3/ 4,1/ 2,0/ 1,0 μ M) em placa de 96 poços como descrito no item acima. Após o período de incubação, o meio de cultura das placas foi removido e 150 μ l de solução de uso de MTT (15 μ l de MTT 5 mg/ml diluídos em 135 μ l de DMEM completo) foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas por 4 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido e 100 μ l da solução de

dimetilformamida/dodecil sulfato de sódio 10% (1:1) foram adicionados em cada poço para dissolver o formazan. A quantificação do formazan foi feita pela medida da absorbância dos poços no comprimento de onda de 570 nm em uma leitora de microplacas.

4.4.5. Dosagem de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de macrófagos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7

A dosagem de NO em sobrenadante de cultura de macrófagos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 foi realizada de acordo com método estabelecido por Griess (134).

Tais ensaios também contaram com a parceria entre nosso laboratório da Universidade de Brasília e a Prof. Dra. Jane Lima dos Santos e sua aluna de doutorado Julyanna Oliveira Castro, no Laboratório de Imunobiologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

As células RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foram cultivadas em DMEM completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino e, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) a 37 °C e 5% de CO₂.

As células RAW 264.7 foram transferidas para placas de cultura de fundo chato (TPP, Switzerland), em triplicatas, com concentração inicial de 5x10⁴ células/poço, e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h para a completa adesão das células no fundo da placa.

Em seguida, as células foram então cultivadas, em diluições seriadas, com os peptídeos antimicrobianos ou com LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma) em placa de 96 poços como descrito no item acima.

Os sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7 foram utilizados na dosagem de NO, uma vez que a célula que produz o óxido nítrico libera-o para o sobrenadante. A concentração de nitrito dos sobrenadantes das culturas foi determinada em placas de cultura de fundo chato (TPP, Switzerland), em triplicatas, onde foram adicionados 50 µl dos sobrenadantes oriundos do tratamento de 24 h das células expostas aos peptídeos antimicrobianos. Em seguida, foram adicionados 50 µl de reagente de Griess [1% sulfanilamida/ 0,1% N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato].

As concentrações de nitrito nos sobrenadantes das culturas foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) com concentrações variando entre 200-0,19

μM . A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (EZ Read 2000 – Biochrom) a 540 nm, e o resultado foi expresso em concentrações de nitrito em micro molar (μM).

4.5. Ensaio hemolítico

Para determinar a capacidade de hemólise dos peptídeos foi utilizado o protocolo descrito por Onuma (135) com algumas modificações.

Eritrócitos de sangue murino, obtidos de um doador sadio, foram separados do plasma por sedimentação e lavados três vezes com tampão NaCl 150 mM contendo Tris-HCl 10 mM pH 7.4. Utilizou-se o mesmo tampão para solubilizar os peptídeos sintéticos e preparar uma solução 1% (v/v) de hemácias. Os peptídeos foram então diluídos serialmente a partir de uma solução estoque de 100 μM e incubados por 1 h à temperatura ambiente com 100 μl da suspensão de eritrócitos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 729 g por 2 min. Uma alíquota de 80 μl de cada sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços de fundo chato (TPP, Switzerland) e a leitura da absorbância realizada a 405 nm em uma leitura de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA).

Para as amostras de referência utilizou-se 100 μl da suspensão de eritrócitos 1% (v/v) incubado com 100 μl de Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de lise e 100 μl da suspensão de eritrócitos 1% (v/v) no mesmo tampão supracitado como referência de 0% de hemólise.

4.6. Dicroísmo circular

O conteúdo das estruturas secundárias dos peptídeos foi estimado por Dicroísmo Circular (CD, do inglês *Circular Dichroism*), em parceria com a Profa. Dra. Sonia Maria de Freitas e a pós-doutoranda Dra. Izadora Cristina Moreira de Oliveira, no Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Brasília (UnB).

Para tal, foi utilizado o espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier, conectado a uma bomba de água (Instrumentos analíticos, Japão).

Os ensaios foram realizados com os peptídeos nas concentrações de 50 μM em água, 35 mM de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*) e 50% de trifluoroetanol (TFE). Os espectros dicroicos foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, na faixa de comprimento de onda distante da luz UV (190-260 nm) com

intervalos de 0,2 nm, taxa de escaneamento de 100 nm/min, tempo de resposta de 0,5 segundos e largura da banda de 0,85 nm, na temperatura de 25 °C. Os resultados foram analisados no software *Spectra Manager II*.

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos a partir da média de cinco leituras consecutivas e a subtração dos valores do sinal dicroico do espectro do solvente, sem a presença do peptídeo, utilizado como branco. As elipticidades (mdeg) obtidas no ensaio foram convertidas em elipticidade molar ($[\theta]$) ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) baseado na massa molecular média calculada por resíduo de 115 Da, segundo a equação 1:

$$[\theta] = 115 \times \alpha / 10 \times C \times l \quad (1)$$

onde, α é o sinal dicroico em mdeg, C é a concentração da amostra (mg.ml^{-1}) e l é o trajeto óptico (cm) da cubeta utilizada.

O conteúdo da estrutura secundária em α -hélice foi estimado considerando os valores de elipticidade molar ($\text{graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) em $\lambda_{222\text{nm}}$ com base na equação 2 (139):

$$fH = ([\theta]_{222} - 3,000) / (-36,000 - 3,000) \quad (2)$$

onde $[\theta]_{222}$ é a elipticidade residual molar média em 222 nm ($\text{graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) e fH é a helicidade fracionária (%).

4.7. Ensaio antioxidante

4.7.1. Ensaio de Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC)

Para determinar a Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC, do inglês Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) foi utilizado o protocolo adaptado de Torre *et al.* (140), com algumas modificações.

O ensaio parte do princípio de que a presença do agente antioxidante neutraliza o radical catiônico ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) através da doação de elétrons ou extração do radical via doação de hidrogênio. O processo é visualizado pela mudança de cor de tons de azul esverdeado ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) para incolor (ABTS^{2-}). A capacidade antioxidante da amostra é comparada com a atividade antioxidante do trolox, um derivado hidrossolúvel de vitamina E.

Em um primeiro momento, foram preparadas as soluções de uso ABTS 7 mM (em penumbra) e Persulfato de Potássio (PP) 140 mM, ambas diluídas em álcool etílico 50%. Em seguida, 17,6 μl de Persulfato de Potássio foram adicionados para cada 1 ml de ABTS

7 mM, no escuro. A solução foi então deixada em temperatura ambiente, no escuro, por 16 horas, até estabilizar. Essa solução dá forma ao radical catiônico ABTS (ABTS^{•+}).

Após 16 horas, o ABTS^{•+} foi diluído em álcool etílico 50% e sua absorbância foi medida em espectrofotômetro a 734 nm, utilizando cubeta de quartzo. Em seguida, o trolox foi pesado e preparado em penumbra, e os peptídeos foram diluídos em álcool etílico 50% e plaqueados em diluição seriada (10 µl por poço) e triplicatas. Para o branco, foram diluídos 10 µl das diferentes concentrações dos peptídeos em 140 µl de álcool etílico 50%, e assim observar se a amostra absorve a 734 nm.

