



# UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PATOLOGIA MOLECULAR

CENTRO DE ANÁLISES PROTEÔMICAS E BIOQUÍMICAS- UCB

## *Mestrado*

AVALIAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE VARIANTES  
SINTÉTICOS DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DO TIPO HAIRPIN  
MBP-1

**Autor: Daniel Amaro Sousa**

**Orientador: Octávio Luiz Franco**

**BRASÍLIA**

**2012**

**DANIEL AMARO SOUSA**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE VARIANTES  
SINTÉTICOS DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DO TIPO HAIRPIN  
MBP-1**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Molecular da Universidade  
de Brasília, como requisito para  
obtenção de Título de Mestre em  
Patologia Molecular.

Orientador: Octávio Luiz  
Franco

Brasília

2012

Dissertação de Mestrado de autoria de Daniel Amaro Sousa intitulada “AVALIAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE VARIANTES SINTÉTICOS DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DO TIPO HAIRPIN MBP-1”, apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, em 8 de fevereiro de 2012, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Dr. Octávio Luiz Franco  
Universidade Católica de Brasília  
Orientador

Dra. Patrícia Barbosa Pelegrini  
Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Examinadora

Dra. Maria Sueli Soares Felipe  
Universidade de Brasília  
Examinadora

Brasília

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 997789.

S725a Sousa, Daniel Amaro.  
Avaliação funcional e estrutural de variantes sintéticos do peptídeo antimicrobiano do tipo Hairpin MBP-1 / Daniel Amaro Sousa. -- 2012.  
73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, 2012.

Inclui bibliografia.

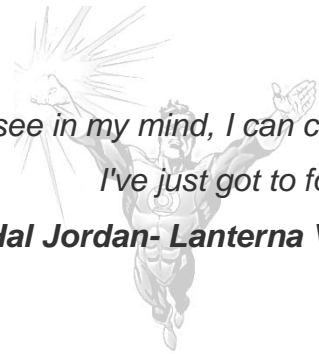
Orientação: Octávio Luiz Franco.

1. Agentes anti-infecciosos. 2. Peptídeos. 3. Bioquímica clínica. I. Franco, Octávio Luiz. II. Título.

CDU 615.03

*" Anything I see in my mind, I can create.  
I've just got to focus."*

**Hal Jordan- Lanterna Verde**



## **AGRADECIMENTO**

Ao meu orientador, Dr. Octávio Luiz Franco, pela oportunidade, confiança, orientação e pela dedicação em corrigir este trabalho;

À Simone Maria Neto, minha co-orientadora de Iniciação Científica, a Fábio Teles Costa, por me conduzir nos primeiros passos no laboratório e a Maria Zaban Silva, minha orientanda em Iniciação Científica, pela contribuição nos experimentos;

Ao Renato Goulart de Almeida, grande amigo, pela contribuição científica e por dividir alegrias e tristezas ao longo dos anos no laboratório;

À minha namorada, Isabel Cristina Marques Fensterseifer, por ter me apoiado, compreendido e suportado em todos os momentos.

Aos meus pais, Nilsete Amaro Costa Sousa e José Lima de Sousa, e minhas irmãs, Alyne, Alycia e Anyelle, por acreditarem em mim e me apoiarem nas minhas escolhas, e pelo exemplo de dedicação.

À Josefa Coelho Marques e Romeo Fensterseifer, pela credibilidade e apoio prestados.

Em especial ainda à Beatriz Simas, Willian Farias Porto, Michelle Flaviane Soares Pinto, Ludovico Migliolo, Osmar Nascimento, Taia Rezende, Mirna de Souza Freire e Nelson Gomes Jr. pelo suporte aos experimentos e acompanhamento.

A Kênia Chaves pelo suporte e dedicação, como técnica no CAPB.

Aos demais amigos do CAPB e UnB, inclusive os que agora estão em outros locais, pois todos tiveram importância para que este projeto fosse realizado.

Ao Daniel Rigden, Universidade de Liverpool, pela colaboração em bioinformática.

Ao Sensei Jorge Kishikawa, do instituto Niten, tão bem representado em Brasília por Ricardo Lopes, Patrick Lopes e Silvana Lopes, pelos valores ensinados e suporte espiritual;

A quaisquer outros que embora não citados, tenham participado desta caminhada;

**O mais sincero sentimento de gratidão.**

## RESUMO

A escassez de novas ferramentas para controle dos agentes microbianos responsáveis por infecções humanas consiste em um grande desafio nos dias atuais. Muitas pesquisas têm sido focadas na busca e caracterização de peptídeos antimicrobianos, categorizados como modelos promissores de novos fármacos antinfeciosos. Neste sentido as plantas constituem um amplo campo de descoberta para novos peptídeos, que podem ser usados como uma ferramenta para a produção biotecnológica de novos compostos. O peptídeo MBP-1 (*Maize Basic Peptide*), anteriormente relatado em sementes de milho, faz parte de uma classe de peptídeos antimicrobianos (*hairpin-like*) que tem chamado atenção devido a um novo tipo de enovelamento descrito, caracterizado pela presença de duas hélices conectadas entre si por duas pontes dissulfeto. Desta forma neste trabalho, o peptídeo MBP-1 foi sintetizado quimicamente e sua atividade antimicrobiana avaliada. O mesmo se apresentou efetivo contra as bactérias Gram-negativas patogênicas humanas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas foi ineficiente contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, assim como contra o fungo *Aspergillus fumigatus*. O peptídeo apresentou ainda baixa atividade hemolítica nas concentrações testadas. Foram realizados testes com variantes sintéticos do MBP-1 que tiveram suas cisteínas ou triptofano substituídos por alanina a fim de melhor entender seu mecanismo de ação. Este teste demonstrou que a ausência de cisteínas ou triptofano diminui ou anula a atividade do peptídeo, evidenciando assim a importância destes resíduos para atividade. Ao relacionar as atividades de cada peptídeo com os modelos gerados por homologia, pode-se notar que a estabilização das porções terminais das  $\alpha$ -hélices por uma ponte dissulfeto parece ser mais importante para atividade bactericida do que estabilizar o interior da molécula. Em geral, estes resultados são úteis para compreensão de algumas características necessárias a atividade do peptídeo MBP-1 e possivelmente dos peptídeos *hairpin-like*, contribuindo assim com aplicações futuras em ferramentas biotecnológicas que possam ser usadas no tratamento de infecções.

**Palavras Chave:** Peptídeos Antimicrobianos, MBP-1, Hemolítico, Peptídeo sintético, *Hairpin-like*.

## ABSTRACT

The lack of novel tools for microbial agents control responsible for human infections consists of a great challenge today. Currently, many researches have been focused on the search and characterization of antimicrobial peptides, which have been classified as models for innovative promising anti-infective drugs. In this sense, the plants provide a wide contribution to the field of discovery for unusual peptides that can be used as tools for biotechnological products. The MBP-1 (Maize Basic Peptide), previously reported in corn, is part of a class of antimicrobial peptides (hairpin-like) that has drawn attention due to a new type of folding recently described, characterized by the presence of two  $\alpha$ -helices connected by two disulfide bonds. Thus, in this work, the MBP-1 was chemically synthesized and its functional characterization activity was further performed. The MBP-1 was active against Gram-negative human pathogenic *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* but was ineffective against the Gram-positive *S. aureus*, as well as against the fungus *A. fumigatus*. The peptide also presented low hemolytic activity at evaluated concentrations. Furthermore, bioassays were performed with MBP-1 synthetic variants that had their cysteines or tryptophan replaced by alanine, in order to better understand the peptide mechanism of action. Those assays demonstrated that the absence of cysteine or tryptophan reduces or suppresses the antimicrobial peptide activity, thus evidencing the importance of these residues for bactericidal activity. By linking the activities of each peptide with the three-dimensional models generated by homology modeling, it can be noted that the stabilization of the terminal portions of  $\alpha$ -helices with a disulfide bond seems to be more important for bactericidal activity than to stabilize the interior of the molecule. In general, these results here presented could be useful for a better understanding of some features necessary for activity of MBP-1 and possibly for the hairpin-like peptides, thus contributing to future applications in biotechnology tools that could be used to treat infections.

**Palavras Chave:** Antimicrobial Peptide, MBP-1, Synthetic peptide, Hemolysis, Hairpin-like.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.1	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE .....	9
1.2	ANTIBIÓTICOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	12
1.3	A BUSCA POR NOVOS ANTIBIÓTICOS .....	17
1.4	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	21
1.5	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS .....	24
1.6	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS <i>HAIRPIN-LIKE</i> .....	27
1.7	MECANISMOS DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS .	30
1.8	CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: PONTES DISSULFETO E EXPOSIÇÃO DO TRIPTOFANO. .	32
1.9	APLICAÇÃO CLÍNICA DOS PAMS .....	35
<b>1</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	SÍNTESE E ENVELAMENTO DO PEPTÍDEO BÁSICO DE MILHO (MBP-1) E SUAS VARIANTES .....	40
4.2	QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA .....	41
4.3	ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	41
4.4	BIOENSAIO CONTRA BACTÉRIAS.....	42
4.5	BIOENSAIO CONTRA FUNGOS.....	43
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	43
4.7	MODELAGEM MOLECULAR .....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

As Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IrAS), são causadas por uma grande variedade de bactérias, fungos e vírus, principalmente em ambientes hospitalares. Entretanto, estas bactérias podem ser encontradas em todos os locais onde há assistência ao paciente, envolvendo sistemas de não internação, como enfermarias, ambulatórios e consultórios, manifestando-se durante a internação ou até mesmo após a alta e podendo se relacionar com a internação ou com procedimentos hospitalares (ANVISA, 2004b).

Dentre os diversos fatores associados, pode-se relacionar o surgimento de IrAS à falta de formação e conhecimento adequado dos profissionais de saúde bem como ao descumprimento de normas por parte dos pacientes (ANVISA, 2004b). Os principais grupos de risco para IrAS consistem em pacientes imunodeprimidos com baixa resistência normalmente associada à idade, portando doenças graves, que estão em pós-operatório e principalmente os pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (YNGSTROM *et al.*, 2011). O risco associado a UTI, que chega a ser até três vezes maior, se relaciona com o grau de debilidade dos indivíduos e o uso de dispositivos invasivos, como catéteres e sondas (CHRISTENSEN *et al.*, 2001).

As IrAS representam não só um problema de saúde, mas também de economia. Estima-se que os custos diretos das IrAS nos Estados Unidos possam ser de 5.7 a 6.8 bilhões de dólares (WHO, 2011), sendo grande parte destes custos associados a dias extras de internação. Dados da Organização Mundial de Saúde, levantados entre 1995 e 2010, apontam que em países desenvolvidos, por volta de 7% dos pacientes internados desenvolvem algum tipo de IrAS, enquanto que nos países em desenvolvimento, a média pode alcançar 11%. No Brasil, as IrAS chegam a acometer por volta de 14% dos pacientes (WHO, 2011).

Várias medidas simples podem ser tomadas para diminuir a incidência destas infecções. A principal medida consiste na higienização adequada das mãos, com

água e sabão, e posterior aplicação de álcool. Outras medidas que contribuem para prevenção de IrAS são o isolamento de pacientes infectados, quando necessário, a correta limpeza ou esterilização de locais e equipamentos de uso médico e a correta educação de todos os profissionais relacionados a saúde (MERMEL, 2010). Diversos microrganismos podem estar associados às IrAS, variando entre espécies mais frequentes, de acordo com a população de pacientes afetados, instalações hospitalares, e até a região demográfica onde são encontrados (PARR *et al.*, 1999). As bactérias podem ser consideradas principais agentes das IrAS. Apesar de serem encontradas na microbiota normal do homem onde convivem de forma harmônica possuindo um papel protetivo, algumas destas bactérias causam processos infecciosos em hospedeiros debilitados (DAVIS, 1996). Existem ainda bactérias que representam um maior risco por serem naturalmente patogênicas e apresentarem maior virulência. Estas bactérias podem causar infecções localizadas ou epidêmicas, independente do estado imunológico do hospedeiro (ANVISA, 2004a).

Dentre as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* são os principais causadores de IrAS, associados a quadros de infecções de pulmão, ossos, endocardites e faringites (BUNCE *et al.*, 1992; ANVISA, 2004b). Dentre as bactérias Gram-negativas, as enterobactérias aparecem como a maior família de importância médica, sendo encontradas em 80% dos isolados clínicos (FARMER *et al.*, 1985). Elas podem ser encontradas naturalmente no trato intestinal humano e de animais, na água, no solo e em plantas, e estão associadas a 50% dos quadros de septicemia e 70% dos quadros de infecção urinária, além de estarem associadas a quadros de infecção intestinal (ANVISA, 2004a).

As principais enterobactérias encontradas tanto em infecções hospitalares como comunitárias são *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.* Além disso, também tem sido observada a presença de *Pseudomonas aeruginosa* que, apesar de não ser classificada como enterobactéria, compartilha da principal característica de virulência entre estes microrganismos que é a presença de fímbrias que auxiliam na aderência a superfícies e membranas mucosas (WEISS, 1971; CONNELL *et al.*, 1996; WITKOWSKA *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* pode ser encontrada no solo, água e microbiota da pele. Este microrganismo se reproduz tanto em ambientes normais como em baixas concentrações de oxigênio, e está geralmente relacionado com infecções de sítio cirúrgico e septicemias em pacientes imunologicamente

debilitados ou que possuam dispositivos médicos como cateteres e sondas (PALLERONI, 2010).

O gênero *Escherichia* apresenta espécies praticamente universais do trato intestinal de humanos e outros animais, onde desempenham importantes funções nos hospedeiros (síntese de vitamina K, por exemplo), não sendo normalmente patogênicas (NATARO *et al.*, 1998; KAMADA *et al.*, 2005). Dentre as espécies a *E. coli* aparece como uma das linhagens mais associadas a infecções, podendo causar diarreia, meningite, septicemia ou infecções urinárias, devido à produção de enterotoxinas. As linhagens de *E. coli* que causam diarreia ainda podem ser classificadas em três grupos: Enteropatogênicas (EPEC - causando diarreia aquosa, característica em crianças), Enterotoxigênicas (ETEC - causando diarreia aquosa do tipo cólera) e Enteroinvasoras (EIEC – causando diarreia que evolui apresentando muco e sangue). Algumas linhagens de EPEC podem causar, com maior frequência, infecções do tipo disentéricas e febres generalizadas (ANVISA, 2004a).

As espécies do gênero *Klebsiella* são encontradas comumente no solo, na água, além de intestinos e fezes de humanos e outros animais. Neste gênero, *Klebsiella pneumoniae* caracteriza-se como o patógeno humano mais comum. Pacientes recebendo ventilação mecânica, com cateteres intravenosos e que estejam tomando antibióticos por um período prolongado são mais suscetíveis. *K. pneumoniae*, que pode ainda estar associada a pneumonias, septicemias, infecções de sítio cirúrgico e meningite (PODSCHUN *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, o número crescente de IrAS, tanto associadas a bactérias quanto a fungos e vírus, tem sido extremamente preocupante. A pressão seletiva gerada pelo uso de uma quantidade cada vez maior de antibióticos tem contribuído para a seleção de microrganismos resistentes, aumentando consideravelmente a mortalidade e morbidade relacionada a essas infecções (SPELLBERG *et al.*, 2011).

## 1.2 ANTIBIÓTICOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA

*”Provavelmente, não há drogas quimioterápicas as quais, em circunstâncias adequadas, as bactérias não consigam reagir de alguma forma a adquirir estabilidade.”*

Alexander Fleming, 1946

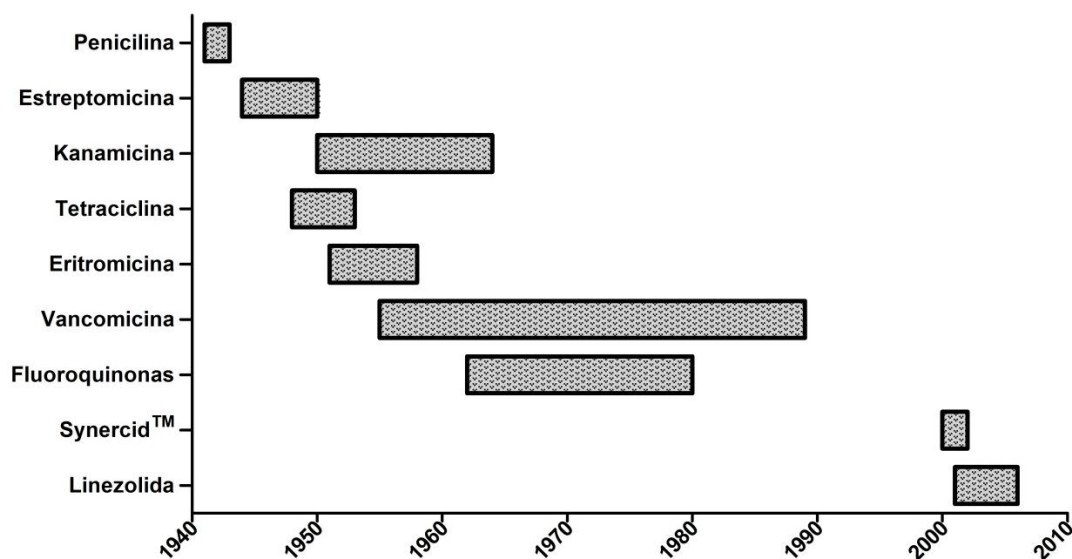
Alexandre Fleming, durante seus primeiros estudos e pesquisas, em 1921, descobriu uma enzima antisséptica, a qual denominou lisozima (FLEMING, 1922). Esta enzima pode degradar a parede celular das bactérias, formada basicamente por peptidoglicanas. Sem a parede celular, as bactérias, especialmente as Gram-positivas, se tornam mais susceptíveis à lise, podendo desta forma ser controladas mais facilmente (JOHNSON, 1998). Apesar de existir em uma grande variedade de tecidos e secreções, como na clara de ovo de galinha e na lágrima humana, esta enzima apresentava baixa atividade contra poucas linhagens patogênicas de bactérias (FLEMING, 1922).

Porém, a busca de Fleming por bactericidas continuou até 1929, quando observou em uma placa de Petri que o crescimento de um gênero de estafilococos foi inibido devido à contaminação pelo fungo *Penicillium notatum*. Após diversos experimentos, ele pôde demonstrar que o meio no qual crescia esse fungo era capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus sp.*, ainda que diluído em 800 vezes (HEWITT, 1967). Mesmo não conseguindo isolar e caracterizar a substância ativa, ele a nomeou de penicilina. Dez anos depois, Ernst Chain e Howard Florey, conseguiram isolar a molécula ativa (CHAIN *et al.*, 2005), tornando-a disponível, primeiramente para tratar infecções nos campos de batalha durante a Segunda Guerra Mundial. Somente cinco anos depois, a penicilina começou a ser usada clinicamente. Em 1945, Fleming, juntamente com Chain e Florey, foram congratulados com o prêmio Nobel por suas descobertas (HARE, 1982), sendo este um marco na medicina moderna e o começo de uma nova era de aparente vitória sobre as infecções.

O primeiro antibiótico a ser vendido comercialmente ao público geral foi o Prontosyl, uma molécula sintética, criada para ser um corante e que teve sua ação antimicrobiana descoberta pelo Doutor Gerhard Domagk (BENTLEY, 2009), também

laureado pelo Nobel em 1939. O Prontosyl foi produzido em larga escala na Alemanha pelo laboratório Bayer. Desde o início dos anos 50, novas classes de antibióticos foram descobertas e introduzidas ao uso clínico, contribuindo significativamente para o aumento da expectativa de vida observado nas últimas décadas (ALANIS, 2005).

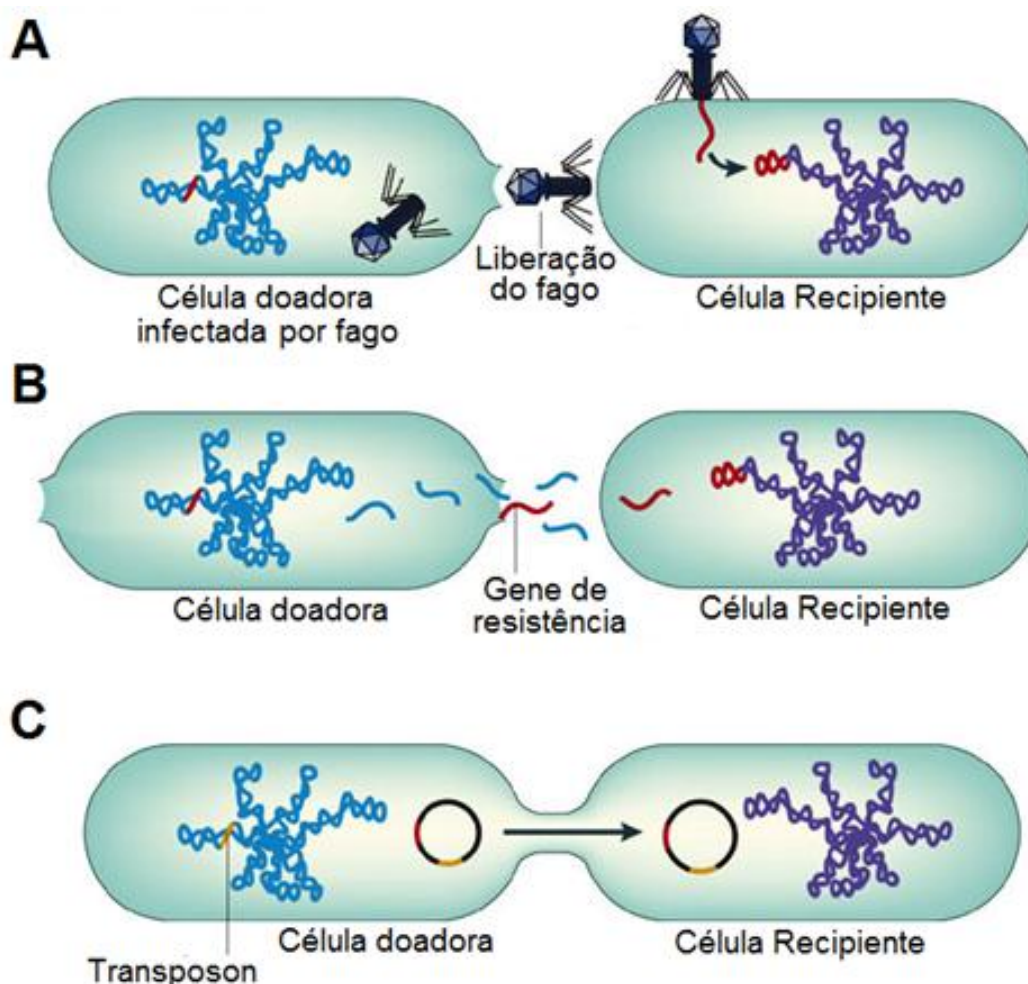
A aparente segurança gerada pelo uso dos antimicrobianos logo foi ameaçada pela quase simultânea identificação de linhagens resistentes, seguida por uma incapacitação gradual dos novos agentes descobertos (PALUMBI, 2001). A Figura 1 ilustra o tempo observado para a identificação de linhagens resistentes a diversos antibióticos. A vancomicina, descoberta em 1953, foi o antibiótico que apresentou maior tempo para o aparecimento de linhagens resistentes, em meados de 1987. Isto pode ser possivelmente atribuído ao fato de este antibiótico era visto como segunda linha de tratamento, além de ter seu uso mais restrito devido aos seus efeitos adversos (GRIFFITH, 1981).



**Figura 1.** Descoberta dos antibióticos e resistência. O início da barra representa a introdução do uso clínico e o término da barra, a identificação de linhagens resistentes ao mesmo. Adaptada de Choffnes (EILEEN R. CHOFFNES, 2010).

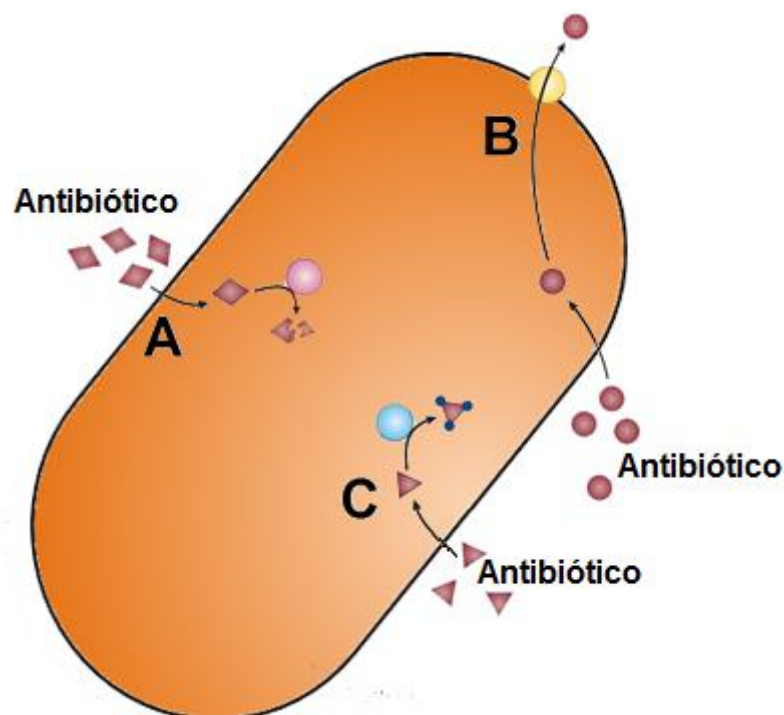
A resistência a determinado antibiótico pode ser tanto natural, quando condicionada por fatores intrínsecos ao organismo ou adquirida, quando ocorre por meio de mutações no próprio DNA ou recebimento de genes de outros indivíduos, sejam eles da mesma ou de outras espécies e linhagens (TENOVER, 2006). Quanto a essa transferência de genes, ela pode ocorrer por via vertical ou horizontal. A transferência vertical ocorre a partir de uma célula que, ao ser selecionada positivamente, transfere seus genes para os seus descendentes (LAWRENCE,

1999). Apesar de mutações serem eventos bastante raros, a taxa de crescimento rápido das bactérias, somado ao número absoluto de indivíduos em uma população bacteriana permite que pouco tempo seja gasto até que células resistentes apareçam. A transferência horizontal parece ocorrer quando o material genético contido em pequenos pacotes de DNA é transferido entre microrganismos da mesma espécie ou de espécies diferentes (DROGE *et al.*, 1998). A transferência horizontal pode ocorrer por transdução (Figura 2A), quando o DNA é transferido de uma bactéria a outra por meio de bacteriófagos; transformação (Figura 2B), quando a bactéria assimila DNA presente no meio externo, proveniente da morte ou lise de outra bactéria; ou conjugação (Figura 2C), quando ocorre a transferência de plasmídeos por meio do contato direto célula-célula entre duas bactérias, sendo este o processo mais frequente (FURUYA *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Mecanismos de transferência de genes de resistência entre bactérias. A) Transdução- Os genes de resistência são transferidos entre bactérias por bacteriófagos. B) Transformação- Ocorre quando o DNA livre resultante da lise de um organismo é assimilado por outro. C) Conjugação- A transferência ocorre entre duas bactérias por contato direto. Adaptada de Furuya (2006).

Uma vez assimilados, estes genes podem conferir diversas formas de resistência. Dentre estas formas pode-se observar a capacidade de degradar ou modificar quimicamente antibióticos (ABRAHAM *et al.*, 1988), tornando-os menos funcionais ou inativos; a capacidade de diminuir a concentração do antibiótico no interior celular, por meio de bombas de efluxo ou redução da permeabilidade da membrana ao antibiótico (POOLE, 2007) e alteração de vias metabólicas (SWEDBERG *et al.*, 1998). A Figura 3 ilustra alguns destes mecanismos, que podem ser diferentes de acordo com o antibiótico empregado.



**Figura 3.** Principais mecanismos de resistência em bactérias a diversos antibióticos. A) Degradação de antibióticos por via enzimática. B) Diminuição da concentração do antibiótico no interior celular por meio de bomba de efluxo. C) Modificação química de antibióticos por via enzimática. Adaptada de Furuya (2006).

A resistência a antibióticos parece estar associada à habilidade inerente das bactérias de responderem à ação dos diversos antimicrobianos. D'COSTA *et al.* (2011) apresenta em um trabalho recente, algumas evidências de que a resistência bacteriana não consiste em um fenômeno recente, que surgiu após a introdução dos antibióticos. Em DNA bacteriano coletado de sedimentos congelados a mais de 30.000 anos, foram encontrados genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina. Acredita-se, então, que o uso inadequado dos antibióticos não favorece o surgimento de linhagens resistentes, mas sim contribui para a seleção de cepas



naturalmente resistentes ou que receberam genes de resistência por mecanismos de transmissão horizontal (TACCONELLI *et al.*, 2008; HSU *et al.*, 2010). O uso inadequado envolve práticas sociais, médicas e agropastoris.

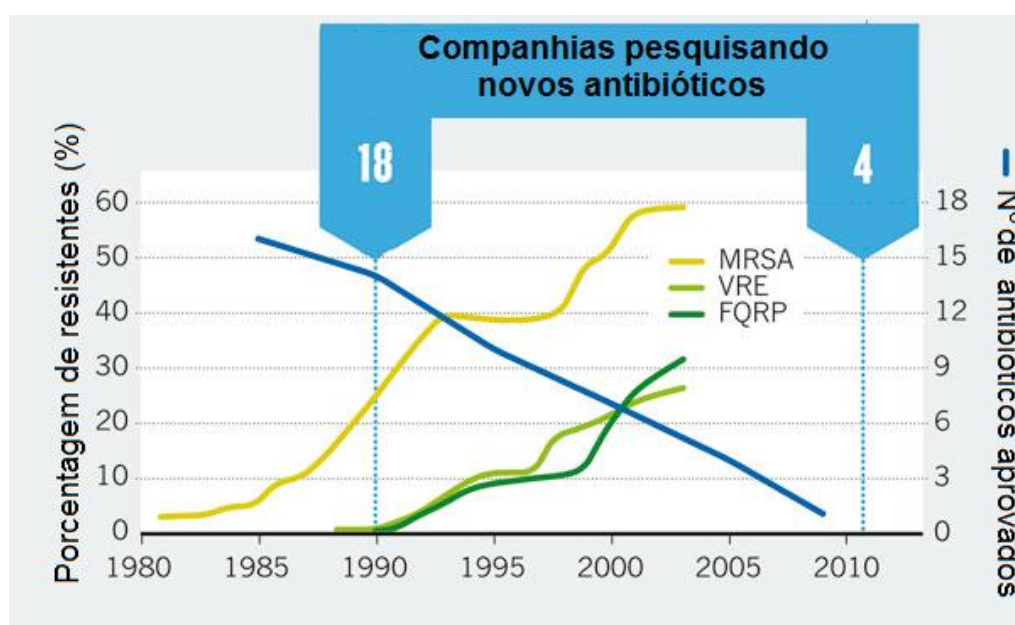
Os antibióticos na agropecuária são usados para promoção do crescimento e prevenção de infecções em animais (GRAHAM *et al.*, 2007). Porém o uso em doses subletais, que é frequente nestas situações, pode ocasionar a seleção de cepas resistentes que se disseminem na cadeia alimentar ou ainda o advento de genes de resistência que possam ser transferidos a patógenos humanos por mecanismos de transmissão horizontal (LEVY *et al.*, 2004). Na União Europeia, este tipo de uso foi banido desde 1999 (MURRAY, 1999). Contudo estima-se que mais de 60% do total de antimicrobianos produzidos nos Estados Unidos sejam usados nas criações de animais, somando aproximadamente 15 mil toneladas somente no ano de 2009 (CIMA, 2011).

Outro possível fator que pode aumentar a pressão de seleção de linhagens resistentes consiste no uso inadequado dos antibióticos nos serviços de saúde. Nos Estados Unidos, estima-se que entre os anos de 2007 e 2008, 58% das prescrições de antibióticos a crianças e adolescentes foram desnecessárias, por se tratarem principalmente de casos de gripes e resfriados comuns (PREVENTION, 2011). Estes dados se referem a prescrições legais dos antimicrobianos. Se incluídos os antibióticos usados sem prescrição médica e os compartilhados entre amigos e familiares, o número total de ingestão desnecessária se apresenta muito maior, contribuindo assim com a pressão de seleção de linhagens resistentes.

Limitar a exposição das bactérias aos antibióticos parece fazer sentido quando se pensa em reduzir a oportunidade de seleção e disseminação da resistência. O uso indiscriminado e inapropriado dos antimicrobianos pelos profissionais de saúde deve ser restringido, como tem sido feito no Brasil (ANVISA, 2010), com a retenção de receita para antibióticos. Pecuáristas e agricultores também podem diminuir ou eliminar o uso nas criações e culturas, uma vez que microrganismos patogênicos de diferentes espécies podem realizar transmissão vertical de genes de resistência. A conscientização do público sobre a importância dos antibióticos e seu uso apropriado também tem sido importante. Porém, uma vez que os próprios antibióticos são a fonte de pressão evolucionária que os torna obsoletos, a resistência é inevitável. Todas as estratégias que visem reduzir o uso incorreto são bem vindas, mas no fim, novos fármacos serão necessários.

### 1.3 A BUSCA POR NOVOS ANTIBIÓTICOS

Apesar do considerável aumento de trabalhos sobre a descoberta de novas bactérias resistentes e de algumas linhagens multirresistentes como MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina e oxacilina) e VRE (Enterococos resistentes à vancomicina), o número de novos fármacos antimicrobianos introduzidos no mercado tem diminuído significativamente. Enquanto 18 grandes companhias farmacêuticas investiam nesta busca em 1990, atualmente apenas 4 continuam a desenvolver novos antibióticos (Figura 4) (COOPER *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Resistência X indústria de antibióticos. O número de grandes empresas pesquisando antibióticos tem diminuído juntamente com o número de novos antibióticos aprovados no mercado. Ao mesmo tempo é observado um aumento no número de isolados clínicos de bactérias resistentes. MRSA- *S. aureus* resistentes a meticilina. VRE- Enterococcus resistentes a vancomicina. FQRP- *P. aeruginosa* resistente a fluoroquinolona. Adaptado de Cooper (2011).

A diminuição do número de novos fármacos lançados no mercado, assim como a crescente incapacitação dos antibióticos em uso clínico, principalmente em casos de bactérias multirresistentes, gera uma demanda futura por novos antimicrobianos. A busca de moléculas alternativas com novos mecanismos de ação tem direcionado o trabalho de inúmeros grupos de pesquisa.

Os antibióticos em uso clínico podem ser divididos em três grandes grupos: os bactericidas, que matam a bactéria ao intervir em seu metabolismo; os bacteriolíticos, uma classe especial de bactericidas que destroem bactérias ao

romper suas membranas; e os bacteriostáticos, que inibem o desenvolvimento e multiplicação sem eliminar diretamente a bactéria (MADIGAN, 2010). Quanto aos mecanismos de ação gerais descritos, eles podem ser divididos em cinco categorias: inibidores da síntese da parede celular, inibidores da síntese proteica, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, inibidores da síntese de metabólitos essenciais e disruptores da membrana celular (CALVO *et al.*, 2009).

Os inibidores da síntese da parede celular, dos quais fazem parte as penicilinas e cefalosporinas inibem a transpeptidase e a carboxipeptidase, enzimas responsáveis pela ligação 1,4 da *N*-acetilglucosamina com o ácido *N*-acetilmurâmico (LEE *et al.*, 2003). Como consequência, a parede celular da bactéria fica progressivamente mais frágil. O complexo formado entre o antibiótico e a transpeptidase ainda estimula a liberação de autolisinas, que degradam o restante da parede celular. A alta pressão osmótica da bactéria nos fluidos corporais humanos faz com que a célula bacteriana se rompa pela ausência da parede celular (FISHER *et al.*, 2005). Os inibidores da síntese proteica, que atuam à nível de ribossomo, como o cloranfenicol, atuam inibindo a formação da ligação peptídica (JARDETZKY, 1963). A eritromicina atua bloqueando a movimentação do RNA mensageiro (SANDLER *et al.*, 1989), enquanto a tetraciclina atua inibindo a ligação do RNA transportador, dificultando assim a síntese proteica e o desenvolvimento e manutenção da célula (GEIGENMULLER *et al.*, 1986). Os inibidores da síntese de ácidos nucleicos, como as quinolonas e a rimfampicina, agem diretamente sobre a formação e alongamento de fitas de DNA e RNA, inibindo assim a replicação e a transcrição (OWENS *et al.*, 2005). Já os inibidores de síntese de metabólitos, como as sulfonamidas, interferem principalmente na produção do ácido fólico (SEYDEL, 1968). Por fim, alguns antibióticos, como a vancomicina, alteram a permeabilidade da membrana plasmática, gerando um desequilíbrio osmótico e perda do conteúdo intracelular (LEVINE, 2006).

Buscando alternativas a estes fármacos, várias frentes de pesquisa foram criadas, gerando alguns resultados promissores. Dentre estas alternativas, destacam-se as estratégias antivirulência, a terapia de fagos, as novas vacinas, os potencializadores dos antibióticos atualmente usados, anticorpos monoclonais, biomateriais antibacterianos e finalmente os peptídeos antimicrobianos (FERNEBRO, 2011).

Na estratégia antivirulência, os maiores alvos são as características que parecem tornar as linhagens de bactérias virulentas, como as toxinas, a produção de biofilme, moléculas de adesão, secreção e relacionadas ao *quorum sensing*. Sem essas características, o sistema imune do hospedeiro aparentemente consegue combater e eliminar os microrganismos infectantes, sem aparente dano a microbiota normal do organismo (RASKO *et al.*, 2010). Atualmente, vários inibidores de características de virulência estão em desenvolvimento, entre eles os derivados de furanona, que inibem o *quorum sensing* de *P. aeruginosa* (HENTZER *et al.*, 2003), os pilicidas, que inibem a adesão de *E. coli* ao inibir a montagem do pili (CEGELSKI *et al.*, 2009), e o INP0007, um inibidor do sistema de secreção do tipo III de *Salmonella thiphymurium* (HUDSON *et al.*, 2007).

A terapia de fagos, que vem sendo estudada como possível alternativa, começou a ser pesquisada no início do século XX, porém a descoberta dos antibióticos levou a uma diminuição das pesquisas nesta área, principalmente no ocidente. Os fagos em questão são vírus bacteriófagos que em sua maioria são classificados como líticos, pois promovem a eliminação das bactérias de forma lítica direta, durante o processo de liberação, após replicar-se na célula. Além dos bacteriófagos existem os fagos lisogênicos que se integram ao genoma bacteriano e apenas lisam a célula em situações específicas (LU *et al.*, 2011). A grande vantagem do uso dos fagos reside no baixo custo de produção e especificidade. Porém o risco de desenvolvimento de resistência pode ser alto, além de estarem sujeitos à neutralização pelo sistema imune do hospedeiro (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001). Dentre os fagos que se apresentam em testes, destaca-se o Biophage PA, em fase III de teste, ativo contra *P. aeruginosa* (WRIGHT *et al.*, 2009); o BFC-1, que consiste em um coquetel de fagos ativos principalmente contra *S. aureus*, incluindo as linhagens MRSA (JIKIA *et al.*, 2005); e o fago T4, que está sendo testado em quadros de diarreia aguda causada por *E. coli* (BRUTTIN *et al.*, 2005).

Outra estratégia usada como alternativa aos antibióticos convencionais consiste na busca de novos antígenos. Estes têm sido estudados quanto ao seu potencial de treinar o sistema imune quanto a infecções causadas pelos mais diferentes patógenos. As vacinas são provavelmente o método de combate aos microrganismos mais barato e que apresenta maior efetividade, além de poder ser utilizado profilaticamente (FERNEBRO, 2011). O IC43, um antígeno formado a partir de proteínas de fusão da membrana de *P. aeruginosa*, parece ser um promissor

candidato à vacina que está em fases de testes clínicos (DORING *et al.*, 2008). O antígeno de *S. aureus* nomeado V710 derivado da proteína IsdB (*Iron surface determinant B*), foi testado com sucesso tanto em modelo murino quanto em macacos rhesus (*Macaca mulatta*), e parece induzir uma rápida resposta de anticorpos, gerando um possível aumento na sobrevivência nos modelos estudados (KUKLIN *et al.*, 2006). Por fim, a IC47 tem sido considerada um forte candidato a produção de uma nova vacina. Ela está sendo desenvolvida a partir de antígenos derivados de proteínas encontrados nas membranas de pneumococos e tem sido testada com sucesso em modelos animais (GIEFING *et al.*, 2008).

Uma diferente alternativa aos antibióticos baseia-se nos anticorpos. Alguns anticorpos já são utilizados há algum tempo com sucesso no tratamento de diversos tipos de câncer, doenças autoimunes e para evitar a rejeição em transplante de órgãos, despertando assim o interesse no uso de outros anticorpos para o tratamento de infecções. Os anticorpos podem ser divididos em duas categorias: a primeira engloba aqueles que possuem ação direta sobre os patógenos, enquanto a segunda neutraliza toxinas e fatores de virulência (BEBBINGTON *et al.*, 2008). Por serem muito específicos, eles aparentemente não afetam a microbiota normal do organismo, e podem ser criados para virtualmente qualquer patógeno. Uma vez que já existem vários dados sobre farmacocinética e farmacodinâmica dos anticorpos, sua introdução na clínica tem sido favorecida, porém a grande desvantagem reside no custo de produção e da necessidade de identificação prévia do microrganismo infectante a ser tratado. O pagibaximab consiste em um exemplo de anticorpo que se encontra em testes clínicos para prevenção de infecções causadas por *S. aureus* em recém-nascidos prematuros (WEISMAN *et al.*, 2009). Outro exemplo consiste no *Anthin*<sup>TM</sup>, um anticorpo com alta especificidade produzido para proteção contra *Bacillus anthrax* (SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Adicionalmente, o anticorpo KB001 tem sido testado em *P. aeruginosa* quanto a sua capacidade de inibir o sistema de secreção do tipo III, associado à virulência desta espécie (BAER *et al.*, 2009).

Além das técnicas supracitadas, existem ainda os potencializadores de antibióticos, que podem funcionar tanto revertendo mecanismos de resistência como sensibilizando linhagens naturalmente resistentes, estendendo assim a possibilidade de uso dos antibióticos convencionais (DRAWZ *et al.*, 2010; FERNEBRO, 2011). Os principais potencializadores consistem em inibidores da  $\beta$ -lactamase, que impedem a degradação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Por exemplo,

as moléculas NXL104 (STACHYRA *et al.*, 2009) e ME1071 (ISHII *et al.*, 2010), que inibem  $\beta$ -lactamases de *E. coli* e *K. pneumoniae*, foram testados com sucesso contra estas bactérias Gram-negativas. Outra classe de potencializadores de antibióticos em desenvolvimento consiste em inibidores de bombas de efluxo, como a piridopirimidina, que impede o efluxo da fluoroquinolona em *P. aeruginosa* (LOMOVSKAYA *et al.*, 2001). A grande desvantagem destes inibidores que pode ser relacionada é a facilidade de desenvolvimento de resistência já reportada nos potencializadores testados (BUYNAK, 2006).

Outra frente de pesquisa na área de antibióticos consiste na busca de biomateriais. O uso de dispositivos médicos como sondas e cateteres representa uma importante porta de entrada de patógenos na circulação sistêmica, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (MAKI *et al.*, 2006; FOXLEY, 2011). A resposta a esse problema parece ser cobrir a superfície destes dispositivos com materiais antimicrobianos que impeçam o surgimento e estabelecimento de colônias de bactérias. Alguns dos esforços nesta área levaram ao desenvolvimento de cateteres com polímeros associados à prata, dificultando assim o surgimento de bactérias (SCHUMM *et al.*, 2008). Um *stent*, que consiste em uma endoprótese extensível que expande veias em processo de obstrução, coberto com triclosan está sendo avaliado quanto a sua eficácia em modelos animais (CADIEUX *et al.*, 2006). Da mesma forma, cateteres cobertos com cloroxilenol e timol demonstraram tanto *in vitro* como *in vivo* uma potencial diminuição no risco de infecções associadas ao uso de cateteres (MANSOURI *et al.*, 2008).

Por fim, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) aparecem como promissores candidatos e como modelos para o desenvolvimento de novos anti-infectivos, especialmente devido ao seu amplo espectro de atividade e rápida ação. Os PAMs serão discutidos em detalhes no próximo tópico.

#### 1.4 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Várias estratégias têm sido estudadas visando combater os microrganismos resistentes, entre elas pode se citar a modificação de moléculas já existentes (TEVYASHOVA *et al.*, 2009), o estudo do genoma e proteoma dos microrganismos,

buscando novos alvos (DU, 2010) e a bioprospecção e caracterização de novas moléculas, que funcionem como alternativa aos compostos já utilizados (BENKO-ISEPPON e CROVELLA, 2010). Nesta última categoria, destacam-se os peptídeos antimicrobianos, que representam um modelo para o desenvolvimento de possíveis novas classes de fármacos anti-infecciosos.

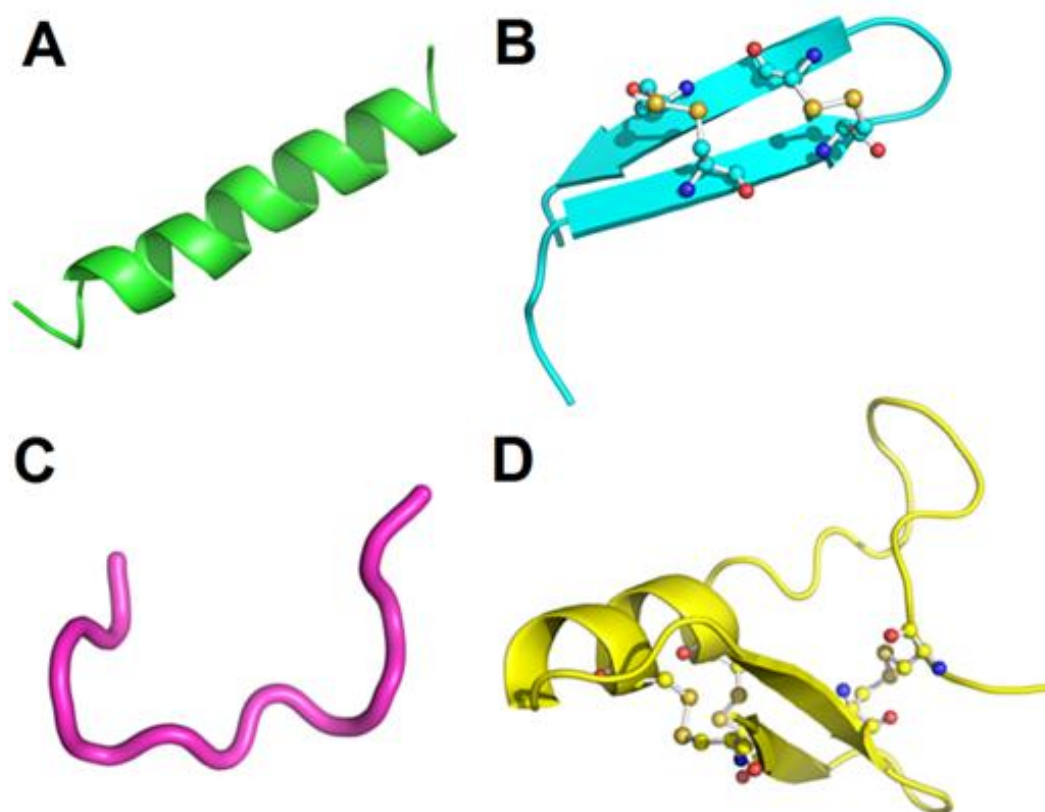
Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são componentes do sistema imune inato de virtualmente todas as formas de vida, que foram retidos durante a co-evolução entre eucariotos e procariotos (PESCHEL *et al.*, 2006). Para os organismos que não possuem uma resposta imune adaptativa, os peptídeos antimicrobianos formam o componente central do sistema imune inato contra a invasão de patógenos. No sistema imune dos organismos mais derivados, os PAMs fazem parte tanto da resposta inata como adaptativa, contribuindo significativamente para o combate das infecções (VICTOR NIZET, 2001). Os PAMs são, em geral, codificados por genes, sintetizados ribossomalmente e produzidos constitutivamente ou em resposta a eventos patológicos (GALLO *et al.*, 2002). Muitos deles são sintetizados como precursores inativos, que são processados até sua forma ativa por clivagem proteolítica de uma região pré-pró-peptídica. Nas plantas, além de agir nos sítios infecciosos, eles também podem se acumular em diversas estruturas vegetais, em um fenômeno conhecido como resistência sistêmica adquirida (BENKO-ISEPPON, GALDINO, *et al.*, 2010).