Por último, em penumbra, o controle negativo de atividade antioxidante foi realizado a partir da diluição de 10 µl de álcool etílico 50% em 140 µl de ABTS^{•+} e mais 140 µl de ABTS^{•+} foram adicionados em cada um dos poços contendo os peptídeos. A densidade óptica foi medida em uma leitora CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Offenburg, Alemanha) a 734 nm após 20 minutos de incubação no escuro.

4.8. Análise estatística

Os dados serão analisados quanto as diferenças estatísticas através do teste Anova fator único, com nível de significância de $P < 0,05$ e teste de Tukey como pós-teste utilizando o programa software *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

Todos os valores foram expressos como médias \pm DP (desvio padrão). Os valores significativamente diferentes do controle ($P < 0,05$) estão indicados com o *octothorpe* (#). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

5. RESULTADOS

6. DISCUSSÃO

O crescente aumento de bactérias resistentes aos antibióticos convencionais traz consigo a necessidade de encontrar novas abordagens terapêuticas para o enfrentamento dessa ameaça aos cuidados de saúde. O simples fato dos peptídeos antimicrobianos serem capazes de matar de forma eficaz um amplo espectro de microrganismos, incluindo aqueles que são multirresistentes, indica que seu modo de ação é diferente quando comparado aos antibióticos convencionais (144). E ainda, os AMPs mais curtos são excepcionalmente adequados, pois possuem custos de produção razoáveis e não desencadeiam resposta imune indesejada.

No entanto, ainda que os AMPs já venham sendo aproveitados com sucesso como antibióticos, sua combinação com domínios de ligação de metal é uma abordagem única e amplamente discutida na literatura atualmente. A maioria das sequências ATCUN ocorrem naturalmente em uma variedade de proteínas, o que os torna verdadeiros candidatos a solução de problemas envolvendo os antibióticos.

O presente trabalho propôs então a caracterização química e biológica, por meio de screening inicial, de peptídeos antimicrobianos curtos, desenhados e sintetizados com base nos peptídeos modelo anoplina e hexa 1, que possuam a capacidade de combinar a ação bactericida/bacteriostática com a de formação de ROS a partir do conjugado ATCUN. Foram obtidos quatro pares de peptídeos sintéticos, dois deles análogos à anoplina (ssp1/ssp1-ATCUN e ssp3/ssp3-ATCUN) e outros dois análogos ao modelo hexa 1 (ssp2/ssp2-ATCUN e ssp4/ssp4-ATCUN).

Para a fabricação dos AMPs-ATCUN foi escolhido o motivo VIH, com base no trabalho de Libardo e colaboradores que, ao examinarem diferentes motivos ATCUN, demonstraram que a incorporação da sequência ATCUN Val-Ile-His aos peptídeos anoplina, PAP e sh-buforina resultou em um aumento considerável da atividade antimicrobiana desses peptídeos sobre as cepas de *E. coli*, *E. aerogenes*, *B. subtilis* e *S. epidermidis* devido a produção de ROS nas taxas mais altas (141). Em outro momento, o mesmo motivo também demonstrou ser capaz de aumentar em quatro vezes a atividade de análogos à sh-buforina sobre cepas de *E. coli* e *E. aerogenes* (90).

Quando os AMPs-ATCUN sintéticos foram testados quanto à sua potência contra as espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas, pode-se notar que o ATCUN de fato aumenta a atividade dos análogos em cerca de até oito vezes. Os peptídeos ssp1-

ATCUN e ssp3-ATCUN, baseados na anoplina, demonstraram uma atividade inibitória entre duas a oito vezes melhor que seus análogos ssp1 e ssp3, quando testados contra as espécies bacterianas *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Em relação aos peptídeos baseado no hexa 1, apenas ssp4-ATCUN demonstrou ser capaz de aprimorar em torno de duas vezes a atividade antimicrobiana de seu análogo ssp4 contra as cepas de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Além disso, vale ressaltar aqui que nenhum dos quatro AMPs-ATCUN demonstrou uma atividade antimicrobiana melhorada sobre a cepa de *E. coli*.

Alguns AMPs usam quelação de metal como mecanismos de ação e não envolvem a produção de ROS (145). Nesses casos, a adição de íons metálicos como Cu^{2+} ao meio afeta negativamente sua atividade antimicrobiana (145). Esse não é o caso dos análogos conjugados ao motivo ATCUN testados neste trabalho, pois quando $32 \mu\text{M}$ de íons Cu^{2+} foram deliberadamente adicionados ao meio de crescimento, a atividade antimicrobiana dos derivados de anoplina e hexa 1 contendo o ATCUN foi mantida. Isso pode indicar que a depleção de metais devido a capacidade quelante dos AMPs-ATCUN sintetizados para esse trabalho não é o mecanismo de ação utilizado por esses peptídeos.

Peptídeos conjugados ao ATCUN aproveitam a presença do conjunto de íons cobre lábeis presentes em bactérias que fluem em resposta a estímulos ambientais (146,147). A alta afinidade do motivo ATCUN pelos íons de cobre permite uma competição bem sucedida pelo pool endógeno de cobre (148). Fica claro então que a síntese de agentes bactericidas com dupla ação pode levar ao desenvolvimento de moléculas clinicamente úteis pois, de forma notável, os peptídeos combinados com a produção de ROS são capazes de alcançar uma defesa antimicrobiana aprimorada (149,150).

Os peptídeos sintetizados também foram testados contra cepas do gênero *Candida* para avaliar se há atividade sobre outros microrganismos e se essa atividade pode ser aprimorada pelos AMPs-ATCUN. Os oito peptídeos foram capazes de inibir o crescimento de pelo menos uma das três cepas de fungos *Candida* mas, de todos os resultados obtidos nos ensaios antifúngicos, chama mais atenção aqueles relacionados ao peptídeo ssp3-ATCUN, que demonstrou ser capaz de melhorar a eficácia da atividade inibitória do seu análogo ssp3 sobre as cepas de *C. albicans* e *C. krusei*.

O peptídeo histatina 5, um dos peptídeos básicos presente na parótida humana, possui naturalmente em sua sequência a presença do motivo Asp-Ser-His e é conhecido por sua

atividade antifúngica (97–99). Hemlerhosrt e colaboradores demonstraram que a histatina 5, ao ser direcionada para a mitocôndria de *C. albicans*, é capaz de gerar ROS devido a presença do motivo DSH em sua sequência o que, por conseguinte, leva a morte celular do patógeno devido à oxidação de macromoléculas biológicas e perda da integridade celular (100).

Mais observações são necessárias para entender em qual local específico do patógeno os peptídeos conjugados ao motivo VIH atuam e como isso ocorre. No entanto, apenas o fato de esses peptídeos também serem capazes de inibir o crescimento de diferentes espécies de fungos, além da atividade antimicrobiana já demonstrada, é um excelente resultado na necessidade urgente de desenvolver novos medicamentos antifúngicos, tendo em vista que o acervo de agentes antifúngicos eficazes permanece muito limitado, com apenas três classes de medicamentos disponíveis para terapia sistêmica (os polienos, os triazóis e as equinocandinas), o que contribui para o aumento de cepas de fungos resistentes (151–153).