Os PAMs, em geral, são caracteristicamente definidos por conterem uma cadeia curta de aminoácidos (10 a 50 a.a.) e por possuírem atividade antimicrobiana. A maioria apresenta uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos e carga total positiva (+2 a +7) em pH fisiológico, devido a grande proporção de resíduos de lisina e arginina (KAMYSZ *et al.*, 2003a). Alguns destes peptídeos tendem a se apresentar sem estrutura definida em solução aquosa, adotando uma forma anfipática ao interagir com membranas, atributo crucial tanto para atividade quanto para citotoxicidade (OREN *et al.*, 1998). Apesar da estrutura tridimensional e propriedades físicas serem bastante semelhantes entre os diversos PAMs, os mesmos tem sido classificados normalmente em famílias estruturais baseadas nos padrões de enovelamentos, pois esses grandes grupos apresentam pouca homologia entre sequências primárias (JASON KINDRACHUK, 2010).

Além da ação antimicrobiana contra bactérias e fungos, já foram reportados PAMs com as mais diversas atividades, entre elas, deletérias contra vírus (YE *et al.*,

2002), protozoários (LOFGREN *et al.*, 2008), nematóides (PARK *et al.*, 2004) e insetos (KELEMU *et al.*, 2004). Alguns outros apresentam ação citotóxica seletiva para células tumorais e espermáticas (REDDY *et al.*, 2004). Por fim, são encontrados ainda PAMs que neutralizam os lipopolissacarídeos resultantes da lise de bactérias Gram-negativas, responsáveis pela síndrome do choque séptico (ROSENFELD *et al.*, 2008) e outros que modulam a resposta imune inata e adaptativa em humanos (KAMYSZ *et al.*, 2003b).

Os PAMs podem ser divididos em categorias baseadas em características estruturais. Análises estruturais por difração de raio-X e ressonância nuclear magnética (RNM) apresentaram quatro grandes grupos estruturais entre os PAMs: os peptídeos lineares que formam hélices em contato com as membranas (Figura 5A), os peptídeos com pontes dissulfeto com o predomínio de folhas  $\beta$ , nas quais  $\beta$ -hairpin estão inclusas (Figura 5B), os peptídeos lineares sem estrutura definida (Figura 5C) e que geralmente possuem um grande número dos mesmos resíduos de aminoácidos e os peptídeos com estruturas secundárias mistas (Figura 5D).



**Figura 5.** Exemplos de grupos de PAMs baseados em estruturas. A) Magainina 2, um peptídeo em  $\alpha$ -hélice (pdb 2MAG). B) Protegrina 1, um peptídeo com pontes dissulfeto e predomínio de folhas  $\beta$  ( $\beta$ -hairpin) (pdb 1PG1). C) Indolicidina, um peptídeo sem estrutura secundária definida (1QXQ). D) Defensina de inseto A, um peptídeo com estrutura secundária mista (pdb 1ICA). Bolas e varetas representam as pontes dissulfeto.



Os PAMs em estrutura predominante de  $\alpha$ -hélices são os peptídeos melhor caracterizados tanto estruturalmente como funcionalmente (ZASLOFF, 2002). Eles podem possuir, de forma geral, uma segregação de cargas ao longo do eixo da hélice, de forma que uma lateral da hélice concentra cargas positivas e a outra uma região hidrofóbica (HANEY *et al.*, 2009). O peptídeo em  $\alpha$ -hélice mais estudado consiste na magainina, um PAM isolado da pele do anfíbio *Xenopus laevis*, que apresenta amplo espectro de atividade contra diversos microrganismos (JACOB *et al.*, 1994). Os peptídeos que apresentam folhas- $\beta$  ligadas por pontes dissulfeto também parecem apresentar essa segregação de cargas, sendo os  $\beta$ -*hairpins* os mais estudados nesta classe (TANG *et al.*, 2009). Os peptídeos sem estrutura secundária definida (ou estendido), geralmente apresentam uma grande quantidade de resíduos de arginina, triptofano e prolina. Um dos PAM mais estudado nesta categoria é a indolicidina, que já alcançou fase III de testes clínicos (ROKITSKAYA *et al.*, 2011).

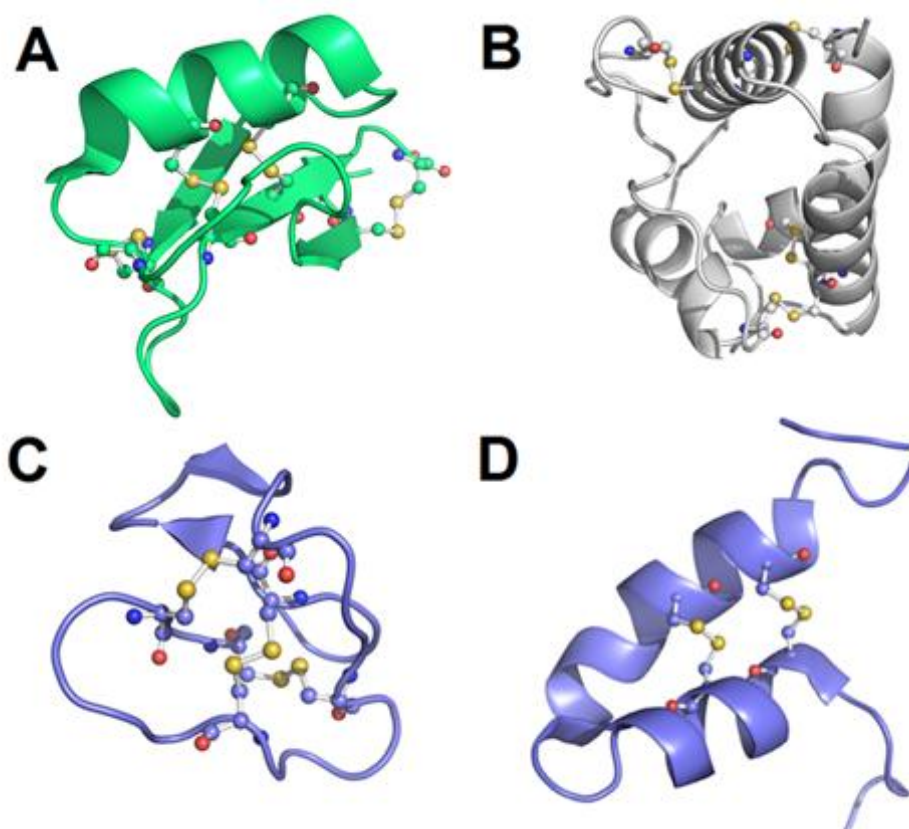
## 1.5 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS

Muito antes da descoberta da existência dos microrganismos e do seu papel nas doenças humanas, a idéia de que certas plantas possuíam um potencial de cura contra infecções já era fazia parte do saber popular. Desta forma, elas são as fontes mais antigas de componentes farmacologicamente ativos, provendo a nossa espécie muitos compostos com ação e eficácia comprovada. Entretanto, muitos destes produtos não são fármacos, ainda que sejam fortes candidatos ao desenvolvimento dos mesmos (NEWMAN, 2003).

Sendo assim, as plantas apresentam-se como excelentes candidatas para busca de peptídeos antimicrobianos, uma vez que estão expostas constantemente aos ataques de predadores e patógenos. Durante a interação planta-patógeno, as plantas resistem aos patógenos por dois mecanismos, sendo o primeiro representado por estruturas e componentes sintetizados durante o desenvolvimento normal das plantas (fatores constitutivos de resistência) e o segundo por mecanismos ativados após o contato com o patógeno (fatores de resistência induzidos). Estes últimos envolvem reconhecimento dos elicitores seguido por

transdução de sinal, que regula a expressão de genes relacionados a defesa. Entre estes genes, são encontrados aqueles que expressam proteínas e peptídeos antimicrobianos e seus precursores. Alguns PAMs podem ainda ser expressos constitutivamente (CASTRO *et al.*, 2005).

De acordo com o PhytAMP (<http://phytamp.pfba-lab-tun.org>), um banco de dados que reúne a maior parte dos PAMs de plantas conhecidos, os peptídeos antimicrobianos provenientes de vegetais podem ser caracterizados por serem ricos em glicina e cisteína, sendo que esta última pode ser encontrada na forma de pontes dissulfeto. Essas ligações covalentes contribuem significativamente para um aumento da estabilidade da estrutura destes PAMs. Em geral, os PAMs de planta possuem carga total positiva, além de uma região hidrofóbica (HAMMAMI *et al.*, 2009). Existem várias classes de peptídeos antimicrobianos em plantas, dentre elas estão as defensinas, snakinas, proteínas de transferência de lipídios, os ciclotídeos e as recentemente descritas *hairpin-like*. (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1998; HAMMAMI *et al.*, 2009; NOLDE *et al.*, 2011) (Figura 6).



**Figura 6.** Exemplos de principais classes de PAMs encontrados em plantas. A) NaD1, uma defensina de *Nicotiana alata* (pdb 1MR4). B) Proteína transportadora de lipídeos de Milho (pdb 1MZL). C) Kalata B1, um ciclotídeo (pdb 1KAL). D) EcAMP1, um *hairpin-like* (pdb 2L2R). Não foi encontrada nenhuma estrutura resolvida para snakinas. Bolas e varetas representam as pontes dissulfeto.

A primeira e mais estudada destas classes, as defensinas, foram descritas pela primeira vez em 1995, com a descoberta de dois peptídeos de semente de rabanete que apresentavam atividade antifúngica (BROEKAERT *et al.*, 1989). Em geral são estruturas pequenas, de aproximadamente 5 kDa e 45 a 54 resíduos de aminoácidos de comprimento. Possuem caráter básico e são ricas em cisteínas. A maior parte das defensinas possuem 8 cisteínas, formando um arranjo estabilizado por 4 pontes dissulfeto (STOTZ *et al.*, 2009). A estrutura terciária das defensinas pode ser formada por três folhas- $\beta$  antiparalelas e uma  $\alpha$ -hélice (PARDI *et al.*, 1992). Apesar da semelhança estrutural, são muito diversas no que se refere à sequência primária, o que explica em parte as diferentes funções atribuídas as defensinas, incluído antibacteriana, inibidores de  $\alpha$ -amilases e proteinases, bem como bloqueadora de canais iônicos (THOMMA *et al.*, 2002). A maioria das defensinas de plantas foi isolada de sementes, onde elas são mais abundantes, entretanto sua expressão também foi observada em outros tecidos como folhas, vagens, tubérculos, frutos, raízes e tecidos florais (HOULNE *et al.*, 1998).

As snakinas são outra classe de peptídeos de plantas. Estes peptídeos são ricos em cisteínas, com um amplo espectro de atividades *in vitro*. Dois peptídeos representam esta classe, ambos isolados de tubérculos de batatas (SEGURA *et al.*, 1999; BERROCAL-LOBO *et al.*, 2002). Possuem 12 resíduos de cisteínas, apesar de baixa similaridade entre as sequências. Sua produção pode ser aumentada em resposta a ferimentos e infecções fúngicas do tubérculo e diminuídas durante as infecções bacterianas. Um estudo conduzindo a super-expressão heteróloga de snakinas aumentou a tolerância a infecções em tomate, demonstrando novamente o papel protetivo desta classe (BALAJI *et al.*, 2011).

As proteínas transportadoras de lipídeos (LTP) são peptídeos catiônicos, subdivididos em duas famílias conhecidas por LTP1 e LTP2, ambas compartilhando resíduos de cisteínas conservados e uma estrutura tridimensional formada por quatro hélices, estabilizada por quatro pontes dissulfeto (YEATS *et al.*, 2008). Esta estrutura tem sido caracterizada ainda por possuir uma cavidade interna hidrofóbica, que se estende por toda molécula, onde se acomodam as cadeias acil, responsáveis pela sua atividade. Elas atuam por meio de permeabilização direta da membrana de fungos e bactérias (REGENTE *et al.*, 2005) e estão geralmente localizadas na parede celular das plantas (GUERBETTE *et al.*, 1999).

Os ciclotídeos são peptídeos que apresentam como principais características a presença do C-terminal unido ao N-terminal e três pontes dissulfeto cruzadas, em um arranjo conhecido como CCK (*cystein knot motif*). Devido a essas características são resistentes a degradação térmica, química e enzimática (SAETHER *et al.*, 1995). Os ciclotídeos apresentam geralmente uma estrutura de 28 a 37 resíduos de aminoácidos e possuem seis resíduos conservados de cisteínas. São encontrados, geralmente, em espécies de plantas das famílias Violaceae, Rubiaceae, Cucurbitaceae e Poaceae (SMITH *et al.*, 2011). Os ciclotídeos têm sido estudados não só por seu amplo espectro de atividades mas também pela possibilidade de uso como modelo para criação de medicamentos mais estáveis a partir do seu desenho (CRAIK *et al.*, 2006).

Existe ainda outra classe de peptídeos antimicrobianos descoberta recentemente conhecida como *hairpin-like*. Esta classe será descrita posteriormente no próximo tópico.

## 1.6 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS HAIRPIN-LIKE

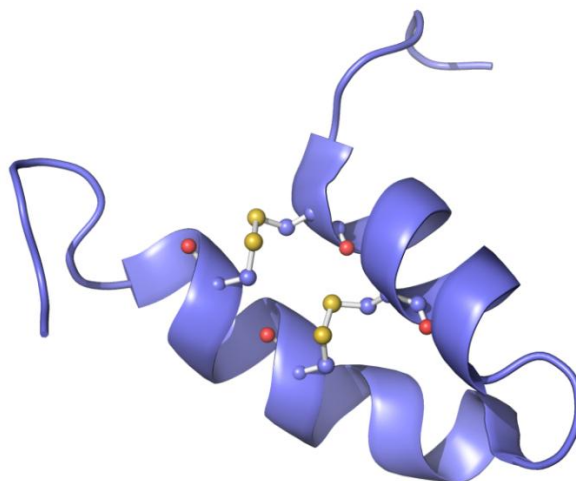
O primeiro peptídeo *hairpin-like* descrito, o MBP-1 (*Maize Basic Peptide 1*), foi isolado em 1992 por Duvick e colaboradores a partir de sementes de milho (*Zea mays*) (DUVICK *et al.*, 1992). Sua atividade foi observada contra a bactéria Gram negativa *E. coli* e o fitopatógeno Gram-positivo *Clavibacter michiganensis*, em concentrações abaixo de 7,26  $\mu\text{M}$ . O MBP-1 também apresentou atividade contra os fungos *Fusarium graminearum*, *Alternaria longipes*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia trifoliorum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Aspergillus flavus* a uma concentração menor que 14,52  $\mu\text{M}$  (DUVICK *et al.*, 1992). Contudo, tanto a estrutura como o mecanismo de ação deste peptídeo não haviam ainda sido elucidados. Neste estudo, não foi encontrada similaridade de sequência deste peptídeo com nenhum outro grupo de PAMs, apesar de ser notada semelhança de atividade com o grupo das defensinas (DUVICK *et al.*, 1992).

O segundo PAM descrito nesta família foi o MiAMP2d, isolado a partir de sementes de Macadâmia (*Macadamia integrifolia*) em 1999 (MARCUS *et al.*, 1999a). Esse peptídeo parece ser um fragmento de uma proteína homóloga a

globulina 7S. Sua atividade de inibição de 50 % do crescimento foi relatada apenas contra *C. michiganensis* a uma concentração de 10,72  $\mu\text{M}$ , apesar de testada contra diversas bactérias. O peptídeo MiAMP2d apresentou atividade mais pronunciada de inibição de 50 % do crescimento contra os fungos *Chalara elegans* em uma concentração de 0,5 a 1  $\mu\text{M}$ ; *Alternaria helianthi*, *Cercospora nicotianae*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora cryptogea elegans* e *Fusarium oxysporum* em uma concentração menor que 2  $\mu\text{M}$ ; e *Ceratocystis paradoxa*, *Leptosphaeria maculans*, *S. sclerotiorum* e *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações acima de 4  $\mu\text{M}$ . O mecanismo de ação para este peptídeo também não foi elucidado, assim como sua estrutura.

Apesar de não serem classificados como peptídeos antimicrobianos, foram descobertos também alguns peptídeos com ação de inibidores de tripsina na família *hairpin-like*, como os peptídeos C2, VhTI e BWI-2b. O peptídeo BWI-2b, isolado em 1997 (PARK *et al.*, 1997) a partir de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), apresentou atividade inibitória de tripsina, em um teste qualitativo, não sendo determinada a concentração inibitória nem sua estrutura. O peptídeo C2, que pode ser processado a partir da proteína PV100 de sementes de abóbora (*Cucurbita máxima*), foi isolado e caracterizado em 1999 (YAMADA *et al.*, 1999). Este peptídeo apresenta atividade de inibição de tripsina a uma concentração de 1 nM. Por fim, foi no VhTI, que consiste em um peptídeo isolado a partir das sementes de *Veronica hederifolia* (CONNERS *et al.* 2007) onde foi primeiramente sugerido o novo tipo de enovelamento característico das *hairpin-like*. Ao observar a estrutura secundária de VhTI ligada a tripsina, decifrada por raio-X, duas  $\alpha$ -hélices conectadas por 2 pontes dissulfeto foram visualizadas (CONNERS *et al.*, 2007). Este peptídeo também apresentou atividade inibitória da tripsina a 50 nM. Outro peptídeo pertencente à família *hairpin-like*, o Luffin P1, foi purificado de sementes de bucha (*Luffa cylindrica*) (LI *et al.*, 2003), demonstrando uma forte atividade inibitória da síntese proteica.

Em um estudo publicado recentemente Nolde (2011), além de apresentar um novo peptídeo com ação antifúngica, sugere a criação de uma nova classe de peptídeos, os *hairpin-like*. A resolução da estrutura tridimensional do peptídeo EcAMP1, proveniente da gramínea *Echinochloa crus-galli*, por RNM demonstrou o enovelamento do peptídeo isolado (Figura 7), caracterizado pela presença de duas hélices antiparalelas estabilizadas por duas pontes dissulfeto.



**Figura 7.** EcAMP, o protótipo estrutural dos peptídeos da classe *haipin-like* (pdb 2L2R). Bolas e varetas representam as pontes dissulfeto.

Nolde identificou e relacionou, por homologia de sequência, os peptídeos anteriormente descritos (Figura 8), de forma que o alinhamento das sequências apresentou um padrão de pontes S-S, representado pela fórmula  $C^1X_3C^2X_nC^3X_3C^4$ .

A	<i>Echinochloa crus-galli</i>	-----GSGRGS <sup>■</sup> CRSQ <sup>■</sup> CMRRHEDEPWRVQ <sup>■</sup> EC <sup>■</sup> VSQ <sup>■</sup> CRRRRGGGD-----	37
B	<i>Zea mays</i>	-----RSGRGE <sup>■</sup> CR <sup>■</sup> RQ <sup>■</sup> CLRRHEGQPWETQ <sup>■</sup> EC <sup>■</sup> MRR <sup>■</sup> CR <sup>■</sup> RRG-----	33
C	<i>Macadamia integrifolia</i>	KRDPQQREYED <sup>■</sup> CR <sup>■</sup> RR <sup>■</sup> CE <sup>■</sup> QQE <sup>■</sup> ---PRQQHQ <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> LR <sup>■</sup> CRE <sup>■</sup> QQ-----	35
D	<i>Cucurbita maxima</i>	QRGSPRAEYEV <sup>■</sup> CR <sup>■</sup> LR <sup>■</sup> CQ <sup>■</sup> VA <sup>■</sup> ERGV <sup>■</sup> -EQ <sup>■</sup> QR <sup>■</sup> K <sup>■</sup> CE <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> V <sup>■</sup> CE <sup>■</sup> ER <sup>■</sup> LR <sup>■</sup> ERE <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> GR <sup>■</sup> GED <sup>■</sup> V <sup>■</sup> D---	49
E	<i>Luffa aegyptiaca</i>	PRGSPRTEYEAC <sup>■</sup> RV <sup>■</sup> RC <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> VA <sup>■</sup> EHGV <sup>■</sup> -ER <sup>■</sup> QR <sup>■</sup> RC <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> V <sup>■</sup> CE <sup>■</sup> K <sup>■</sup> RL <sup>■</sup> RE <sup>■</sup> RE <sup>■</sup> -GR <sup>■</sup> RE <sup>■</sup> -V <sup>■</sup> D---	47
F	<i>Veronica hederifolia</i>	-----NTDPE <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> CK <sup>■</sup> VM <sup>■</sup> C <sup>■</sup> YA <sup>■</sup> QR <sup>■</sup> H <sup>■</sup> SS <sup>■</sup> PELL <sup>■</sup> RR <sup>■</sup> CL <sup>■</sup> DN <sup>■</sup> CE <sup>■</sup> KE <sup>■</sup> HD-----	34
G	<i>Fagopyrum esculentum</i>	SDKPQQ-LLE <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> CR <sup>■</sup> YL <sup>■</sup> CR <sup>■</sup> IR <sup>■</sup> RW <sup>■</sup> ST <sup>■</sup> -DM <sup>■</sup> V <sup>■</sup> HR <sup>■</sup> C <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> K <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> DD <sup>■</sup> F <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> R <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> Q <sup>■</sup> RG <sup>■</sup> GG <sup>■</sup> SS <sup>■</sup> DE <sup>■</sup> GN	51

**Figura 8.** Alinhamento de EcAMP1 com peptídeos semelhantes. As linhas representam a conexão entre as pontes dissulfeto formadas entre os resíduos de cisteínas (sombreados em cinza). A) Peptídeo EcAMP1 de *E. crus-galli*. B) Peptídeo MBP-1 de *Zea mays*. C) Peptídeo MiAMP2d de *M. integrifolia*. D) Peptídeo processado C2 da proteína PV100 de *C. maxima*. E) Peptídeo inativador de ribossomo luffin P1 de *L. aegyptiaca*. F) Peptídeo Inibidor de tripsina VhTI de *V. hederifolia*. G) Peptídeo BWI-2B de *F. esculentum*. Adaptada de Nolde (2011).

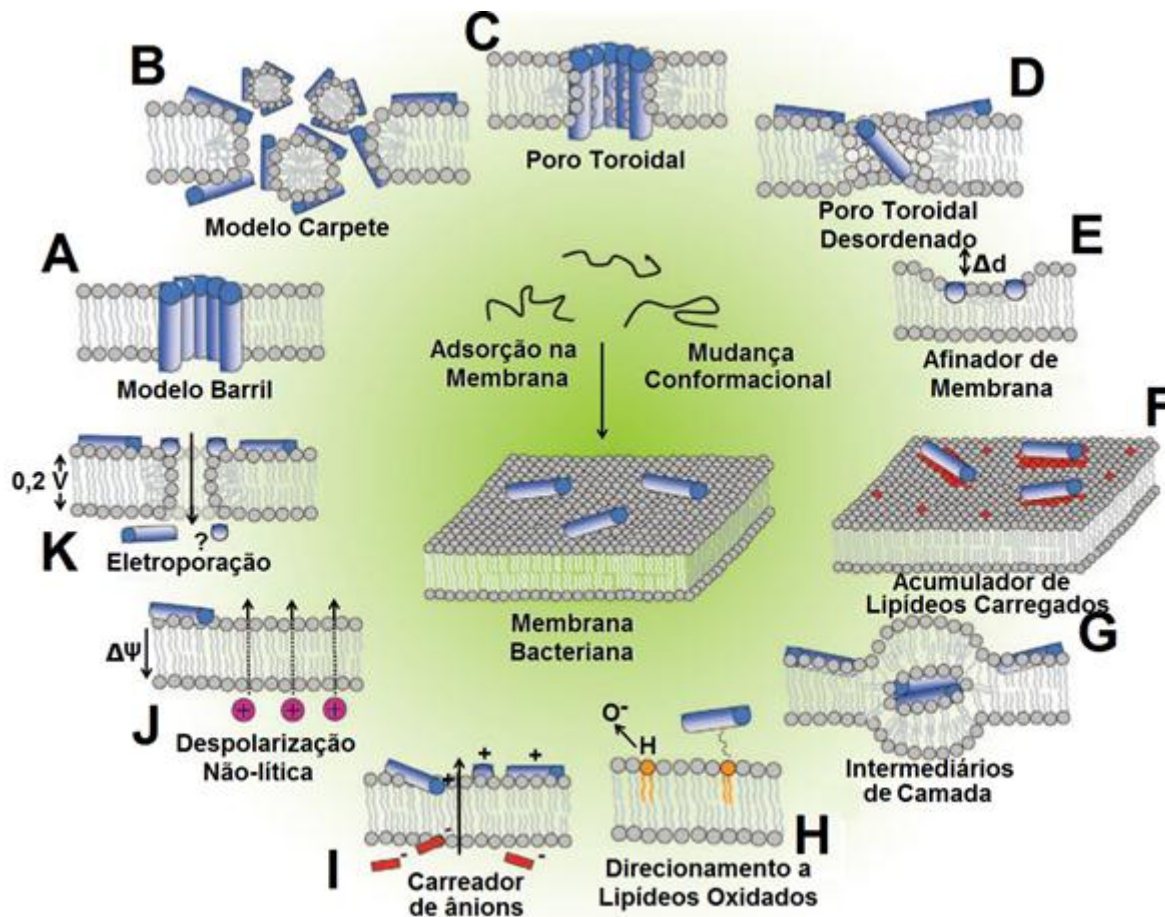
Apesar de apresentarem baixa identidade, um enovelamento similar foi observado em  $\kappa$ -hefutoxina-1 do veneno do escorpião asiático negro da floresta (*Heterometrus fulvipes*) e da toxina OmTx1 do escorpião negro de madagascar (*Opisthacanthus madagascariensis*), que atuam bloqueando canais de potássio (CHAGOT *et al.*, 2005). Outro enovelamento semelhante foi encontrado na proteína fitotóxica PcF, isolada a partir do fungo *Phytophthora cactorum* (NICASTRO *et al.*, 2009)

## 1.7 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

De modo geral, os peptídeos antimicrobianos podem causar o impedimento de vários processos-chave na célula bacteriana. Estes processos podem ser interrompidos por múltiplos mecanismos, ilustrados pela figura 9. Dentre todos sugeridos, três modelos aparecem para explicar a ação dos PAMs sobre as membranas. Todos eles são baseados na possível inserção na membrana e formação de poros após o alcance de uma concentração limiar. No modelo de barril (Figura 9A), os peptídeos se inserem paralelamente na membrana para formar um poro; no modelo carpete (Figura 9B), os PAMs solubilizam porções da membrana, induzindo a formação de poros; e no modelo poro toroidal (Figura 9C), é formado um poro com peptídeos inseridos paralelamente intercalados por lipídeos (BROGDEN, 2005).

Os outros modelos citados na Figura 9 foram propostos à medida que novos estudos mais aprofundados sobre mecanismos de ação foram realizados, entre eles o modelo poro toroidal desordenado (Figura 9D), onde uma menor concentração de peptídeo, disposta de forma mais desorganizada, forma o poro toroidal; o modelo de afinamento da membrana (Figura 9E), onde a atração de fosfolipídios carregados gera regiões menos espessas e mais frágeis na membrana; o modelo de remodelamento da membrana (Figura 9F), que forma domínios ricos em lipídios aniônicos, circundando os peptídeos (NGUYEN *et al.*, 2011).

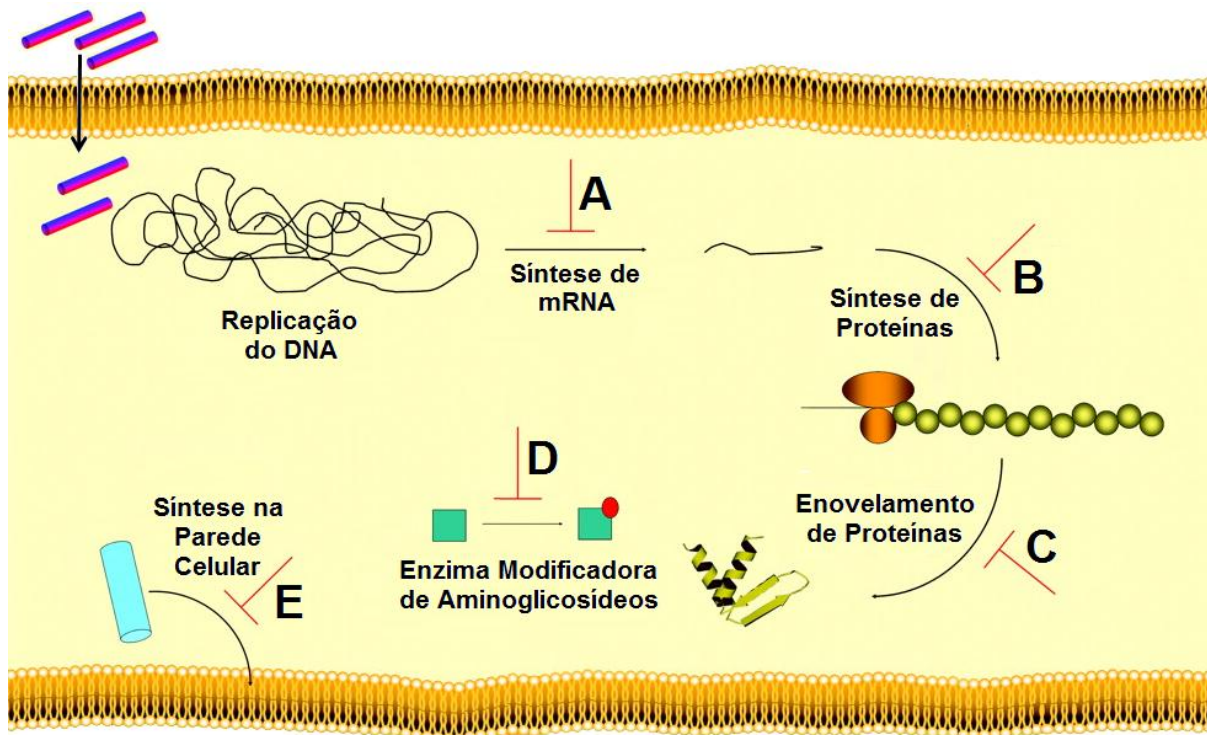
Em casos mais específicos, a presença de PAMs pode induzir a formação de intermediários de membrana diferentes da dupla camada (Figura 9G); ou a adsorção do peptídeo pode ser aumentada (Figura 9H) pela presença de lipídeos oxidados por ROIs (Espécies de intermediários de oxigênio). No modelo de atração de ânions (Figura 9I), os PAMs podem atrair pequenos ânions, fazendo-os atravessar a membrana e causando uma perda do potencial eletrostático. Outro modelo propõe que a perda do potencial eletrostático pode ocorrer ainda sem a atração de íons (Figura 9J). Por fim, no modelo de eletroporação (Figura 9K), os PAMs podem afetar o potencial de membrana com conseqüente diminuição da permeabilidade a várias moléculas (NGUYEN *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Eventos na membrana plasmática bacteriana após adsorção do PAM. Estes eventos não são necessariamente excludentes. A) Modelo Barril. B) Modelo Carpete. C) Poro toroidal. D) Poro Toroidal Desordenado. E) Modelo afinador de Membrana. F) Acumulador de Lipídeos Carregados. G) Formação de intermediários de membrana. H) Direcionamento a lipídeos oxidados. I) Carreador de ânions. J) Despolarização não-lítica. K) Modelo de Eletroporação. Adaptado de Nguyen (2011), com modificações.

Além das ações citadas na membrana, os peptídeos antimicrobianos podem agir ainda no interior da célula bacteriana (Figura 10) (JENSSEN *et al.*, 2006). Alguns PAMs podem inibir a síntese de DNA e RNA (Figura 10A) ou diminuir a síntese de proteínas (Figura 10B). Outros PAMs podem afetar o correto enovelamento (Figura 10C) e a atividade de certas enzimas (Figura 10D). Por fim, existem PAMs que podem inibir a formação de componentes estruturais, como a parede celular (Figura 10E).





**Figura 10.** Mecanismos de ação intracelular dos PAMs. A) Inibição da síntese de DNA e RNA. B) Inibição da síntese de proteínas. C) Interferência no correto enovelamento de proteínas. D) Inibição enzimática. E) Inibição da formação de componentes estruturais. Adaptado de Jenssen (2006), com modificações.

## 1.8 CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: PONTES DISSULFETO E EXPOSIÇÃO DO TRIPTOFANO.

Nos PAMs, dentre todos os resíduos de aminoácidos, dois parecem estar fortemente associados tanto a atividade antimicrobiana como a manutenção da estrutura. O primeiro deles, a cisteína, possui um grupamento tiol nucleofílico que pode ser facilmente oxidado. A reatividade deste grupamento pode ser aumentada durante a ionização e, uma vez que os resíduos de cisteína possuem valores de pKa próximos a 7, eles podem ser encontrados em células na forma reativa de tiolato (BULAJ *et al.*, 1998). Por causa desta reatividade, o grupo tiol das cisteínas possuem muitas funções biológicas, das quais uma delas consiste na formação de pontes dissulfeto.

As pontes dissulfeto nas proteínas e peptídeos são formadas pela oxidação dos grupos tiol nos resíduos de cisteína. Estas pontes contribuem para manutenção da estrutura terciária das proteínas, além de conferir certo grau de resistência contra proteólise e outros fatores como temperatura e variações de pH. As pontes dissulfeto podem ser encontradas principalmente em proteínas secretadas, uma vez que grande parte dos compartimentos celulares possui potencial redutor. No interior celular, a formação das pontes dissulfeto ocorre por meio de isomerases, que catalisam a formação apropriada destas pontes (SEVIER *et al.*, 2002a).

Nos PAMs, as cisteínas parecem possuir um papel essencial para manutenção da estrutura em peptídeos. Porém em algumas classes de PAMs as cisteínas parecem não necessárias para a atividade antimicrobiana. Em um trabalho realizado em 2002 (HOOVER *et al.*, 2003), foi estudada a importância de três pontes dissulfeto encontradas na  $\beta$ -defensina humana 3. Para isso, os peptídeos foram sintetizados tanto em sua forma natural quanto substituindo as cisteínas por ácidos  $\alpha$ -aminobutíricos. Os peptídeos foram avaliados contra *E. coli*, *S. aureus* e o fungo *C. albicans*. A forma linearizada apresentou atividade cinco vezes maior do que a sequência original contra *E. coli*, duas vezes maior contra *S. aureus* e atividade semelhante contra *C. albicans*. Resultados similares foram observados em um trabalho realizado com a  $\beta$ -defensina humana 1 (SCHROEDER *et al.*, 2011).

Outro trabalho, realizado em 1996 (HARWIG *et al.*, 1996), avaliou a importância das pontes dissulfeto na protegrina-1, um peptídeo antimicrobiano isolado originalmente em leucócitos de porco (*Sus domesticus*). A estrutura tridimensional da protegrina é composta por duas folhas  $\beta$  ligadas por duas pontes dissulfeto. Ao substituir uma ou as duas pontes dissulfeto trocando as cisteínas por alanina, foi observada uma redução na atividade contra *P. aeruginosa* quando uma ponte não está presente e uma redução ainda maior quando todas as cisteínas são substituídas. Em outro trabalho (MANGONI *et al.*, 1996), onde as cisteínas são substituídas por acetamidometil, também é observada uma redução da atividade contra *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, na molécula sem as pontes dissulfeto em relação ao peptídeo original, o que mostra que para a classe das protegrinas, aparentemente as pontes dissulfeto são necessárias a atividade.

Outro aminoácido, que parece importante para atividade dos peptídeos sobre membranas lipídicas, apesar de não ser encontrado em todos PAMs é o triptofano (VOGEL *et al.*, 2002). Vários trabalhos avaliaram a importância do triptofano em

peptídeos antimicrobianos, mostrando que a substituição deste resíduo pode gerar mudanças na atividade observada. Um trabalho publicado em 2005 (DESLOUCHES *et al.*, 2005), buscou avaliar a substituição de resíduos de aminoácidos em PAMs gerados a partir de modelos *de novo*, os peptídeos em  $\alpha$ -hélice LBU (*lytic base unit*) 1, 2, 3 e 4. Em todos estes peptídeos testados, a substituição de resíduos de valina por resíduos de triptofanos na face hidrofóbica da hélice aumentou consideravelmente a atividade destes peptídeos contra os microrganismos testados, assim como aumentou a seletividade do peptídeo em modelos de cocultura contra *P. aeruginosa* em relação a fibroblastos humanos. Outro trabalho, realizado 2002 (FIMLAND *et al.*, 2002), avaliou a substituição dos resíduos de triptofano presentes na sakacina P, uma bacteriocina (classe de PAMs produzidos por bactérias) que parece apresentar uma conformação estrutural em  $\alpha$ -hélice. Fimland observou que a substituição de Trp<sup>33</sup> presentes da hélice pelos resíduos hidrofóbicos de leucina e fenilalanina apenas diminuiu levemente a atividade, enquanto que a substituição deste mesmo resíduo por tirosina ou arginina diminuiu a atividade de 10 a 20 e 500 a 1000 vezes, respectivamente.

Outro trabalho realizado por Strom (2001), a partir da substituição um a um dos resíduos de aminoácidos na lactoferricina bovina por alanina, parece apontar que somente alguns resíduos são essenciais para ação antimicrobiana contra *E. coli*, enquanto que quase todos são necessários para ação contra *S. aureus*. Os resíduos de triptofano, porém, parecem aparecer como os resíduos essenciais para atividade observada contra as duas bactérias. Baseado no trabalho de Strom, um outro estudo (HAUG *et al.*, 2001) promoveu substituições dos resíduos de triptofano por aminoácidos não naturais, mas com cadeias cíclicas, observando que a atividade foi mantida. Haug defende então, que resíduos contendo hidrocarbonetos aromáticos podem ser inseridos na membrana bacteriana, facilitando assim a atividade do peptídeo. Finalmente, outro estudo, realizado em 2003 (JIN *et al.*, 2003), demonstrou que o peptídeo antimicrobiano sintético (KIGAKI)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, tinha sua atividade aumentada quando um resíduo de triptofano era adicionado ao N-terminal, e que outros variantes que possuíam a mesma carga total e hidrofobicidade média do peptídeo com triptofano, aparentam ter propriedades de ligação à membrana distintas.

## 1.9 APLICAÇÃO CLÍNICA DOS PAMS

Apesar de mais de 1.000 peptídeos antimicrobianos já terem sido descritos, apenas alguns compostos contendo PAMs alcançaram as fases clínicas de teste. De fato, o desenvolvimento comercial destes peptídeos, ainda que para simples aplicações, tem sido muito limitado (BROGDEN *et al.*, 2011). A Tabela 1 descreve alguns dos peptídeos com ação antimicrobiana que estão em fase clínica de testes.

Dentre os peptídeos descritos na tabela, o peptídeo rBPI<sub>21</sub>, apresenta resultados muito promissores, pois além de prevenir infecções associadas a queimaduras e transplantes, também foi capaz de reduzir a morbidade em casos de sepse meningocócica (LEVIN *et al.*, 2000). O peptídeo MX-226 mostrou resultados muito promissores no tratamento e prevenção de infecções associadas a cateteres. O peptídeo XOMA 629, assim como o HB-1345, tem sido testado com sucesso para o tratamento da acne, uma vez que apresenta atividade contra a bactéria *Propionibacterium acnes* (KINDRACHUK *et al.*, 2010).

Um dos grandes limitantes da aplicação terapêutica dos peptídeos tem sido sem dúvida o custo de produção associado à síntese. Enquanto os antibióticos convencionais, a exemplo dos aminoglicosídeos, custam por volta de U\$ 0,80 por grama, os AMPs obtidos a partir do isolamento em fontes naturais custam de U\$ 100 a U\$ 600 por grama. Uma vez que as terapias requerem várias doses, o custo é aparentemente inviável no presente momento (MARR *et al.*, 2006). A fim de solucionar este problema, outras metodologias têm sido utilizadas, como a metodologia do DNA recombinante, que consiste na expressão de peptídeos antimicrobianos em bactérias transformadas com plasmídeos contendo genes codificantes (BOMMARIUS, 2010; ZORKO *et al.*, 2010). A partir desta metodologia de produção, pode-se obter uma concentração muito maior de PAMs do que pela metodologia de extração convencional, possibilitando assim o uso e testes em larga escala de um grande número de peptídeos e seus derivados.

**Tabela 1.** Alguns peptídeos antimicrobianos em testes clínicos e pré-clínicos Adaptado de Fjell (STEINSTRAESSER *et al.*, 2011), com modificações

<b>Droga</b>	<b>Descrição</b>	<b>Estágio de desenvolvimento</b>	<b>Uso Médico</b>
rBPI <sub>21</sub>	N-terminal de proteína bactericida de linfócitos	Fase IIIb	Previne infecções associadas a transplante e queimaduras
Omiganan (Migenix / BioWest Therapeutics)	Peptídeo catiônico sintético, derivado de indolicidina	Fase III	Antibacteriano tópico, prevenção de infecções relacionadas a catéteres
Acetato de Pexiganan (MacroChem)	Análogo sintético da magainina 2	Fase III	Antibacteriano tópico
Iseganan (Ardea Biosciences)	Peptídeo sintético, derivado de protegrina-1	Fase III	Mucosites orais em pacientes em tratamento com radioterápicos
Omiganan (Migenix / Cutanea Life Sciences)	Peptídeo catiônico sintético, derivado de indolicidina	Fase II/III	Acne severa e antiinflamatório
CZEN-002 (Zengen)	Peptídeo derivado do hormônio estimulador de $\alpha$ -melanócitos	Fase IIb	Candidíase vulvovaginal e antiinflamatório
PAC-113 (Pacgen Biopharmaceuticals)	Peptídeo sintético derivado da histatina 3 e histatina 5	Fase IIb	Candidíase oral
Xoma 629 (Xoma)	Derivado de proteína bactericida por aumento de permeabilidade	Fase IIa	Infecções cutâneas superficiais causadas por <i>S. aureus</i>
Delmitide (Genzyme)	Peptídeo semissintético derivado de HLA classe 1B2702	Fase II	Doença inflamatória de Bowel
OP-145 (OctoPlus / Leiden University)	Peptídeo sintético derivado de LL-37	Fase II	Infecção bacteriana crônica do ouvido médio
Ghrelin™ (University of Myazaki)	Peptídeo endógeno de defesa	Fase II	Inflamação das vias aéreas e fibrose cística
PMX-30063 (PoliMedix)	Oligômero de arilamida mimético de defensinas	Fase II	Infecções cutâneas causadas por <i>S. aureus</i>
hLF-11 (AM-Pharma)	Fragmento do peptídeo catiônico lactoferrina de humana	Fase I/II	Bacteremia e infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos
IMX942 (Inimex)	Peptídeo sintético derivado de IDR-1 e bactenecina	Fase Ia	Infecções nosocomiais e neutropenia febril
Plectasin (Novozymes)	Defensina fúngica	Pré-clínica	Doenças bacterianas
HB-1345 (Helix BioMedix)	Lipohexapeptídeo sintético	Pré-clínica	Acne, antibiótico de amplo espectro

## 1 OBJETIVOS

Avaliar a atividade do peptídeo antimicrobiano MBP-1 e seus derivados (com variações no padrão de pontes dissulfeto ou sem a presença do triptofano) com potencial inibitório de bactérias patogênicas humanas, correlacionando a atividade do peptídeo original e seus variantes com as estruturas geradas, visando assim um maior entendimento da importância dos resíduos de cisteína e triptofano para a atividade antimicrobiana na família *hairpin-like*.

## 2 JUSTIFICATIVA

A importância deste estudo deve-se à necessidade de se obter novas ferramentas para o combate de agentes microbianos causadores de infecções ao homem, os quais se encontram resistentes a muito dos medicamentos comercializados atualmente. Devido ao amplo espectro de atividade, os peptídeos antimicrobianos constituem um amplo campo de estudos nesta área. Espera-se, com este trabalho, identificar características estruturais importantes para a atividade antibacteriana que possam contribuir para um melhor entendimento do funcionamento dos peptídeos antimicrobianos, em especial da classe dos *hairpin-like*, permitindo assim o desenvolvimento racional de novas moléculas antibióticas.

### 3 HIPÓTESE

Os resíduos de cisteínas, em pontes dissulfeto, e o triptofano são necessários à atividade antibacteriana do peptídeo *hairpin-like* MBP-1?



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SÍNTESE E ENOVELAMENTO DO PEPTÍDEO BÁSICO DE MILHO (MBP-1) E SUAS VARIANTES

Os peptídeos (Tabela 2) foram sintetizados pela empresa *China Peptides CO., LTD* (Shangai, China). A metodologia empregada para síntese foi Fmoc (CARPINO, 1972), sendo em seguida os peptídeos purificados por HPLC em coluna C18 até uma pureza de 95%, confirmadas por espectrometria de massa tipo ESI. Em seguida os peptídeos foram liofilizados, ressuspensos em um volume mínimo de água ultrapura e o enovelamento foi realizado com DMSO 20 % por 7 h, de acordo com protocolo descrito (TAM, 1991), com modificações. Os peptídeos dobrados foram aplicados diretamente em cromatografia de fase reversa em coluna analítica de HPLC (Vydac C-18TP 522), e eluídos com um gradiente linear de acetonitrila (5-50%). As frações coletadas foram então verificadas por espectrometria de massa em um MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha).

**Tabela 2.** Lista de peptídeos utilizados no trabalho e respectivas sequências. Em amarelo as cisteínas, em verde o triptofano e em vermelho as alaninas.