Quanto a sua citotoxicidade, em um primeiro momento, os peptídeos foram testados contra linhagens celulares de adenocarcinoma mamário MCF-7 e de fibroblasto murino NIH-3T3. A MCF-7 é uma das linhagens celulares de câncer de mama mais comumente utilizadas na pesquisa, pois prova ser a linhagem mais adequada para investigações relacionadas ao câncer de mama, bem como a terapias anticâncer (154). Por outro lado, os fibroblastos são as células mais fundamentais do tecido conjuntivo, responsáveis por sintetizar substâncias básicas e fibras, além de serem capazes de responder à inflamação por meio do recrutamento de células imunes (155,156).

Os peptídeos ssp3, ssp3-ATCUN e ssp4-ATCUN foram capazes de inibir a proliferação de células da linhagem de MCF-7 com valores de IC₅₀ relativamente baixos. No entanto, os peptídeos ssp3 e ssp3-ATCUN foram tóxicos tanto para a linhagem de MCF-7 quanto para a linhagem de NIH-3T3, com um IC₅₀ aumentado e um IC₅₀ muito próximo, respectivamente.

O peptídeo ssp4-ATCUN por sua vez indicou uma possível seletividade em relação às células tumorais, pois apresentou um IC₅₀ de 19,51 µM ao ser testado contra a linhagem MCF-7. O mesmo não foi observado após a incubação do peptídeo com a linhagem de fibroblasto NIH-3T3. Determinadas características que estão geralmente presente nos AMPs, como é o caso da anfipacidade, carga positiva, dentre outras; são responsáveis por favorecer uma interação maior com os fosfolípidios carregados negativamente que estão

presentes na membrana de microrganismos do que com os fosfolipídios neutros (ou “zwireriônicos”) presentes na superfície extracelular das membranas celulares de mamíferos (157). No entanto, diferenças presentes nas membranas de células cancerígenas, que possuem uma quantidade maior de componentes carregados negativamente, como a fosfatidilserina, glicoproteínas e glicolipídios, podem aumentar a atividade dos peptídeos sobre essas células (158).

Vale ressaltar também que o seu análogo ssp4 não foi capaz de inibir a proliferação das células neoplásicas em nenhuma das concentrações testadas, o que supostamente pode apontar para uma melhora da atividade antiproliferativa do AMP-ATCUN devido a presença do motivo em sua sequência. Tal resultado vem possivelmente a somar com o número crescente de trabalhos que têm abordado o uso dos motivos ATCUN no desenvolvimento de novas terapias anticâncer, como é o caso do tripeptídeo Gly-Gly-His (GGH) capaz de aumentar atividade antitumoral já conhecida do ascorbato, inibir o crescimento do tumor ascético de Ehrlich in vitro, e ainda prolongar o tempo de vida de camundongos inoculados com as células neoplásicas (159). Posteriormente, utilizando o mesmo motivo ATCUN, mas dessa vez conjudo aos proto-oncogenes Jun e Fos, Mahmoudi e Sarkar demonstraram a clivagem da proteína ativadora do gene-1 (AP1) no local de consenso [TGA(C/G)TCA] (160). Na presença de Cu(II) ou Ni(II) e do ascorbato o motivo ATCUN é capaz de gerar espécies de oxigênio altamente reativas que são então capazes de clivar o esqueleto fosfodiéster do DNA (161–165).

Yu e colaboradores por sua vez, tendo em vista o DNA telomérico como um novo alvo para o desenvolvimento de drogas anticancerígenas, projetaram um complexo de cobre-acridina-ATCUN (CuGGHK-Acr) para atingir o DNA telomérico G4 (166). A partir do desenvolvimento desse agente de clivagem acoplado a um ATCUN, o grupo demonstrou que CuGGHK-Acr é capaz de encurtar de forma significativa o DNA telomérico o que, conseqüentemente, foi responsável por causar a senescência celular e a apoptose de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 (166).

Em um segundo momento, ainda a fim de avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade, os peptídeos foram testados contra a linhagem RAW 264.7 de monócito-macrófago de camundongo. Nesse caso, os peptídeos ssp2 e ssp2-ATCUN demonstraram ser citotóxicos em baixas concentrações sobre os monócitos-macrófagos da linhagem RAW 264.7, enquanto os peptídeos ssp1-ATCUN e ssp3-ATCUN apresentaram citotoxicidade na maior concentração testada.

As células RAW 264.7 são versáteis, sendo comumente utilizadas em modelos in vitro a fim de realizar a triagem de compostos antiinflamatórios e imunomoduladores. Isso ocorre porque a linhagem celular RAW 264.7 produz uma resposta inflamatória robusta e bem conhecida, especialmente quando desafiada por estimulantes inflamatórios, como o lipopolissacarídeo (LPS), um agonista do receptor Toll-like 4 (TLR4). A estimulação de TLR4 ativa cascatas de sinalização intracelular, que mobiliza fatores de transcrição nuclear, o que acaba levando à produção de mediadores inflamatórios, como por exemplo o óxido nítrico (167–169).

O óxido nítrico (NO) é o biomarcador inflamatório mais comum utilizado na triagem de possível ação antiinflamatória e imunomoduladora de qualquer composto ou medicamento. Ele é produzido após a ação inicial do agente, culminando na indução da óxido nítrico sintase (iNOS) e em sua produção substancial (170,171). Sendo assim, os sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7 também foram incubados com os peptídeos sintetizados a fim de quantificar a produção de óxido nítrico (NO).

Os peptídeos sintetizados, quando em concentrações não citotóxicas, não constituíram estímulo suficiente para induzir a produção de NO. Grandes quantidades de NO podem ter como alvo diversas proteínas e enzimas que são críticas para a sobrevivência e sinalização celular, como no caso de moléculas envolvidas na sinalização de citocinas, algumas proteínas G e fatores de transcrição (172–174). A nitração de cisteínas nestas proteínas pode levar à sua ativação ou inativação. Além disso, o óxido nítrico também possui envolvimento com a regulação e liberação de hormônios responsáveis por controlar o processo inflamatório (175).

Em adição a atividade antimicrobiana e antiproliferativa, os peptídeos sintetizados, inclusive aqueles contendo o motivo ATCUN, apresentaram baixa atividade hemolítica, com hemólise inferior a 10%, sugerindo uma seletividade desses peptídeos para lisar as células de microrganismos em vez de hemácias.

A atividade biológica, assim como a seletividade dos AMPs, se deve a parâmetros físico-químicos como tamanho, carga, helicidade e hidrofobicidade, além dos tamanhos dos seus domínios hidrofílicos e hidrofóbicos (176,177). A maioria dos pares de peptídeos obtidos pela síntese possuem razão hidrofóbica relativamente baixa (entre 43-58%) e valor GRAVY; e a representação da roda helicoidal indicou que os peptídeos apresentam uma grande face apolar rica em aminoácidos leucina e triptofano.