Peptídeo	Sequência
MBP-1 (Original)	RSGRGE <span style="background-color: yellow;">C</span> RRQ <span style="background-color: yellow;">C</span> LRRHGQP <span style="background-color: green;">W</span> ETQE <span style="background-color: yellow;">C</span> MRR <span style="background-color: yellow;">C</span> RRRG
Var 1 (W20A)	RSGRGE <span style="background-color: yellow;">C</span> RRQ <span style="background-color: yellow;">C</span> LRRHGQP <span style="background-color: red;">A</span> ETQE <span style="background-color: yellow;">C</span> MRR <span style="background-color: yellow;">C</span> RRRG
Var 2 (C7A, C11A, C25A, C29A)	RSGRGE <span style="background-color: red;">A</span> RRQ <span style="background-color: red;">A</span> LRRHGQP <span style="background-color: green;">W</span> ETQE <span style="background-color: red;">A</span> MRR <span style="background-color: red;">A</span> RRRG
Var 3 (C7A, C25A)	RSGRGE <span style="background-color: yellow;">C</span> RRQ <span style="background-color: red;">A</span> LRRHGQP <span style="background-color: green;">W</span> ETQE <span style="background-color: yellow;">C</span> MRR <span style="background-color: red;">A</span> RRRG
Var 4 (C7A, C29A)	RSGRGE <span style="background-color: yellow;">C</span> RRQ <span style="background-color: red;">A</span> LRRHGQP <span style="background-color: green;">W</span> ETQE <span style="background-color: red;">A</span> MRR <span style="background-color: yellow;">C</span> RRRG
Var 5 (C11A, C25A)	RSGRGE <span style="background-color: red;">A</span> RRQ <span style="background-color: yellow;">C</span> LRRHGQP <span style="background-color: green;">W</span> ETQE <span style="background-color: yellow;">C</span> MRR <span style="background-color: red;">A</span> RRRG
Var 6 (C11A, C29A)	RSGRGE <span style="background-color: red;">A</span> RRQ <span style="background-color: yellow;">C</span> LRRHGQP <span style="background-color: green;">W</span> ETQE <span style="background-color: red;">A</span> MRR <span style="background-color: yellow;">C</span> RRRG

## 4.2 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA

A quantificação protéica foi realizada através do kit Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen). Um volume de 199 µL da solução tampão Quant-iT™ foi homogeneizado por 2 s, juntamente com 1 µL do reagente fluorimétrico Quant-iT™. Logo após, uma alíquota de 10 µL da amostra foi adicionada a 190 µL da solução tampão padrão do reagente + fluorocromo padrão do reagente, sendo então homogeneizada por 2 s e incubada a uma temperatura de 25° C por 15 min. Após este tempo, essa solução foi submetida ao processo de quantificação no fluorímetro Qubit™ e os valores de concentração protéica presentes nas amostras foram calculados utilizando três padrões protéicos distintos como referência na calibração prévia do equipamento.

## 4.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A análise de massa molecular das frações obtidas foi realizada em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha) equipado com laser *Smart Beam*™ controlado pelo software Flexcontrol 3.0. Objetivando as análises de MALDI-TOF MS, as frações liofilizadas foram dissolvidas em água ultra pura e homogeneizadas a uma solução saturada (50 µl TFA 3%, 250 µl ACN 100% e 200 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q) de uma matriz constituída por ácido α-ciano-4-hidroxi-cinâmico (1:3). Em seguida foram depositadas em duplicata em uma placa do tipo *Anchorchip* Var-384 e cristalizadas à temperatura ambiente. Os componentes moleculares presentes tiveram suas massas moleculares determinadas por MS com calibração externa com mistura de peptídeos padrão (*Peptide Calibration Standard* I, Bruker Daltonics) sob modo de operação refletivo e positivo.

#### 4.4 BIOENSAIO CONTRA BACTÉRIAS

Nos ensaios de atividade *in vitro* foram utilizadas as bactérias *E. coli* DH5- $\alpha$ , *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* 27853, *K. pneumoniae* 13882. As células bacterianas foram previamente replicadas em meio Luria Bertani (LB) líquido (50% bactotripton, 25% extrato de levedura: 35% NaCl, diluídos em água destilada), sob agitação durante 2-3 horas a 37° C. A atividade antimicrobiana foi determinada usando o método de microdiluição em caldo de acordo M100-S22 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Previamente a curva de crescimento da cultura original foi estabelecida por monitoramento do crescimento bacteriano através da observação da densidade ótica a 595 nm, a cada meia hora. Dessa forma, foi possível determinar o tempo ótimo em que o inóculo alcançou o meio da fase exponencial. Para determinar a relação entre unidades formadoras de colônias (UFC) e densidade ótica, foi aplicada a técnica de micro gotas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão, onde uma alíquota foi coletada durante as leituras de meia hora, submetida a diluições de 1:10 e micro gotas das suspensões foram semeadas em meio LB acrescido de agar (15 g.L<sup>-1</sup>). Os testes contra as bactérias foram realizados em placas multi-poços, a partir da cultura original, onde foi preparado um inóculo, diluído para aproximadamente 5 x 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> por poço, sem ultrapassar 10% do volume do poço contendo meio LB líquido, juntamente com 50; 25; 17,5 e 2,5  $\mu$ M do peptídeo testado, sendo água destilada estéril utilizada como controle negativo e como controle positivo cloranfenicol 80  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. As placas multi-poços inoculadas foram incubadas com agitação leve a 37° C durante 4 horas. O crescimento bacteriano foi monitorado a 595 nm, a cada meia hora, durante a fase exponencial de crescimento bacteriano. A quantidade de crescimento bacteriano nos poços do controle positivo foi comparada com a quantidade de crescimento nos poços do controle negativo para determinar os pontos finais de crescimento.

#### 4.5 BIOENSAIO CONTRA FUNGOS

O teste contra o fungo *Aspergillus fumigatus* foi realizado através de inoculação de 50 µl de amostra a uma concentração de 100 e 200 µg.ml<sup>-1</sup> em discos de papel de filtro sobre meio sólido YPD (1% de extrato de levedo, 2% de peptona e 2% de glicose, 2% de ágar). Como controle negativo foi usado água destilada e estéril e como controle positivo fungizona (anfotericina B) a 100 µg.ml<sup>-1</sup>. O fungo foi inoculado no centro da placa, e os discos de papel nas laterais, margeando o inóculo do fungo. Os meios foram mantidos em estufa (37° C) por cinco dias. A análise da inibição foi feita avaliando-se a presença de halos em volta dos discos.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O ensaio para determinação da atividade hemolítica foi realizado de acordo com Bignami (BIGNAMI, 1993) com modificações. Primeiramente, as células foram separadas do plasma por sedimentação e preparadas a 1% (v:v). Esta suspensão de eritrócitos humanos foi lavada três vezes com uma solução de PBS. Em seguida foram alicotadas em tubos de polietileno 50 µl da solução de eritrócitos 1% e aplicadas diferentes concentrações do peptídeo (50 µM, 25 µM, 17,5 µM e 2,5 µM). Solução salina foi usada como controle negativo e Triton X-100 0,1% como controle positivo. Após uma hora em repouso, os tubos foram centrifugados a 1000 G por 2 min, e 100 µl do sobrenadante foram aplicados em uma placa multi-poços, foram lidas a 406 nm em um leitor de ELISA (Bio-Tek PowerWave HT- USA).

#### 4.7 MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular foi realizada através do programa Modeller 9.10 (ESWAR *et al.*, 2006), pelo qual foram construídos 500 modelos utilizando como molde a estrutura do peptídeo EcAMP1 (código PDB 2L2R), que apresentou 66 %

de identidade com o MBP-1. Dentre os 500 modelos, a estrutura de menor energia indicado pelo DOPE score (-1898,13892) foi selecionada. O modelo foi validado pelos softwares ProSa (Zscore - 4,43) (WIEDERSTEIN *et al.*, 2007) e Procheck (*Ramachandran Plot*: Regiões favoráveis- 92,6%, regiões generosamente permitidas- 3,7%, regiões proibidas- 3,7%; *G-factor*: 0,13) (LASKOWSKI, 1993); e visualizado pelo software Pymol (<http://www.pymol.org>). A superfície eletrostática foi calculada utilizando também o Pymol.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

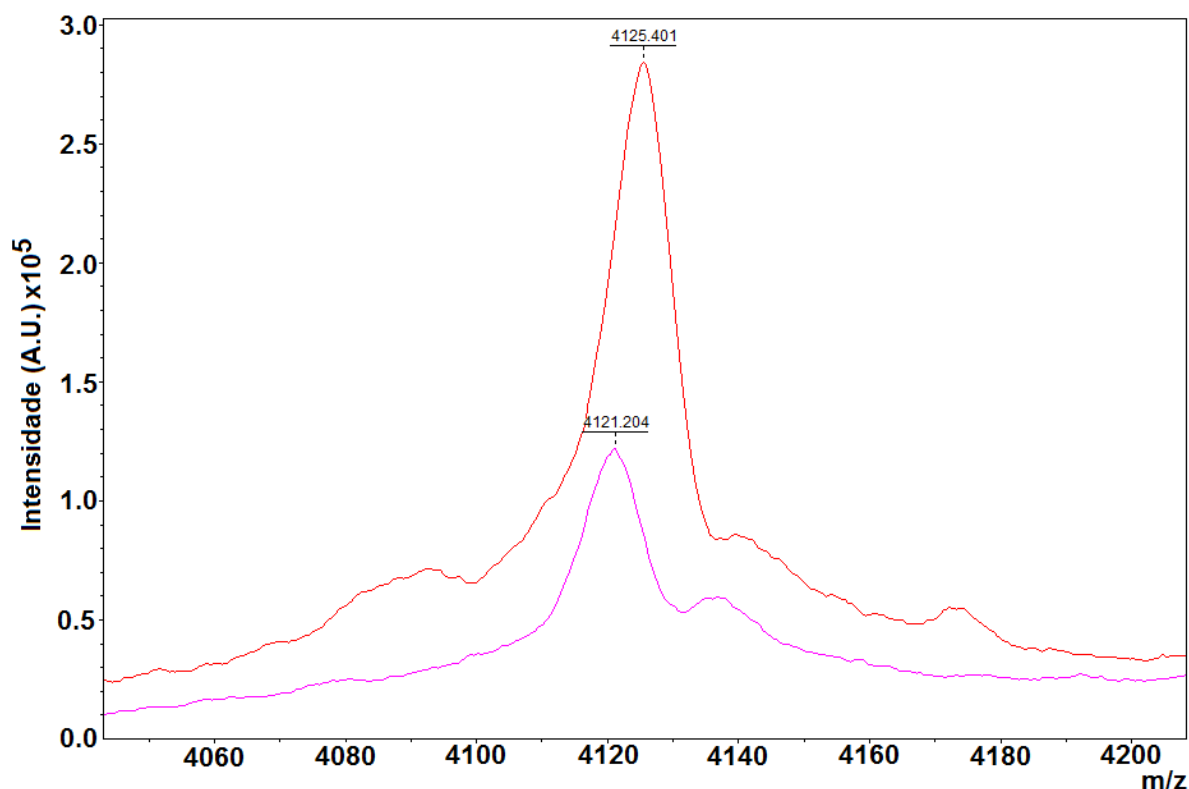
A fim de entender melhor a importância dos resíduos de cisteína e triptofano para a atividade e estrutura do peptídeo MBP-1, a sequência original foi sintetizada assim como seis variantes (Tabela 2). Para que a estrutura natural do peptídeo fosse mimetizada, foi necessário o desenvolvimento de um enovelamento *in vitro* a fim de produzir as possíveis ligações entre as cisteínas.

A oxidação das cisteínas geralmente acontece *in vivo* por meio de um processo enzimático que ocorre principalmente no retículo endoplasmático, e envolve a ação de oxidoredutases tiol-dissulfeto, especialmente a Ero 1 (oxidoredutina do retículo endoplasmático) e a PDI (dissulfeto isomerase de proteínas). A Ero 1 transfere equivalentes de oxidação diretamente para a PDI, que por sua vez oxida as proteínas (SEVIER *et al.*, 2002b). Para formação de pontes dissulfeto em processos *in vitro*, principalmente de proteínas sintéticas, vários métodos foram desenvolvidos, entre eles o uso de reagentes dissulfídicos como a cistina, cistamina ou ditioneitol (DTT) ou ainda outros reagentes aceptores de elétrons como o oxigênio (ar), iodina ou o dimetilsulfóxido (DMSO) (BULAJ, 2005).

Neste trabalho, inicialmente realizou-se a oxidação das cisteínas da sequência original do MBP-1 usando uma solução de 100 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,7 (DUVICK *et al.*, 1992), assim como descrito para o próprio peptídeo MBP-1. Porém esta metodologia foi ineficiente sendo possível observar apenas a perda de 2 Da, indicando que aparentemente, apenas uma das pontes estava sendo formada (dados não mostrados). Entretanto, ao realizar a oxidação com DMSO 20%, assim como descrito em outros trabalhos (TAM, 1991; WANG *et al.*, 2009), foi observada por espectrometria de massa (Tabela 3) a perda de 4 Da, no MBP-1 original (Figura 12) e no MBP-1 sem triptofano (Var 1), indicando que possivelmente ocorreu a oxidação das 4 cisteínas nestes peptídeos. Desta forma, a metodologia utilizando DMSO foi aplicada a todos os outros peptídeos. A formação de pontes dissulfeto também foi observada pela aparente perda de massa de 2 Da entre os peptídeos Var 4, 5 e 6. No peptídeo Var 2, que não apresentava cisteína não foi observada perda de massa, enquanto que no Var 3, não foi possível identificar a massa esperada tanto antes como após o enovelamento, o que foi associado a um possível erro durante a síntese do peptídeo, sendo esse variante descartado do estudo.

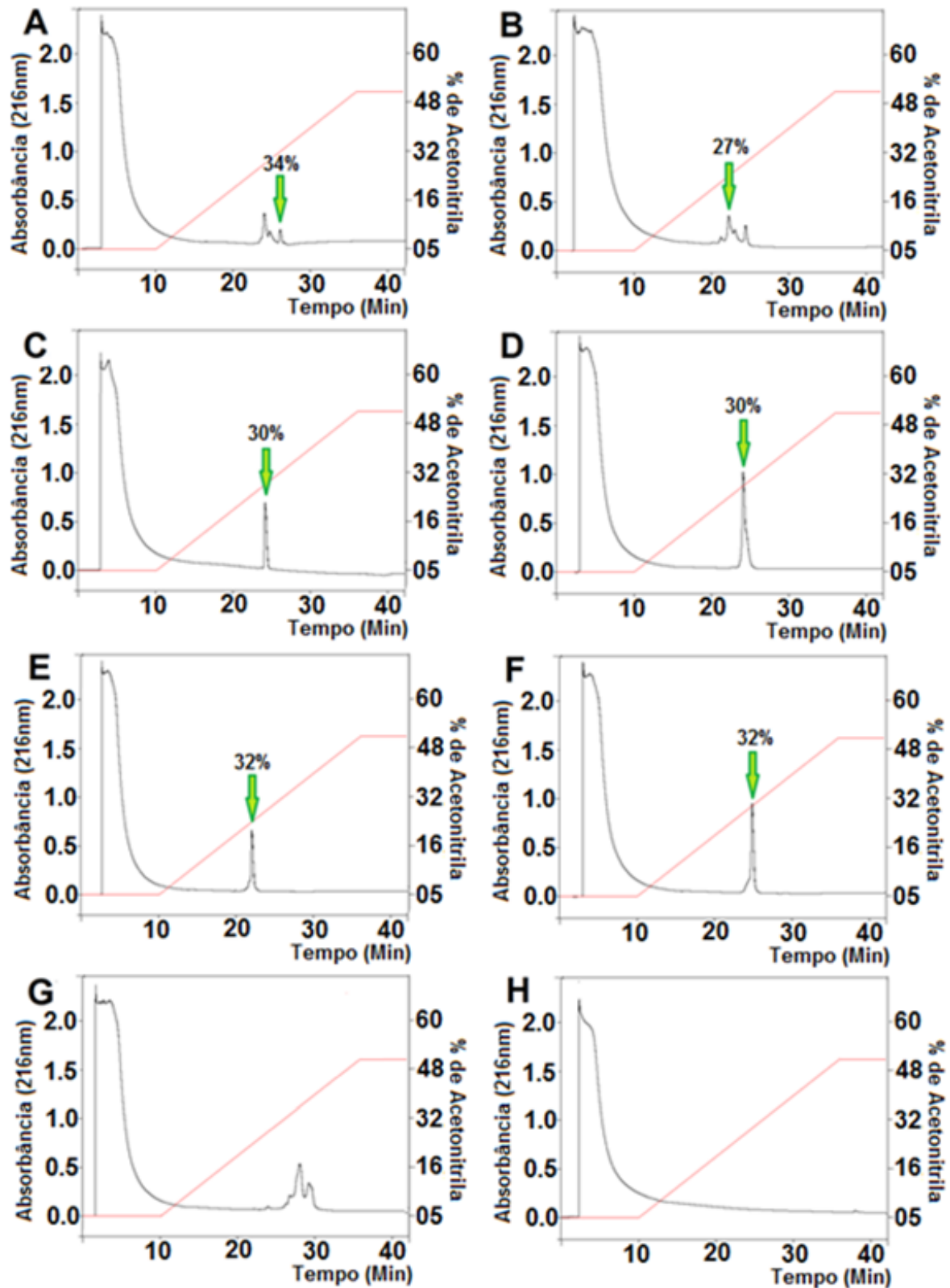
**Tabela 3-** Análise de espectrometria de massa do peptídeo MBP-1 e seus variantes. Principais íons, correspondentes a massa, antes e após o envelhecimento. Me- Massa média. Mo- Massa Monoisotópica.

Peptídeo	Antes do Envelamento		Após o Envelamento	
	Observada	Esperada	Observada	Esperada
MBP-1 (Original)	4029,46 <sub>Me</sub>	4129,71 <sub>Me</sub>	4125,40 <sub>Me</sub>	4125,20 <sub>Me</sub>
Var 1 (W20A)	4008,05 <sub>Mo</sub>	4008,00 <sub>Mo</sub>	4004,01 <sub>Mo</sub>	4004,00 <sub>Mo</sub>
Var 2 (C7A, C11A, C25A, C29A)	4001,40 <sub>Mo</sub>	3999,54 <sub>Mo</sub>	4001,40 <sub>Mo</sub>	3999,54 <sub>Mo</sub>
Var 3 (C7A, C25A)	-	4065,58 <sub>Me</sub>	-	4063,58 <sub>Me</sub>
Var 4 (C7A, C29A)	4065,30 <sub>Me</sub>	4065,58 <sub>Me</sub>	4063,20 <sub>Me</sub>	4063,58 <sub>Me</sub>
Var 5 (C11A, C25A)	4065,13 <sub>Me</sub>	4065,58 <sub>Me</sub>	4063,74 <sub>Me</sub>	4063,58 <sub>Me</sub>
Var 6 (C11A, C29A)	4065,40 <sub>Me</sub>	4065,58 <sub>Me</sub>	4063,15 <sub>Me</sub>	4063,58 <sub>Me</sub>



**Figura 12-** Espectro do peptídeo MBP-1 antes equivalente a 4125.40 Da (linha superior) e depois do envelhecimento, equivalente a 4121.20 Da (linha inferior), que demonstra a perda de 4 Da relativos as cisteínas que foram oxidadas.

Para assegurar a remoção do DMSO, (como demonstrado na Figura 13H, onde somente DMSO 20 % foi aplicado na coluna C18), os peptídeos envelhecidos foram aplicados em coluna C18 de fase reversa. A remoção do DMSO foi importante, uma vez que o mesmo apresenta toxicidade às bactérias e poderia gerar falsos resultados nos ensaios antimicrobianos (BASCH *et al.*, 1968). Os cromatogramas provenientes do HPLC de fase reversa, para cada peptídeo, encontram-se na Figura 13.



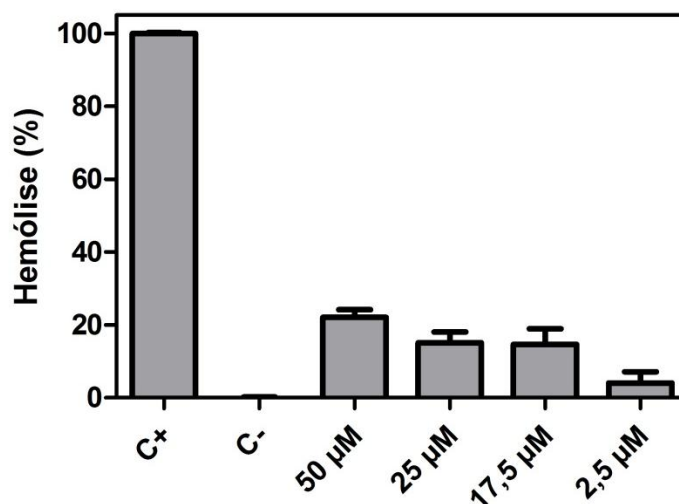
**Figura 13-** Cromatografias de fase reversa em coluna analítica de HPLC (Vydac C-18 TP 522) de MBP-1 e variantes. A linha diagonal representa o gradiente linear de acetonitrila (0-60%). A) Sequência original. B) Var 1 (W20A). C) Var 2 (C7A, C11A, C25A, C29A). D) Var 4 (C7A, C29A). E) Var 5 (C11A, C25A). F) Var 6 (C11A, C29A). G) Var 3 (C7A, C25A). H) DMSO 20% usado como controle. As setas representam as frações coletadas.



O fato de ser observada mais de uma fração em alguns dos cromatogramas (Figura 13 A, B e G) sugere a presença de outros produtos que podem ser formados durante a reação com DMSO ou ainda resíduos da síntese, que podem ser observados nas espécies com 4 cisteínas. As frações que apresentaram os peptídeos de interesse, identificados por espectrometria de massa estão marcadas na figura com uma seta.

Após confirmação do enovelamento, foram iniciados os testes antibacterianos, antifúngicos e hemolíticos. A sequência original do peptídeo MBP-1, foi sintetizada em maior quantidade, tanto para permitir os experimentos de enovelamento e hemólise, quanto para encontrar um microrganismo que servisse como modelo de testes para os demais peptídeos.

O peptídeo MBP-1 apresentou atividade hemolítica relativamente baixa, de cerca de 20% mesmo em concentrações mais elevadas, como a 48,5  $\mu\text{M}$  (Figura 14), favorecendo a aplicação destes peptídeos em testes farmacológicos com mamíferos. Alguns peptídeos descritos na literatura, como a melitina, possuem valores de hemólise total de 1,75  $\mu\text{M}$  (SUN *et al.*, 2005), enquanto que a magainina, um peptídeo antimicrobiano amplamente testado em mamíferos, possui valores superiores a 83  $\mu\text{M}$  (HELMERHORST *et al.*, 1999).



**Figura 14-** Atividade hemolítica do peptídeo MBP-1 em diferentes concentrações. Controle positivo: Triton X-100 0,1%. Controle negativo: PBS.

Apesar de um estudo prévio (DUVICK *et al.*, 1992) relatando a atividade do MBP-1 contra vários fungos fitopatógenos, como *Alternaria longipes*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium gramineum*, *Sclerotia trifolium*, *Sclerotia sclerotium*, o presente trabalho demonstrou que o MBP-1 sintético não apresentou atividade

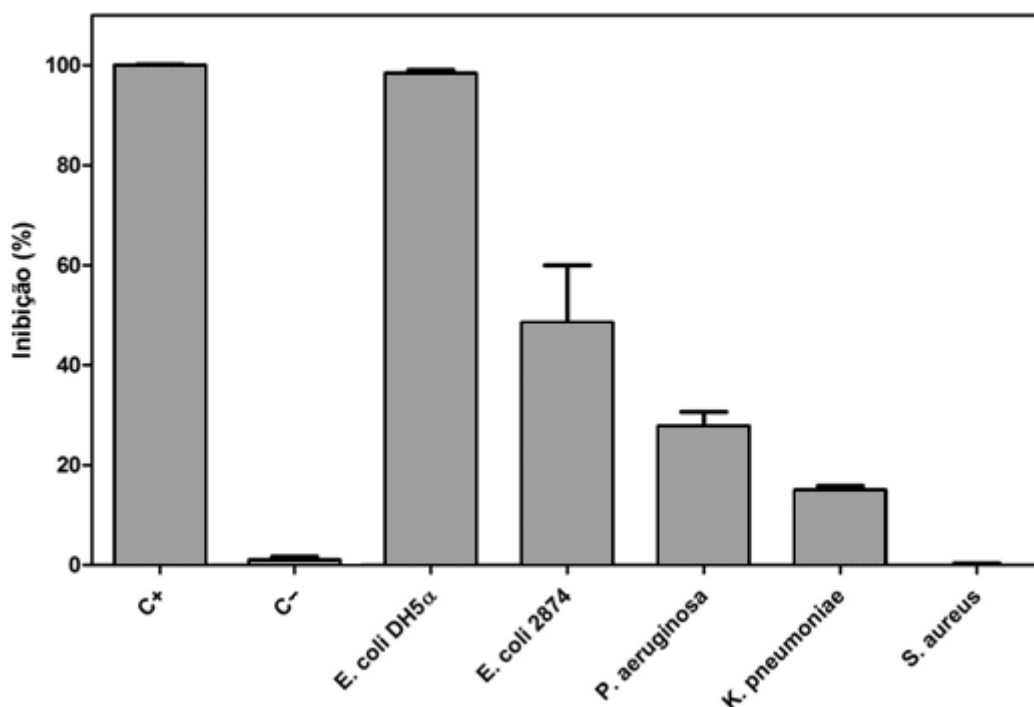
contra o fungo testado, *Aspergillus fumigatus* (dados não mostrados). Este resultado pode estar relacionado à grande diversidade de composições de parede celular dos fungos (BOWMAN *et al.*, 2006), que pode variar consideravelmente entre espécies. Desta forma a composição da membrana de alguns fungos pode impedir tanto a ação na membrana como no interior celular, ainda que esses mesmos peptídeos sejam ativos contra outras espécies.