Os peptídeos ssp1/ssp1-ATCUN e ssp3/ssp3-ATCUN, além do tamanho e da hidrofobicidade, também demonstram uma característica própria da classe de peptídeos ao qual o seu modelo anoplina pertence de se adaptarem a uma conformação α -hélice anfipática, apresentando caráter anfifílico essencial para exibir suas atividade biológicas (178–180). Quando examinados quanto a sua estrutura secundária a partir da adição de TFE na concentração final de 50% (v/v) em espectroscopia de dicroísmo circular demonstraram curvas características indicativas de α -hélice. Isso sugere que esses peptídeos adotam uma conformação helicoidal ao interagir com a membrana bacteriana.

Por sua vez, os peptídeos ssp2/ssp2-ATCUN e ssp4/ssp4-ATCUN possuem uma tendência de estruturação em α -hélice quando na presença de SDS e TFE mas com baixa porcentagem de hélice, quando comparados aos demais peptídeos. Os peptídeos ssp2 e ssp4 são constituídos de seis e sete resíduos de aminoácidos, respectivamente, sendo uma sequência de Arg e Trp. Estes resíduos apresentam cadeia lateral longa (R) e dois anéis aromáticos (W), o que pode dificultar o dobramento na conformação em hélice, por impedimento estérico das cadeias laterais (181–183). Além disso, a adição do motivo ATCUN VIH na sequência dos peptídeos ssp2-ATCUN e ssp4-ATCUN também não favorece a formação de hélice.

No entanto, sabe-se que peptídeos contendo em torno três resíduos de triptofano, como no caso dos análogos ssp2/ssp2-ATCUN e ssp4/ssp4-ATCUN, são altamente antimicrobianos mas não tóxicos para células sanguíneas (143,184,185). Provavelmente, a baixa atividade hemolítica desses peptídeos deve-se principalmente ao seu tamanho curto e a sua hidrofobicidade, características que os tornam altamente seletivos para bactérias, pois essas possuem uma proporção maior de fosfolipídios aniônicos em comparação com os fosfolipídios zwitteriônicos das hemácias (186).

Por último, os AMPs foram submetidos a ensaio de capacidade antioxidante equivalente a trolox (TEAC) para avaliar seu potencial antioxidante. Os peptídeos ssp-2/ssp2-ATCUN e ssp4/ssp4-ATCUN foram os únicos que demonstraram algum grau de atividade antioxidante em sua maior concentração testada (100 μ M).

A busca por antioxidantes continua sendo uma área ativa de pesquisa, sendo uma das estratégias a imitação de enzimas naturais, tendo em vista que o estresse oxidativo resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as

vias de proteção é responsável pelo envelhecimento e diversos distúrbios de saúde, incluindo doenças neurodegenerativas ou câncer (187–189).

7. CONCLUSÃO

Neste estudo demonstramos que oito peptídeos antimicrobianos curtos (SPAMs) obtidos a partir da síntese baseada nos peptídeos modelo anoplina e hexa 1 (um dos derivados de lactoferrina) possuem potente atividade bactericida contra os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos aqui testados, em sua grande maioria com MICs em concentrações muito baixas. Ao associar quatro desses peptídeos a um motivo de ligação amino terminal cobre e níquel (ATCUN) foi possível observar que há um aumento da atividade bactericida de duas até oito vezes, dependendo do peptídeo e do patógeno analisados.

Os peptídeos análogos também foram capazes de inibir o crescimento de três cepas do gênero *Candida* em concentrações relativamente baixas na maioria das vezes. Além disso, chama atenção o fato de o peptídeo ssp3 associado ao motivo ATCUN ser capaz de aumentar a atividade fungicida contra as cepas de *C. albicans* e *C. krusei* quando comparado ao seu análogo ssp3 sem o motivo em sua sequência, no entanto, é escasso na literatura relatos sobre a ação antifúngica de peptídeos conjugados a um motivo ATCUN.

Os oito peptídeos apresentaram toxicidade sobre a linhagem de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e também sobre a linhagem de fibroblasto murino (NIH-3T3), sendo que um deles (ssp4-ATCU) indicou uma possível seletividade em relação à linhagem neoplásica. O análogo ssp4, que não contém o motivo ATCUN conjugado a sua sequência, não foi capaz de inibir a proliferação das células neoplásicas em nenhuma das concentrações testadas, o que possivelmente pode apontar para uma melhora da atividade antiproliferativa do peptídeo devido a presença do motivo ATCUN em sua sequência.

Quanto aos monócitos-macrófagos da linhagem RAW 264.7, os peptídeos ssp2 e ssp2-ATCUN demonstraram ser citotóxicos em baixas concentrações, enquanto os peptídeos ssp1-ATCUN e ssp3-ATCUN apresentaram citotoxicidade na maior concentração testada. No entanto, quando em concentrações não citotóxicas, os peptídeos não constituíram estímulo suficiente para induzir a produção de NO.

Em adição a atividade antimicrobiana e antiproliferativa, os peptídeos sintetizados, inclusive aqueles contendo o motivo ATCUN, apresentaram baixa atividade hemolítica,

sugerindo uma seletividade desses peptídeos para lisar as células de microrganismos em vez de hemácias.

Ensaio antioxidantes indicaram que os peptídeos ssp2, ssp2-ATCUN, ssp4 e ssp4-ATCUN são os únicos que demonstraram algum grau de atividade antioxidante em sua maior concentração testada (100 µM).

A seletividade e alta atividade biológica desses peptídeos pode ser atribuída às suas características físico-químicas como a estrutura, hidrofobicidade, cationicidade e por sua capacidade de formarem α -hélice.

Concluindo, os peptídeos sintéticos aqui obtidos demonstram ser excelentes candidatos para uma potencial molécula no desenvolvimento de novos medicamentos anti-infecciosos contra bactérias e fungos, bem como de novos agentes anticancerígenos.

Mais análises serão necessárias para identificação do mecanismo de ação dos peptídeos associados ao motivo ATCUN sobre os microrganismos estudados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Control of infectious diseases, 1990-1999. Morbidity and Mortality Weekly Report. 1999;48(29):621–9.
2. Cossart YE. The rise and fall of infectious diseases: Australian perspectives, 1914-2014. Med J Aust. 2014;201(1 Suppl):S11–4.
3. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. The British Journal of Experimental Biology. 1929;10(3):226–36.
4. Abraham EP, Chain E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. Nature. 1940;146:837-undefined.
5. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2010;74(3):417–33.
6. Blumberg HM, Rimland D, Carroll DJ, Terry P, Wachsmuth IK. Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin-susceptible and -resistant Staphylococcus aureus. J Infect Dis. 1991;163(6):1279–85.

7. Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Nov;30(5):398–408.
8. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 23]. Available from: <https://www.iica.int/pt/node/18560>
9. Organização Mundial da Saúde (OMS). WHO Publishes List of Bacteria Which New Antibiotics are Urgently Needed [Internet]. 2017 [cited 2021 Jun 23]. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
10. Abushaheen MA, Muzaaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*. 2020 Jun 1;66(6).
11. Naylor NR, Atun R, Zhu N, Kulasabanathan K, Silva S, Chatterjee A, et al. Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7:58.
12. Organização Mundial da Saúde (OMS). Antibacterial Agents in Clinical Development: An Analysis of the Antibacterial Clinical Development pipeline, Including Tuberculosis [Internet]. 2017 [cited 2021 Jun 23]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258965>
13. Carrasco-Garrido P, Jiménez-García R, Hernández Barrera V, Gil de Miguel A. Predictive factors of self-medicated drug use among the Spanish adult population. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2008 Feb;17(2):193–9.
14. Lee Ventola C. The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. 2015;40(4):277–83.
15. Duval RE, Grare M, Demoré B. Fight Against Antimicrobial Resistance: We Always Need New Antibacterials but for Right Bacteria. *Molecules*. 2019 Aug 29;24(17).
16. Lewies A, du Plessis LH, Wentzel JF. Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019 Jun 15;11(2):370–81.

17. Charles PGP, Grayson ML. The dearth of new antibiotic development: Why we should be worried and what we can do about it. *Medical Journal of Australia*. 2004 Nov 15;181(10):549–53.
18. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*. 2006 Jun;34(5 SUPPL.):S3–10.
19. Zhou G, Shi QS, Huang XM, Xie XB. The Three Bacterial Lines of Defense Against Antimicrobial Agents. Vol. 16, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2015. p. 21711–33.
20. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. Vol. 95, *Microbial Pathogenesis*. Academic Press; 2016. p. 32–42.
21. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6(DEC).
22. Saiman L, Tabibi S, Starner TD, San Gabriel P, Winokur PL, Hong Peng Jia, et al. Cathelicidin Peptides Inhibit Multiply Antibiotic-Resistant Pathogens from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(10):2838–44.
23. Rosenfeld Y, Barra D, Simmaco M, Shai Y, Mangoni ML. A Synergism between Temporins toward Gram-negative Bacteria Overcomes Resistance Imposed by the Lipopolysaccharide Protective Layer. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Sep 29;281(39):28565–74.
24. Mania D, Hilpert K, Ruden S, Fischer R, Takeshita N. Screening for Antifungal Peptides and Their Modes of Action in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Nov;76(21):7102–8.
25. Kalfa VC, Jia HP, Kunkle RA, McCray J, Tack BF, Brogden KA. Congeners of SMAP29 Kill Ovine Pathogens and Induce Ultrastructural Damage in Bacterial Cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(11):3256–61.
26. Linde CMA, Hoffner SE, Refai E, Andersson M. In vitro activity of PR-39, a proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;47:575–80.

27. Hilpert K, Volkmer-Engert R, Walter T, Hancock REW. High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat Biotechnol.* 2005 Aug;23(8):1008–12.
28. Powers JPS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides (NY).* 2003;24(11):1681–91.
29. Mangoni ML, Ludovica Marcellini HG, Simmaco M. Biological characterization and modes of action of temporins and bombinins H, multiple forms of short and mildly cationic anti-microbial peptides from amphibian skin. *Journal of Peptide Science.* 2007 Sep;13(9):603–13.
30. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;19(3):491–511.
31. Hancock REW, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett [Internet].* 2002;206:143–9. Available from: www.fems-microbiology.org
32. Hancock REW, Chapple DS. Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy .* 1999;43(6):1317–23.
33. Fernández-Vidal M, Jayasinghe S, Ladokhin AS, White SH. FOLDING AMPHIPATHIC HELICES INTO MEMBRANES: AMPHIPHILICITY TRUMPS HYDROPHOBICITY. *J Mol Biol.* 2007;370(3):459–70.
34. Brown KL, Hancock REW. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol.* 2006 Feb;18(1):24–30.
35. Mishra AK, Choi J, Moon E, Baek KH. Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides. *Molecules.* 2018;23(4).
36. Browne K, Chakraborty S, Chen R, Willcox MDP, Black DS, Walsh WR, et al. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 1;21(19):1–23.
37. Morgera F, Antcheva N, Pacor S, Quaroni L, Berti F, Vaccari L, et al. Structuring and interactions of human β -defensins 2 and 3 with model membranes. *Journal of Peptide Science.* 2008 Apr;14(4):518–23.
38. Wang G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Nov 21;283(47):32637–43.

39. Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Current Biology*. 2016 Jan 11;26(1):R14–9.
40. Fox JL. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nat Biotechnol*. 2013;31(5):379–82.
41. Wang G, Li X, Wang Z. The antimicrobial peptide database [Internet]. [cited 2021 Jun 23]. Available from: <https://wangapd3.com/main.php>
42. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1087–93.
43. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1999;1462:55–70. Available from: www.elsevier.com/locate/bba
44. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1999;1462:1–10. Available from: www.elsevier.com/locate/bba
45. Huang HW. Action of antimicrobial peptides: Two-state model. *Biochemistry*. 2000 Jul 25;39(29):8347–52.
46. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* [Internet]. 2002;415. Available from: www.nature.com
47. Brogden KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005 Mar;3(3):238–50.
48. Sengupta D, Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2008 Oct;1778(10):2308–17.
49. Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and Its Fluorescently Labeled Analogues with Phospholipid Membranes? *Biochemistry*. 1992;31:12416–23.
50. Shai Y, Oren Z. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides (NY)* [Internet]. 2001;22:1629–41. Available from: <http://www.bbc->

51. Kragol G, Hoffmann R, Chattergoon MA, Lovas S, Cudic M, Bulet P, et al. Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrolicorin. *Eur J Biochem.* 2002;269(17):4226–37.
52. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals.* 2013 Nov 28;6(12):1543–75.
53. Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;160:91–6.
54. Yan J, Wang K, Dang W, Chen R, Xie J, Zhang B, et al. Two hits are better than one: Membrane-active and DNA binding-related double-action mechanism of NK-18, a novel antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):220–8.
55. Otvos L, Insug O, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, et al. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry.* 2000 Nov 21;39(46):14150–9.
56. Park CB, Kim HS, Kim SC. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Bufenin II: Bufenin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;244:253–7.
57. Brötz H, Bierbaum G, Leopold K, Reynolds PE, Sahl HG. The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(1):154–60.
58. Lee B, Hwang JS, Lee DG. Antibacterial action of lactoferricin B like peptide against *Escherichia coli*: reactive oxygen species-induced apoptosis-like death. *J Appl Microbiol.* 2020 Aug 1;129(2):287–95.
59. Fleming A, Allison VD. Observations on a bacteriolytic substance (“Lysozyme”) found in secretions and tissues. *The British Journal of Experimental Pathology.* 1922;3(5):252–60.
60. Dubos RJ. Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil Bacillus. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 1939;70:1–10. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/70/1/1/1140819/1.pdf>
61. Landy M, Warren GH, Rosenman SB, Colio LG. Bacillomycin: An Antibiotic from *Bacillus subtilis* Active against Pathogenic Fungi.

- Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1948;67(4):539–41.
62. Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. Vol. 55, Journal of Microbiology. Microbiological Society of Korea; 2017.
 63. Mor A, Chartrelt N, Vaudryt H, Nicolas P. Skin peptide tyrosine-tyrosine, a member of the pancreatic polypeptide family: Isolation, structure, synthesis, and endocrine activity. Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 1994;91:10295–9. Available from: <https://www.pnas.org>
 64. Vouldoukis I, Shai Y, Nicolas P, Mor A. Broad spectrum antibiotic activity of skin-PYY. FEBS Lett. 1996 Feb 19;380(3):237–40.
 65. Santana CJC, Magalhães ACM, Dos Santos Júnior ACM, Ricart CAO, Lima BD, Álvares A da CM, et al. Figainin 1, a novel amphibian skin peptide with antimicrobial and antiproliferative properties. Antibiotics. 2020 Sep 1;9(9):1–14.
 66. Xue XF, Han FF, Gao YH, Liu YF, Xia X, Wang YZ. In vitro Detections of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Porcine B-defensins. Journal of Agricultural Biotechnology. 2012;20(11):1291–9.
 67. Li J, Koh JJ, Liu S, Lakshminarayanan R, Verma CS, Beuerman RW. Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design. Front Neurosci. 2017 Feb 14;11(FEB).
 68. Raheem N, Straus SK. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. Front Microbiol. 2019 Dec 12;10.
 69. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. Science (1979). 2020 May 1;368(6490).
 70. Nam J, Yun H, Rajasekaran G, Kumar SD, Kim J II, Min HJ, et al. Structural and Functional Assessment of mBjAMP1, an Antimicrobial Peptide from Branchiostoma japonicum, Revealed a Novel α -Hairpinin-like Scaffold with Membrane Permeable and DNA Binding Activity. J Med Chem. 2018 Dec 27;61(24):11101–13.

71. Irazazabal LN, Porto WF, Fensterseifer ICM, Alves ESF, Matos CO, Menezes ACS, et al. Fast and potent bactericidal membrane lytic activity of PaDBS1R1, a novel cationic antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019 Jan 1;1861(1):178–90.
72. Hu F, Wu Q, Song S, She R, Zhao Y, Yang Y, et al. Antimicrobial activity and safety evaluation of peptides isolated from the hemoglobin of chickens. *BMC Microbiol.* 2016 Dec 5;16(1).
73. Hancock REW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases.* 2001;1:156–64.
74. da Costa JP, Cova M, Ferreira R, Vitorino R. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 Feb 19;99(5):2033–40.
75. Rodríguez-Rojas A, Makarova O, Rolff J. Antimicrobials, Stress and Mutagenesis. *PLoS Pathog.* 2014 Oct 1;10(10).
76. Gough M, Hancock REW, Kelly NM. Antiendotoxin Activity of Cationic Peptide Antimicrobial Agents. *Infect Immun.* 1996;64(12):4922–7.
77. Blondelle SE, Houghten RA. Design of Model Amphipathic Peptides Having Potent Antimicrobial Activities. *Biochemistry.* 1992;31(50):12688–94.
78. Deslouches B, Phadke SM, Lazarevic V, Cascio M, Islam K, Montelaro RC, et al. De novo Generation of Cationic Antimicrobial Peptides: Influence of Length and Tryptophan Substitution on Antimicrobial Activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jan;49(1):316–22.
79. Kerns R, Dong SD, Fukuzawa S, Carbeck J, Kohler J, Silver L, et al. The Role of Hydrophobic Substituents in the Biological Activity of Glycopeptide Antibiotics. *J Am Chem Soc.* 2000 Dec 20;122(50):12608–9.
80. Wenzel M, Chiriac AI, Otto A, Zweytick D, May C, Schumacher C, et al. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(14).
81. Neupane KP, Aldous AR, Kritzer JA. Metal-binding and redox properties of substituted linear and cyclic ATCUN motifs. *J Inorg Biochem.* 2014;139:65–76.

82. Libardo MDJ, Nagella S, Lugo A, Pierce S, Angeles-Boza AM. Copper-binding tripeptide motif increases potency of the antimicrobial peptide Anoplin via Reactive Oxygen Species generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2;456(1):446–51.
83. Sóvágó I, Osz K. Metal ion selectivity of oligopeptides. *Dalton Transactions.* 2006;(32):3841–54.
84. Jin Y, Cowan JA. DNA cleavage by copper-ATCUN complexes. Factors influencing cleavage mechanism and linearization of dsDNA. *J Am Chem Soc.* 2005 Jun 15;127(23):8408–15.
85. Jin Y, Lewis MA, Gokhale NH, Long EC, Cowan JA. Influence of stereochemistry and redox potentials on the single- and double-strand DNA cleavage efficiency of Cu(II)- and Ni(II)-Lys-Gly-His- derived ATCUN metallopeptides. *J Am Chem Soc.* 2007 Jul 4;129(26):8353–61.
86. Fang YY, Claussen CA, Lipkowitz KB, Long EC. Diastereoselective DNA cleavage recognition by Ni(II)-Gly-Gly-His- derived metallopeptides. *J Am Chem Soc.* 2006 Mar 15;128(10):3198–207.
87. Fang YY, Ray BD, Claussen CA, Lipkowitz KB, Long EC. Ni(II)-Arg-Gly-His-DNA Interactions: Investigation into the Basis for Minor-Groove Binding and Recognition. *J Am Chem Soc.* 2004 May 5;126(17):5403–12.
88. Liang Q, Ananias DC, Long EC. Ni(II)-Xaa-Xaa-His Induced DNA Cleavage: Deoxyribose Modification by a Common “Activated” Intermediate Derived from KHSO₅, MMPP, or H₂O₂. *J Am Chem Soc.* 1998;120:248–57.
89. Angeles-Boza AM. ATCUN-AMPs [Internet]. [cited 2021 Jul 7]. Available from: <https://angeles-boza.chemistry.uconn.edu/atcun-amps/#>
90. Libardo MDJ, Paul TJ, Prabhakar R, Angeles-Boza AM. Hybrid peptide ATCUN-sh-Buforin: Influence of the ATCUN charge and stereochemistry on antimicrobial activity. *Biochimie.* 2015 Jun 1;113:143–55.
91. Libardo MDJ, Gorbatyuk VY, Angeles-Boza AM. Central Role of the Copper-Binding Motif in the Complex Mechanism of Action of Ixosin: Enhancing Oxidative Damage and Promoting Synergy with Ixosin B. *ACS Infect Dis.* 2016 Jan 8;2(1):71–81.

92. Soldevila-Barreda JJ, Sadler PJ. Approaches to the design of catalytic metallodrugs. *Curr Opin Chem Biol.* 2015 Apr 1;25:172–83.
93. Agbale CM, Cardoso MH, Galyuon IK, Franco OL. Designing metallodrugs with nuclease and protease activity. *Metallomics.* 2016 Nov 1;8(11):1159–69.
94. Alexander JL, Thompson Z, Yu Z, Cowan JA. Cu-ATCUN Derivatives of Sub5 Exhibit Enhanced Antimicrobial Activity via Multiple Modes of Action. *ACS Chem Biol.* 2019 Mar 15;14(3):449–58.
95. Fung DKC, Lau WY, Chan WT, Yan A. Copper efflux is induced during anaerobic amino acid limitation in *Escherichia coli* to protect iron-sulfur cluster enzymes and biogenesis. *J Bacteriol.* 2013;195(20):4556–68.
96. Pham AN, Xing G, Miller CJ, Waite TD. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *J Catal.* 2013 May;301:54–64.
97. Melino S, Gallo M, Trotta E, Mondello F, Paci M, Petruzzelli R. Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. *Biochemistry.* 2006 Dec 26;45(51):15373–83.
98. Cabras T, Patamia M, Melino S, Inzitari R, Messana I, Castagnola M, et al. Pro-oxidant activity of histatin 5 related Cu(II)-model peptide probed by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 22;358(1):277–84.
99. Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B. Histatins: Salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs Perspectives for biomedical applications. *FEBS Journal.* 2014;281(3):657–72.
100. Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG, Robbins PW. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet].* 2001;98(25):14637–42. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.141366998
101. Subramanian S, Ross NW, MacKinnon SL. Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Marine Biotechnology.* 2009 Nov;11(6):748–57.

102. Cantisani M, Leone M, Mignogna E, Kampanaraki K, Falanga A, Morelli G, et al. Structure-activity relations of myxinidin, an antibacterial peptide derived from the epidermal mucus of hagfish. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Nov;57(11):5665–73.
103. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol.* 2017 Jun 1;133:117–38.
104. Álvarez CA, Guzmán F, Cárdenas C, Marshall SH, Mercado L. Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish Shellfish Immunol.* 2014 Apr 30;41(1):93–101.
105. Ganz T. Hepcidin - A regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18(2 SPEC. ISS.):171–82.
106. Maisetta G, Petruzzelli R, Brancatisano FL, Esin S, Vitali A, Campa M, et al. Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: Effect of copper and acidic pH. *Peptides (NY).* 2010 Nov;31(11):1995–2002.
107. Melino Garlando M Patamia M Paci R Petruzzelli SL, Melino S, Garlando L, Paci M, ÔÔTor VergataÕÕ R, Patamia IM, et al. A metal-binding site is present in the amino terminal region of the bioactive iron regulator hepcidin-25. *J Peptide Res.* 2006;65–71.
108. Jeżowska-Bojczuk M, Stokowa-Sołtys K. Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. *Eur J Med Chem.* 2018 Jan 1;143:997–1009.
109. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 May;12(5):371–87.
110. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature.* 2015 Jan 22;517(7535):455–9.
111. Coates AR, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? LINKED ARTICLES. 2011; Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.2011.163.issue-1>

112. Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol.* 2018 Feb 1;49:23–8.
113. Hancock REW, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology.* 1998;16(2):82–8.
114. Hancock REW, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006 Dec;24(12):1551–7.
115. Roboz GJ. Current treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2012 Nov;24(6):711–9.
116. Pisa R, Kapoor TM. Chemical strategies to overcome resistance against targeted anticancer therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2020 Aug 1;16(8):817–25.
117. Vallabhaneni S, Mody RK, Walker T, Chiller T. The Global Burden of Fungal Diseases. *Infect Dis Clin North Am.* 2016 Mar 1;30(1):1–11.
118. Ginsburg I, Koren E. Are cationic antimicrobial peptides also “double-edged swords”? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008 Aug;6(4):453–62.
119. Ramesh S, Govender T, Kruger HG, de la Torre BG, Albericio F. Short AntiMicrobial Peptides (SPAMs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *Journal of Peptide Science.* 2016 Jul 1;22:438–51.
120. Libardo MDJ, Nagella S, Lugo A, Pierce S, Angeles-Boza AM. Copper-binding tripeptide motif increases potency of the antimicrobial peptide Anoplin via Reactive Oxygen Species generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2;456(1):446–51.
121. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Analysis Tools on the ExPASy Server. In: *The Proteomics Protocols Handbook* [Internet]. 2005. p. 571–607. Available from: <http://www.expasy.org/tools/>.
122. Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of protein from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis.* 1994;15(1):529–39.

123. Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasqueli C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, et al. The focusing of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*. 1993;14:1023–31.
124. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Web Server issue):W597–600.
125. Mól AR, Castro ;, Fontes ; NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections. *bioRxiv* [Internet]. 2018;1–7. Available from: <https://doi.org/10.1101/416347>
126. Zheng W, Zhang C, Li Y, Pearce R, Bell EW, Zhang Y. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Reports Methods*. 2021 Jul 26;1(3):1–14.
127. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2014 Jan 1;12(1):7–8.
128. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W174–81.
129. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(SUPPL. 1):D933–7.
130. Wang Z, Wang G. APD: The antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(DATABASE ISS.):D590–2.
131. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1087–93.
132. Anvisa. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. 2003.
133. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63.

134. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [¹⁵N]Nitrate in Biological Fluids. *Anal Biochem.* 1982;126:1–138.
135. Onuma Y, Satake M, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, et al. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon.* 1999;37:55–65.
136. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5):715S-725S.
137. Zhang YM, Marrakchi H, Rock CO. The fabR (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 May 3;277(18):15558–65.
138. Hong R, Kang TY, Michels CA, Gadura N. Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Mar;78(6):1776–84.
139. Corrêa D, Henrique C, Ramos I, Corrêa DHA, Ramos CHI. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research [Internet].* 2009;3(5):164–73. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJBR>
140. Torres P, Santos J, Chow F, Santos D. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo [Internet]. 2017;1–4. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/324452636>
141. Libardo MD, Cervantes JL, Salazar JC, Angeles-Boza AM. Improved bioactivity of antimicrobial peptides by addition of amino-terminal copper and nickel (ATCUN) binding motifs. *ChemMedChem.* 2014;9(8):1892–901.
142. Konno K, Hisada M, Fontana aYb R, Lorenzi bYd CC, Naoki H, Itagaki Y, et al. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim Biophys Acta [Internet].* 2001;1550:70–80. Available from: www.bba-direct.com
143. Strøm MB, Rekdal Ø, Svendsen JS. Antimicrobial activity of short arginine- and tryptophan-rich peptides. *Journal of Peptide Science.* 2002;8(8):431–7.
144. Pathan FK, Venkata DA, Panguluri SK. Recent Patents on Antimicrobial Peptides. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2010;4:10–6.