Outros peptídeos da família *haipin-like* apresentam atividade antifúngica, como o EcAMP-1 (NOLDE *et al.*, 2011), que parece ser ativo contra os fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Polymyxa betae*, *Phytophthora infestans*, *Pythium debaryanum* e *Pythium ultimum*, porém não foi observada atividade contra *Colletotrichum graminicola*, *Diplodia maydis*, *Tritirachium álbum* e *Aspergillus niger*, sendo o último do mesmo gênero testado neste trabalho. Outro peptídeo da classe *hairpin-like* que parece apresentar atividade antifúngica consiste no peptídeo MiAMP2d (MARCUS *et al.*, 1999b), que apresentou atividade contra os fungos fitopatogênicos *Alternaria helianthi*, *Ceratocystis paradoxa*, *Cercospora nicotianae*, *Chalara elegans*, *F. oxysporum*, *Leptosphaeria maculans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* e *Phytophthora cryptogea*.

Para melhor caracterizar a atividade antifúngica do peptídeo MBP-1, principalmente a relacionada a fungos com potencial de infectar humanos como *A. fumigatus*, novos estudos devem ser realizados.

Uma vez que não foi observada atividade antifúngica, o peptídeo MBP-1 original foi testado contra bactérias na concentração de 50  $\mu$ M, sendo avaliado o crescimento das bactérias após 2,5 h de incubação. As atividades apresentadas contra *P. aeruginosa*, *E. coli* 8739, *E. coli* DH5 $\alpha$  e *K. pneumoniae*, encontram-se na Figura 15.

O trabalho anterior realizado por Duvick (DUVICK *et al.*, 1992) indicava que o peptídeo MBP-1 apresentava atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* DH5 $\alpha$  e a Gram-positiva *C. michiganensis*. No presente estudo, a sequência original do MBP-1 não demonstrou atividade contra a bactéria Gram-positiva, *S. aureus*, porém, contra *E. coli* foi observada a atividade de inibição total do crescimento em concentrações acima de 50  $\mu$ M, apesar de a bactéria retomar o seu crescimento após 2,5 h de incubação (dados não mostrados).



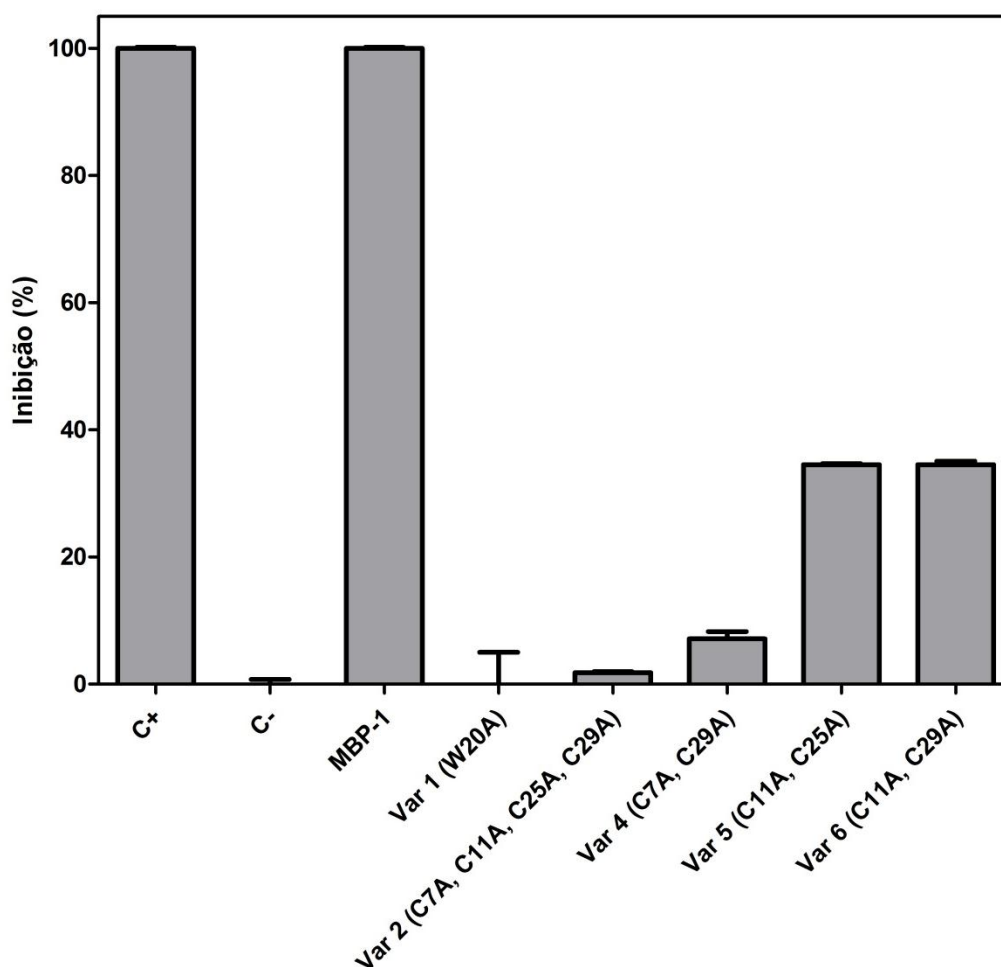
**Figura 15.** Porcentagem de inibição do peptídeo MBP-1 (sequência original) a 50 µM após 2,5 horas de incubação. Controle positivo: Cloranfenicol a 80 µg.mL<sup>-1</sup>. Controle Negativo (não mostrado): Água ultrapura.

O trabalho anterior realizado por Duvick (DUVICK *et al.*, 1992) indicava que o peptídeo MBP-1 apresentava atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* DH5α e a Gram-positiva *C. michiganensis*. No presente estudo, a sequência original do MBP-1 não demonstrou atividade contra a bactéria Gram-positiva, *S. aureus*, porém, contra *E. coli* foi observada a atividade de inibição total do crescimento em concentrações acima de 50 µM, apesar de a bactéria retomar o seu crescimento após 2,5 h de incubação (dados não mostrados).

Este resultado foi diferente do relatado (DUVICK *et al.*, 1992), que associou o MIC de MBP-1 a 1 µM. Possivelmente a diferença observada se relaciona à metodologia de ensaio empregada, uma vez que no trabalho obtido na literatura a bactéria foi incubada por 1 h em um tampão de fosfato de sódio 10 mM contendo o peptídeo MBP-1, sendo depois removida desta solução por centrifugação, diluída em 10 vezes no mesmo tampão fosfato e inoculada em placas com meio LB, sendo o MIC associado à concentração de peptídeo que era capaz de inibir a formação de colônias. No presente trabalho que segue as normas do NCCLS, modificado apenas em relação ao tempo de ensaio, o peptídeo foi incubado diretamente com a bactéria no meio de cultura e o crescimento foi avaliado após o fim do período por meio da densidade óptica observada no meio. Esta última metodologia de ensaio tem sido

amplamente usada para determinação de MICs de PAMs, e foi usada com outro peptídeo da família *hairpin-like*, o MiAMP2d. Este peptídeo foi testado contra as bactérias *C. michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* e *E. coli*, apresentando atividade apenas contra *E. coli* na maior concentração testada, de 10  $\mu\text{M}$  (MARCUS *et al.*, 1999a).

Uma vez que o peptídeo MBP-1 original apresentou maior atividade inibitória absoluta contra a linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$ , essa estirpe foi escolhida para os testes subsequentes. Para os testes utilizando os peptídeos derivados, foi utilizada a concentração de 50  $\mu\text{M}$ , onde melhor se podia observar a atividade do peptídeo. Os resultados normalizados se encontram na Figura 16.



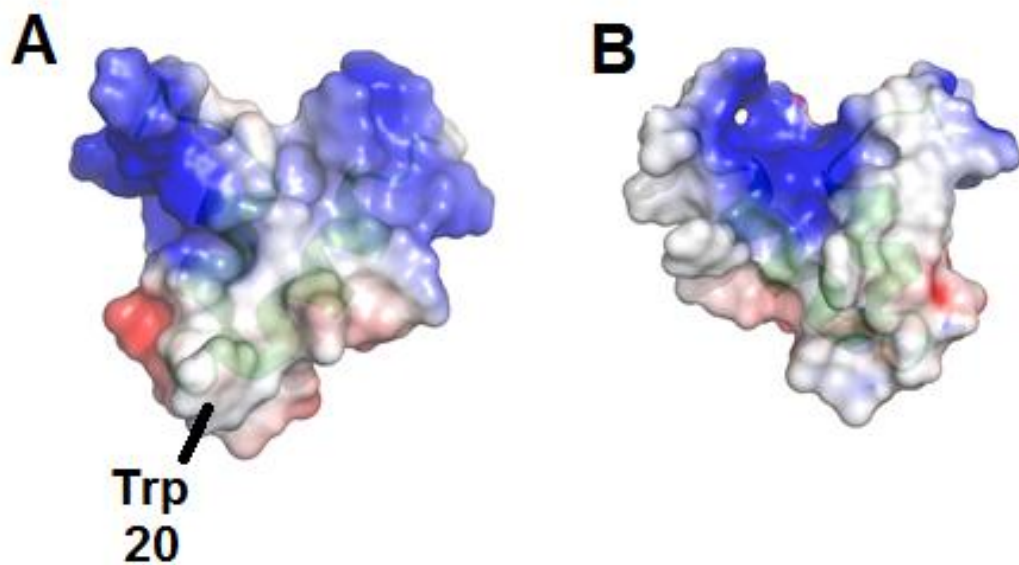
**Figura 16.** Ensaio de MBP-1 e variantes contra *E. coli*, incubados por 12 horas a 37° C. A figura corresponde à inibição após 2,5 horas de incubação, onde as diferenças foram mais evidentes. **C+**: Cloranfenicol 80  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . **C-**: Água Ultrapura. Todas as frações foram testadas a 50  $\mu\text{M}$ .

É importante ressaltar que o resultado após 2,5 horas de incubação foi escolhido por demonstrar a maior diferença de inibição, uma vez que na concentração empregada, por se tratar possivelmente de uma molécula com ação

bacteriostática, foi observado um reestabelecimento do crescimento das bactérias, de forma que somente o peptídeo original manteve parte da sua atividade (dados não mostrados). Após 2,5 h, foi possível observar 100% de inibição para o peptídeo MBP-1, porém não é observada atividade no Var 1 (W20A), resultado que mostra a importância do resíduo de triptofano no peptídeo. Este efeito observado sugere que, assim como em outros peptídeos descritos na literatura, este resíduo tem papel chave na interação com membrana, devido a sua hidrofobicidade. Foi observado que para o PAM bacteriano sakacina P, a substituição do triptofano por resíduos de aminoácidos apolares como leucina e fenilalanina parecem causar pouco impacto na atividade antimicrobiana, enquanto que a substituição por resíduos de aminoácidos polares como arginina e tirosina reduziu a atividade de 10 a 50 e de 200 a 500 vezes contra os microrganismos testados (FIMLAND *et al.*, 2002). Sendo assim, a substituição por alanina como no presente trabalho, teria um grande impacto sobre a atividade. De fato, em um estudo sobre variantes da lactoferrina (STROM *et al.*, 2001), os peptídeos que tinham os resíduos de triptofano substituídos por alanina apresentaram um decréscimo considerável de atividade contra *S. aureus* e *E. coli*. Por fim outro estudo demonstra o mesmo efeito nos peptídeos sintéticos LBU (*Litic basic units*) (DESLOUCHES *et al.*, 2005), onde os resíduos de valina foram substituídos por triptofanos, aumentando assim a atividade contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

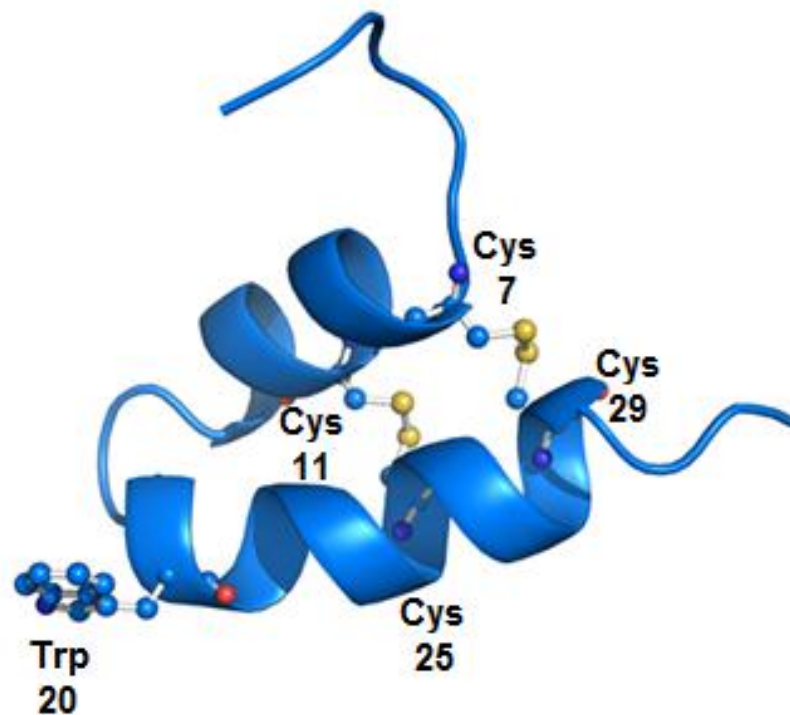
O modelo da superfície eletrostática do MBP-1, gerado por modelagem molecular (Figura 17), sugere que o triptofano exposto possui um papel importante para interação com a membrana através de forças de Van der Waals. Desta forma, um dos modelos de ação mais favoráveis para o peptídeo MBP-1 pode ser o modelo de carpete, onde o peptídeo solubilizaria porções da membrana induzindo a formação de poros.

Além disso, sem as pontes dissulfeto também não foram observadas elevadas atividades inibitórias, possivelmente devido a desestabilização da estrutura tridimensional do peptídeo, o que provavelmente leva a uma mudança de conformação e localização dos sítios hidrofóbicos e carregados positivamente, dificultando a interação com a membrana. A diminuição da atividade foi mais pronunciada no peptídeo em que todas as cisteínas foram modificadas (Var 2), seguido pelo Var 4, que apresenta ligação entre as cisteínas mais internas na sequência.



**Figura 17.** Superfície eletrostática de MBP-1. Em azul as regiões básicas, em vermelho as regiões ácidas e em branco as regiões hidrofóbicas. A) Face do peptídeo com triptofano em evidência. B) Face oposta de A.

De acordo com modelo da estrutura do peptídeo MBP-1 (Figura 18), gerado por homologia com o peptídeo EcAMP1 (pdb 2L2R), as pontes dissulfeto naturalmente formadas deveriam ser feitas entre os resíduos Cys<sup>7</sup> e Cys<sup>29</sup> e os resíduos Cys<sup>11</sup> e Cys<sup>25</sup>.



**Figura 18.** Modelo do peptídeo MBP-1, evidenciando as cisteínas e o triptofano. Cys<sup>7</sup> e Cys<sup>29</sup> parecem estabilizar a porção mais próxima ao terminal das hélices, enquanto que Cys<sup>11</sup> e Cys<sup>25</sup> parecem estabilizar o interior das hélices. Bolas e varetas representam as pontes dissulfeto.

O fato de se observar a oxidação não natural entre os resíduos Cys<sup>7</sup> e Cys<sup>25</sup> (Var 5) com atividade semelhante a Cys<sup>7</sup> e Cys<sup>29</sup> (40%), parece apontar que a estabilização da hélice mais próxima ao N-terminal por meio da Cys<sup>7</sup> pode ser mais importante do que estabilizar a base do peptídeo por meio das ligações entre Cys<sup>11</sup> e Cys<sup>25</sup>. Esta estabilização manteria o triptofano na posição mais adequada a atividade. Estes dados parecem ainda apontar que estabilizar as porções mais próximas aos terminais das hélices com pontes dissulfeto pode ser mais importante que estabilizar a região interior das hélices, uma vez que as cargas positivas presentes nas regiões N-terminal e C-terminal possivelmente podem gerar um maior distanciamento entre as porções terminais das hélices.

Resultados similares foram obtidos para o peptídeo protegrina-1 (HARWIG *et al.*, 1996), onde a substituição das cisteínas por ácido  $\alpha$ -aminobutírico causou a diminuição considerável da atividade. Outro trabalho (MANGONI *et al.*, 1996), que também estudou a protegrina-1, fez substituição das cisteínas por alanina, e também observou um decréscimo da atividade contra a bactéria testada, *P. aeruginosa*. Em um estudo realizado por Powers (2004), a substituição das cisteínas por serinas no peptídeo  $\beta$ -hairpin polifemusina foi avaliada, observando-se um decréscimo de quatro a seis vezes da atividade contra as bactérias *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* e fungo *C. albicans*. Por fim, (TAMAMURA *et al.*, 1993) foi realizada a substituição das cisteínas por acetamidometil ou alanina, e em ambos os casos a atividade foi diminuída contra os microorganismos testados.

Outros artigos, porém, demonstram que para alguns peptídeos antimicrobianos, a substituição ou deleção das cisteínas pode não ter influência sobre a atividade do peptídeo. Em um trabalho realizado com a  $\beta$ -defensina humana 3 (HBD-3) (HOOVER *et al.*, 2003), foi observado que a linearização do peptídeo, por meio da substituição das cisteínas por ácido  $\alpha$ -aminobutírico, implicou em um aumento da atividade do peptídeo de cinco vezes contra *E. coli* e de duas vezes contra *S. aureus*, porém a atividade foi mantida contra *C. albicans*. Em outro estudo, foi observado que para a  $\beta$ -defensina humana 1, quando testada em meios redutores, que induziam a redução das pontes dissulfeto, possuía atividade muito aumentada contra o fungo *Candida albicans* e a bactéria Gram-positiva *Bifidobacterium adolescentis* (SCHROEDER *et al.*, 2011). Entretanto a atividade foi mantida contra a bactéria Gram-negativa *Bacteroides vulgatus*. No mesmo trabalho

foi ainda realizada a substituição das cisteínas por serinas ou alaninas, porém em nenhuma condição estudada foi observada atividade significativa destes variantes, de forma que as cisteínas, ainda que não na forma oxidada, podem ser importantes para a atividade do peptídeo estudado em ambientes redutores.

Em um estudo realizado com a protegrina-1 (LAI *et al.*, 2002), um peptídeo formado por duas folhas- $\beta$  antiparalelas ligadas por duas pontes dissulfeto, as cisteínas foram substituídas por treoninas. Segundo o autor, esse aminoácido apresenta maior preferência pela conformação em folha  $\beta$ , e diferente do observado (HARWIG *et al.*, 1996; MANGONI *et al.*, 1996), a atividade do peptídeo linear foi mantida para *E. coli* e diminuída em quatro vezes para *S. aureus*. Em outro estudo com o peptídeo Ib-AMP1(WANG *et al.*, 2009), também formado por duas folha  $\beta$ , extraído da planta *Impatiens balsâmica*, foi observado que ao remover as cisteínas a atividade permaneceu igual para *E. coli*, e foi aumentada em duas vezes para *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *S. epidermidis*, quatro vezes para *S. aureus* e oito vezes para *S. typhimurium* e *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). Por fim, outro estudo (RAO, 1999) avaliou as consequências da substituição das cisteínas da tachiplesina, extraídas de caranguejo-ferradura, por diversos resíduos de aminoácidos. Na substituição por alanina e aspartato, não foi observada atividade, enquanto que na substituição por fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina, metionina e valina, a atividade é mantida ou aumentada contra as bactérias *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *Shigella dysenteriae*, além do fungo *C. albicans*. Em conjunto, os dados da literatura apontam que a substituição, nas  $\beta$ -*hairpins*, das cisteínas por alanina, podem desestabilizar as folhas  $\beta$ , diminuindo assim a atividade.

Apesar da produção de peptídeos sem pontes dissulfeto ser aparentemente mais barata e relativamente mais simples, a presença destas ligações confere aos peptídeos antimicrobianos uma maior resistência à degradação termal, química e enzimática, que pode ser útil na produção de novos medicamentos de uso sistêmico, resistentes a proteases endógenas. Além disto, as pontes dissulfeto parecem ser essenciais à atividade de MBP-1, e possivelmente na classe *hairpin-like*, uma vez que a deleção de qualquer ponte dissulfeto, por meio de substituição por alanina, diminuiu consideravelmente a atividade.



O presente trabalho foi o primeiro a avaliar a substituição de cisteínas em um peptídeo *hairpin-like*. Os outros trabalhos que avaliaram esta atividade trataram apenas com peptídeos das classes das defensinas ou peptídeos com a conformação  $\beta$ -hairpin, com duas folhas  $\beta$  e duas pontes dissulfeto. Para resultados mais conclusivos sobre a importância das pontes dissulfeto na classe *hairpin-like*, novos testes são necessários para avaliar a deleção ou substituição da cisteína por outros resíduos de aminoácidos, assim como testar estes peptídeos contra outros microrganismos.

## 6 CONCLUSÕES

Os dados aqui mostrados demonstram que a formação das pontes dissulfeto no peptídeo MBP-1 pode ocorrer a partir da oxidação com DMSO. O peptídeo enovelado não apresenta atividade *in vitro* contra o fungo patógeno humano *Aspergillus fumigatus* nas concentrações testadas, assim como apresenta baixa atividade hemolítica. O peptídeo MBP-1 apresenta atividade *in vitro* contra bactérias Gram-negativas causadoras de infecção hospitalar como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, mas não contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Por fim, as atividades dos variantes de MBP-1 contra *E. coli*, parecem apontar que o resíduo de triptofano é essencial à atividade, assim como o modelo da superfície eletrostática indicam que o peptídeo age por meio da formação de carpetes que solubilizam porções da membrana bacteriana, criando poros. A substituição das cisteínas por alanina diminuiu consideravelmente a atividade do peptídeo, que foi menor observada no variante sem cisteínas. Os modelos gerados por homologia, em conjunto com os ensaios de atividade, parecem apontar que a estabilização por pontes dissulfeto das porções terminais das hélices, parece ser mais importante para atividade bactericida do que estabilizar a região interior das hélices. Estes resultados são úteis para compreensão das características necessárias a atividade do peptídeo MBP-1 e possivelmente dos peptídeos *hairpin-like*, porém novos estudos serão necessários para uma melhor compreensão destes fenômenos observados.

## **7 PERSPECTIVAS**

Dentre as perspectivas futuras, espera-se testar o peptídeo MBP-1 contra outras bactérias e fungos, assim como gerar novas variantes a partir da sequência primária de MBP-1, substituindo as cisteínas por outros resíduos de aminoácidos, para melhor caracterizar a atividade dos variantes, e compreensão dos mecanismos de ação. Espera-se ainda que estudos futuros, envolvendo a marcação do peptídeo, em conjunto com imagens de microscopia, permitirão confirmar o mecanismo de ação desta classe de peptídeos contra bactérias.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 677-8, Jul-Aug 1988.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, Nov-Dec 2005.