145. Silva FD, Rezende CA, Rossi DCP, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, et al. Structure and Mode of Action of Microplusin, a Copper II-chelating Antimicrobial Peptide from the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Dec;284(50):34735–46.
146. Rubino JT, Franz KJ. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function. *J Inorg Biochem*. 2012;107(1):129–43.
147. Wayne Outten F, Munson GP. Lability and liability of endogenous copper pools. *J Bacteriol*. 2013;195(20):4553–5.
148. Harford C, Sarkar B. Amino Terminal Cu(II)-and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties. *Acc Chem Res*. 1997;30:123–30.
149. Liu Z, Cai Y, Young AW, Totsingan F, Jiwrajka N, Shi Z, et al. OH radical production stimulated by (RW)4D, a synthetic antimicrobial agent and indolicidin. *Medchemcomm*. 2012 Dec;3(12):1548–54.
150. Pokrovskaya V, Baasov T. Dual-acting hybrid antibiotics: A promising strategy to combat bacterial resistance. *Expert Opin Drug Discov*. 2010 Sep;5(9):883–902.
151. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* (1979) [Internet]. 2018;360:739–42. Available from: <https://www.science.org>
152. Lestrade PP, Bentvelsen RG, Schauwvlieghe AFAD, Schalekamp S, Van Der Velden WJFM, Kuiper EJ, et al. Voriconazole resistance and mortality in invasive aspergillosis: A multicenter retrospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*. 2019 Apr 24;68(9):1463–71.
153. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infect Dis*. 2019 Mar 15;6:S79–94.
154. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015;35:3147–54.

155. Rahimi AM, Cai M, Hoyer-Fender S. Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line. *Cells*. 2022 Sep 1;11(17).
156. Sahinturk V, Kacar S, Vejselova D, Kutlu HM. Acrylamide exerts its cytotoxicity in NIH/3T3 fibroblast cells by apoptosis. *Toxicol Ind Health*. 2018 Jul 1;34(7):481–9.
157. Matsuzaki K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2009 Aug;1788(8):1687–92.
158. Huang Y, Feng Q, Yan Q, Hao X, Chen Y. Alpha-Helical Cationic Anticancer Peptides: A Promising Candidate for Novel Anticancer Drugs. *Mini-Reviews in Medical Chemistry [Internet]*. 2015;15:73–81. Available from: <http://aps.unmc.edu/>
159. Kimoto E, Tanaka H, Gytoku J, Morishige F, Pauling L. Enhancement of Antitumor Activity of Ascorbate against Ehrlich Ascites Tumor Cells by the Copper:Glycylglycylhistidine complex. *Cancer Res [Internet]*. 1983;43:824–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/43/2/824><http://cancerres.aacrjournals.org/content/43/2/824#related-urls>
160. Mahmoudi T, Sarkar B. Addition of positively charged tripeptide to N-terminus of the Fos basic region leucine zipper domain: Implications on DNA bending, affinity, and specificity. *Biopolymers*. 1999 Sep;50(3):273–86.
161. Mack DP, Dervan PB. Sequence-Specific Oxidative Cleavage of DNA by a Designed Metalloprotein, Ni(II)-GGH(Hin 139-190). *Biochemistry [Internet]*. 1992;31:9399–405. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
162. Nagaoka M, Hagihara M, Kuwahara J, Segiura Y. A Novel Zinc Finger-Based DNA Cutter: Biosynthetic Design and Highly Selective DNA Cleavage. *American Chemical Society [Internet]*. 1994;116(9):4085–6. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
163. Mack DP, Dervan PB. Nickel-Mediated Sequence-Specific Oxidative Cleavage of DNA by a Designed Metalloprotein. *American Chemical Society*. 1990;112(11).

164. Chiou SH. DNA-and Protein-Scission Activities of Ascorbate in the Presence of Copper Ion and a Copper-Peptide Complex. *J Biochem.* 1983;94:1259–67.
165. Harford C, Narindrasorasak S, Sarkar B. The Designed Protein M(II)-Gly-Lys-His-Fos(138-211) Specifically Cleaves the AP-1 Binding Site Containing DNA. *Biochemistry [Internet]*. 1996;35:4271–8. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
166. Yu Z, Han M, Cowan JA. Toward the design of a catalytic metallodrug: Selective cleavage of G-quadruplex telomeric DNA by an anticancer copper-acridine-atcun complex. *Angewandte Chemie - International Edition.* 2015 Feb 9;54(6):1901–5.
167. Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One.* 2018 Jun 1;13(6).
168. Lawrence T. The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6).
169. Elisia I, Pae HB, Lam V, Cederberg R, Hofs E, Krystal G. Comparison of RAW264.7, human whole blood and PBMC assays to screen for immunomodulators. *J Immunol Methods.* 2018 Jan 1;452:26–31.
170. Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2017 Sep 1;93:370–5.
171. Saha BK, Burns SL. The Story of Nitric Oxide, Sepsis and Methylene Blue: A Comprehensive Pathophysiologic Review. *Southern Society for Clinical Investigation [Internet]*. 2020;1–9. Available from: www.amjmedsci.com
172. Moilanen E, Vapaatalo H. Special Section: Nitric Oxide in Medicine Nitric Oxide in Inflammation and Immune Response. *Ann Med.* 1995;27:359–67.
173. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response NO production in the immune system. *Nat Immunol [Internet]*. 2001;2:907–16. Available from: <http://immunol.nature.com>
174. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol [Internet]*. 2001;1:1397–406. Available from: www.elsevier.com/locate/intimp

175. Givalois L, Li S, Pelletier G. Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult male rats. *Molecular Brain Research* [Internet]. 2002;102:1–8. Available from: www.elsevier.com/locate/bres
176. B. Guimarães A, J.Q. Costa F, R.P. Júnior O, Fontes W, S. Castro M. The Amazing World of Peptide Engineering: the Example of Antimicrobial Peptides from Frogs and Their Analogues. *Protein Pept Lett*. 2016 Jul 30;23(8):722–37.
177. Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1999;1462:71–87. Available from: www.elsevier.com/locate/bba
178. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1999;1462:1–10. Available from: www.elsevier.com/locate/bba
179. Oren Z, Shai Y. Mode of Action of Linear Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biopoly*. 1998;47:451–63.
180. Matsuzaki K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1376:391–400.
181. Haney EF, Petersen AP, Lau CK, Jing W, Storey DG, Vogel HJ. Mechanism of action of puoroindoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2013;1828(8):1802–13.
182. Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2006 Sep;1758(9):1184–202.
183. Nguyen LT, Chau JK, Perry NA, de Boer L, Zaat SAJ, Vogel HJ. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS One*. 2010;5(9):1–8.
184. Bechinger B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1999;1462:157–83. Available from: www.elsevier.com/locate/bba

185. Strøm MB, Rekdal Ø, Svendsen JS. The effects of charge and lipophilicity on the antibacterial activity of undecapeptides derived from bovine lactoferricin. *Journal of Peptide Science*. 2002;8(1):36–43.
186. Verkleij AJ, Zwaal RFA, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, Van Deenen LLM. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1973;323:178–93.
187. Sies H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr Opin Toxicol*. 2018 Feb;7:122–6.
188. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press; 2015.
189. Alfadda AA, Sallam RM. *Reactive Oxygen Species in Health and Disease*. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012.