ANVISA. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica – Módulo V**. SAÚDE, M. D. Brasília: Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004a.

\_\_\_\_\_. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. . SAÚDE, M. D. Brasília, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004b.

\_\_\_\_\_. **RESOLUÇÃO-RDC Nº 44**. DOU nº 157: 78- 81 p. 2010.

BAER, M.; SAWA, T.; FLYNN, P.; LUEHRSEN, K.; MARTINEZ, D.; WIENER-KRONISH, J. P.; YARRANTON, G.; BEBBINGTON, C. An engineered human antibody fab fragment specific for *Pseudomonas aeruginosa* PcrV antigen has potent antibacterial activity. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1083-90, Mar 2009.

BALAJI, V.; SMART, C. D. Over-expression of snakin-2 and extensin-like protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). **Transgenic Research**, Apr 9 2011.

BASCH, H.; GADEBUSCH, H. H. In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 1953-4, Dec 1968.

BEBBINGTON, C.; YARRANTON, G. Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects. **Current Opinion Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 613-9, Dec 2008.

BENKO-ISEPPON, A. M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: state of art and perspectives. **Curr Protein Pept Sci**, v. 11, n. 3, p. 189-94, May 1 2010.

BENKO-ISEPPON, A. M.; GALDINO, S. L.; CALSA, T., JR.; KIDO, E. A.; TOSSI, A.; BELARMINO, L. C.; CROVELLA, S. Overview on plant antimicrobial peptides. **Curr Protein Pept Sci**, v. 11, n. 3, p. 181-8, May 1 2010.

BENTLEY, R. Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence beta-lactams). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 775-86, Jun 2009.

BERROCAL-LOBO, M.; SEGURA, A.; MORENO, M.; LOPEZ, G.; GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 951-61, Mar 2002.

BIGNAMI, G. S. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. **Toxicon**, v. 31, n. 6, p. 817-20, Jun 1993.

BOMMARIUS, A. S. Protein engineering: Check nature first, then evolve. **Nat Chem Biol**, v. 6, n. 11, p. 793-4, Nov 2010.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, Aug 2006.

BROEKAERT, W. F.; J, V. A. N. P.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1100-2, Sep 8 1989.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews in Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-50, Mar 2005.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **Int J Antimicrob Agents**, v. 38, n. 3, p. 217-25, Sep 2011.

BRUTTIN, A.; BRUSSOW, H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2874-8, Jul 2005.

BULAJ, G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 1, p. 87-92, Jan 2005.

BULAJ, G.; KORTEEMME, T.; GOLDENBERG, D. P. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. **Biochemistry**, v. 37, n. 25, p. 8965-72, Jun 23 1998.

BUNCE, C.; WHEELER, L.; REED, G.; MUSSER, J.; BARG, N. Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. **Infect Immun**, v. 60, n. 7, p. 2636-40, Jul 1992.

BUYNAK, J. D. Understanding the longevity of the beta-lactam antibiotics and of antibiotic/beta-lactamase inhibitor combinations. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 930-40, Mar 30 2006.

CADIEUX, P. A.; CHEW, B. H.; KNUDSEN, B. E.; DEJONG, K.; ROWE, E.; REID, G.; DENSTEDT, J. D. Triclosan loaded ureteral stents decrease proteus mirabilis 296 infection in a rabbit urinary tract infection model. **Jornal of Urology**, v. 175, n. 6, p. 2331-5, Jun 2006.

CALVO, J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L. [Antimicrobial mechanisms of action]. **Enferm Infec Microbiol Clin**, v. 27, n. 1, p. 44-52, Jan 2009.

CARPINO, L. A., HAN, G. Y. . The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 37, n. 22, p. 3404, 1972.

CASTRO, M. S.; FONTES, W. Plant defense and antimicrobial peptides. **Protein Pept Lett**, v. 12, n. 1, p. 13-8, Jan 2005.

CEGELSKI, L.; PINKNER, J. S.; HAMMER, N. D.; CUSUMANO, C. K.; HUNG, C. S.; CHORELL, E.; ABERG, V.; WALKER, J. N.; SEED, P. C.; ALMQVIST, F.; CHAPMAN, M. R.; HULTGREN, S. J. Small-molecule inhibitors target Escherichia coli amyloid biogenesis and biofilm formation. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 12, p. 913-9, Dec 2009.

CHAGOT, B.; PIMENTEL, C.; DAI, L.; PIL, J.; TYTGAT, J.; NAKAJIMA, T.; CORZO, G.; DARBON, H.; FERRAT, G. An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the

scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochemistry Journal**, v. 388, n. Pt 1, p. 263-71, May 15 2005.

CHAIN, E.; FLOREY, H. W.; ADELAIDE, M. B.; GARDNER, A. D.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A.; ORR-EWING, J.; SANDERS, A. G.; PELTIER, L. F. The Classic - Penicillin as a chemotherapeutic agent (Reprinted from *Lancet*, vol 24, pg 226-231, 1940). **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 439, p. 23-26, Oct 2005.

CHRISTENSEN, M.; JEPSEN, O. B. Reduced rates of hospital-acquired UTI in medical patients. Prevalence surveys indicate effect of active infection control programmes. **Journal of Hospital Infection**, v. 47, n. 1, p. 36-40, Jan 2001.

CIMA, G. Data show volume of antimicrobials sold. **Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 3, p. 273-273, Feb 1 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Wayne, PA. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.

CONNELL, I.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MARILD, S.; SVANBORG, C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9827-32, Sep 3 1996.

CONNERS, R.; KONAREV, A. V.; FORSYTH, J.; LOVEGROVE, A.; MARSH, J.; JOSEPH-HORNE, T.; SHEWRY, P.; BRADY, R. L. An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of *Veronica* (*Veronica hederifolia* L.). **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p. 27760-8, Sep 21 2007.

COOPER, M. A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 32, Apr 7 2011.

CRAIK, D. J.; CEMAZAR, M.; DALY, N. L. The cyclotides and related macrocyclic peptides as scaffolds in drug design. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 9, n. 2, p. 251-60, Mar 2006.

D'COSTA, V. M.; KING, C. E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W. W.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G. B.; POINAR, H. N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457-61, Sep 22 2011.

DAVIS, C. P. Normal Flora. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th. Galveston (TX), 1996.

DESLOUCHES, B.; PHADKE, S. M.; LAZAREVIC, V.; CASCIO, M.; ISLAM, K.; MONTELARO, R. C.; MIETZNER, T. A. De novo generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 316-22, Jan 2005.

DORING, G.; PIER, G. B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v. 26, n. 8, p. 1011-24, Feb 20 2008.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Review**, v. 23, n. 1, p. 160-201, Jan 2010.

DROGE, M.; PUHLER, A.; SELBITSCHKA, W. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. **Journal of Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 75-90, Sep 17 1998.

DU, Y. New approaches to target gram-negative bacteria. **Curr Top Med Chem**, v. 10, n. 18, p. 1846-7, 2010.

DUVICK, J. P.; ROOD, T.; RAO, A. G.; MARSHAK, D. R. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 26, p. 18814-20, Sep 15 1992.

EILEEN R. CHOFFNES, D. A. R., ALISON MACK. **Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies**. Washington, U.S.: Institute of Medicine of the National Academies, 2010.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M. A.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M. Y.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. Chapter 5, p. Unit 5 6, Oct 2006.

FARMER, J. J., 3RD; DAVIS, B. R.; HICKMAN-BRENNER, F. W.; MCWHORTER, A.; HUNTLEY-CARTER, G. P.; ASBURY, M. A.; RIDDLE, C.; WATHEN-GRADY, H. G.; ELIAS, C.; FANNING, G. R.; ET AL. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 46-76, Jan 1985.

FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections-future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 2, p. 125-39, Apr 2011.

FIMLAND, G.; EIJSINK, V. G.; NISSEN-MEYER, J. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. **Biochemistry**, v. 41, n. 30, p. 9508-15, Jul 30 2002.

FISHER, J. F.; MEROUEH, S. O.; MOBASHERY, S. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. **Chemistry Reviews**, v. 105, n. 2, p. 395-424, Feb 2005.

FLEMING, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 9, n. 653, p. 306- 317, 1922.

FOXLEY, S. Driving down catheter associated infection rates. **Nursing Times**, v. 107, n. 29, p. 14, 16, 18, Jul 26-Aug 1 2011.

FURUYA, E. Y.; LOWY, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 36-45, Jan 2006.

GALLO, R. L.; MURAKAMI, M.; OHTAKE, T.; ZAIYOU, M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 6, p. 823-31, Dec 2002.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 479-91, 1998.

GEIGENMULLER, U.; NIERHAUS, K. H. Tetracycline can inhibit tRNA binding to the ribosomal P site as well as to the A site. **European Journal of Biochemistry**, v. 161, n. 3, p. 723-6, Dec 15 1986.

GIEFING, C.; MEINKE, A. L.; HANNER, M.; HENICS, T.; BUI, M. D.; GELBMANN, D.; LUNDBERG, U.; SENN, B. M.; SCHUNN, M.; HABEL, A.; HENRIQUES-NORMARK, B.; ORTQVIST, A.; KALIN, M.; VON GABAIN, A.; NAGY, E. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 1, p. 117-31, Jan 21 2008.

GRAHAM, J. P.; BOLAND, J. J.; SILBERGELD, E. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. **Public Health Reports**, v. 122, n. 1, p. 79-87, Jan-Feb 2007.

GRIFFITH, R. S. Introduction to vancomycin. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 3 suppl, p. S200-4, Nov-Dec 1981.

GUERBETTE, F.; GROSBOIS, M.; JOLLIOT-CROQUIN, A.; KADER, J. C.; ZACHOWSKI, A. Lipid-transfer proteins from plants: structure and binding properties. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 192, n. 1-2, p. 157-61, Feb 1999.

HAMMAMI, R.; BEN HAMIDA, J.; VERGOTEN, G.; FLISS, I. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Database issue, p. D963-8, Jan 2009.

HANEY, E. F.; HUNTER, H. N.; MATSUZAKI, K.; VOGEL, H. J. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1639-55, Aug 2009.

HARE, R. New light on the history of penicillin. **Medical History**, v. 26, n. 1, p. 1-24, Jan 1982.

HARWIG, S. S.; WARING, A.; YANG, H. J.; CHO, Y.; TAN, L.; LEHRER, R. I. Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, n. 2, p. 352-7, Sep 1 1996.

HAUG, B. E.; SVENDSEN, J. S. The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide. **Journal of Peptides Science**, v. 7, n. 4, p. 190-6, Apr 2001.

HELMERHORST, E. J.; REIJNDERS, I. M.; VAN 'T HOF, W.; VEERMAN, E. C.; NIEUW AMERONGEN, A. V. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. **FEBS Letters**, v. 449, n. 2-3, p. 105-10, Apr 23 1999.

HENTZER, M.; WU, H.; ANDERSEN, J. B.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T. B.; BAGGE, N.; KUMAR, N.; SCHEMBRI, M. A.; SONG, Z.; KRISTOFFERSEN, P.; MANFIELD, M.; COSTERTON, J. W.; MOLIN, S.; EBERL, L.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 15, p. 3803-15, Aug 1 2003.

HEWITT, W. L. Penicillin-historical impact on infection control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 145, n. 2, p. 212-5, Sep 27 1967.

HOOVER, D. M.; WU, Z.; TUCKER, K.; LU, W.; LUBKOWSKI, J. Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2804-9, Sep 2003.



HOULNE, G.; MEYER, B.; SCHANTZ, R. Alteration of the expression of a plant defensin gene by exon shuffling in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **Molecular and General Genetics**, v. 259, n. 5, p. 504-10, Sep 1998.

HSU, L. Y.; TAN, T. Y.; TAM, V. H.; KWA, A.; FISHER, D. A.; KOH, T. H. Surveillance and correlation of antibiotic prescription and resistance of Gram-negative bacteria in Singaporean hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1173-8, Mar 2010.

HUDSON, D. L.; LAYTON, A. N.; FIELD, T. R.; BOWEN, A. J.; WOLF-WATZ, H.; ELOFSSON, M.; STEVENS, M. P.; GALYOV, E. E. Inhibition of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by small-molecule inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2631-5, Jul 2007.

ISHII, Y.; ETO, M.; MANO, Y.; TATEDA, K.; YAMAGUCHI, K. In vitro potentiation of carbapenems with ME1071, a novel metallo-beta-lactamase inhibitor, against metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3625-9, Sep 2010.

JACOB, L.; ZASLOFF, M. Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. **Ciba Foundation symposium**, v. 186, p. 197-216; discussion 216-23, 1994.

JARDETZKY, O. Studies on the mechanism of action of chloramphenicol. I. The conformation of chloramphenicol in solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 238, p. 2498-508, Jul 1963.

JASON KINDRACHUK, A. N. A. R. E. W. H. Host Defence Peptides: Bridging Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. **Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology**, v. 5, p. 175-216, 2010.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**, v. 19, n. 3, p. 491-511, Jul 2006.

JIKIA, D.; CHKHAIDZE, N.; IMEDASHVILI, E.; MGALOBlishvili, I.; TSITLANADZE, G.; KATSARAVA, R.; MORRIS, G. J.; SULAKVELIDZE, A. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 30, n. 1, p. 23-26, Jan 2005.

JIN, Y.; MOZSOLITS, H.; HAMMER, J.; ZMUDA, E.; ZHU, F.; ZHANG, Y.; AGUILAR, M. I.; BLAZYK, J. Influence of tryptophan on lipid binding of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochemistry**, v. 42, n. 31, p. 9395-405, Aug 12 2003.

JOHNSON, L. N. The early history of lysozyme. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 11, p. 942-944, Nov 1998.

KAMADA, N.; INOUE, N.; HISAMATSU, T.; OKAMOTO, S.; MATSUOKA, K.; SATO, T.; CHINEN, H.; HONG, K. S.; YAMADA, T.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, T.; WATANABE, N.; TSUCHIMOTO, K.; HIBI, T. Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. 5, p. 455-63, May 2005.

KAMYSZ, W.; OKROJ, M.; LUKASIAK, J. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta Biochemitry Polonica**, v. 50, n. 2, p. 461-9, 2003a.

\_\_\_\_\_. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta Biochim Pol**, v. 50, n. 2, p. 461-9, 2003b.

KELEMU, S.; CARDONA, C.; SEGURA, G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 867-73, Dec 2004.

KINDRACHUK, J.; NIJNIK, A.; HANCOCK, R. E. W. 5.07 - Host Defense Peptides: Bridging Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. In: EDITORS-IN-CHIEF: LEW, M. e HUNG-WEN, L. (Ed.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier, 2010. p.175-216.

KUKLIN, N. A.; CLARK, D. J.; SCORE, S.; COOK, J.; COPE, L. D.; MCNEELY, T.; NOBLE, L.; BROWN, M. J.; ZORMAN, J. K.; WANG, X. M.; PANCARI, G.; FAN, H.; ISETT, K.; BURGESS, B.; BRYAN, J.; BROWNLOW, M.; GEORGE, H.; MEINZ, M.; LIDDELL, M. E.; KELLY, R.; SCHULTZ, L.; MONTGOMERY, D.; ONISHI, J.; LOSADA, M.; MARTIN, M.; EBERT, T.; TAN, C. Y.; SCHOFIELD, T. L.; NAGY, E.; MEINEKE, A.; JOYCE, J. G.; KURTZ, M. B.; CAULFIELD, M. J.; JANSEN, K. U.; MCCLEMENTS, W.; ANDERSON, A. S. A novel *Staphylococcus aureus* vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine *S. aureus* sepsis model. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2215-23, Apr 2006.

LAI, J. R.; HUCK, B. R.; WEISBLUM, B.; GELLMAN, S. H. Design of non-cysteine-containing antimicrobial beta-hairpins: structure-activity relationship studies with linear protegrin-1 analogues. **Biochemistry**, v. 41, n. 42, p. 12835-42, Oct 22 2002.

LASKOWSKI, R. A., MACARTUR, M.W., MOSS, D.S., THORNTON, J.M.: PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283--291, 1993.

LAWRENCE, J. G. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 519-23, Oct 1999.

LEE, M.; HESEK, D.; SUVOROV, M.; LEE, W.; VAKULENKO, S.; MOBASHERY, S. A mechanism-based inhibitor targeting the DD-transpeptidase activity of bacterial penicillin-binding proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 52, p. 16322-6, Dec 31 2003.

LEVIN, M.; QUINT, P. A.; GOLDSTEIN, B.; BARTON, P.; BRADLEY, J. S.; SHEMIE, S. D.; YEH, T.; KIM, S. S.; CAFARO, D. P.; SCANNON, P. J.; GIROIR, B. P. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. rBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group. **Lancet**, v. 356, n. 9234, p. 961-7, Sep 16 2000.

LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42 Suppl 1, p. S5-12, Jan 1 2006.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12 Suppl, p. S122-9, Dec 2004.

LI, F.; YANG, X. X.; XIA, H. C.; ZENG, R.; HU, W. G.; LI, Z.; ZHANG, Z. C. Purification and characterization of Luffin P1, a ribosome-inactivating peptide from the seeds of *Luffa cylindrica*. **Peptides**, v. 24, n. 6, p. 799-805, Jun 2003.

LOFGREN, S. E.; MILETTI, L. C.; STEINDEL, M.; BACHERE, E.; BARRACCO, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 197-202, Feb 2008.

LOMOVSKAYA, O.; WARREN, M. S.; LEE, A.; GALAZZO, J.; FRONKO, R.; LEE, M.; BLAIS, J.; CHO, D.; CHAMBERLAND, S.; RENAULT, T.; LEGER, R.; HECKER, S.; WATKINS, W.; HOSHINO, K.; ISHIDA, H.; LEE, V. J. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 105-16, Jan 2001.

LU, T. K.; KOERIS, M. S. The next generation of bacteriophage therapy. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 524-31, Oct 2011.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., STAHL, D., CLARK, D. P. **Brock Biology of Microorganisms**. U.S.A.: Benjamin Cummings, 2010. 1152

MAKI, D. G.; KLUGER, D. M.; CRNICH, C. J. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n. 9, p. 1159-71, Sep 2006.

MANGONI, M. E.; AUMELAS, A.; CHARNET, P.; ROUMESTAND, C.; CHICHE, L.; DESPAUX, E.; GRASSY, G.; CALAS, B.; CHAVANIEU, A. Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulphide bridges for pore formation. **FEBS Letters**, v. 383, n. 1-2, p. 93-8, Mar 25 1996.

MANSOURI, M. D.; DAROUICHE, R. O. In-vitro activity and in-vivo efficacy of catheters impregnated with chloroxylenol and thymol against uropathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 2, p. 190-2, Feb 2008.

MARCUS, J. P.; GREEN, J. L.; GOULTER, K. C.; MANNERS, J. M. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. **Plant Journal**, v. 19, n. 6, p. 699-710, Sep 1999a.

\_\_\_\_\_. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. **Plant J**, v. 19, n. 6, p. 699-710, Sep 1999b.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 5, p. 468-72, Oct 2006.

MERMEL, L. A. Healthcare-associated infections: what can be done to reduce risk to our patients? **Medicine and Health Rhode Island**, v. 93, n. 9, p. 261-2, Sep 2010.

MURRAY, G. EU bans use of four antibiotics used as growth promoters in feed. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 2, p. 127-127, Feb 1999.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan 1998.

NEWMAN, D. J., GRAGG, G. M., SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, n. 66, p. 1022-1037, 2003.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464-72, Sep 2011.

NICASTRO, G.; ORSOMANDO, G.; FERRARI, E.; MANCONI, L.; DESARIO, F.; AMICI, A.; NASO, A.; CARPANETO, A.; PERTINHEZ, T. A.; RUGGIERI, S.; SPISNI, A. Solution structure of the phytotoxic protein PcF: the first characterized member of the Phytophthora PcF toxin family. **Protein Sci**, v. 18, n. 8, p. 1786-91, Aug 2009.

NOLDE, S. B.; VASSILEVSKI, A. A.; ROGOZHIN, E. A.; BARINOV, N. A.; BALASHOVA, T. A.; SAMSONOVA, O. V.; BARANOV, Y. V.; FEOFANOV, A. V.; EGOROV, T. A.; ARSENIIEV, A. S.; GRISHIN, E. V. Disulfide-stabilized helical hairpin structure and activity of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 25145-53, Jul 15 2011.

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 451-63, 1998.

OWENS, R. C., JR.; AMBROSE, P. G. Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41 Suppl 2, p. S144-57, Jul 15 2005.

PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* story. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1377-83, Jun 2010.

PALUMBI, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. **Science**, v. 293, n. 5536, p. 1786-90, Sep 7 2001.

PARDI, A.; ZHANG, X. L.; SELSTED, M. E.; SKALICKY, J. J.; YIP, P. F. NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1. **Biochemistry**, v. 31, n. 46, p. 11357-64, Nov 24 1992.

PARK, S. S.; ABE, K.; KIMURA, M.; URISU, A.; YAMASAKI, N. Primary structure and allergenic activity of trypsin inhibitors from the seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **FEBS Letters**, v. 400, n. 1, p. 103-7, Jan 2 1997.

PARK, Y.; JANG, S. H.; LEE, D. G.; HAHM, K. S. Antinematodal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Peptide Science**, v. 10, n. 5, p. 304-11, May 2004.

PARR, A. M.; ZOUTMAN, D. E.; DAVIDSON, J. S. Antimicrobial activity of lidocaine against bacteria associated with nosocomial wound infection. **Annals of Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 239-45, Sep 1999.

PESCHEL, A.; SAHL, H. G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Reviews of Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 529-36, Jul 2006.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, n. 4, p. 589-603, Oct 1998.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p. 162-176, 2007.

POWERS, J. P.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. Structure-activity relationships for the beta-hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I. **Biochim Biophys Acta**, v. 1698, n. 2, p. 239-50, May 6 2004.

PREVENTION, C. C. F. D. C. A. Office-related antibiotic prescribing for persons aged  $\leq 14$  years--United States, 1993-1994 to 2007-2008. **CDC - Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 60, n. 34, p. 1153-6, Sep 2 2011.

RAO, A. G. Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachyplesin lacking disulfide bonds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 361, n. 1, p. 127-34, Jan 1 1999.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117-28, Feb 2010.

REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **Int J Antimicrob Agents**, v. 24, n. 6, p. 536-47, Dec 2004.

REGENTE, M. C.; GIUDICI, A. M.; VILLALAIN, J.; DE LA CANAL, L. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 183-9, 2005.

ROKITSKAYA, T. I.; KOLODKIN, N. I.; KOTOVA, E. A.; ANTONENKO, Y. N. Indolicidin action on membrane permeability: carrier mechanism versus pore formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, n. 1, p. 91-7, Jan 2011.

ROSENFELD, Y.; SAHL, H. G.; SHAI, Y. Parameters involved in antimicrobial and endotoxin detoxification activities of antimicrobial peptides. **Biochemistry**, v. 47, n. 24, p. 6468-78, Jun 17 2008.

SAETHER, O.; CRAIK, D. J.; CAMPBELL, I. D.; SLETTEN, K.; JUUL, J.; NORMAN, D. G. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. **Biochemistry**, v. 34, n. 13, p. 4147-58, Apr 4 1995.

SANDLER, P.; WEISBLUM, B. Erythromycin-induced ribosome stall in the ermA leader: a barricade to 5'-to-3' nucleolytic cleavage of the ermA transcript. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 12, p. 6680-8, Dec 1989.

SCHROEDER, B. O.; WU, Z.; NUDING, S.; GROSCURTH, S.; MARCINOWSKI, M.; BEISNER, J.; BUCHNER, J.; SCHALLER, M.; STANGE, E. F.; WEHKAMP, J. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 419-23, Jan 20 2011.

SCHUMM, K.; LAM, T. B. Types of urethral catheters for management of short-term voiding problems in hospitalised adults. **Cochrane Database System Reviews**, n. 2, p. CD004013, 2008.

SEGURA, A.; MORENO, M.; MADUENO, F.; MOLINA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 1, p. 16-23, Jan 1999.

SEVIER, C. S.; KAISER, C. A. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 836-47, Nov 2002a.

\_\_\_\_\_. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 836-47, Nov 2002b.

SEYDEL, J. K. Sulfonamides, structure-activity relationship, and mode of action. Structural problems of the antibacterial action of 4-aminobenzoic acid (PABA) antagonists. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 9, p. 1455-78, Sep 1968.

SMITH, A. B.; DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Cyclotides: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, v. 21, n. 11, p. 1657-72, Nov 2011.

SPELLBERG, B.; BLASER, M.; GUIDOS, R. J.; BOUCHER, H. W.; BRADLEY, J. S.; EISENSTEIN, B. I.; GERDING, D.; LYNFIELD, R.; RELLER, L. B.; REX, J.; SCHWARTZ, D.; SEPTIMUS, E.; TENOVER, F. C.; GILBERT, D. N. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52 Suppl 5, p. S397-428, May 2011.

STACHYRA, T.; LEVASSEUR, P.; PECHEREAU, M. C.; GIRARD, A. M.; CLAUDON, M.; MIOSSEC, C.; BLACK, M. T. In vitro activity of the  $\beta$ -lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and Enterobacteriaceae expressing KPC carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 326-9, Aug 2009.

STEINSTRÄESSER, L.; KRANEBURG, U.; JACOBSEN, F.; AL-BENNA, S. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 322-33, Mar 2011.

STOTZ, H. U.; THOMSON, J. G.; WANG, Y. Plant defensins: defense, development and application. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, n. 11, p. 1010-2, Nov 2009.

STROM, M. B.; REKDAL, O.; STENSEN, W.; SVENDSEN, J. S. Increased antibacterial activity of 15-residue murine lactoferricin derivatives. **The Journal of Peptide Research**, v. 57, n. 2, p. 127-39, Feb 2001.

SUBRAMANIAN, G. M.; CRONIN, P. W.; POLEY, G.; WEINSTEIN, A.; STOUGHTON, S. M.; ZHONG, J.; OU, Y.; ZMUDA, J. F.; OSBORN, B. L.; FREIMUTH, W. W. A phase 1 study of PAmAb, a fully human monoclonal antibody against Bacillus anthracis protective antigen, in healthy volunteers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 1, p. 12-20, Jul 1 2005.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G., JR. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649-59, Mar 2001.

SUN, X.; CHEN, S.; LI, S.; YAN, H.; FAN, Y.; MI, H. Deletion of two C-terminal Gln residues of 12-26-residue fragment of melittin improves its antimicrobial activity. **Peptides**, v. 26, n. 3, p. 369-75, Mar 2005.

SWEDBERG, G.; RINGERTZ, S.; SKOLD, O. Sulfonamide resistance in Streptococcus pyogenes is associated with differences in the amino acid sequence of its chromosomal dihydropteroate synthase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1062-1067, May 1998.

TACCONELLI, E.; DE ANGELIS, G.; CATALDO, M. A.; POZZI, E.; CAUDA, R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Therapy**, v. 61, n. 1, p. 26-38, Jan 2008.

TAM, J. P., WU, C., LIU, W., ZHANG, J. Disulfide Bond Formation in Peptides by Dimethyl Sulfoxide. Scope and Applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 6657-6662, 1991.

TAMAMURA, H.; IKOMA, R.; NIWA, M.; FUNAKOSHI, S.; MURAKAMI, T.; FUJII, N. Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 41, n. 5, p. 978-80, May 1993.

TANG, M.; HONG, M. Structure and mechanism of beta-hairpin antimicrobial peptides in lipid bilayers from solid-state NMR spectroscopy. **Molecular Biosystems Articles**, v. 5, n. 4, p. 317-22, Apr 2009.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5 Suppl 1, p. S3-10; discussion S64-73, Jun 2006.

TEVYASHOVA, A. N.; OLSUFYEVA, E. N.; BALZARINI, J.; SHTIL, A. A.; DEZHENKOVA, L. G.; BUKHMAN, V. M.; ZBARSKY, V. B.; PREOBRAZHENSAYA, M. N. Modification of the antibiotic olivomycin I at the 2'-keto group of the side chain. Novel derivatives, antitumor and topoisomerase I-poisoning activity. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 62, n. 1, p. 37-41, Jan 2009.

THOMMA, B. P.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Plant defensins. **Planta**, v. 216, n. 2, p. 193-202, Dec 2002.

VICTOR NIZET, T. O., XAVIER LAUTH, JANET TROWBRIDGE, JENNIFER RUDISILL, ROBERT A. DORSCHNER, VASUMATI PESTONJAMASP, JOSEPH PIRAINO, KENNETH HUTTNER & RICHARD L. GALLO. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. **Nature**, v. 414, p. 454-457, 22 November 2001 2001.

VOGEL, H. J.; SCHIBLI, D. J.; JING, W.; LOHMEIER-VOGEL, E. M.; EPAND, R. F.; EPAND, R. M. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, n. 1, p. 49-63, 2002.

WANG, P.; BANG, J. K.; KIM, H. J.; KIM, J. K.; KIM, Y.; SHIN, S. Y. Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1. **Peptides**, v. 30, n. 12, p. 2144-9, Dec 2009.

WEISMAN, L. E.; THACKRAY, H. M.; GARCIA-PRATS, J. A.; NESIN, M.; SCHNEIDER, J. H.; FRETZ, J.; KOKAI-KUN, J. F.; MOND, J. J.; KRAMER, W. G.; FISCHER, G. W. Phase 1/2 double-blind, placebo-controlled, dose escalation, safety, and pharmacokinetic study of pagibaximab (BSYX-A110), an antistaphylococcal monoclonal antibody for the prevention of staphylococcal bloodstream infections, in very-low-birth-weight neonates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2879-86, Jul 2009.

WEISS, R. L. The structure and occurrence of pili (fimbriae) on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of general microbiology**, v. 67, n. 2, p. 135-43, Aug 1971.

WHO. **Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide**. WHO. Geneva, Suíça. 2011.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407-10, Jul 2007.

WITKOWSKA, D.; MIESZALA, M.; GAMIAN, A.; STANISZEWSKA, M.; CZARNY, A.; PRZONDO-MORDARSKA, A.; JAQUINOD, M.; FOREST, E. Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella fimbriae* are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 221-30, Aug 1 2005.

WRIGHT, A.; HAWKINS, C. H.; ANGGARD, E. E.; HARPER, D. R. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clinical Otolaryngology**, v. 34, n. 4, p. 349-57, Aug 2009.

YAMADA, K.; SHIMADA, T.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Multiple functional proteins are produced by cleaving Asn-Gln bonds of a single precursor by vacuolar processing enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 2563-70, Jan 22 1999.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a new cyclophilin-like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. **Life Sciences**, v. 70, n. 10, p. 1129-38, Jan 25 2002.

YEATS, T. H.; ROSE, J. K. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). **Protein Science**, v. 17, n. 2, p. 191-8, Feb 2008.

YNGSTROM, D.; LINDSTROM, K.; NYSTROM, K.; NILSSON-MARTTALA, K.; HILLBLOM, L.; HANSSON, L.; KLARIN, M.; LARSSON, J. Healthcare-associated infections must stop: a breakthrough project aimed at reducing healthcare-associated infections in an intensive-care unit. **BMJ Quality and Safety**, v. 20, n. 7, p. 631-6, Jul 2011.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-95, Jan 24 2002.

ZORKO, M.; JERALA, R. Production of recombinant antimicrobial peptides in bacteria. **Methods Mol Biol**, v. 618, p. 61-76, 2010.



## **ANEXOS**

Produção científica durante o período 2010/2011.

## Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control

Anselmo Jesus Otero-González,\* Beatriz Simas Magalhães,<sup>†</sup> Monica Garcia-Villarino,\* Carlos López-Abarrategui,\* Daniel Amaro Sousa,<sup>†</sup> Simoni Campos Dias,<sup>†</sup> and Octávio Luiz Franco<sup>†,‡,1</sup>

\*Centro de Estudos de Proteínas, Universidad de La Habana, Havana, Cuba; <sup>†</sup>Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; and <sup>‡</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

**ABSTRACT** Antimicrobial peptides are widely expressed in organisms and have been linked to innate and acquired immunities in vertebrates. These compounds are constitutively expressed and rapidly induced at different cellular levels to interact directly with infectious agents and/or modulate immunoreactions involved in defense against pathogenic microorganisms. In invertebrates, antimicrobial peptides represent the major humoral defense system against infection, showing a diverse spectrum of action mechanisms, most of them related to plasma membrane disturbance and lethal alteration of microbial integrity. Marine invertebrates are widespread, extremely diverse, and constantly under an enormous microbial challenge from the ocean environment, itself altered by anthropic influences derived from industrialization and transportation. Consequently, this study reexamines the peptides isolated over the past 2 decades from different origins, bringing phyla not previously reviewed up to date. Moreover, a promising novel use of antimicrobial peptides as effective drugs in human and veterinary medicine could be based on their unusual properties and synergic counterparts as immune response humoral effectors, in addition to their direct microbicidal activity. This has been seen in many other marine proteins that are sufficiently immunogenic to humans, not necessarily in terms of antibody generation but as inflammation promoters and recruitment agents or immune enhancers.—Otero-González, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D. A., Dias, S. C., Franco, O. L. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *FASEB J.* 24, 1320–1334 (2010). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

*Key Words:* innate immunity • peptide structure and function • unusual properties

THE UBIQUITOUS PRESENCE OF antimicrobial peptides (AMPs) in nature attests to their overall importance in building the defense strategies of most organisms. They are considered part of the humoral natural defense of invertebrates against infections and have thus also been termed “natural antibiotics.” Their enhanced expres-

sion, due in part to various stress factors such as infective organisms, has been directly linked to the quick and efficient innate immune response of their hosts (1). In particular, when considering marine invertebrates, which are thought to account for >30% of all animal species, comprising >20 different phyla, it is noteworthy that they should have retained an ancestral, nonspecific innate immunodefense system mainly composed of AMPs (2, 3). In this respect, the effectiveness of their immune response relies solely on the ability of the organism to distinguish between “noninfectious self” and “infectious nonself” in order to mount a defensive response that not only can kill or disable the invader, but also can recognize and eliminate its own damaged or diseased cells. These requirements lead to some of the essential components of innate immunity: 1) recognition responses, in part mediated by pattern recognition proteins and cell adhesion factors; 2) cell-free or humoral responses characterized by the expression of antibacterial peptides, small molecule antifungal and antibacterial compounds; 3) cellular responses, such as the presence of physiochemical barriers (melanin) and granulated vesicles associated with antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase), and mechanisms such as phagocytosis; 4) the communication and integration of the immune function pathways, which include the activation of lectins and other products of the prophenyloxidase system, complement system, cytokines, eicosanoids, and Toll-like receptors; and 5) evidence for primitive immune memory and specificity (4). Despite these responses, additional care has to be taken when assessing the origin of the antimicrobial content in marine organisms. The role of microbiology in marine biology is nowadays extremely well recognized. The traditional view of an independent macroorganism is elusive: both descriptive and experimental approaches have explained key functions of

<sup>1</sup> Correspondence: Universidade Católica de Brasília, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Campus II, SGAN Quadra 916, Modulo B, Av. W5 Norte, Brasília-DF, CEP 70790-160, Brazil. E-mail: [ocfranco@pos.uceb.br](mailto:ocfranco@pos.uceb.br), [ocfranco@gmail.com](mailto:ocfranco@gmail.com)

doi: 10.1096/fj.09-143388

# Bactericidal Activity Identified in 2S Albumin from Sesame Seeds and In silico Studies of Structure–Function Relations

Simone Maria-Neto · Rodrigo V. Honorato · Fábio T. Costa · Renato G. Almeida · Daniel S. Amaro · José T. A. Oliveira · Ilka M. Vasconcelos · Octávio L. Franco

Published online: 21 June 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** Pathogenic bacteria constitute an important cause of hospital-acquired infections. However, the misuse of available bactericidal agents has led to the appearance of antibiotic-resistant strains. Thus, efforts to seek new antimicrobials with different action mechanisms would have an enormous impact. Here, a novel antimicrobial protein (*SiAMP2*) belonging to the 2S albumin family was isolated from *Sesamum indicum* kernels and evaluated against several bacteria and fungi. Furthermore, in silico analysis was conducted in order to identify conserved residues through other 2S albumin antimicrobial proteins (2S-AMPs). *SiAMP2* specifically inhibited *Klebsiella* sp. Specific regions in the molecule surface where cationic (RR/RRRK) and hydrophobic (MEY-WPR) residues are exposed and conserved were proposed as being involved in antimicrobial activity. This study reinforces the hypothesis that plant storage proteins might also play as pathogen protection providing an insight into the mechanism

of action for this novel 2S-AMP and evolutionary relations between antimicrobial activity and 2S albumins.

**Keywords** Antimicrobial proteins · 2S albumins · Phylogenetic analysis · Homology modeling · Structure–function relationship

## Abbreviations

AMP	Antimicrobial peptide/protein
RF	Protein rich fraction
NRP	Non-retained proteins
RP	Retained proteins
MIC	Minimum inhibitory concentration
IPG	Immobilized pH gradient
<i>SiAMP2</i>	Antimicrobial protein from <i>Sesamum indicum</i>
CFU	Colony forming units
MP	Maximum Parsimony method
2S-AMP	Antimicrobial 2S albumin

S. Maria-Neto · R. V. Honorato · F. T. Costa · R. G. Almeida · D. S. Amaro · O. L. Franco (✉)  
Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN Quadra 916, Módulo B, Brasília, Distrito Federal 70790-160, Brazil  
e-mail: ocfranco@pos.ucb.br; ocfranco@gmail.com

S. Maria-Neto  
e-mail: simoneneto@gmail.com

R. V. Honorato  
e-mail: rvhonorato@gmail.com

F. T. Costa  
e-mail: fubu03@gmail.com

R. G. Almeida  
e-mail: renatogda@gmail.com

D. S. Amaro  
e-mail: amarods@gmail.com

D. S. Amaro · O. L. Franco  
Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal 70910-900, Brazil

J. T. A. Oliveira · I. M. Vasconcelos  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Av. da Universidade 2853, Benfica, Fortaleza, Ceará 60020-181, Brazil

O. L. Franco  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer s/n, Campus Universitário Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais 36015-260, Brazil

# Identification and Structural Characterization of Novel Cyclotide with Activity against Insect Pest of Sugar Cane\*<sup>§</sup>

Received for publication, August 17, 2011, and in revised form, October 31, 2011. Published, JBC Papers in Press, November 10, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.294009

Michelle F. S. Pinto<sup>‡</sup>, Isabel C. M. Fensterseifer<sup>‡</sup>, Ludovico Migliolo<sup>‡</sup>, Daniel A. Sousa<sup>+++</sup>, Guy de Capville<sup>§</sup>, Jorge W. Arboleda Valencia<sup>§¶</sup>, Michelle L. Colgrave<sup>||</sup>, David J. Craik<sup>\*\*1</sup>, Beatriz S. Magalhães<sup>‡</sup>, Simoni C. Dias<sup>‡</sup>, and Octávio L. Franco<sup>‡2</sup>

From the <sup>‡</sup>Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, Brazil, the <sup>¶</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil, <sup>§</sup>CENARGEN (Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brazil, <sup>||</sup>Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Livestock Industries, 306 Carmody Road, St. Lucia, Queensland 4067, Australia, the <sup>\*\*</sup>Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Brisbane, Queensland 4072, Australia, and the <sup>++</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil

**Background:** Cyclotides are a family of plant-derived defense peptides.

**Results:** Parigidin-br1, a novel cyclotide, shows insecticidal activity *in vivo* and *in vitro*. Mechanistic insights into the activity were provided by theoretical and electron microscopic studies.

**Conclusion:** The cyclotide disrupts insect cell membranes and has potential applications as a biotechnological insecticide.

**Significance:** The study provides an enhanced understanding of cyclotide activity against a sugarcane insect pest.

Cyclotides are a family of plant-derived cyclic peptides comprising six conserved cysteine residues connected by three intermolecular disulfide bonds that form a knotted structure known as a cyclic cystine knot (CCK). This structural motif is responsible for the pronounced stability of cyclotides against chemical, thermal, or proteolytic degradation and has sparked growing interest in this family of peptides. Here, we isolated and characterized a novel cyclotide from *Palicourea rigida* (Rubiaceae), which was named parigidin-br1. The sequence indicated that this peptide is a member of the bracelet subfamily of cyclotides. Parigidin-br1 showed potent insecticidal activity against neonate larvae of *Lepidoptera* (*Diatraea saccharalis*), causing 60% mortality at a concentration of 1  $\mu$ M but had no detectable antibacterial effects. A decrease in the *in vitro* viability of the insect cell line from *Spodoptera frugiperda* (SF-9) was observed in the presence of parigidin-br1, consistent with *in vivo* insecticidal activity. Transmission electron microscopy and fluorescence microscopy of SF-9 cells after incubation with parigidin-br1 or parigidin-br1-fluorescein isothiocyanate, respectively, revealed extensive cell lysis and swelling of cells, consistent with an insecticidal mechanism involving membrane disruption.

This hypothesis was supported by *in silico* analyses, which suggested that parigidin-br1 is able to complex with cell lipids. Overall, the results suggest promise for the development of parigidin-br1 as a novel biopesticide.

The challenge of improving food production to maintain an estimated 9.5 billion people worldwide by 2050 is very significant. Moreover, the growing demand for biofuel and cattle feed crops has driven increasing interest in agricultural productivity, given that arable land is finite (1). Allied to these factors, the ability to reduce damage to plants caused by pests and pathogens is also important because insect predation currently still leads to substantial crop losses despite the use of conventional pesticides (2). Although these pesticides can control insects, they also cause significant environmental damage due to high toxicity and low selectivity among species affected, which include key pollinators such as bees (3). Given these problems, there is a great interest in developing molecules with potentially lower off-target effects than conventional insecticides. An alternative to topical pesticides is plant bioengineering. Plants can be genetically modified to express insecticidal biomolecules in specific tissues in order to be more selective to target pests (4). This technology is used commonly in many countries, and in 2009, 134 million hectares of genetically modified plants were grown, representing 9% of the 1.5 billion hectares of crops in the world (5). After resistance was first reported (6), researchers started to develop crops with more than one defensive protein, each with a different mechanism of action, to retard insect resistance, but there is a need for further development of novel insecticidal agents.

Among compounds with insecticidal activity extracted from plants, cyclotides have been explored because of their stability and diverse range of functions (7). Cyclotides comprise a pep-

\* This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação de Amparo a Pesquisa do Distrito Federal, Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, and Universidade Católica de Brasília. Work at the University of Queensland was supported in part by a grant from the Australian Research Council.

<sup>§</sup> This article contains supplemental Figs. 1 and 2.

<sup>1</sup> A National Health and Medical Research Council (Australia) professorial fellow.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília SGAN, Quadra 916, Módulo B, Av. W5 Norte, CEP 70.790-160 Brasília-DF, Brazil. Tel.: 55-61-3448-7220; Fax: 55-61-3347-4797; E-mail: ocfranco@pos.ucb.br or ocfranco@gmail.com.

# Deciphering the Magainin Resistance Process of *Escherichia coli* Strains in Light of the Cytosolic Proteome

AQ: au **Simone Maria-Neto,<sup>a</sup> Elizabete de Souza Cândido,<sup>a</sup> Diana Ribas Rodrigues,<sup>a</sup> Daniel Amaro de Souza,<sup>a,c</sup> Ezequiel Marcelino da Silva,<sup>b</sup> Lidia Maria Pepe de Moraes,<sup>b</sup> Anselmo de Jesus Otero-Gonzales,<sup>e</sup> Beatriz Simas Magalhães,<sup>a</sup> Simoni Campos Dias,<sup>a</sup> and Octávio Luiz Franco<sup>a,c,d</sup>**

Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70790-160, Brazil<sup>1</sup>; Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil<sup>2</sup>; Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil<sup>3</sup>; Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer s/n, Campus Universitário Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36015-260, Brazil<sup>4</sup>; and Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de Habana, Habana, Cuba<sup>5</sup>

**Antimicrobial peptides (AMPs) are effective antibiotic agents commonly found in plants, animals, and microorganisms, and they have been suggested as the future of antimicrobial chemotherapies. It is vital to understand the molecular details that define the mechanism of action of and resistance to AMPs for a rational planning of the next antibiotic generation and also to shed some light on the complex AMP mechanism of action. Here, the antibiotic resistance of *Escherichia coli* ATCC 8739 to magainin I was evaluated in the cytosolic subproteome. Magainin-resistant strains were selected after 10 subsequent spreads at subinhibitory concentrations of magainin I (37.5 mg · liter<sup>-1</sup>), and their cytosolic proteomes were further compared to those of magainin-susceptible strains through two-dimensional electrophoresis analysis. As a result, 41 differentially expressed proteins were detected by *in silico* analysis and further identified by tandem mass spectrometry *de novo* sequencing. Functional categorization indicated an intense metabolic response mainly in energy and nitrogen uptake, stress response, amino acid conversion, and cell wall thickness. Indeed, data reported here show that resistance to cationic antimicrobial peptides possesses a greater molecular complexity than previously supposed, resulting in cell commitment to several metabolic pathways.**

Infectious diseases have affected humanity since the early days of human existence. In this view, the discovery of antibiotics provided a powerful weapon in the battle against pathogenic microorganisms (reviewed in reference 22). From the penicillin scaffold, several other molecules have been developed, and new antibiotic classes have been discovered and classified according to their distinct mechanisms of action. However, one by one these agents have become useless against new strains of bacteria with acquired resistance resulting from the misuse of current antibiotics (for a review, see reference 25).

Antimicrobial peptides (AMPs) have arisen against this alarming backdrop as an alternative strategy to escape from resistance mechanisms developed against classic antibiotics, which are widespread among bacteria (4). AMPs are effective antibiotic agents commonly found in plants, animals, microorganisms, and viruses (29). Magainins are  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides (CAMPs) first isolated from *Xenopus laevis* (65), and they have been described as possessing other actions, such as antileishmanial (28) and antitumor (18, 38) actions. The modes of action proposed for magainins are based on the model of cell membrane disruption and include the random insertion of peptide hydrophobic regions into the membrane alignment, the removal of membrane sections, and pore formation (32, 33). However, the internalization of the peptide also has been observed in the *Escherichia coli* cytosol (31), suggesting a possible intracellular target as well.

Are AMPs immune to the process of acquired resistance? It is currently supposed that the development of natural resistance to AMPs arises from spontaneous mutations. These modifications could be the result of microorganisms' short generation times under the selective pressure exerted when they are frequently ex-

posed to AMPs. If these adaptations occur, it is urgent and necessary to understand the bacterial resistance to these compounds to underpin the rational planning of the next antibiotic generation.

The mechanisms of bacterial resistance that respond to the presence of AMPs are extremely complex and, at least so far, do not seem to follow a single pattern. Among other studies of bacterial resistance to CAMPs, the resistance to polymyxins and polycationic peptides has long been studied and has been associated with the punctual modification of lipid A from lipopolysaccharide structures (5, 6, 10, 36, 39, 42). The reduction in the negative charge resulting from these modifications could reduce the affinity between CAMP and the cell membrane and further the effectiveness of CAMP binding. Other molecular mechanisms of resistance to CAMPs have been suggested that involve the overexpression of bacterial efflux systems (7, 45, 53), transperiplasmic exoprotein transport systems (60), proteinases (51), and the use of L-Lys or L-Ala to introduce positive charges to the membrane surface (24). Most proteomic studies focused on AMP resistance in Gram-positive bacteria (23, 50, 59), and few reports have been dedicated to Gram-negative resistance. The only proteomic study on the outer and inner membranes of *Vibrio parahaemolyticus*

Received 18 August 2011 Returned for modification 27 November 2011

Accepted 15 January 2012

Published ahead of print ●●●

Address correspondence to O. L. Franco, ocf Franco@gmail.com.

Supplemental material for this article may be found at <http://aac.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05558-11